

國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系
碩士論文

Department of Agronomy
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

氮素對高溫下水稻穎果充實期蛋白質累積之影響

Effects of Nitrogen on Protein Accumulation of Rice Caryopsis
during Filling Stage under High Temperature



馮學謙

HSUEH-CHIEN FENG

指導教授：盧虎生 博士
Advisor: Hsu-Sheng Lur, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月
June 2009

目錄

口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
壹、前言.....	1
貳、前人研究.....	2
參、試驗推論.....	9
肆、材料與方法.....	11
一、試驗水稻材料之準備、溫度跟氮肥處理與取樣.....	11
二、生理分析方法.....	12
三、穎果中Amino acids 分析.....	16
四、穎果儲存性蛋白分析方法.....	19
伍、結果.....	24
一、農藝性狀調查結果.....	24
二、生理性狀分析.....	28
三、氨基酸與蛋白質含量結果.....	38
陸、討論.....	53
柒、結論.....	62
捌、參考文獻.....	65

圖表與附錄

圖 1、高溫與氮素處理對 TK 9 開花後劍葉葉綠素值之影響。.....	25
圖 2、高溫與氮素處理對 TK 9 成熟穗重之變化。.....	25
圖 3、高溫與氮素處理對 TK 9 之結實率與充實率.....	26
圖 4、高溫與氮素處理對 TK 9 開花後各時期之穎果鮮重之變化。.....	27
圖 5、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期之各時期穎果外觀之影響。.....	29
圖 6、高溫與氮素處理下 TK 9 糙米之外觀。.....	30
圖 7、高溫與氮素處理下 TK 9 充實期穎果之葉綠素含量變化。.....	31
圖 8、高溫與氮素處理下 TK 9 充實期穎果之過氧化氫 (H ₂ O ₂) 含量變化。....	34
圖 9、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期 ATP 含量之影響。.....	35
圖 10、高溫與氮素處理對 TK 9 糙米 pH 值之影響。.....	36
圖 11、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 Amino Nitrogen 含量測定。....	37
圖 12、高溫與氮素處理下 TK 9 穎果充實期之 Glutamate 及 Alanine 含量之變 化。.....	39
圖 13、氮素處理下常溫生長之 TK 9 充實期穎果內總儲存蛋白質之電泳分 析。.....	41
圖 14、氮素處理下高溫生長之 TK 9 充實期穎果內總儲存蛋白質電泳分 析。.....	42
圖 15、高溫與氮素處理對 TK 9 充實期穎果內 α -Glutelins 與 β -Glutelins 含 量。.....	43
圖 16、TK 9 水稻充實期穎果內 Prolamins 含量。.....	44
圖 17、氮素處理對常溫生長下 TK 9 充實期穎果內 Albumins 電泳分析。.....	46
圖 18、氮素處理對高溫生長下 TK 9 充實期穎果內 Albumins 電泳分析。.....	47

圖 19、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 Albumins-7 的含量變化。.....	48
圖 20、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 Albumins-8 的含量。.....	48
圖 21、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 Albumins-14 的含量變化。.....	49
圖 22、氮素處理對常溫生長下 TK 9 充實期穎果內 Globulins 電泳分析。.....	50
圖 23、氮素處理對高溫生長下 TK 9 充實期穎果內 Globulins 電泳分析。.....	51
圖 24、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 Globulins 的含量。.....	52
表 1、Amino acids 回收率。.....	19
附圖 1、水稻在高溫下氮源利用途徑假說模式圖。.....	10
附圖 2、Amino Acids Standard 示意圖。.....	18
附圖 3、水稻穎果於高溫下之可能氮素利用途徑與品質之影響。.....	64



國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

氮素對高溫下水稻穎果充實期蛋白質累積之影響

Effects of Nitrogen on Protein Accumulation of
Rice Caryopsis during Filling Stage under High
Temperature

本論文係馮學謙君 (R95621110) 在國立臺灣大學農藝學系完成之碩士學位論文，於民國九十八年六月二十四日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

朱 鈞 博士 (Dr. Chun Chu)
國立台灣大學農藝學系名譽教授

陳宗禮 博士 (Dr. Chung-Li Chen)
國立中興大學農藝學系教授

張素貞 博士 (Dr. Su-Jeng Chang)
苗栗改良場副研究員兼課長

羅正宗 博士 (Dr. Jeng-Chung Lo)
台南改良場副研究員兼嘉義分場主任

盧虎生 博士 (Dr. Hui-Sheng Lur)
國立台灣大學農藝學系教授

致謝

首先感謝我的父母，雖然這幾年沒有經常見面，但是在電話或網路上聊天中，仍然給我許多鼓勵。在家一起生活的老哥與表弟，也常在忙碌一星期後的週末帶給我許多歡樂，雖然沒有言語的直接鼓勵，但是快樂的生活，就已經足夠給我繼續在研究所這三年走下去的動力。

感謝盧老師這三年來耐心的指導，在實驗方向的提點給我相當大的幫助。感謝朱鈞博士、陳宗禮博士、張素貞博士、羅正宗博士對我論文的指正與建議，讓這篇論文更加完整。感謝張孟基老師在課業上的指導與生活上的閒聊來紓解壓力。佳諭姊姊、雪玉姊姊、曉婷姊姊、成玉姊姊，實驗室的姊姊們扮演亦師亦友的角色，對剛進實驗室還懵懵懂懂的我，幫了很大的忙，辛苦姊姊們了。感謝賢書，雖然只有半年多的相處，但是就像是個老大哥一樣可靠。芹如、摸摸、泡泡，謝謝你們在實驗與材料準備上的陪伴，那段挖土、搬水稻的日子雖然很辛苦，但是有你們的陪伴還滿有趣的XD。謝謝實驗室的夥伴與學弟妹們平時閒聊打屁，也帶給我許多的歡樂。感謝 Jolin 徐在最後論文衝刺的階段給我許多鼓勵與鞭策，讓我能順利生出這本論文，謝謝妳！

還有很多想感謝的朋友，還有很多想說的話要對大家說，感謝師長與朋友們在我研究所三年的陪伴與鼓勵，謝謝你們，希望大家在未來的路上一切順心、平安、健康。

中文摘要

梗型水稻適合生長於溫帶氣候地區，而台灣地處亞熱帶氣候，夏季炎熱的高溫常造成第一期水稻穀粒白堊質產生，以致於品質的下降，全球面臨氣候暖化，此現象可能將更為嚴重。過去對於水稻與高溫的研究多注重於穀粒內的大分子，例如澱粉與蛋白質之改變，鮮少針對高溫下穎果充實期蛋白質累積過程之變化與影響，本試驗希望透過高溫處理加上氮素的添加，觀察高溫下穎果內氮源的利用與蛋白質累積之變化，進而探討高溫對品質影響的原因與改善方法。

試驗結果顯示，高溫降低水稻穎果的結實率與充實率，外觀性狀則是呈現嚴重的白堊質，高溫處理下添加氮素則可部分恢復，但是不足以恢復到常溫的結果，不過仍然顯示氮素的添加的確有抵抗高溫逆境之效果，對水稻的產量與品質皆有所助益。

生理試驗中，從穀粒鮮重累積與外觀性狀可以看出，高溫使穎果提早且快速累積鮮重，充實後期穎果的種（果）皮與維管束上的葉綠素提早老化消失，等於提早結束充實期，造成最後糙米乾重比常溫來的低，而提早結束充實期的原因可以從過氧化氫的試驗中發現，高溫處理使穎果內過氧化氫含量提高，尤其充實後期更為顯著，且糙米 pH 值試驗顯示高溫組的 pH 值顯著低於常溫。而氮素處理組則發現，高溫下穎果的過氧化氫含量較少，充實期較為延長。透過 HPLC-FLD 與 SDS-PAGE 分析穎果內氨基酸與儲存性蛋白質的含量，結果顯示高溫處理造成 alanine 的含量顯著提高，而氮素的添加使 alanine 與其他胺基酸含量相較之下，顯著增加，且 ATP 的含量也有所提昇。儲存性蛋白質的結果顯示 glutelins 在充實前期提早累積，充實後期與常溫組無顯著差異，prolamins 也是提早累積，但是

在充實後期的含量顯著低於常溫組，albumins 與 globulins 則在充實期皆高於常溫組，唯 Glo-6 (19 kA globulins precursor) 在充實後期顯著低於常溫組。總體來說，高溫使穎果內儲存性蛋白質的總量下降，進而影響到蛋白質體與澱粉粒之間的堆疊，造成白堊質的發生。氮素添加對儲存性蛋白質中 prolamins 的含量恢復到與常溫組相當，表示高溫處理對穎果之危害，透過添加氮素有所改善。

本試驗之結果顯示高溫對水稻穎果充實期之影響，而添加氮素可能恢復高溫對碳水化合物與氮源相關代謝的損害，並提出高溫下水稻穎果內氮素利用途徑模式圖，未來希望透過其他代謝途徑與基因表現等實驗來加以驗證。

關鍵字：水稻;高溫;白堊質;氮素;氨基酸;丙胺酸;麩胺酸;儲存性蛋白質;谷蛋白;醇溶谷蛋白;白蛋白;球蛋白



Abstract

In Taiwan, japonica rice usually exposes to high temperature in summer during grain-filling stage, and frequently causes chalky grain and reducing grain quality. It is expected even worse by global warming in recent years. Previous researches usually focused on starch or protein biosynthetic pathway, their components, or structural changes under high temperature. Few researches have been dealing with the effects on relationship between protein accumulation and grain quality by high temperature during grain-filling stage. The present study focused on effects of nitrogen and storage protein accumulation during grain-filling stage under high temperature of japonica rice (TK 9).

The results showed that high temperature caused reducing setting and filling percentage of rice caryopsis. Increase in fresh weight of caryopsis was enhanced but stopped earlier under high temperature, resulting lower grain weight than normal one. Chalky grain percentage was also increased. Nitrogen fertilizer treatment could partially recover the defective effects induced by high temperature. In physiological analysis hydrogen peroxide production was elevated by high temperature during later grain-filling stage. ATP production was also suppressed by high temperature. Through HPLC-FLD and SDS-PAGE analysis, the changes of amino acids and storage proteins were further determined. Results showed that alanine was significantly elevated during early

grain-filling stage under high temperature. Amount of glutelins elevated in early grain-filling stage, but there was no differences that of control in later stage. Amount of prolamins also increased at early grain-filling stage, but declined to half of control at later stage. Amount of albumins and globulins elevated during grain-filling stage; nevertheless, the quantity of storage proteins remained decrease than control. The high temperature caused lower amount of storage proteins affect the packing of starch and protein bodies, resulting in a characteristic of chalky grain. Adding nitrogen fertilizer could increase the content of ATP and prolamins. Chalky grains slightly recovered.

The present results suggest the existence of a peroxidative condition in caryopsis growing under high temperature, and might cause defective changes in energy, carbohydrate, and nitrogen related metabolisms. Nitrogen application may ameliorate the defective effects induced by high temperature. Studies in metabolic mechanism and gene regulation are certainly needed to elucidate detail pathway in the future.

Key words : rice;high temperature;chalky;nitrogen fertilizer;amino acids;alanine; glutamate;storage protein;glutelins;prolamins;albumins;globulins;

壹、前言

台灣現行栽培水稻以溫帶粳型稻 (temperate Japonica type) 為主，但是台灣地處於亞熱帶氣候，尤其南部地區，第一期水稻在種子充實期常遭遇高溫，導致白堊質的發生，造成稻米品質下降。近幾年由於全球氣候暖化，台灣近幾年月均溫有逐年攀高的趨勢，高溫將是台灣稻米品質與產量的主要問題之一。

前人在開始重視全球氣候暖化的問題後，陸續對各種不同作物進行高溫試驗，探求作物在遭遇高溫後所產生的生理機制，以及可能的解決辦法，例如栽培制度改良、基因轉殖等等；而前人對水稻與高溫的研究大多以外表型改變與儲存性大分子的研究居多，例如遭遇高溫後，澱粉結構的變化和儲存性蛋白的改變，而目前鮮少針對水稻穎果充實期遭遇高溫下的生理機制研究。近年已有對水稻之外作物的報導指出，充實期種子內部的能量狀態與生理代謝情形可供對照參考。

氮肥與水稻之間已有許多年的研究，針對不同品種所需要的氮肥施用方法都有許多詳盡文獻。近年來亦有報告及田間實作指出，添加的氮素多貢獻在胚乳外層細胞，在水稻充實期遭遇高溫時施加氮肥可減緩產量及外觀品質的下降，可以控制蛋白質含量在 7% 以下而不會影響食味質，但其中的生理機制尚未清晰，而本研究即擬以此為試驗重點，探討氮肥對於高溫下水稻穎果充實影響的可能生理機制。

貳、前人研究

一、台灣氣候與水稻栽培

一般而言，粳型水稻的栽培是適應溫帶氣候，一年一作，全生育期 140 日以上，而台灣地處亞熱帶，為緯度最低栽培粳型水稻的區域之一，對於良質米的栽培與培育之壓力較其他溫帶地區更高。粳型水稻的穎果充實期適合溫度在 21 ~ 23 °C 之間，而從台灣各地改良場溫度記錄的年度日均溫顯示，在七月到九月間的日均溫超過 26 °C，為一般認為穎果充實期適合溫度之上限，超過則可能對稻米的品質造成影響。國內稻作一年可種植兩期作，一期作的穎果充實期則會受到高溫之影響，而二期作的充實期雖然當時氣溫較低，稻米品質較一期作高，但是較低落的充實速率無法以延長的充實期補足，反而導致產量比一期作低 (Lur and Liu, 2006; 朱及盧, 1984.)。

二、水稻穎果與高溫對穎果充實期跟稻米品質之影響

1、水稻穎果的發育：

穎果中主要的組織分別是胚與胚乳，水稻產量與品質的決定關鍵就是胚乳的發育。胚的發育較胚乳快速，約受粉後十天就接近完成的形態，而胚乳細胞核在受粉後，先呈現游離狀態並且快速細胞分裂，形成細胞化 (cellular) 的形式，隨著充實期逐漸累積儲存物質而膨大，穎果的鮮重也逐漸上升 (Kuwada, 1909; Terada, 1928; Hoshikawa, 1967.)。

穎果內的儲存物質主要是澱粉與儲藏性蛋白質 (Matsushita, 1958)，澱粉則是在開花後四天開始累積 (Sato, 1964)，而開花後六天就可以觀察到有儲存性蛋白質的累積 (Lin *et al.*, 2005)，一般而言，澱粉粒的累積速率比儲存性蛋白質

快，開花後十四天的澱粉含量已經到達成熟穎果的 80%，而儲存性蛋白質要到開花後約二十天才達到高峰（Rosario *et al.*, 1968），此時總乾物重也接近最高。

2、水稻穎果的儲藏性蛋白質：

穎果內的儲藏性蛋白質依照溶解特性可以分成四種：酸、鹼溶性蛋白質（glutelins）、醇溶性蛋白質（prolamins）、水溶性蛋白質（albumins）、鹽溶性蛋白質（globulins），其中以 glutelins 的含量最多，prolamins 次之，最後是 albumins 與 globulins，雖然含量少，但是多屬酵素類的蛋白質所以不容忽視（簡等, 1997）。整體儲存性蛋白質約在開花後第五天到第十二天的合成速率最快，其中 glutelins 的合成時間最早，約開花後三天左右就有累積的情形，而 prolamins 的時間較晚，到開花後第十天左右才有明顯的累積（Yamagata *et al.*, 1982）。各族的儲藏性蛋白質在米粒內的分佈有些不同，albumins、globulins 多分布在糊粉層或含糊粉層以下三至四層細胞，與其多具有活性酵素蛋白質有關，在種子發芽時可以迅速啟動生理功能有關，而 glutelins 與 prolamins 主要分布在糊粉層以下的胚乳澱粉層當中的主要兩種蛋白質體-I 與 II [protein body (PB) - I、II]（簡等, 1997; 林及盧, 2004），prolamins 主要位於 PB-I 中，而 glutelins 主要位於 PB-II 中，PB-II 的累積時間約在開花後七天，早於 PB-I 的開花後十四天（Yamagata *et al.*, 1982）。

水稻穎果中 glutelins 的胺基酸組成與燕麥的 globulins 與大豆的 glycinins 非常相似（Walburg and Larkin, 1983.）。水稻的 glutelins 是從分子量 57 kDa 的蛋白質前驅物經過蛋白水解酵素作用後而來（Furuta *et al.*, 1986; Krishnan and Okita, 1986），並且形成兩種 subunits，分別是 34 - 39 kDa 的 α -subunits 與 21 - 22 kDa 的 β -subunits（Yamagata *et al.*, 1982; Sarker *et al.*, 1986），對這兩種

subunits 的胺基酸莫耳百分比比較後，可發現 α -subunits 含有較多的 glutamate，而 β -subunits 含有較多的 lysine (Wen and Luthe, 1985)，同時也可證實 α -subunits 屬於酸性， β -subunits 屬於鹼性。由於 glutelins 含有較高的 lysine、arginine、glycine 等必須胺基酸，故營養價值較高。人體對 prolamins 的消化率較低，且與口感呈現負相關，故營養價值較低 (簡等, 1997)。albumins 與 globulins 富含 lysine、arginine 等必須胺基酸，所以營養價值高，但是又因為穎果中的 albumins 與 globulins 的含量少，故對稻米的營養價值影響有限 (Lasztity, 1986; Masumura *et al.*, 1989)。Yoshinaga 等學者在 1997 年的研究顯示，蛋白質對口感品質的影響係數為 50.5%，大於澱粉的 6.2%，表示稻米的蛋白質含量對品質影響甚鉅。

3、高溫與穎果充實期：

由於全球氣候暖化的趨勢，近十幾年來已經有許多研究針對植物在高溫逆境下的反應，水稻也不例外。溫度對穎果充實期影響最大的時間是在開花後的二十天內 (Tashiro and Wardlaw, 1991a; 程及張, 1999)。本研究的主要對象是水稻穎果，已有研究界定出水稻穎果充實期如果遇到 26 °C 以上的溫度，則會提高白堊質出現的機率 (Tashiro and Wardlaw, 1991)，在 36 / 31 °C 日/夜溫的處理下，發現穎果中碳水化合物的含量下降 (Tashiro and Wardlaw, 1991)，35 / 30 °C 與 33 / 30 °C 的處理下都發現澱粉的累積與堆疊遭到破壞 (Zakaria *et al.*, 2002; Yamakawa *et al.*, 2007)，由於高溫環境造成穎果在充實期的累積速率過快，營養輸送組織 (珠心、外穎維管束) 提早老化，造成穎果儲存物質的原料輸送提早結束，導致最後粒重顯著下降 (Morita *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2005)。溫度與穎果蛋白質累積方面的研究不多。高溫處理下 (35 / 30 °C) 可發

現到穎果的 glutelins 與 prolamins 累積時間提早，但是在最後成熟穎果內的含量有減少的趨勢，而依水稻品種不同，下降的程度有微差別 (Lin *et al.*, 2005)，至於高溫影響蛋白質累積的原因目前並不明瞭。

4、充實期穎果內的低氧環境 (hypoxic environment)

近年來研究發現種子在充實期間，其內部的氧氣含量分布呈現不均勻的差距，如玉米穎果充實過程中，中心區域幾乎偵測不到氧氣，其濃度約僅為大氣中氧氣濃度的 1.2 ~ 1.4%，並且中心低氧區域隨著充實期而逐漸擴大，表示玉米穎果在充實期的過程，內部是處於一個低氧的生理環境 (hypoxic internal environment)，除了玉米之外，大豆種子發育也有類似的情形 (Rolletschek *et al.*, 2004; Rolletschek *et al.*, 2002)，表示種子的發育過程可能都伴隨著內部低氧的生理環境，水稻也可能是如此。另外還有研究發現豌豆發育過程中，氧氣與一氧化氮 (NO) 的含量呈現負相關的關係 (Rolletschek *et al.*, 2007)。

穎果充實期內部的低氧生理環境也影響到儲存物質的合成，從玉米的研究顯示，提高穎果外部空氣的氧氣含量，胚乳內的氧氣含量卻沒有隨之上升，推測似乎是因為耗氧量也隨著上升而互相抵消，而穎果內的呼吸作用也受限於內部氧氣含量 (Rolletschek *et al.*, 2005)，小麥的穎果發育也有類似情形 (Van Dongen *et al.*, 2004)。胚乳內儲藏性大分子的合成需要 ATP，ATP 的來源由呼吸作用而來，故胚乳內氧氣的含量會影響到 ATP 的合成，在玉米胚乳的研究中發現 ATP 含量多的區域，同時也是氧氣含量較高的區域 (Rolletschek *et al.*, 2004)，進一步的研究把胚乳外部氧氣含量提高，胚乳內的 ATP/ADP 的比值也隨之提高，表示胚乳內的氧氣含量的確影響穎果內部能量的狀態 (Rolletschek *et al.*, 2005)。近年

更有研究發現向日葵種子的發育過程中，隨著外界溫度的上升，種子內部氧氣含量也隨之下降，表示高溫處理會使種子內部的低氧生理環境更加嚴重

(Rolletschek *et al.*, 2007)。

5、低氧環境與氨基酸的變化

相較於穎果發育過程處於低氧生理環境，有些種子可以在浸水 (submergence) 的環境下發芽，同時也是一個低氧的生理環境，水稻就是其中之一，水稻種子甚至在近真空的環境下尚能發芽，其鞘葉 (coleoptiles) 也能生長 (Alpi and Beevers, 1983)，前人也認為水稻種子對低氧生理環境的耐性，與維持糖解活性 (glycolytic activity) 來產生 ATP 相關 (Guglielminetti *et al.*, 1995; Perata *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2001)。研究發現，水稻的 root 與 shoots 在浸水狀態下，其胺基酸含量有上升的情形 (Reggiani *et al.*, 1988, 2000; Menegus *et al.*, 1989)，而水稻種子在浸水發芽的時候，種子內的 free amino acids (FAA) 含量也有提高，進一步分析分別是哪些胺基酸，結果發現 alanine 與 gamma-aminobutyric acid (GABA) 的含量顯著上升 (Kato-Noguchi and Ohashi, 2006)。alanine 與 GABA 是植物遭遇到低氧甚至無氧 (anoxia) 的環境時，組織會有大量累積情形的胺基酸 (Kikuchi *et al.*, 1999; Kinnersley and Turano, 2000)，推測其功能與維持細胞的膨壓與 pH 值等等有關 (Reggiani *et al.*, 1988; Drew, 1997)。此外，alanine 的合成酵素 alanine aminotransferase (AlaAt) 在植物處於逆境下發現表現量有上升的情形，而且透過 GUS 報導基因發現水稻的 AlaAt 在成熟穎果糊粉層以下的胚乳細胞有大量的表現，認為 AlaAt 的表現也與

水稻穎果的成熟有關 (Kikuchi, 1999)。至於高溫下，水稻穎果內氨基酸的變化及其與蛋白質合成之關係如何，在文獻上並不明瞭。

6、穎果發育與程序性細胞死亡 (PCD)

植物遭遇到非生物逆境的時候，例如：冷 (Koukalova *et al.*, 1997)、滲透壓逆境 (Streb and Feierabend, 1996)、臭氧、UV、鹽害等等逆境，都會產生活化氧族 (ROS: H_2O_2 、 $*O_2^-$ 、 $*OH^-$)，而 ROS 的產生會導致植物組織 PCD 的發生 (Jacobson, 1996; Jabs, 1999; Sandstrom *et al.*, 1994)。ABA、ethylene 是影響禾穀類胚乳發生 PCD 的關鍵因素之一，玉米與小麥的穎果在充實過程也發現到胚乳細胞的 PCD 情形，其中伴隨著 DNA 的降解現象 (Young and Gallie, 2000)。細胞的酸化 (acidification) 也是造成 PCD 的原因之一 (Drew *et al.*, 2000)，而造成酸化的原因可能是植物在缺氧下為了獲得能量，透過糖解 (glycolysis) 產生 ATP，其產物 pyruvate 的代謝途徑可能透過 lactate dehydrogenase (LDH) 與 pyruvate decarboxylase (PDC) 產生 lactate 與 ethanol，兩者皆會造成細胞酸化的情形，而透過 AlaAt 產生 alanine 來代謝 pyruvate 是可以避免細胞酸化的一條途徑 (Sousa and Sodek, 2002; Gibbs and Greenway, 2003;)。

三、氮肥對水稻、穎果發育與稻米品質之影響

水稻田間肥料試驗研究已經有許多年的歷史與累積，一般認為多施氮肥可以提高產量，但是過多的氮肥會造成植株節間過度伸長而倒伏，還有分蘖過多、地上部鮮重增加，地上部乾物重卻下降、植株水份含量提高而柔軟，容易受到病蟲害之侵襲等等副作用 (Perez *et al.*, 1996; Wopereis-Pura *et al.*, 2002; 潘, 2005)，而

國內育出的品種例如台梗九號，在較少的氮肥（100 kg/ha）施用量，也可以有 6-7 t/ha 不錯的產量。研究指出，提高施加氮肥量可以增加水稻穀粒碾米後的完整米率，進一步透過低氮、中氮、高氮的研究發現，施加的氮肥經過合成為儲存性蛋白質多累積在穎果的側面（lateral side），故推測因此減少碾米過程造成斷裂米（broken rice）的比率、增加完整米率（percentage of head rice），但是不同水稻品種對於氮肥的利用效率不同，可能有程度上的差異（Leesawatwong *et al.*, 2005）。研究發現，施加穗肥或粒肥可以減少水稻穀粒白堊質發生比率，推測可能由於儲存性蛋白質所存在的蛋白質體（protein body）位於澱粉粒間，並且緊密堆疊，對於澱粉粒的結晶過程有密切關係導致（孫等, 2004; 林及盧, 2004），但是過多的氮肥可能造成米粒外觀泛黃，米質較硬而食味值較低，而且由於 prolamins 的含量與食味值成負相關，粒肥的施加可能導致 prolamins 的含量上升，但是穗肥的施加可以提高 glutelins 的含量，其含有較高的 lysine，為必須胺基酸之一，營養價值較高（簡等, 1997; 林及盧, 2004; 潘, 2005;）。近年由於氣候暖化，高溫造成稻米品質下降，白堊質發生率上升是重要原因之一，研究發現在高溫環境下的穀粒含氮量有下降的情形，而適當增加穗肥的處理有降低白堊質發生率之功用，而造成此結果之生理機制目前尚未清晰（Lin *et al.*, 2005; 小葉田亨及安原宏宣, 2005）。

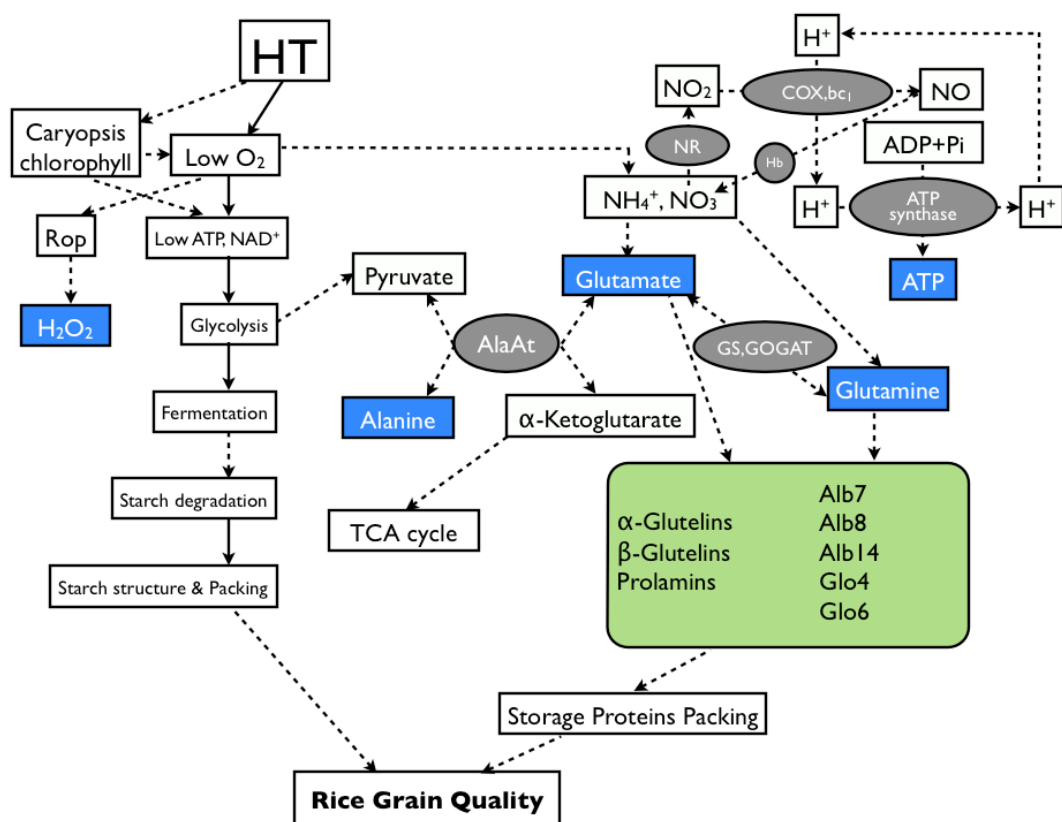
如上述文獻顯示，研究多為水稻種子於發芽期間胺基酸的變化（Kato-Noguchi and Ohashi, 2006），與高溫下水稻穎果內大分子儲存性物質累積之改變，對於水稻穎果充實期間遭遇高溫逆境，其胺基酸變化的研究目前甚少，因此本研究目的為透過結合氮素的添加與高溫的處理，了解水稻穎果在充實期的胺基酸變化，以至於對儲存性蛋白質累積之影響。

參、試驗推論

綜合前人對於穎果發育、低氧環境、高溫與氮肥的研究，再以本實驗室高溫下水稻穎果發育生理途徑模式圖為基礎，本研究先架構一個高溫下穎果發育的氮源利用生理途徑假說模式圖（附圖 1）。推論中，以高溫處理為起點，可能造成穎果發育中的低氧環境更為嚴峻，導致穎果的能量缺乏，以致於需要透過糖解作用（glycolysis）來產生 ATP 來供給合成與累積儲藏物質所需要的能量。由於醣類也是水稻穎果合成澱粉的原料，所以糖解作用會造成澱粉合成與堆疊

（packing）過程遭到障礙，導致澱粉粒的結晶不完全而產生空隙，是稻米產生白垩質的主要原因之一。高溫與低氧環境也可能促使活化氧族（ROS，ex： H_2O_2 .etc）提早產生與增加，造成穎果發育提早發生程序性細胞死亡（PCD），使提供養分來源的維管束與提供氧氣來源的種（果）皮上葉綠素提早死亡，導致水稻穎果的充實提早結束，乾物重下降。高溫使穎果有缺氮的情形，使蛋白質體（protein body）堆疊不完全、澱粉粒之間的堆疊不密實，也會造成白垩質的發生。水稻穎果在高溫下缺氮的生理原因目前尚未清晰，由於蛋白質合成的前驅物為胺基酸，所以根據前人研究，植物組織（種子、根）在低氧環境下會改變胺基酸代謝途徑，推測與水稻在高溫下缺氮的情形有關。

為了要證實本試驗的假說，吾人選用台灣良質米品種台梗九號作為試驗品種，進行以下試驗：水稻穎果充實期葉色值測量，穗重、粒重、穎果外觀調查，穎果葉綠素含量、過氧化氫（ H_2O_2 ）含量、ATP 含量、amino nitrogen 含量、pH 值、胺基酸含量、儲存性蛋白質（glutelins、prolamins、albumins、globulins）含量的測量，希望以此分析瞭解水稻穎果在高溫下氮源利用的生理作用及其與穎果發育間的關係。



附圖、1、水稻在高溫下氮源利用途徑假說模式圖。藍底白字與表示待測物質，綠底方框內為儲存性蛋白質，橢圓形表示酵素，虛線表示仍有待確認的部份。

肆、材料與方法

一、試驗水稻材料之準備、溫度跟氮肥處理與取樣

本實驗以粳型水稻 (*Oryza sativa* L. cv. TK9, Japonica) 台粳九號 (tai-ken 9, TK9) 為材料，其為台灣現行良質米品種之一。

水稻植株之培育先選取外觀良好種子，以 6% 次氯酸鈉溶液稀釋四倍後，將種子放入並攪拌、靜置 10 分鐘後，以自來水清洗，再將種子平鋪在以蒸餾水潤濕後的濾紙之上，置於玻璃培養皿中放入 37°C 生長箱催芽。1-2 天後，將發芽的種子約每 30 粒置於不鏽鋼網架之上，再將網架放入裝有木村氏 (Kimura's) 水耕液 (戶刈義次, 1963) 的 500 ml 塑膠燒杯中，塑膠燒杯外層包裹鋁箔紙阻隔光線的照射。將水耕培養種子的塑膠燒杯移入生長箱 (日溫/夜溫 - 30°C/25°C，相對濕度 70~80%，光照 12 hr，光強度為 180 μ mole/m²/s) 中生長，每隔 3 天更換一次水耕液，當水稻幼苗生長至 3~4 葉齡時，移植至內有 8 分滿栽培土、面積為 2232 cm²，深約 23 cm 的方形塑膠盆當中，每盆種植 3 行，1 行 5 株，單本植，共 15 株水稻幼苗。

肥料管理參考高雄區農業改良場推薦使用量，每公頃氮：磷：鉀 = 100：80：80)，磷肥 (過磷酸鈣) 與鉀肥 (氯化鉀) 在基肥全量添加，氮肥 (硫酸銨) 在基肥使用全量的 25% (25 kg / ha)，插秧後兩週的第一次追肥施全量的 25% (25 kg / ha)，插秧後 30 天的第二次追肥施加全量的 30% (30 kg / ha)，穗肥則在孕穗期的幼穗分化初期施加全量的 20% (20 kg / ha)。植株置於台灣大學生農學院附設之人工氣候室 25 / 20 °C (日 / 夜溫) 的自然光照玻璃溫室內生長，待植株開花時 (穗開花數達 50% 以上時，標示為此穗開花第一

天)，將一半的塑膠盆移至 35 / 30°C（日 / 夜溫）進行高溫處理，再將常溫與高溫各一半的塑膠盆添加額外約 22 kg / ha 氮肥（硫酸銨）進行氮肥處理。

在 Tashiro and Wardlaw (1991a) 的研究指出，水稻穎果在開花後 20 天的充實期是主要影響稻米品質的時間，故樣品取樣分別是開花後 6、9、15、20 天（days after flowering, DAF）及成熟（M）之穎果，取下穗後裝入標示好日期的塑膠袋，並馬上放入裝有液態氮之鋼瓶內，帶回實驗室後保存在 -80°C 冰箱內，待進行後續分析使用。

本實驗共進行四種處理：

1. 25/20°C（日/夜溫）常溫處理，開花時移入高溫未添加氮肥，標示 25CK
2. 25/20°C（日/夜溫）常溫處理，開花時移入高溫添加氮肥處理，標示 25N
3. 35/30°C（日/夜溫）高溫處理，開花時移入高溫未添加氮肥，標示 35CK
4. 35/30°C（日/夜溫）高溫處理，開花時移入高溫添加氮肥處理，標示 35N

二、生理分析方法

1. 水稻葉片之葉綠素計值測定

使用葉色計 SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta, Japan) 測定水稻劍葉之葉綠素值 (SPAD value)。進行八重複測量並以 LSD 統計方法對相同時間的處理進行顯著性測驗。

2. 穎果農藝性狀與外觀調查

成熟稻穗剪下自然風乾後，秤穗重記錄。將穗上穀粒脫粒後，計算稔實率，再把結實的穀粒經過風選後，計算結實率。脫殼後的糙米再利用穀粒外觀判別機

single-grain rice inspector RN600 (Kett, Japan) 進行更詳細之外觀性狀調查。進行三重複試驗並以LSD統計方法對各處理間進行顯著性測驗。水稻穎果之不同發育時期的外觀調查，則是將 6、9、15、20 DAF的穎果在裝有液態氮的保麗龍盒中去除內外穎，秤重並照相記錄外觀。

3. 穎果葉綠素含量測定

參照 Wintermans 等人 (1965) 建立的方法進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 3 粒，去除內外穎並秤重記錄之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO sample homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，加入 1 mL 之 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.80) 室溫下振盪均質後，取 200 μ L 之萃取液至 1.5 mL eppendorf 中，加入 800 μ L 之乙醇 (100%) 混合均勻，在 4°C 黑暗下靜置 30 分鐘後，以 4°C，2500 \times g 離心 20 分鐘，取上清液以 Spectrophotometer U-2000 (HITACHI, Japan) 測定其 A₆₆₅ 及 A₆₄₉ 之吸光值。空白組以 95% 乙醇代替。進行三重複試驗並以LSD統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

總葉綠素含量 (total chlorophyll content) 以下列公式計算：

$$\text{total chlorophyll} = (6.1 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649}) [\mu\text{g Chl (200 } \mu\text{l)}^{-1}]$$

$$\text{total chlorophyll content (mg g}^{-1}\text{ FW)}$$

$$= \text{total chlorophyll} \times \text{稀釋倍數} \div 1000 \div \text{FW (g)}$$

4. 穎果過氧化氫 (H₂O₂) 含量測定

參照 Jana and Choudhuri (1981) 建立的方法進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 10 粒，去除內外穎並秤重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在

液態氮低溫下使用 KURABO sample homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，加入 600 μL 之 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8, 內含 1 mM Hydroxylamine) 進行萃取，以 4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 $\times g$ ，離心 25 分鐘，取 500 μL 之上清液至新管中，再加入 100 μL 之 TiCl_4 [titanium chloride (0.1%, v/v) 溶於 20% (v/v) H_2SO_4]，振盪均勻後於室溫下以 8000 $\times g$ 離心 15 分鐘，以 spectrophotometer U-2000 (HITACHI, Japan) 測定其 A_{410} 吸光值。空白組以 sodium phosphate buffer 代替上清液。標準曲線以 0.01, 0.02, 0.05, 0.07, 0.15 μmol H_2O_2 建立之。進行三重複試驗並以 LSD 統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

5. 穎果中 ATP 含量測定

參照 Napolitano and Shain (2005) 建立的 perchloric acid extraction 方法經過部分修改後進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 3 粒，去除內外穎並稱重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，迅速加入 500 μL 之預冰的 7% perchloric acid，振盪均勻後置於冰上反應 10 分鐘，再以 0 $^{\circ}\text{C}$ ，16,750 X g 離心 10 分鐘，將上清液移至新管中，沈澱部分再加入 500 μL 之冰冷的 7% perchloric acid 萃取第二次並將上清液合併。以 3 M KOH、0.4 M Tris、3 M KCl 調整 pH 值至約 7.75，混合均勻後以約以 0 $^{\circ}\text{C}$ ，18,000 X g 離心 10 分鐘，估算中和後之萃取液體積。以滅菌去離子水將中和萃取液稀釋 100 倍與 1000 倍後置於冰上待測。

ATP 含量檢測以 ENLITEN ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit (Promega, USA) 進行，取 10 μL 稀釋之萃取液加入 100 μL 之 rL/L reagent (luciferin-luciferase reagent)，混合均勻後（用 pipetmen 並避免氣泡）以 GLOMAX 20/20 LUMINOMETER 冷光儀 (Promega, USA) 進行偵測。空白組以

稀釋 1000X 之中和 perchloric acid 溶液取代稀釋之萃取液。標準曲線以 10^{-16} ~ 10^{-12} mol ATP 建立。進行三重複試驗並以 LSD 統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

6. 糙米之 pH 值測定

參照 Macnicol and Jacobsen (1992) 之方法進行。從各處理中各取兩粒糙米，去除內外穎並裝在 2 mL eppendorf 中，使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，加入 200 μ L 之蒸餾水混合均勻呈米漿狀，迅速以 pH meter (XP-701, SUNTEX, Taiwan) 測量混濁米漿之 pH 值。進行四重複試驗並以 LSD 統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

7. 穎果中 amino nitrogen 含量測定

參照 Moore and Stein (1948) 之方法進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 2 粒，去除內外穎並秤重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，加入 1 mL 之乙醇 (80%，v/v) 振盪混合均勻後，放入 85°C 熱水浴中反應 20 分鐘後，以室溫，16,750 X g 離心 10 分鐘，用 80% 乙醇定量至 1 mL，取 0.1 mL 上清液加入 1 mL ninhydrin solution 並振盪之，再放入 100°C 熱水浴反應 20 分鐘後，冷卻至室溫，加入 2 mL n-propanol (50%) 混合均勻後，以 Spectrophotometer U-2000 (HITACHI, Japan) 測定 A_{570} 吸光值。空白組以 0.1 mL 乙醇 (80%，v/v) 代替上清液。進行三重複試驗並以 LSD 統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

三、穎果中amino acids 分析

1. amino acids 萃取方法：

參照 Noctor and Foyer (1998) 之方法進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 3 粒，去除內外穎並稱重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，全程皆在冰上進行，加入 1 mL 0.1 N HCl 混合均勻後，置於冰上每 5 分鐘振盪一次，10 分鐘後以 4°C，18,000 X g 離心 10 分鐘取上清液通過 0.02 μ m filter 移入新管，冰入 -20°C 冰箱待後續試驗。

2. Amino acids analysis：

Amino acids 分析實驗與行政院農委會茶葉改良場凍頂工作站合作進行，使用 Agilent 1100 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 分離經過 o-phthalaldehyde (OPA) 與 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) 衍生 (derivatization) 後的產物，並經由 Agilent Fluorescence Laser Detector (FLD) (OPA excitation 340 nm, emission 450 nm、FMOC excitation 266 nm, emission 305 nm) 偵測並記錄之。操作步驟如下：

將萃取好的樣品分裝每 200 μ L 至 HPLC 用之玻璃小瓶中並貼上標籤標示，放入 autosampler 中，樣品從 vial 11 開始放起，衍伸之動作由電腦設定使 autosampler 自動進行並注射，如下表示：

1. DRAW 2.5 μL from vial 1 (0.4 N borate buffer)
2. DRAW 0.5 μL from sample
3. MIX 3.0 μL in air, max. speed, 2 times
4. WAIT 0.50 min
5. DRAW 0.0 μL from vial 2 (water, 洗針)
6. DRAW 0.5 μL from vial 3 (OPA)
7. MIX 3.5 μL in air, max. speed, 6 times
8. DRAW 0.0 μL from vial 2 (water, 洗針)
9. DRAW 0.5 μL from vial 4 (FMOC)
10. MIX 4.0 μL in air, max. speed, 6 times
11. DRAW 32.0 μL from vial 5 (water)
12. MIX 18.0 μL in air, max. speed, 2 times
13. INJECT 5.0 μL

移動相分為 A、B 兩液：

A：40 mM Na_2HPO_4 pH 7.8 [5.5 g Na_2HPO_4 , monohydrate + 1 L 去離子水，用

NaOH solution (10 N) 調整 pH 值至 7.8]

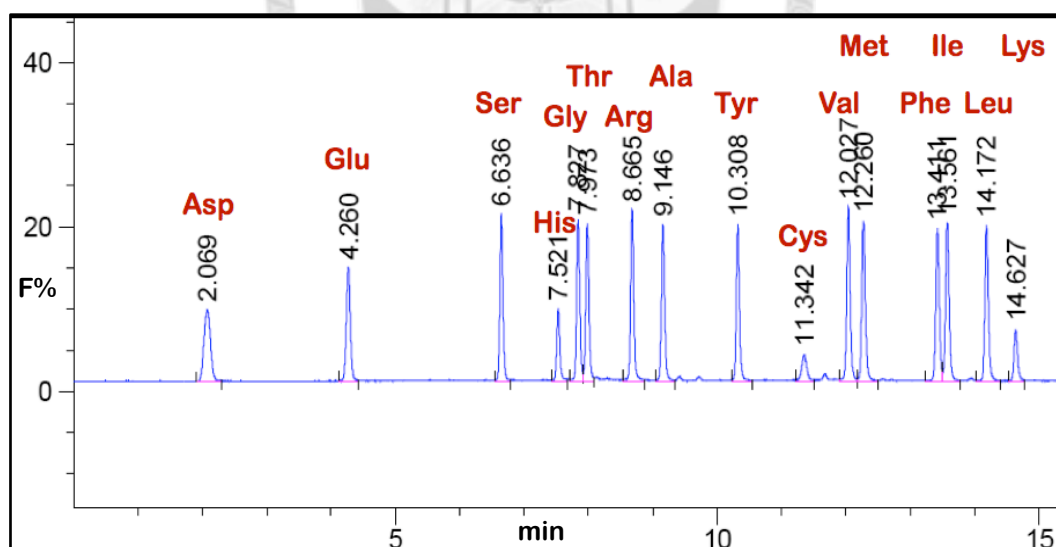
B：以 acetonitrile : methanol : water (45 : 45 : 10, v/v/v) 的比例配成

沖提時序 (elution time table)：

Time (分鐘)	A (%)	B (%)
0.00	100.0	0.0
1.90	100.0	0.0
18.10	43.0	57.0
18.60	0.0	100.0
22.30	0.0	100.0
23.20	100.0	0.0
26.00	100.0	0.0

HPLC columns 使用 ZORBAX Eclipse-AAA 4.6 x 150 mm, 3.5 μm (PN 963400-902) 與 guard column ZORBAX Eclipse-AAA 3.0 x 150 mm, 3.5 μm ，並使用溫控箱將 columns 的溫度維持在 40°C。

標準品為 19 種 amino acid 分別為 aspartate (Asp) , glutamate (Glu) , serine (Ser) , histidine (His) , glycine (Gly) , threonine (Thr) , arginine (Arg) , alanine (Ala) , tyrosine (Tyr) , cystine (Cys) , valine (Val) , methionine (Met) , phenylalanine (Phe) , isoleucine (Ile) , leucine (Leu) , lysine (Lys) , γ - aminobutyric acid (GABA) , asparagine (Asn) 與 glutamine (Gln) 。標準品為 Agilent Technologies 的 amino acid standard , 產品編號為 5061-3331 。標準品圖示如附圖 2 , 並以濃度 10 pmol , 25 pmol , 50 pmol , 100 pmol , 250 pmol , 將所得之面積製作標準曲線 , 而樣品之積分面積透過公式換算即可得知該 amino acid 之含量。進行三重複試驗並以 LSD 統計方法對各處理間進行顯著性測驗。



附圖、2、Amino acids standard 示意圖。

3. 回收率估算

將樣品磨碎、萃取後，分成兩份，一份加入 100 pmol AA standard，一份補上等體積之 0.1N HCl。經過 HPLC-FLD 測量後，將有加 standard 的樣品，各項 amino acids 之 area 減掉 100 pmol AA standard 的 area 得到計算量，再將計算量除未加入 AA standard 之樣品 area，可算出各項 amino acids 的回收率（如表一）。進行四重複試驗並以LSD統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

表 1、Amino acids 回收率。

	回收率平均	SE
Asp	102.55	5.86
Glu	101.46	6.19
Ser	90.79	0.69
Gln	92.43	0.89
Ala	100.94	10.36
Val	101.58	8.80

四、穎果儲存性蛋白分析方法

1. 水稻穎果酸、鹼溶性（glutelins）及醇溶性（prolamins）蛋白質之萃取

參照 Iida 等人（1993）之方法進行。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 2 粒，去除內外穎並稱重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末後，加入 0.8 mL 之 extraction buffer [1 倍的PBS（phosphate buffered saline 10×stock：NaCl 80 g，KCl 2 g，Na₂HPO₄ 61 g，KH₂PO₄ 2 g，H₂O，pH 6.8）內含有 4 % SDS、8 M urea、20 % glycerol、5 % 2-mercaptoethanol，調整 pH 值至 6.8] 振盪均勻後，放

入 60 °C，1700 × g thermomixer 中搖晃 2 小時，再以 20 °C，16,750 × g 離心 10 分鐘，取最上層之上清液 40 μL 至新管，並加入 10 μL 追蹤染液（water：glycerol，1：1，v / v，少許 bromophenol blue）混合均勻，放入 -20 °C 冰箱以待電泳使用。

由於此抽取方法中以 glutelins 及 prolamines 為主要蛋白質，因此本研究以此抽取方法及後續之電泳分別進行 glutelins 及 prolamines 之相對含量分析。

2. 水稻穎果水溶性（albumins）、鹽溶性（globumins）蛋白質萃取

參照 Huebner 等（1990）之方法修改後進行（黃, 1995）。取不同發育時期與處理的水稻穎果樣品各 3 粒，去除內外穎並稱重之。樣品裝在 2 mL eppendorf 中在液態氮低溫下使用 KURABO Sample Homogenizer SH-100 磨碎成粉末。

Albumins 之萃取：加入 1 mL 萃取液 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM ethylene diamine tetraacetate (EDTA)]，放入置於 4°C 冰箱內之 mixer 振盪 1 小時，以 4°C，16,750 X g 離心 10 分鐘，取 400 μL 之上清液兩次各加入 800 μL acetone（事先冰在 -20 °C 冰箱內）混合均勻，置於 -20 °C 冰箱內沈澱至隔天，以 4°C，16,750 X g 離心 10 分鐘，倒去上清液，置於 Savant Speed Vac SC 110 乾燥沉澱物 2 小時，兩管各加入 80 μL SDS-PAGE solution 回溶 buffer（Tris-HCl 0.25 mM，9% SDS，30% glycerol，pH 6.8），將沉澱物回溶後，兩管合併成一管冰入 -20 °C 冰箱內待電泳試驗用。

Globumins 之萃取：將上述第一次離心所剩之樣品沈澱，加入萃取液 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、1mM ethylene diamine tetraacetate (EDTA)] 500 μ L 振盪混合均勻，以 4 $^{\circ}$ C，16,750 X g 離心 10 分鐘，倒去上清液，加入 1 mL 萃取液 B [10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 、1mM ethylene diamine tetraacetate (EDTA) + 0.5 M NaCl] 放入置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱內之 mixer 振盪 1 小時，以 4 $^{\circ}$ C，16,750 X g 離心 10 分鐘，取 400 μ L 兩次上清液各加入 800 μ L acetone (預冰在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱內) 混合均勻，置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱內沈澱至隔天，以 4 $^{\circ}$ C，16,750 X g 離心 10 分鐘，倒去上清液，置於 Savant Speed Vac SC 110 乾燥沉澱物 2 小時，兩管各加入 80 μ L SDS-PAGE solution 回溶 buffer，將沉澱物回溶後，兩管合併成一管冰入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱內待電泳試驗用。

3. SDS-PAGE 電泳

參照 Sambrook (1989) 等人之方法配置溶液進行。將洗淨之玻璃與膠臺組合好 (一次電泳實驗製作 2 片膠，需使用 4 片玻璃)，注入配置混合好的 13.5% running gel solution (19.625 mL 去離子H₂O，16.825 mL 40% Acrylamide，12.5 mL Tris-HCl，0.5 mL 10% SDS，0.02 mL TEMED，注膠前再加入 0.5 mL ammonium persulfate (APS，0.1N 溶於去離子水中)]，再加入適量酒精覆蓋 gel solution 上以整平膠面待聚合凝固，約 30 分鐘後，倒去酒精，自然風乾約 10 分鐘去除殘留酒精，再插上齒槽，加入已配好之 stacking gel solution [5.9 mL 去離子H₂O，1.32 mL 40% acrylamide，2.48 mL stacking buffer (Tris 6 g，TEMED 0.4 mL，1 N HCl 40 mL，40 mL 去離子水，調整 pH 值至 6.8 再定量到 100 mL)，0.1 mL 10% SDS，注膠前再加入 0.1 mL ammonium persulfate (APS，0.1N 溶於去離子水中)，等待約 30 分鐘聚合凝固後，小心拔除齒槽，

取 20 μ L 蛋白質萃取液注入樣品槽中，將 tank 槽與玻璃上方組合好，移除下方膠臺，置於 Amersham Biosciences SE 600 Ruby 電泳槽中，內含有 1 倍 tank buffer (10 \times tank buffer : Tris 120 g, glycine 576 g, SDS 40 g, 去離子水 3.5 L, 調整 pH 值至 8.3 再定量到 4 L) , tank 槽同樣加入 1 倍 Tris-glycine electrophoresis buffer, 確保淹過白金線, 使用 Amersham Biosciences EPS 3501 XL 定電流 100 mA 進行電泳約 4 小時, 追蹤染劑到膠片底部後, 即可終止電泳。

將膠片小心收置於塑膠盒中, 加入固定液 (10% trichloroacetic acid、3% sulfosalicylic acid) 放在 15 rpm 之震盪機上浸泡 1 小時, 回收固定液, 以蒸餾水小心清洗膠片, 洗去剩餘固定液, 加入染色液 (Coomassive Brilliant Blue R-250 1.25 g, methanol 225 mL, 去離子水 225 mL, acetic acid 50 mL) 放在 15 rpm 之震盪機上浸泡 30 分鐘, 回收染色液, 以蒸餾水小心清洗膠片, 洗去剩餘染色液, 加入脫色液 (20% methanol, 10% acetic acid) 放在 15 rpm 之震盪機上浸泡直到膠片背景完全透明後, 倒去脫色液以蒸餾水小心清洗後, 以 Epson Perfection V750 PRO 掃瞄器掃描膠片成電子檔儲存待後續分析。以 preservation solution (50% methanol, 10% glycerol) 將膠片縮小至原來尺寸, 用玻璃紙封膠固定保存。

4. 蛋白質相對含量計算

將各個膠片掃描的電子檔用軟體 Quantity One Ver. 4.6.2 (BIO-RAD) 讀取後, 測量 marker 各分子量條帶的畫素讀值, 以 25CK 膠片的 marker 為基準, 其他膠片之 marker 之讀值對其做校正, 來去除膠片間因染色、退染程度不同所造成的差異。校正後, 各項蛋白質的相對含量計算方法, 以 25CK 6 DAF 讀值為基

準，其他發育時期與處理皆除以 25CK 6 DAF 讀值後得到相對含量。水溶與鹽溶蛋白質身分參考自 Pan, 2005。進行三重複試驗並以LSD統計方法對各處理間進行顯著性測驗。

表 1、Albumins 與 Globulins 之身分

Spot No.	Mr (kb)	pI	Homologous protein	Score	Sequence covered (%)	Accession number
Alb-7	58.9	5.95	putative ATP synthase β chain	403	25	gi50932681
Alb-8	52.66	6.23	putative alanine aminotransferase	216	14	gi37533928
Alb-14	16.93	6.18	putative heat shock protein	414	75	gi50900608
Glo-4	56.82	4.95	protein disulfide-isomerase (PDI)	991	51	gi1709619
Glo-6	21.04	7.51	19kDa globulin precursor	78	13	gi20159

伍、結果

一、農藝性狀調查結果：

1、高溫處理加速穎果充實期、劍葉老化與氮素處理之改善

圖 1 為高溫與氮素處理對 TK9 開花後劍葉葉綠素計值之影響，結果顯示高溫 35°C 處理控制組（35CK），使其劍葉在開花後逐漸黃化，20 DAF 天後劍葉葉綠素值明顯下降至 30 以下，此與常溫 25°C 控制組（25CK）的趨勢相同。而常溫 25°C 與高溫 35°C 施加氮素之處理組 25N、35N 可在穎果充實前期提昇劍葉之葉綠素含量並且維持到 30 DAF 左右，葉綠素值才降到 30 以下，顯示氮素對於穎果充實期之劍葉有 stay-green 之效用。35CK 在穎果充實期之葉綠素值有時較 25CK 高，推測可能因為高溫處理下，植株之蒸散速率較快，對土壤中氮素的吸收也較快，但確切原因有待試驗加以證明。

2、高溫處理對產量構成要素之影響與氮素之效應

高溫處理下，圖 2 顯示 35CK 與 25CK 的穗重相比，呈顯著下降的情形，而 35N 的穗重比 35CK 高，顯示氮素處理對高溫所造成穗重的下降，有改善之功能。同樣在穗的稔實率與風選後的結實率（圖 3 A、B）顯示，高溫處理皆造成稔實率與結實率的下降，而施加氮素有助於提高或回復穗的稔實率與結實率，但 35N 仍不足以回復到 25CK 之水準（圖 3 A、B）。穎果之鮮重（圖 4，30 DAF 表示成熟穎果之糙米）顯示，高溫處理下，35CK 的穎果鮮重有提早累積之趨勢，6、9、15 DAF 都比 25CK 高，但是 35CK 在 15 DAF 後穎果重量累積趨緩，到 30 DAF 的成熟重量明顯顯示比 25CK 來的低。氮素的效應方面，在常溫 25N 的鮮重與糙米乾重都比 25CK 高；在高溫處理下，35N 充實前期的穎果重比 35CK 高，但充實後期 20、30 DAF 兩者間沒有顯著差異。

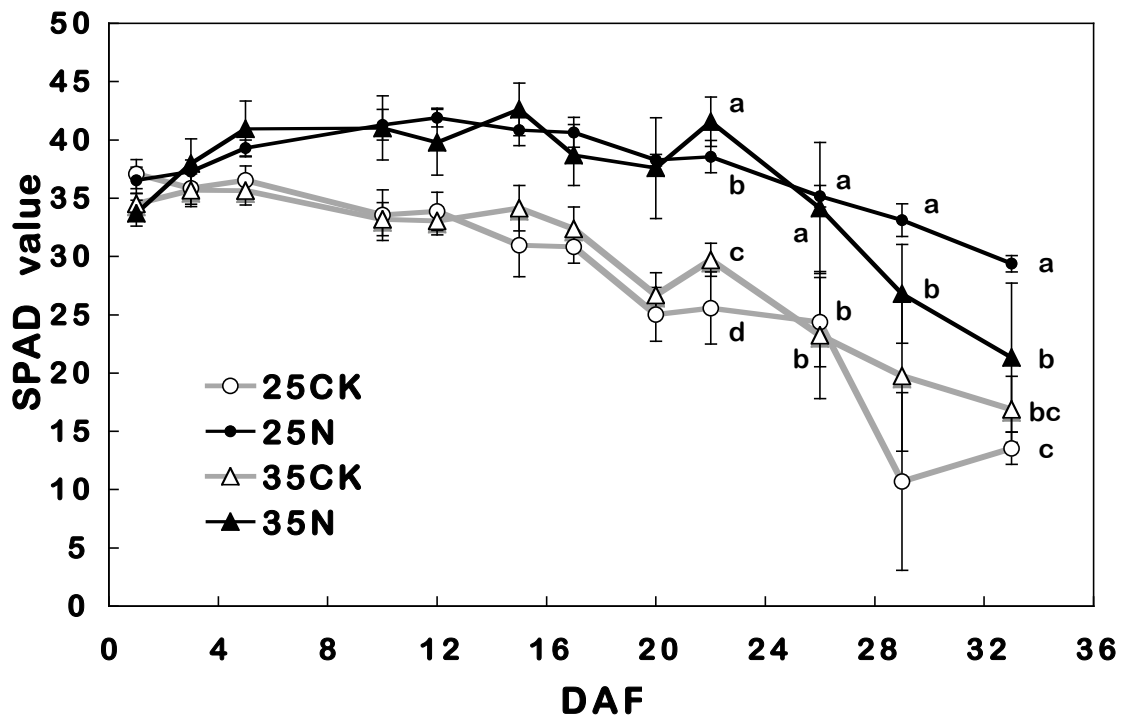


圖 1、高溫與氮素處理對 TK 9 開花後劍葉葉綠素計值之影響。數值為八重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

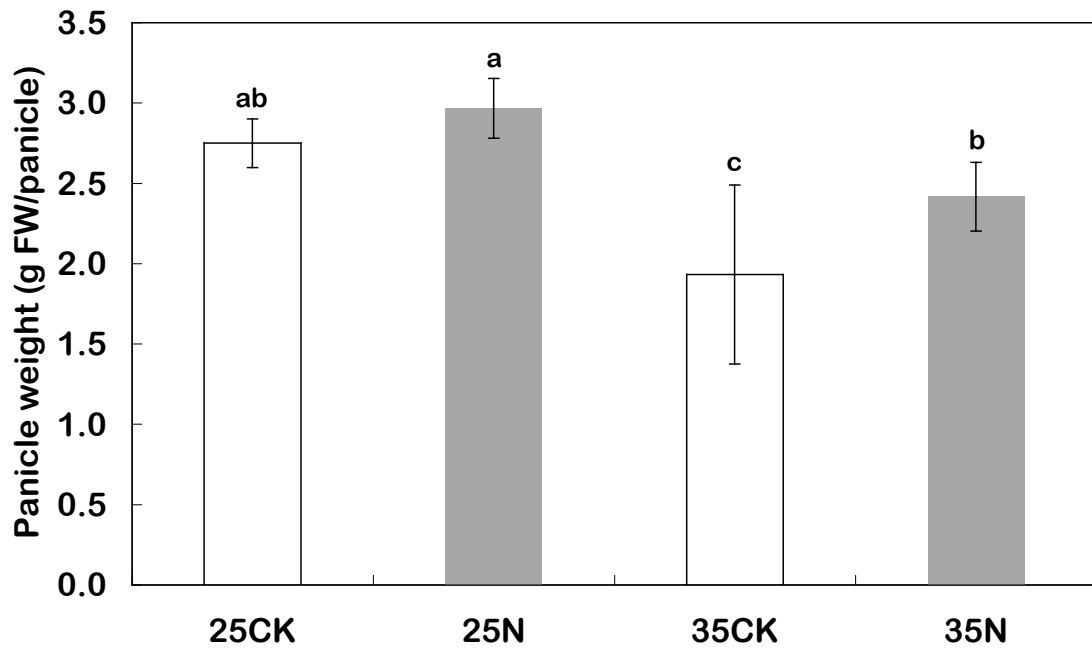
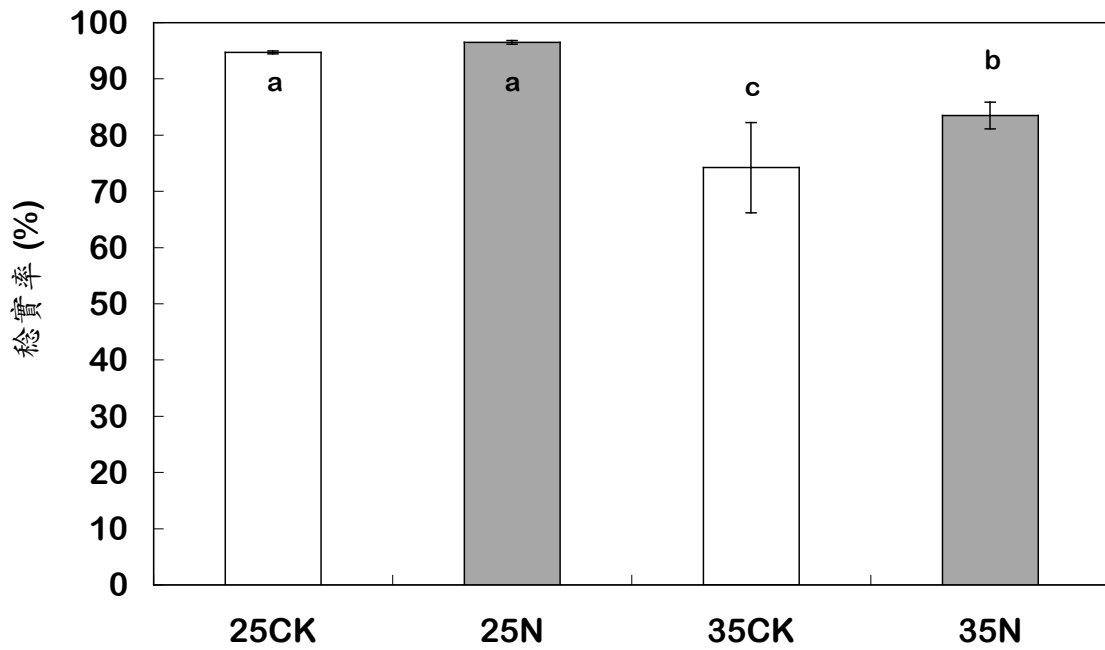


圖 2、高溫與氮素處理對 TK 9 成熟穗重之變化。數值為五重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

A.



B.

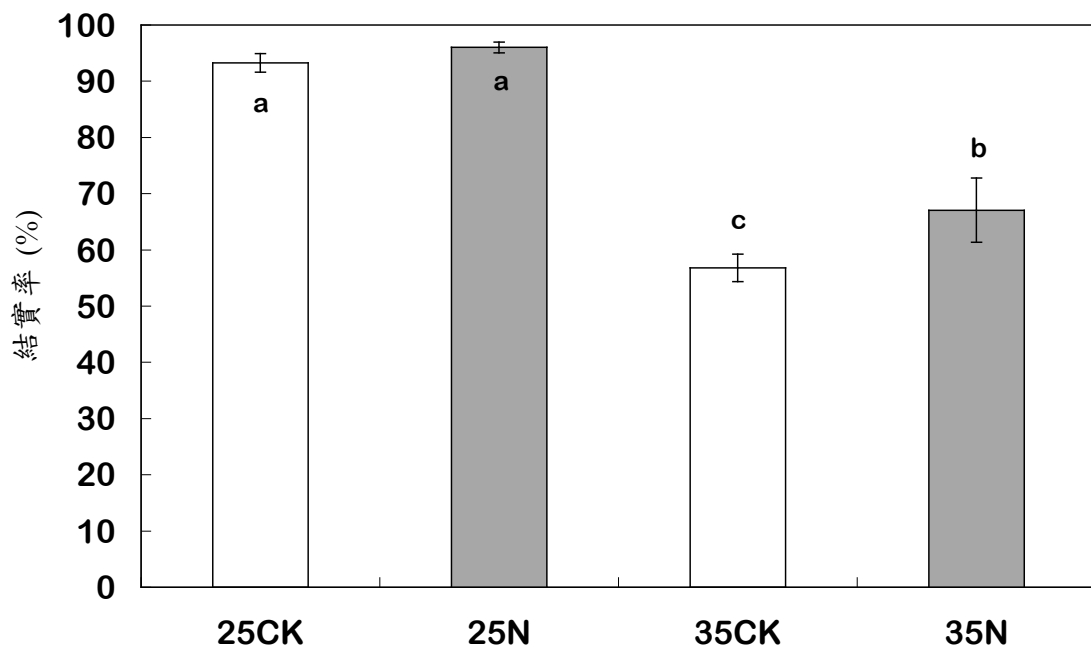


圖 3、高溫與氮素處理對TK 9 之稔實率 (A) 結實率 (B)。 (A) 數值為五重複之 mean \pm SE， (B) 數值為三重複之 mean \pm SE。 25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。 圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

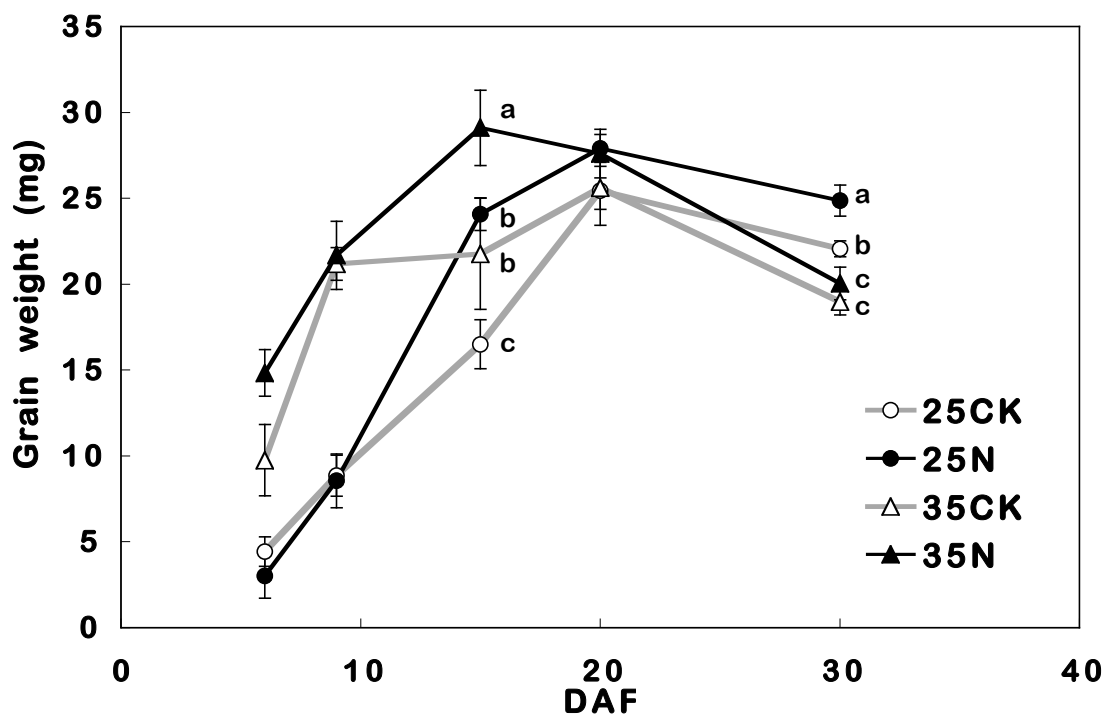


圖 4、高溫與氮素處理對 TK 9 開花後各時期之穎果鮮重之變化。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

3、高溫及氮素處理與穎果外觀之影響

依據材料收集與處理，觀察水稻穎果充實期與糙米外觀（圖 5），可看出高溫處理的 35CK、35N 早期穎果發育明顯比常溫組 25CK、25N 快，但是到 15 DAF，高溫組穎果種皮逐漸黃化，到 20 DAF，穎果外觀已經成熟變成白色，但是 35N 穎果微管束仍保持部分綠色，顯示 35N 穎果成熟速率比 35CK 慢，保有較長的充實期。

成熟穎果經碾糙後，逢機挑選部分 25CK、25N、35CK、35N 糙米放置在照光版上觀察（如圖 6）。圖 6 A、B 可以看到在常溫下，糙米的透光程度相當高，鮮少白垩質發生。觀察圖 6 C、D，比較 35N 和 35CK 同樣發生白垩質的部位，發現 35N 的白垩質程度較低，透光率較高，顯示高溫下氮素處理有改善白垩質的情形，但仍然不至於完全改善，相對常溫下對照組，白垩質的比例仍然很高。

二、生理性狀分析：

1、氮素延緩高溫下穎果葉綠素老化

從上述圖 5 穎果充實期 20 DAF 已可看到各處理穎果外觀顏色上之明顯差異，高溫處理下穎果的葉綠素提早老化，而施加氮素的 35N 似乎延緩老化之趨勢，因此再進行測定穎果葉綠素含量。圖 7 顯示 35CK、35N 在穎果充實期的葉綠素含量都比常溫的低，而在充實後期 15、20 DAF，35N 的葉綠素含量都比 35CK 高，表示在高溫下開花後施加氮素可以延緩穎果葉綠素的老化現象。

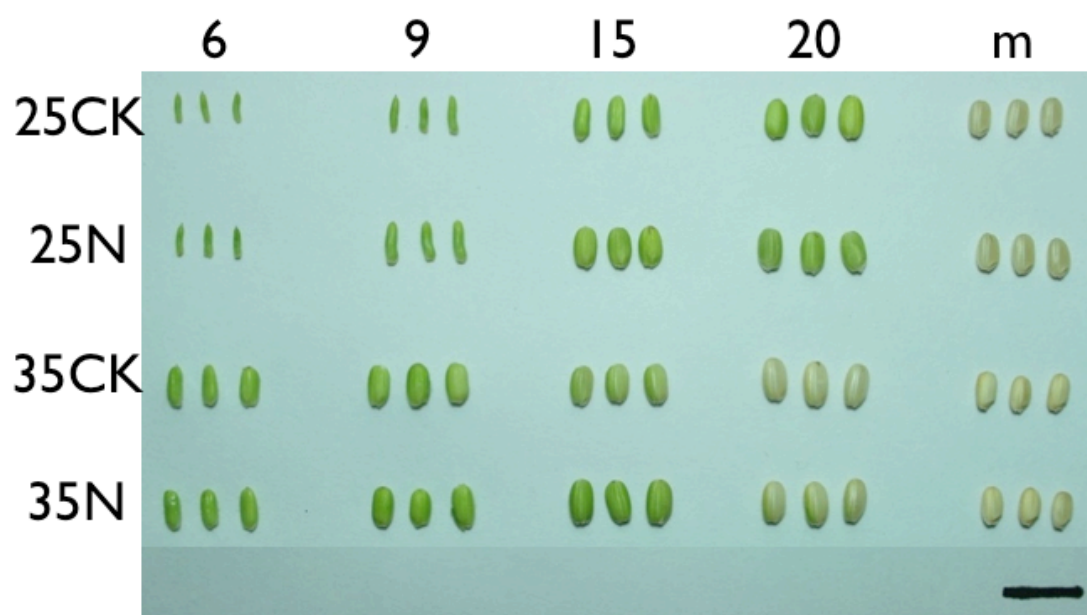


圖 5、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期之各時期穎果外觀之影響。上排數字代表開花後的時間軸 (DAF) 與成熟糙米 (M)。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。(右下角黑線表示 1 cm)

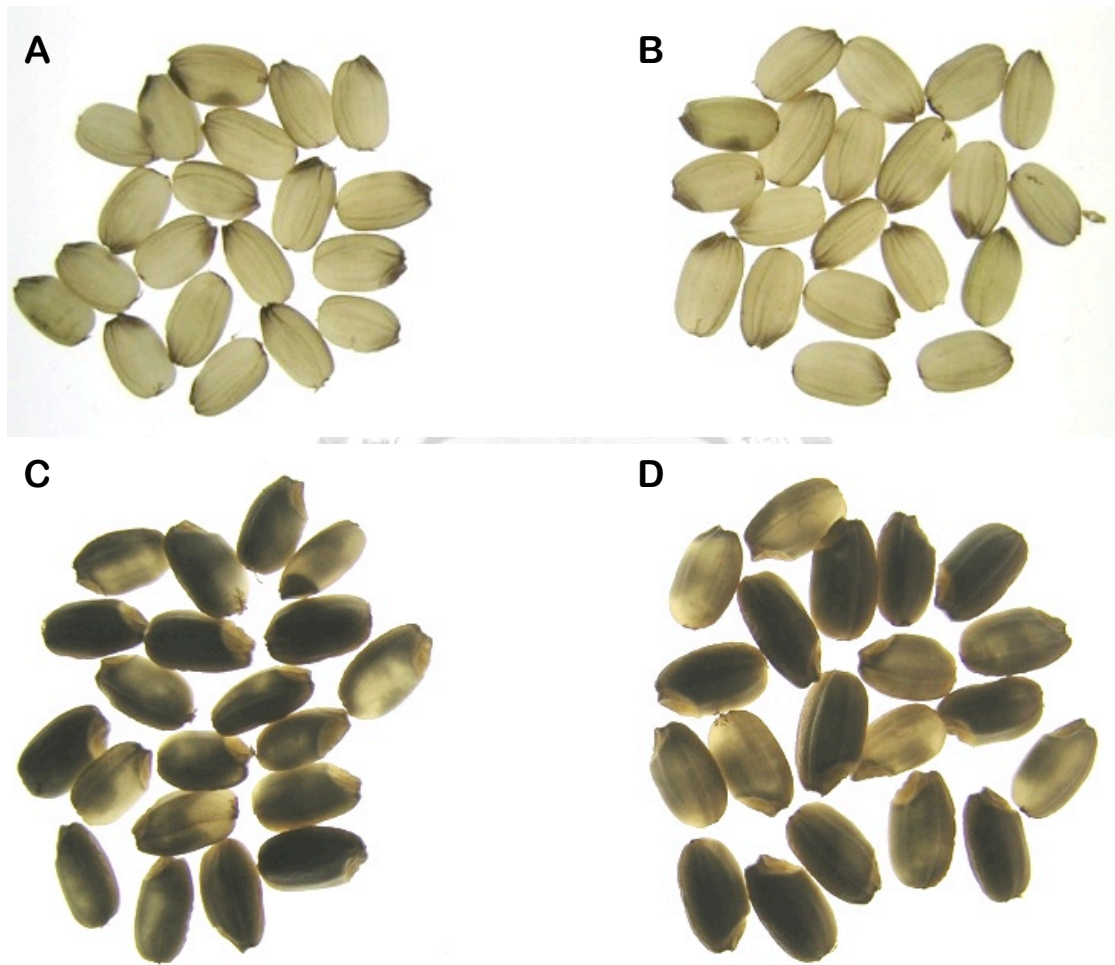


圖 6、高溫與氮素處理下 TK 9 糙米之外觀。A：25CK，常溫處理組；B：25N，常溫氮素組；C：35CK，高溫處理組；D：35N，高溫氮素組。

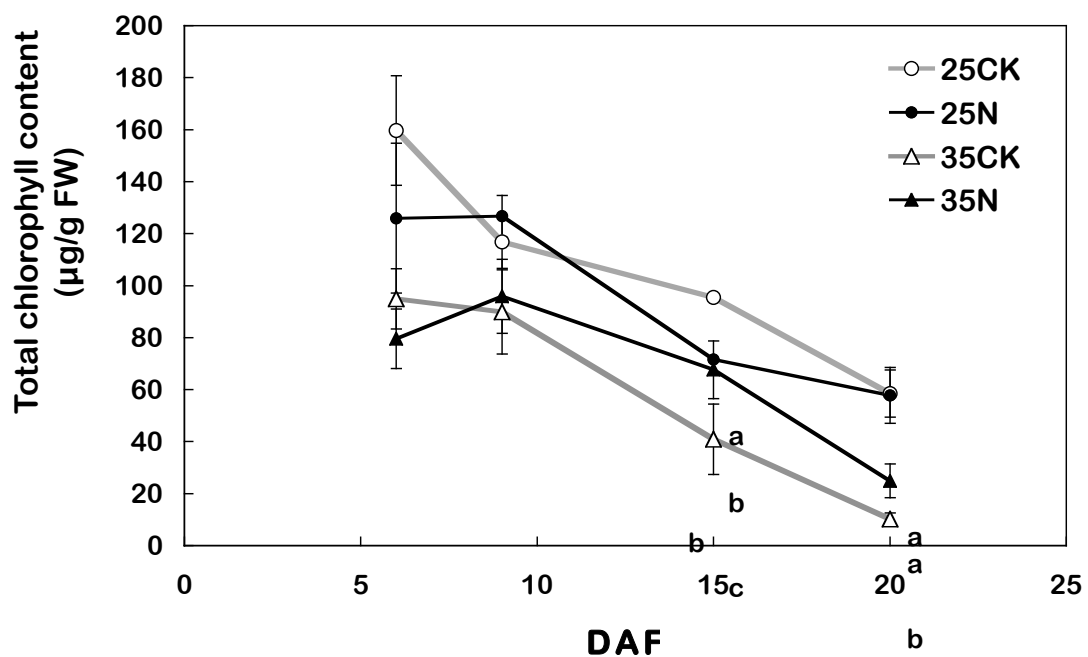


圖 7、高溫與氮素處理下 TK 9 充實期穎果之葉綠素含量變化。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；

35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

2、氮素減緩高溫下造成穎果氧化逆境，過氧化氫的產生

前人研究已得知高溫會造成穎果氧化逆境的提升，圖 8 A 每單位鮮重顯示 35CK 在 15、20 DAF 比起 25CK 與 25N 有較高的過氧化氫 (H_2O_2) 含量，表示高溫的確會提高穎果內的氧化逆境。圖 8 B 以每單位穎果顯示 35CK 在各充實期的過氧化氫含量都是最高，而圖 8 A、B 的 35N 在各個充實期的 H_2O_2 含量都較 35CK 低，表示施加氮素的確可以減緩穎果內因高溫所提昇的氧化逆境。

3、高溫降低穎果充實期之 ATP 含量

圖 9 A 為穎果之單位重量的 ATP 含量變化。圖中顯示 25CK 的趨勢是在 9 DAF 到達最大量，然後逐漸下降 (25CK)，常溫下施加氮素 (25N) 可以提高穎果充實期的 ATP 含量。高溫處理使穎果在 6 DAF 有較高的 ATP 含量，但隨著充實期逐漸下降，而 35N 呈現先上升後下降的趨勢，在 9、15 DAF 有比 35CK 高且顯著的 ATP 含量。圖 9 B 為每單位穎果的 ATP 含量變化，顯示 25CK 穎果內的 ATP 含量隨著充實期增高，而 35CK 的 ATP 含量則是一開始在 6 DAF 的含量高，但隨著充實期逐漸下降。高溫下施加氮素 (35N) 可以提高 9、15 DAF 的 ATP 含量，可能供應此時正快速合成與累積之澱粉與蛋白質等分子使用。

4、高溫與氮素影響糙米之 pH 值變化

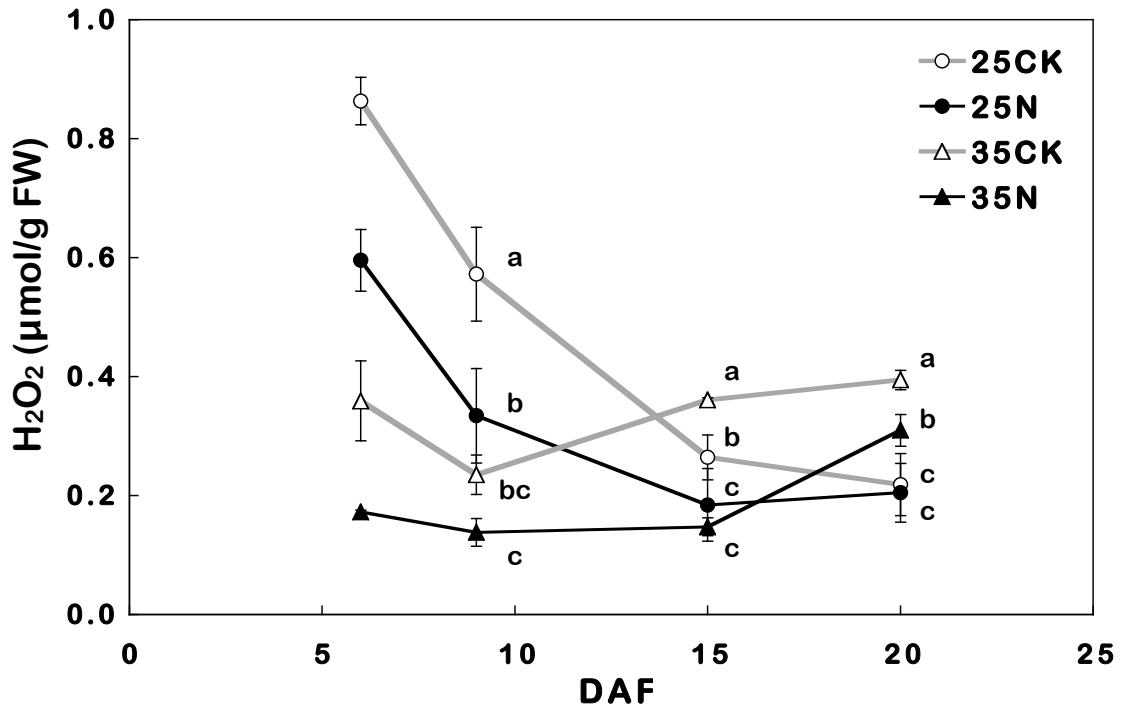
高溫可能導致穎果的酸化，且有穎果 PCD 提早的可能，並觀察氮素對糙米 pH 值的影響，是否有改善酸化情形的可能。結果如圖 10，常溫組的 pH 值皆高於高溫組，而高溫組除了分有無氮素處理外，還有經過穀粒外觀判別機區分成死米 (dead rice) 與完整粒 (head rice)，結果顯示 35CK 死米 pH 值顯著低於

35CK 完整粒，而 35N 完整粒與 35CK 完整粒沒有顯著差異，35N 死米則與 35N 完整粒、35CK 死米沒有顯著差異，但平均值是高於 35CK 死米。

5、高溫與氮素影響穎果充實期之總氨態氮含量

由於前人研究已發現高溫下穎果可能發生缺氮的情形，所以本研究推測施加氮素可以提供更多的氮源供給穎果。圖 11 A 顯示高溫處理組（35CK、35N）在 15 DAF 的（amino nitrogen，氨態氮）明顯比常溫組（25CK、25N）來的低，而圖 11 A 以每單位鮮重的計算則看不出施加氮素有明顯提高穀粒內氮源的效應。圖 11 B 以每單位穎果則可以看出，在常溫下施加氮素，25N 比 25CK 在 9 DAF 有較高的 amino nitrogen 含量，9 DAF 達到全充實期的最高，25CK 則是在 15 DAF 達到最高。35N 則是在 6 DAF 呈現有比 35CK 較高的 amino nitrogen 含量，而且 35CK、35N 的 amino nitrogen 則在穎果充實初期（6 DAF）就已達到最高含量，到 15 DAF 有明顯下降的趨勢。此 amino nitrogen 含量在充實期的變化可能與穎果內儲存性蛋白質的合成需求有關。

A.



B.

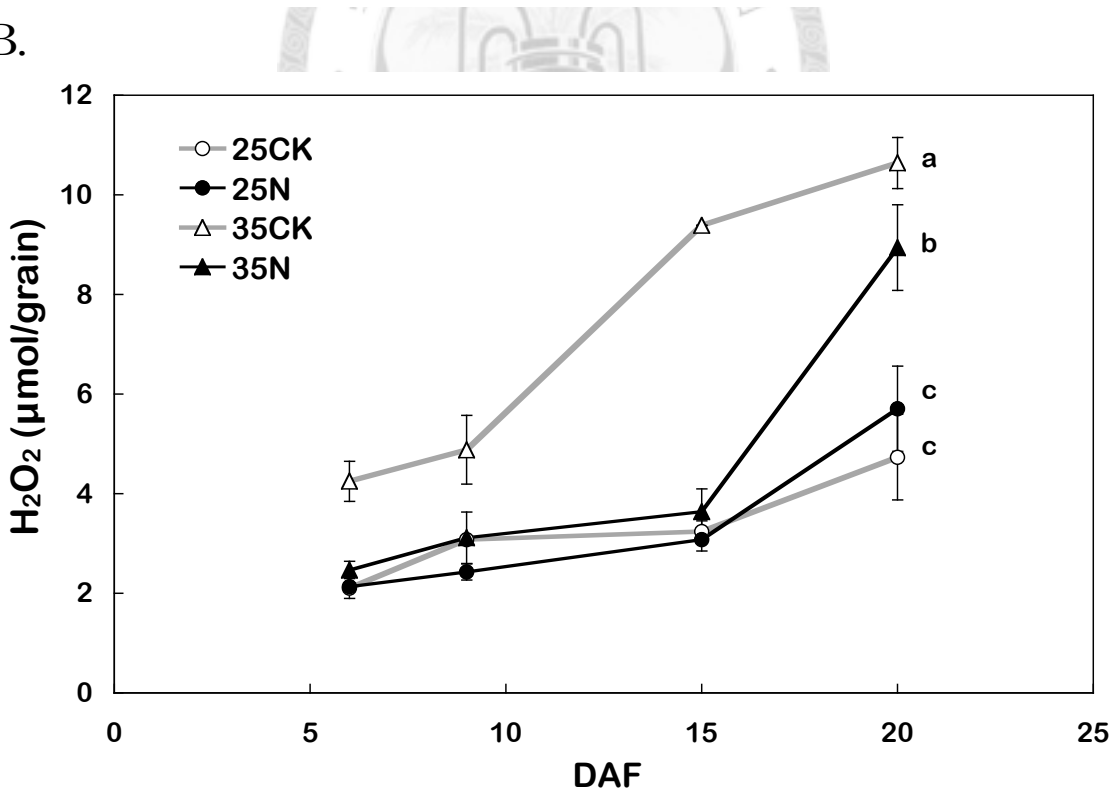
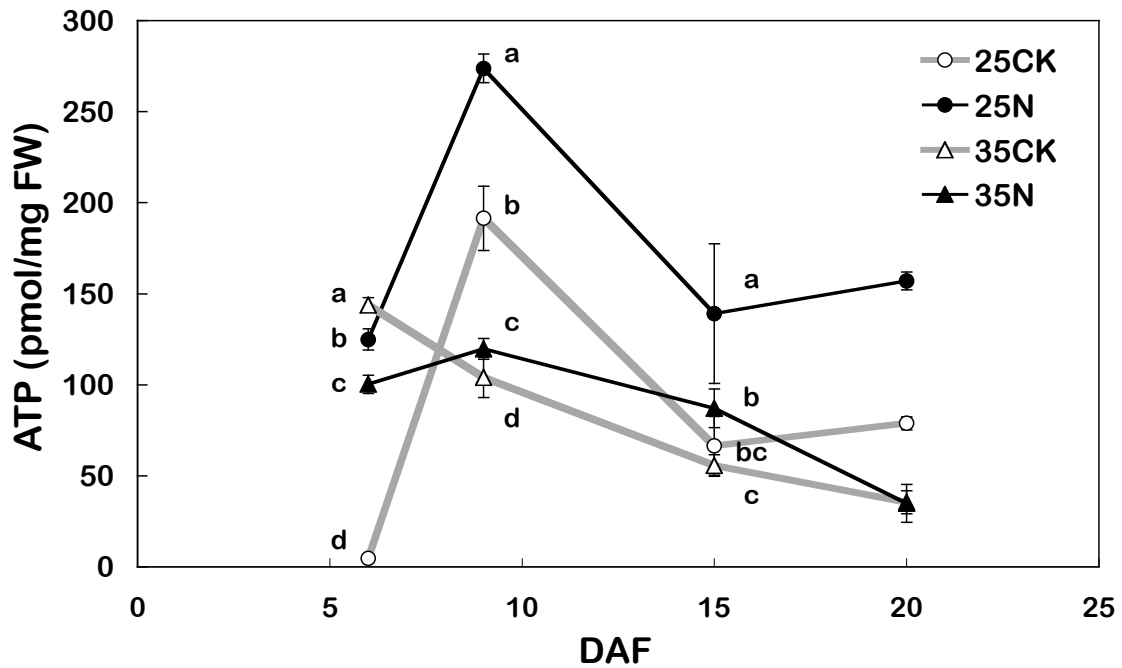


圖 8、高溫與氮素處理下 TK 9 充實期穎果之過氧化氫 (H₂O₂) 含量變化。A. 每單位重量所含有 H₂O₂ 的莫耳數，B. 每單位穎果所含有 H₂O₂ 的莫耳數。數值為三重複之 mean ± SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

A.



B.

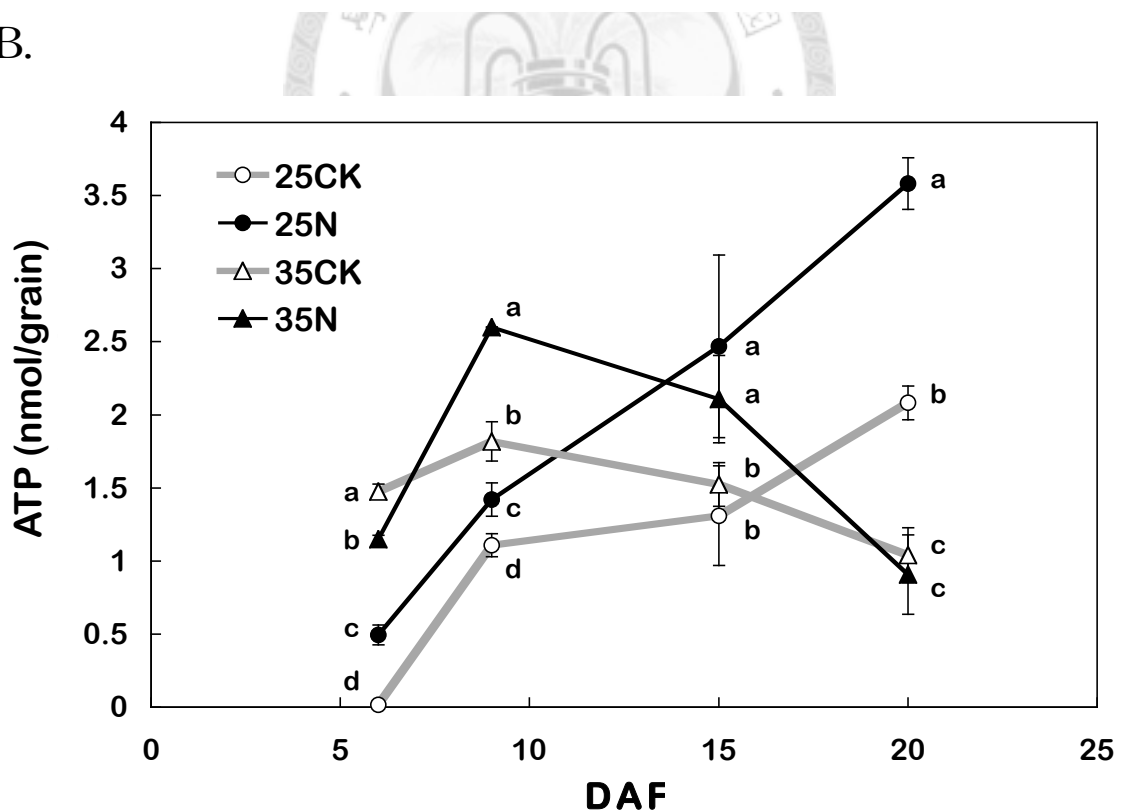


圖 9、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期 ATP 含量之影響。A. 每單位重量所含有 ATP 的莫耳數，B. 每單位穎果所含有 ATP 的莫耳數。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

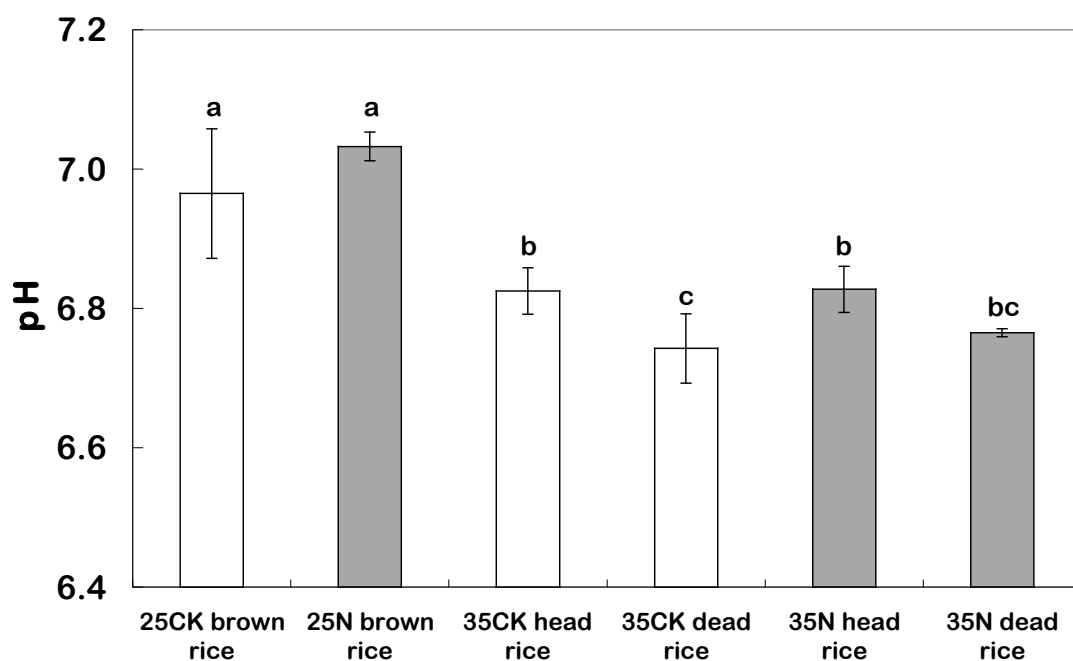
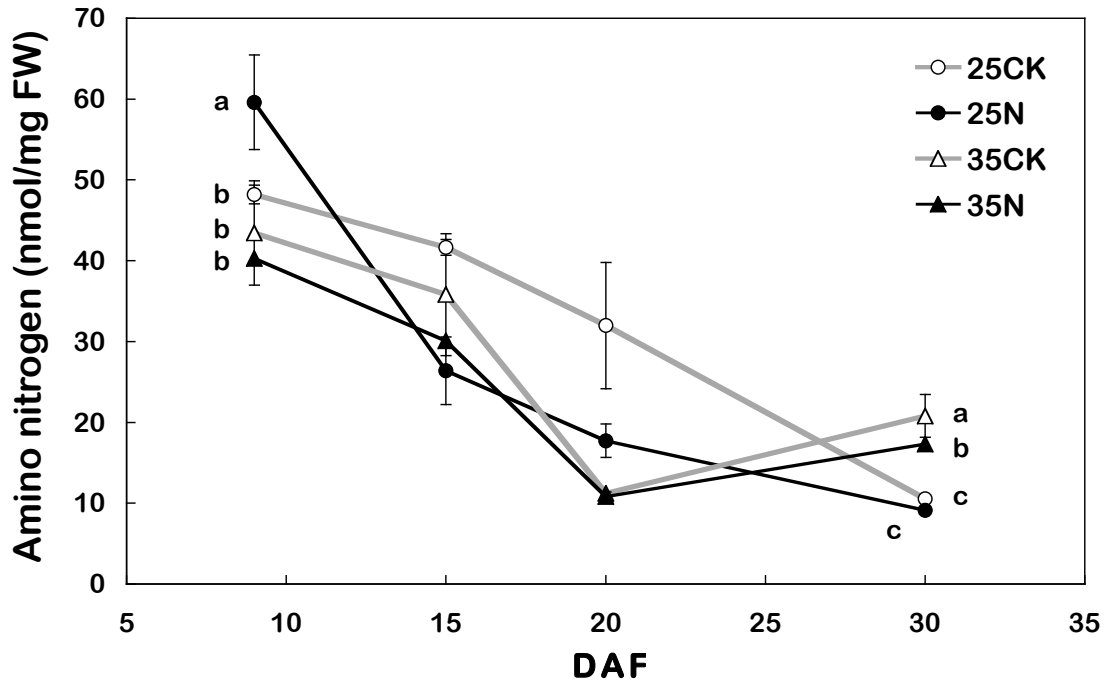


圖 10、高溫與氮素處理對 TK 9 糙米 pH 值之影響。數值為四重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

A.



B.

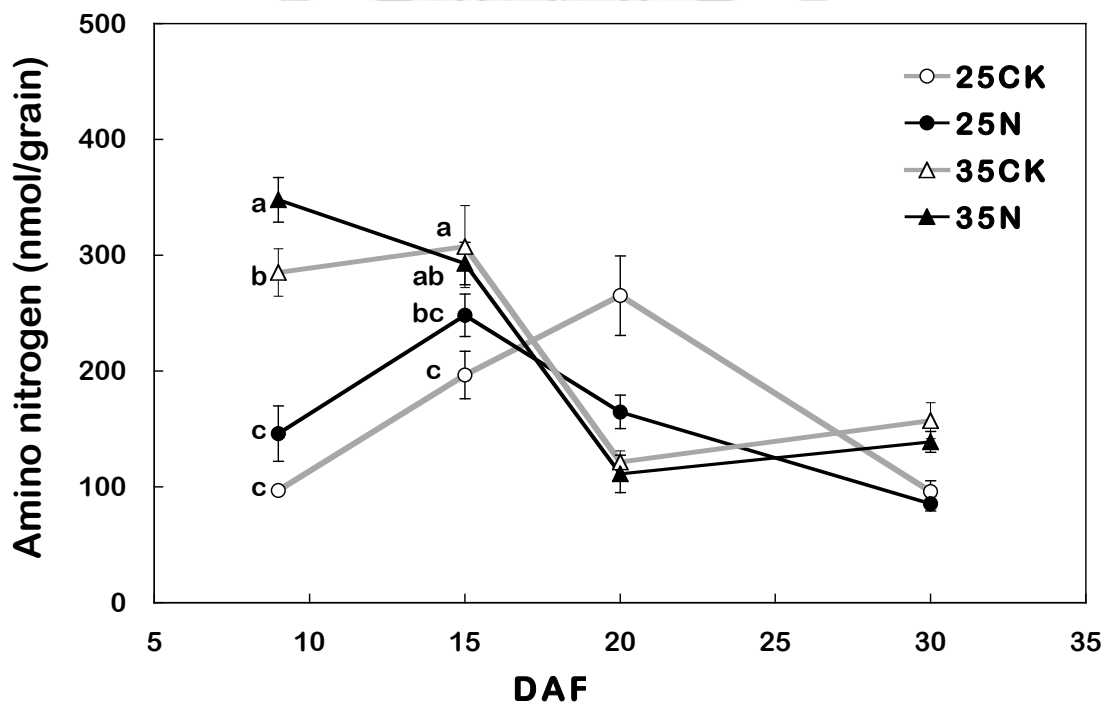


圖 11、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 amino nitrogen 含量測定。A. 每單位重量所含有 amino nitrogen 的莫耳數，B. 每一顆穎果所含有 amino nitrogen 的莫耳數。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

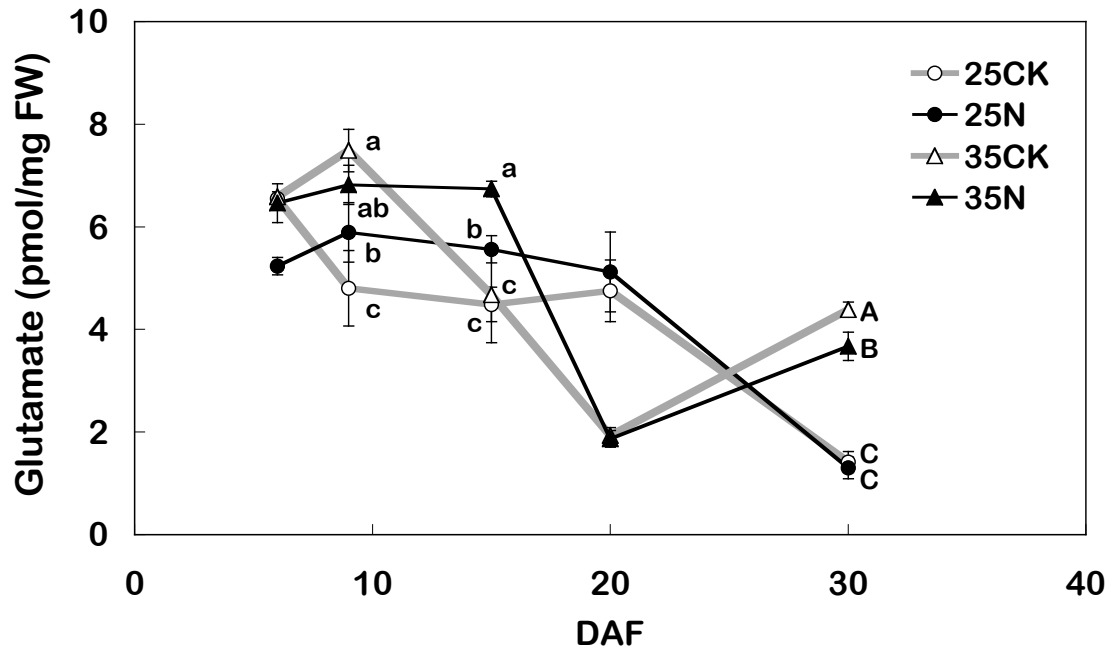
三、氨基酸與蛋白質含量結果：

1、氮素與高溫處理對水稻穎果充實期的氨基酸含量影響變化

本研究在前期試驗中確立各種穎果氨基酸的分析方法與流程，已分析穎果充實期間各處理之氨基酸含量的變化（附圖 2），其中發現 glutamate 和 alanine 之變化最為顯著，因此以下僅呈現此二種氨基酸的分析結果。

圖 12 A 顯示，比起 25CK，25N、35CK、35N 在 9、15 DAF 表現有較高的 glutamate，而高溫處理組之 35CK、35N 在 20 DAF 的 glutamate 含量顯著下降至只有同時期常溫組的一半以下。圖 12 B 顯示，25CK 的 alanine 含量在 15 DAF 達到最高，25N 則是在 9 DAF 達到最高，高溫處理的 35CK 與 35N 在 6、9 DAF 顯著含有高 alanine 含量，且 35N 在 6、9、15 DAF 的 alanine 含量比 35CK 更高，但是在常溫下 25N 相較 25CK 並沒有顯著的提升，暗示在高溫下可能有較高的 alanine 需求。與 glutamate 一樣，alanine 含量在 20 DAF 的含量顯著下降，且比常溫組來的低許多。

A.



B.

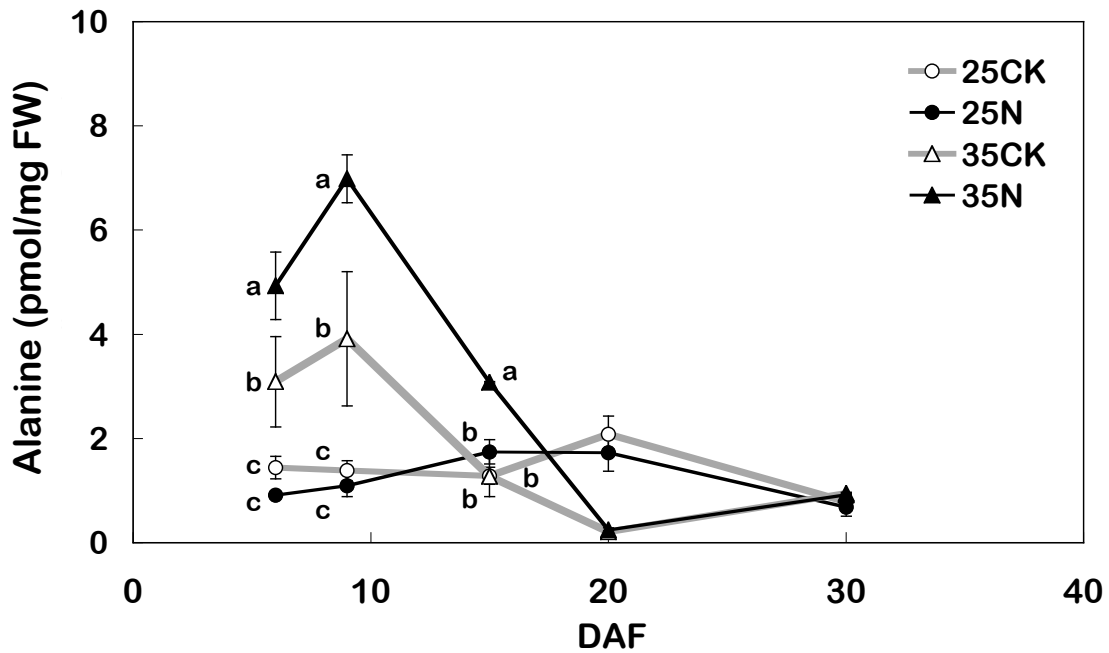


圖 12、高溫與氮素處理下 TK 9 穎果充實期之 glutamate 及 alanine 含量之變化。A. glutamate。B. alanine。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組、25N：常溫氮素組、35CK：高溫處理組、35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

2、氮素與高溫對水稻穎果充實期蛋白質累積影響

本試驗將處理間有顯著差異之條帶與潘（2005）建構之水稻儲存性蛋白質電泳身分比對，Total storage proteins 以 α -glutelins、 β -glutelins、prolamins；水溶性蛋白質以 albumins 7、8、14；鹽溶性蛋白質以 globulins- 4、6 為主要分析目標。

(1) Glutelins 與 Prolamins

圖 13、14 分別為 25CK / 25N、35CK / 35N 的電泳膠片。圖 13 可以看出 25N 的 α -glutelins、 β -glutelins、prolamins 在各充實期的含量明顯比 25CK 多，表示施加氮素可以提高穎果內此主要儲存蛋白質的含量。常溫下穎果內 storage proteins 約 15 DAF 左右開始有較明顯的累積，在成熟時的含量達到最高（圖 13），而在高溫處理下，則是提早到 9 DAF 就開始有大量 storage proteins 累積，在 20 DAF 左右含量達到最高，到成熟後的 storage proteins 含量反而下降（圖 14）。

再以 Quantity One 分析圖檔中各項目標 storage proteins (α -glutelins、 β -glutelins、prolamins) 並製作相對含量，如圖 15、16。結果發現，穎果在高溫下會提早累積 storage proteins 之 α -glutelins 與 β -glutelins，6 DAF 已開始有明顯累積，到 15 DAF 的含量達到最高，成熟後反而下降。氮素在高溫下對 α -glutelins 與 β -glutelins 的效應在 6、9 DAF 有顯著差異（如圖 15 A、B）。prolamins 的累積較 glutelins 晚（如圖 16），在高溫下一樣會提早累積，而其對氮素的效應較 glutelins 更明顯，35N 成熟穎果的 prolamins 可以回復到與 25CK 成熟穎果相同的含量。

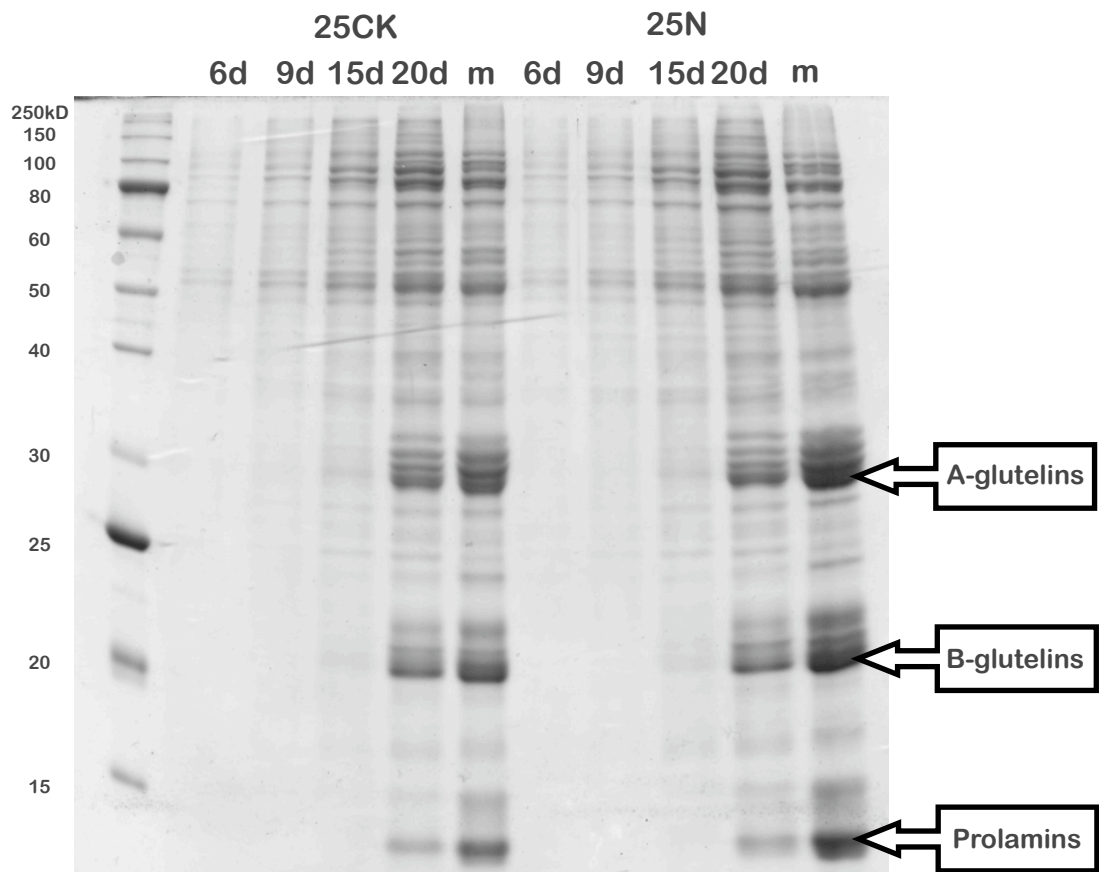


圖 13、氮素處理下常溫生長之 TK 9 充實期穎果內總儲存蛋白質之電泳分析。

25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20 DAF、mature (M)。

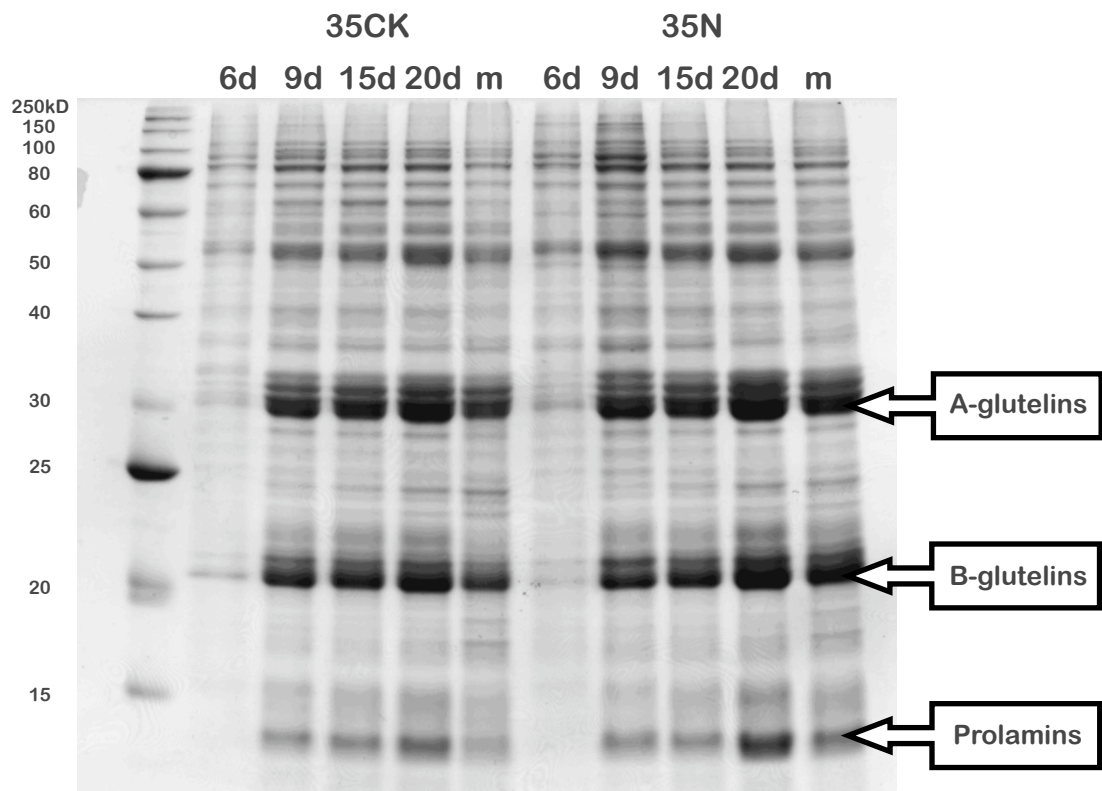
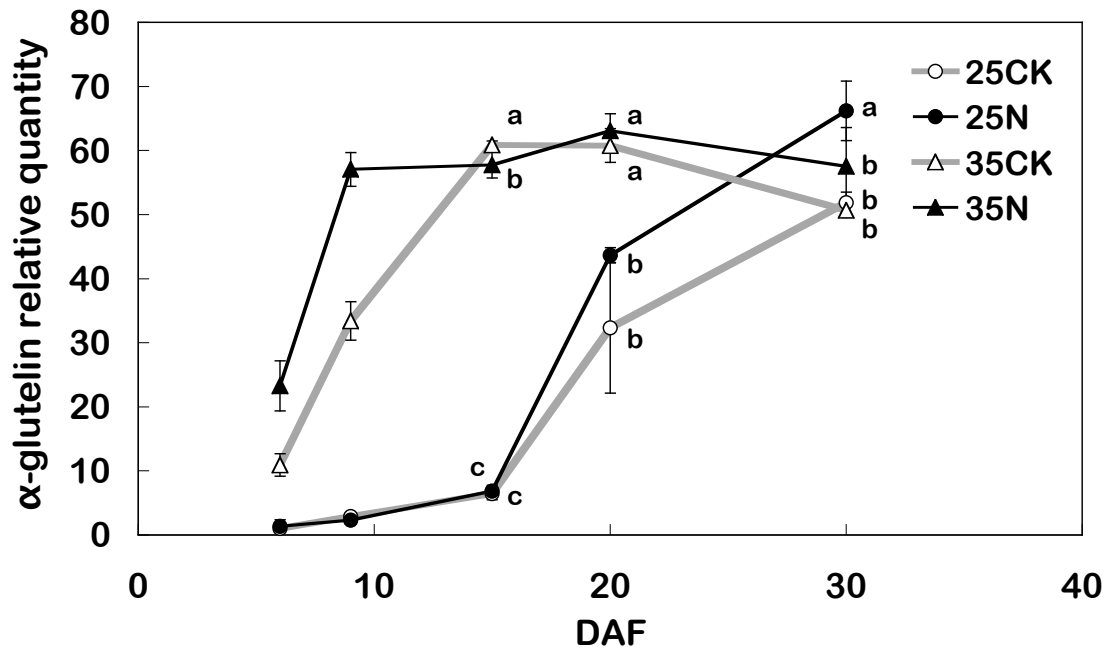


圖 14、氮素處理下高溫生長之 TK 9 充實期穎果內總儲存蛋白質電泳分析。

35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20 DAF、mature (M)。

A.



B.

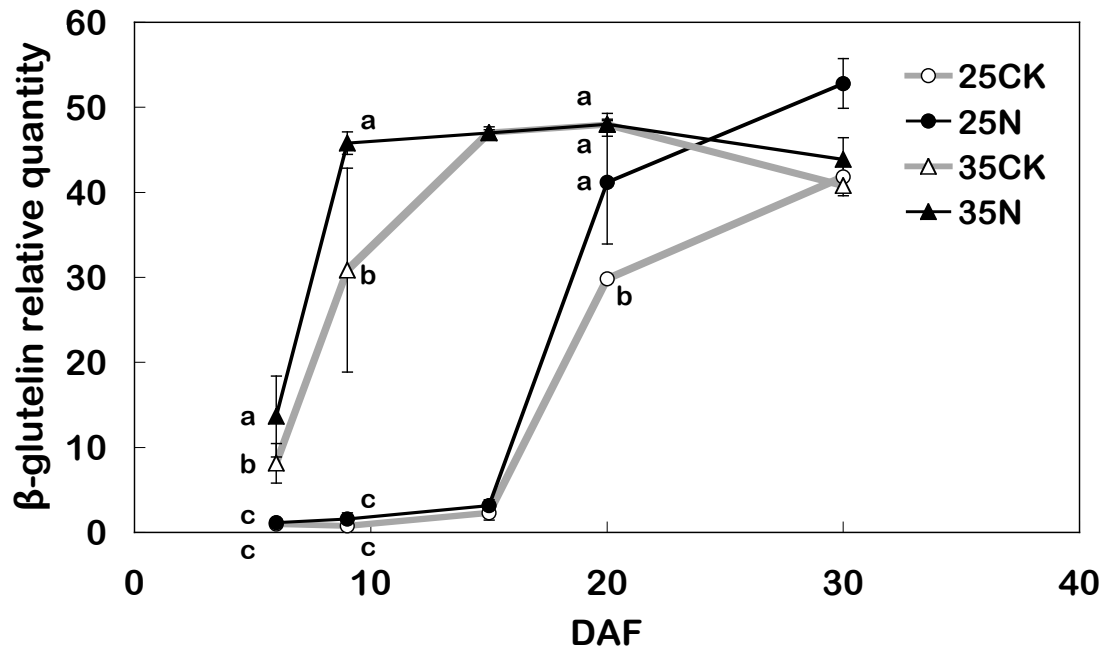


圖 15、高溫與氮素處理對 TK 9 充實期穎果內 α -glutelins 與 β -glutelins 含量。A. α -glutelins。B. β -glutelins。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

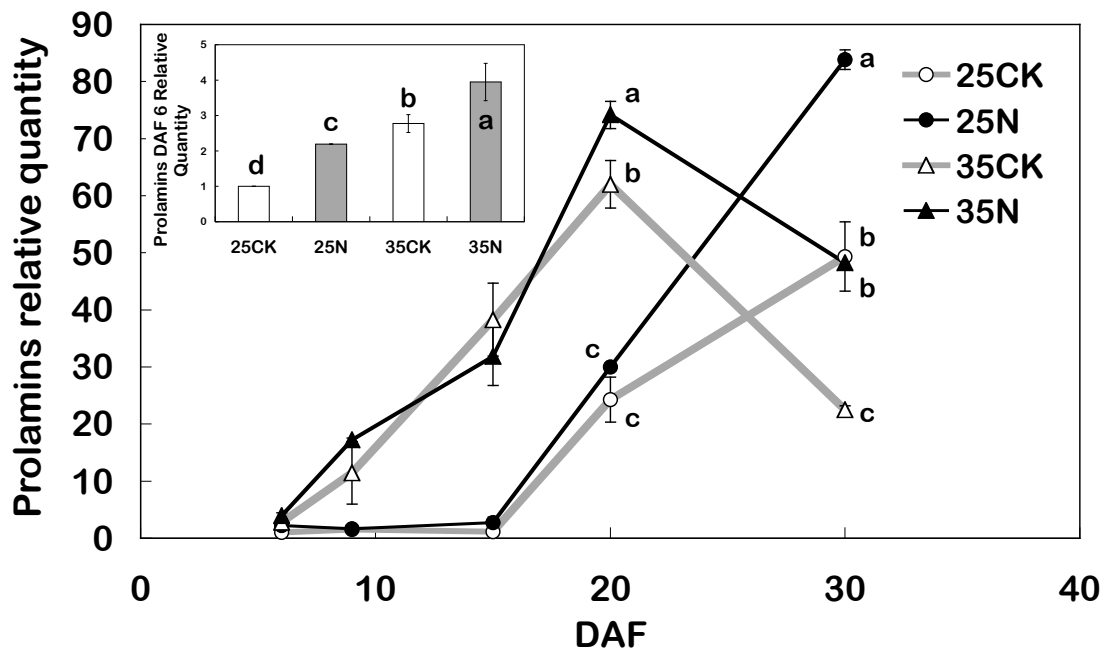


圖 16、TK 9 水稻充實期穎果內 prolamins 含量。圖中方框內為 6 DAF 時期之分析圖。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

(2) Albumins

圖 17、18 為常溫與高溫處理下有無施加氮素之水溶性儲存蛋白質的電泳圖。水稻穎果充實期在常溫下，從 6 DAF 就已經有明顯 albumins 的累積（圖 17），並且 Alb-7、8 的含量是隨著充實期而增加（圖 19、20）。而高溫處理下的水稻穎果中，Alb-7、8 含量的都比常溫高。氮素處理對 Alb-7、8 的影響，在高溫下表現不顯著，只有 25N 在 20 DAF 的 Alb-7、8 含量有比 25CK 高。Alb-14 在常溫下的穎果中表現穩定含量，隨著充實期有些微增加（圖 21），25N 的氮素處理使穎果在 9、15 DAF 有比 25CK 高的表現量。高溫處理下，穎果中 Alb-14 的累積量明顯比常溫高許多，隨著充實期而差距增加，而 35N 在 30 DAF 的含量比 35CK 低，顯示在高溫下施加氮素有減緩累積 Alb-14 的趨勢，但是對 Alb-7、8 的含量影響不顯著。

(3) Globulins

圖 22、23 為常溫與高溫下氮素處理對鹽溶性儲存蛋白質之影響的電泳分析。鹽溶性蛋白質在水稻穎果中的累積較晚才開始，常溫下要到 20 DAF 左右才有明顯的累積（圖 22），在最後 30 DAF 達到最高。另外從圖 24 A、B 的 25CK 與 25N 可看出，在常溫下，氮素對鹽溶性蛋白質的合成時序影響並不顯著。高溫處理下，從膠片上很明顯的可以看到鹽溶性蛋白在 9 DAF 就有累積的情形（圖 23），到 30 DAF 的累積量些許下降。在高溫下施加氮素處理，35N 的 Glo-4 的累積量在 9、30 DAF 有顯著地比 35CK 低，而 30 DAF 的 Glo-6 累積量比 35CK 高，表示氮素的效應，對 Glo-4 有減緩的作用，而對 Glo-6 有促進的作用，相同的是，氮素處理讓 Glo-4、Glo-6 的累積量，趨向 25CK 30 DAF 的累積量（圖 24 A、B），代表氮素處理對水稻穎果對高溫下鹽溶性蛋白質不正常的累積有改善之功能。

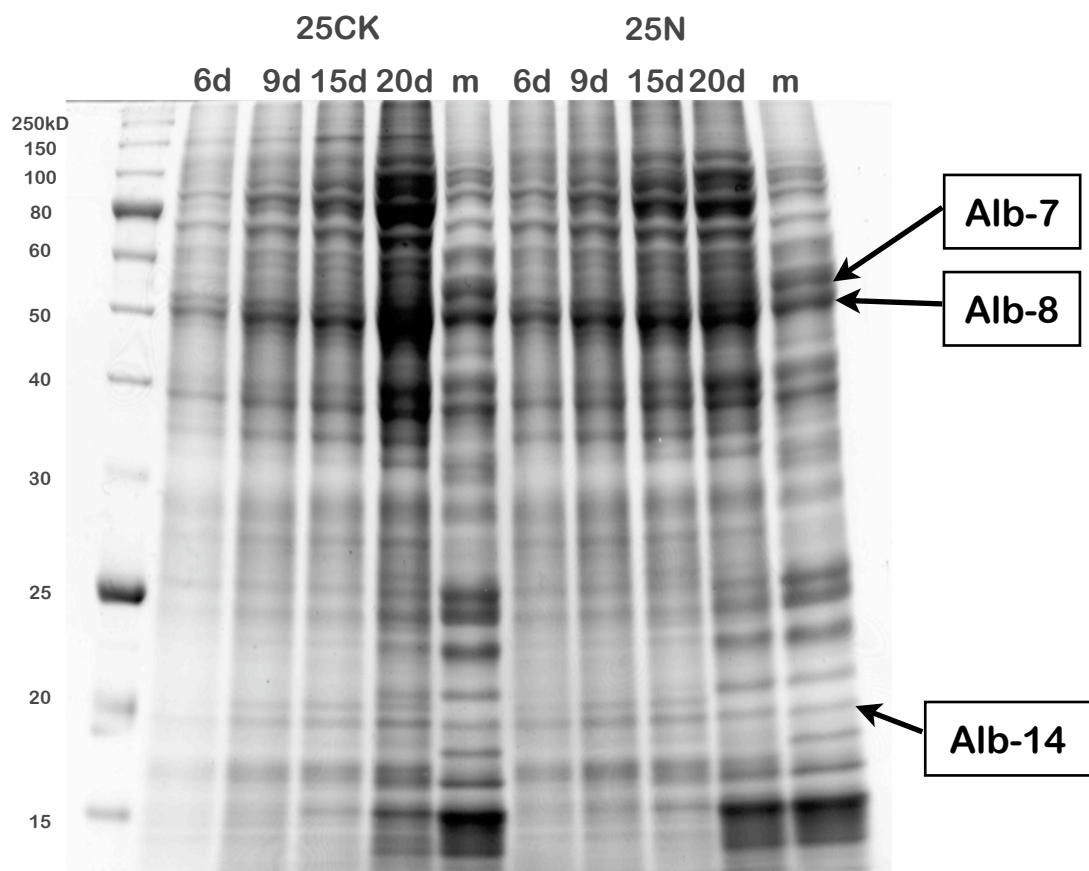


圖 17、氮素處理對常溫生長下 TK 9 充實期穎果內 albumins 電泳分析。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20、DAF mature (M)。

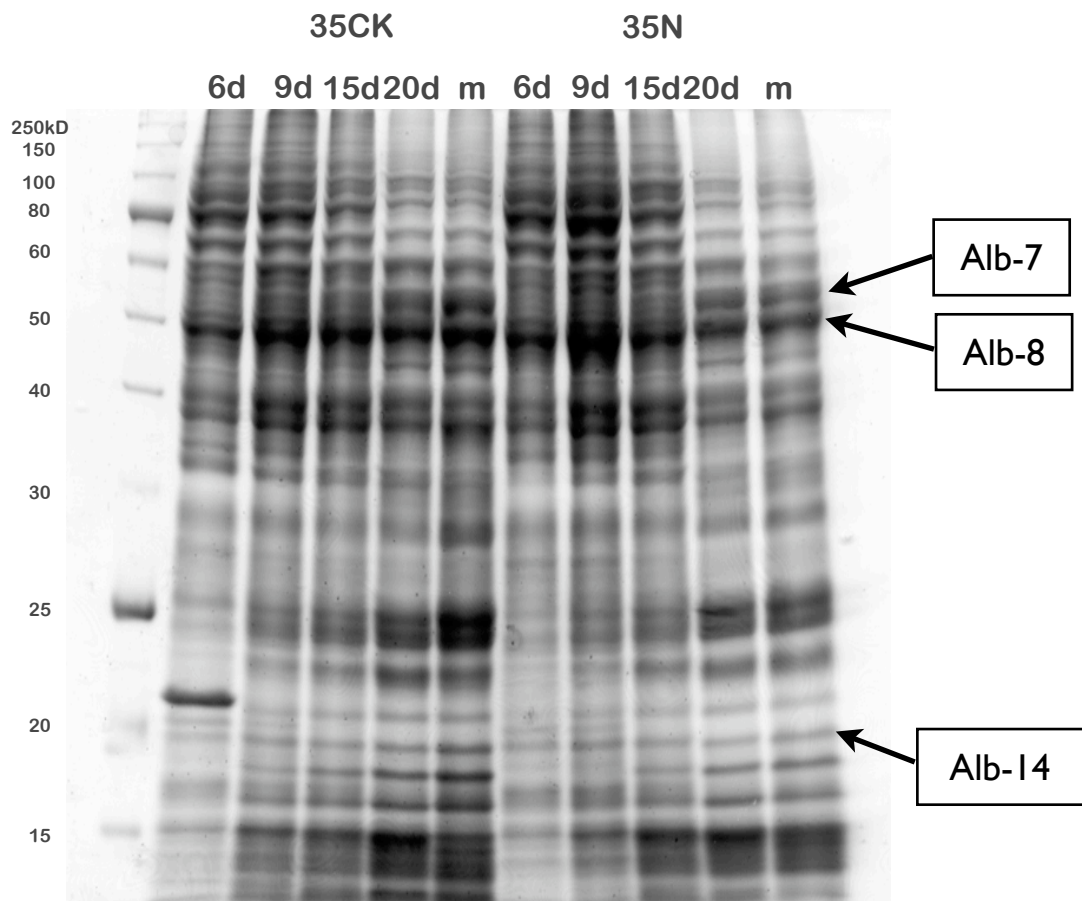


圖 18、氮素處理對高溫生長下 TK 9 充實期穎果內 albumins 電泳分析。35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20、DAF mature (M)。

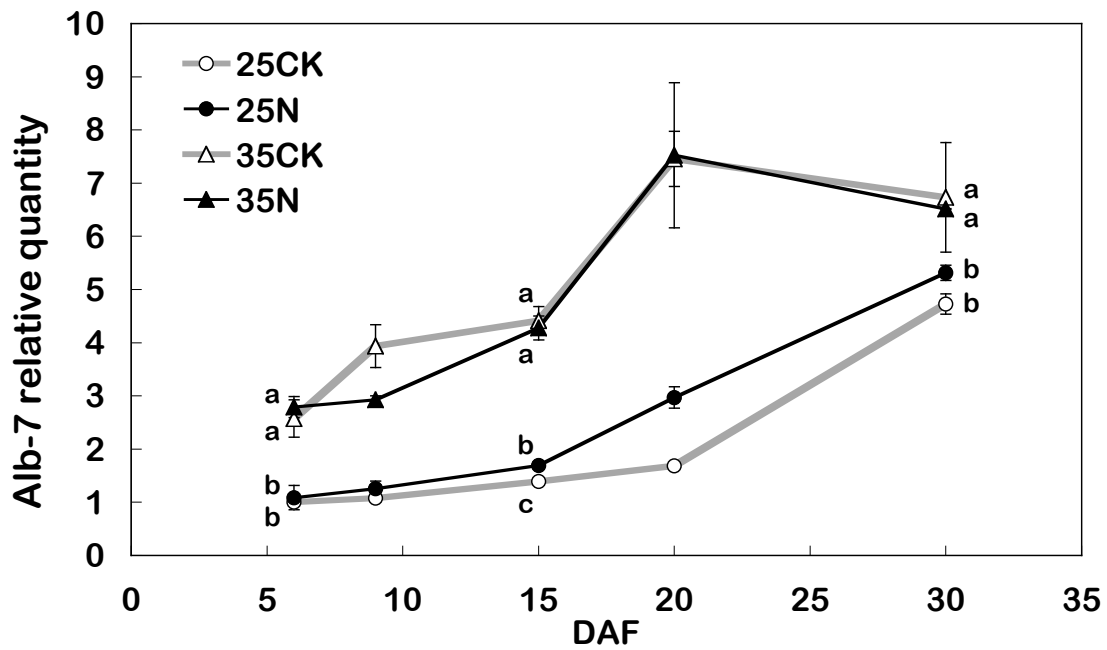


圖 19、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 albumins-7 (putative ATP synthase β chain) 的含量變化。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

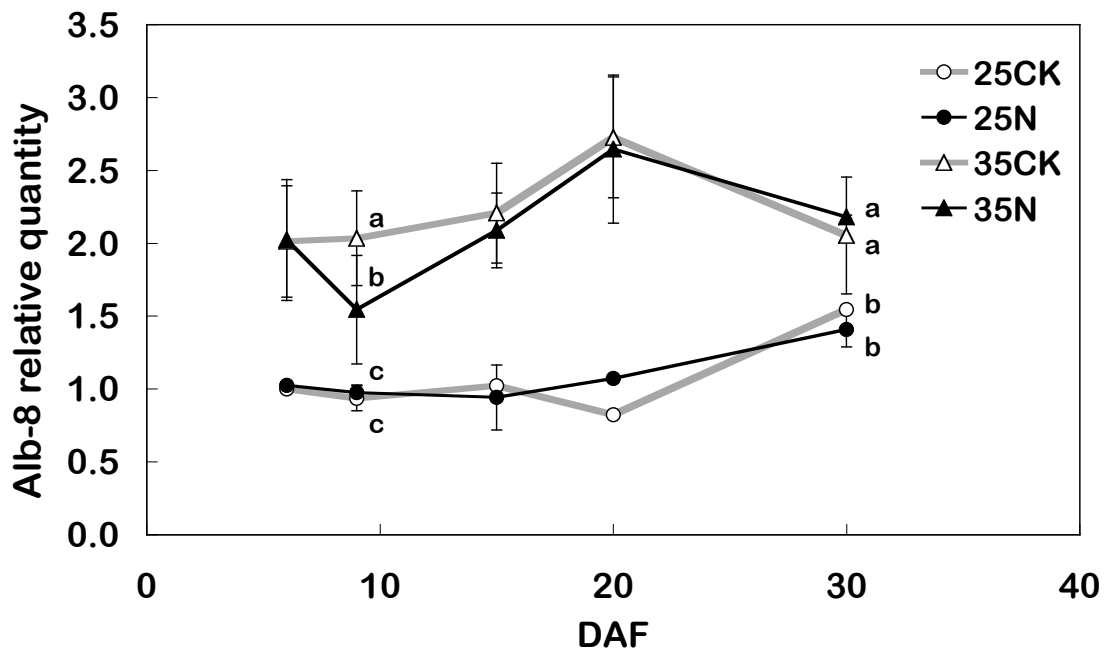


圖 20、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 albumins-8 (putative alanine aminotransferase) 的含量。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

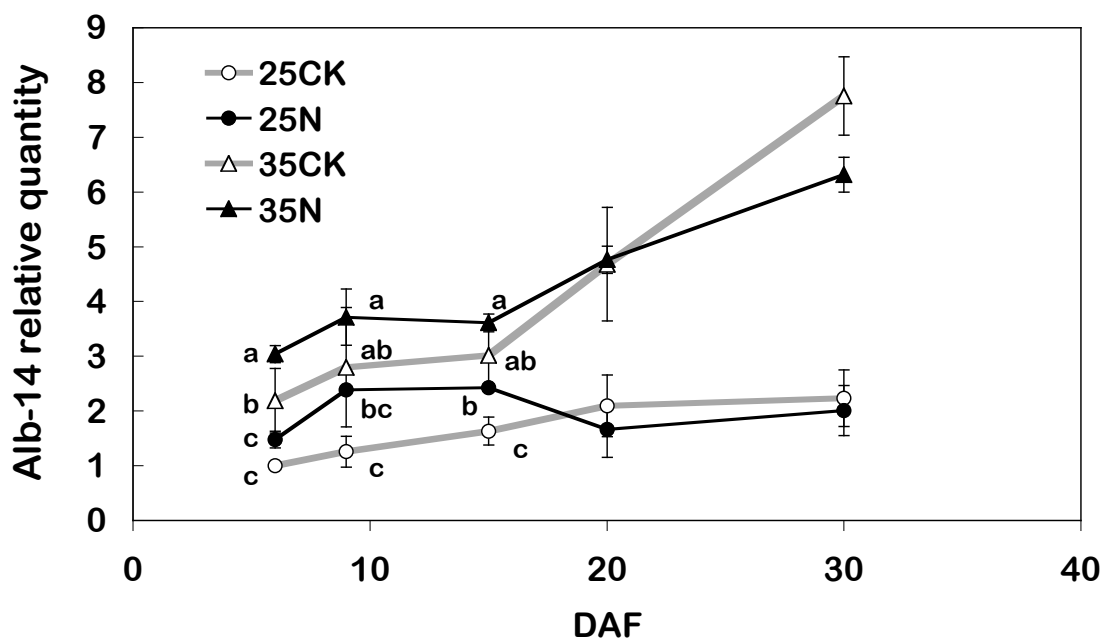


圖 21、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 albumins-14 (putative heat shock protein) 的含量變化。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

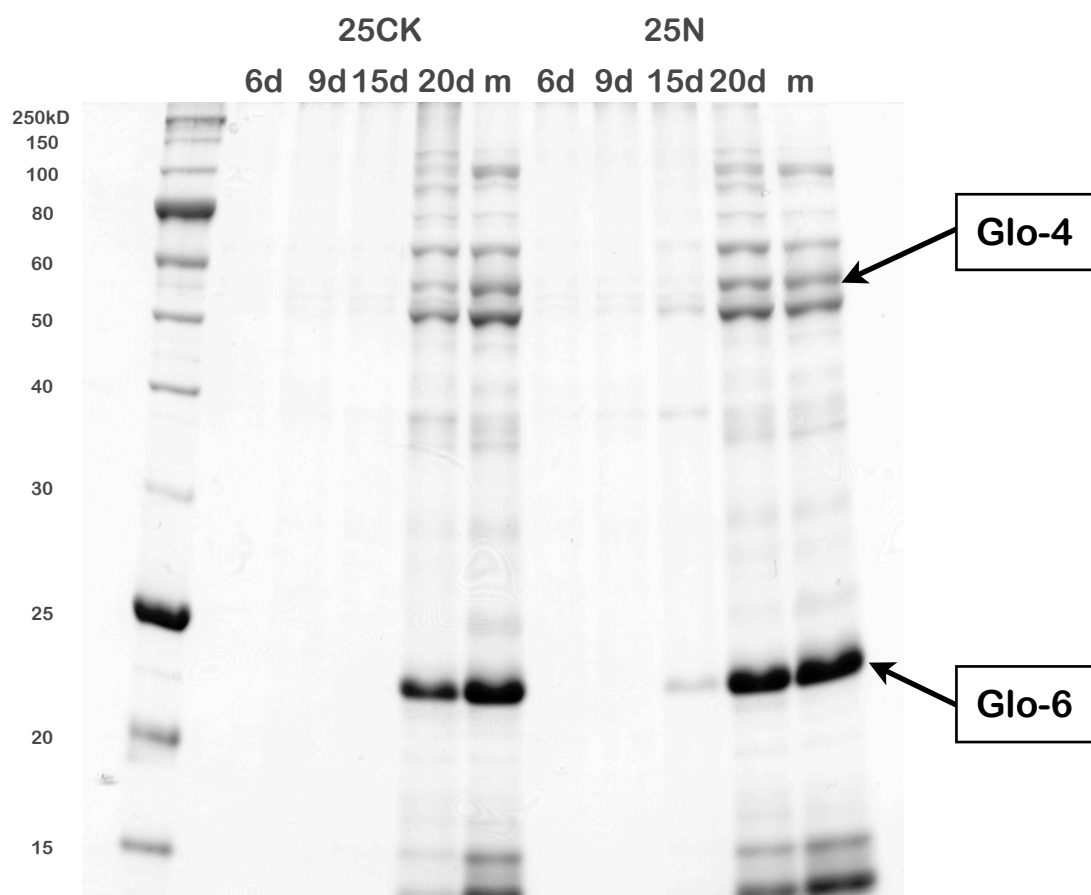


圖 22、氮素處理對常溫生長下 TK 9 充實期穎果內 globulins 電泳分析。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20、DAF mature (M)。

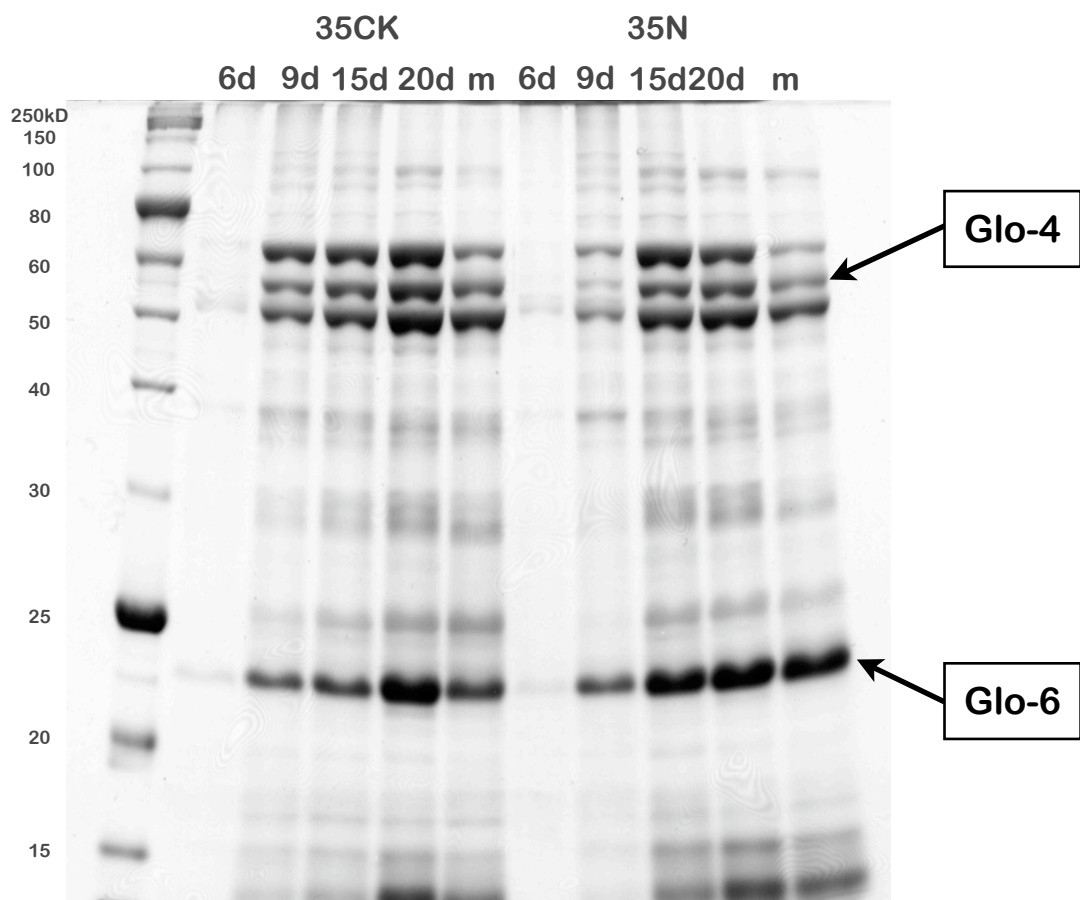
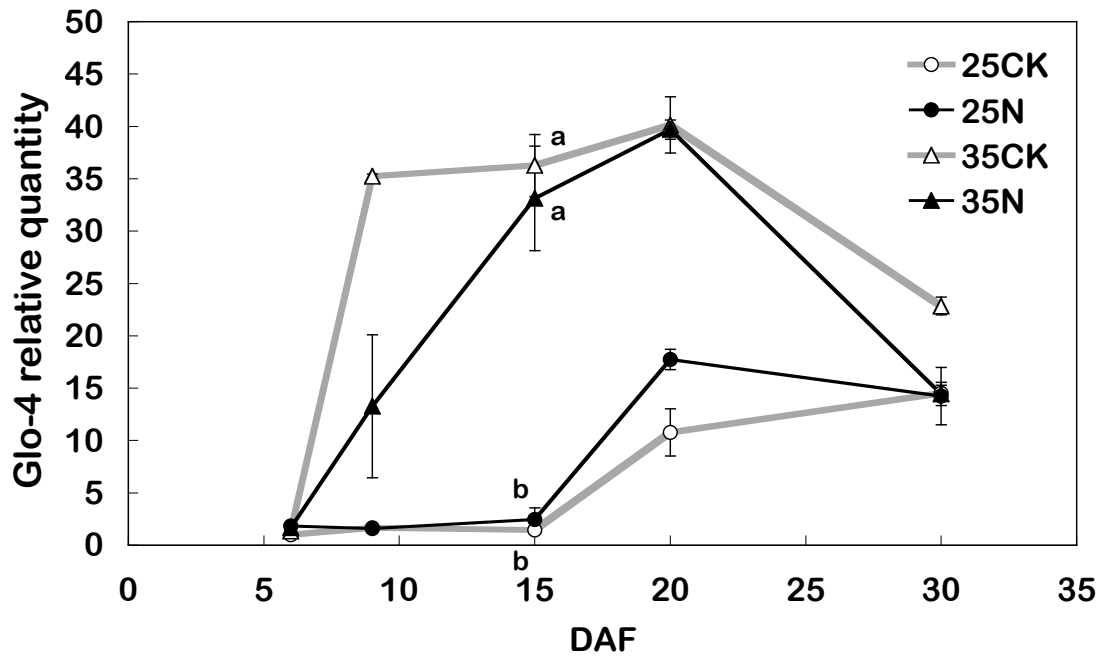


圖 23、氮素處理對高溫生長下 TK 9 充實期穎果內 globulins 電泳分析。35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組，各別有五充實期，分別是 6、9、15、20、DAF mature (M)。

A.



B.

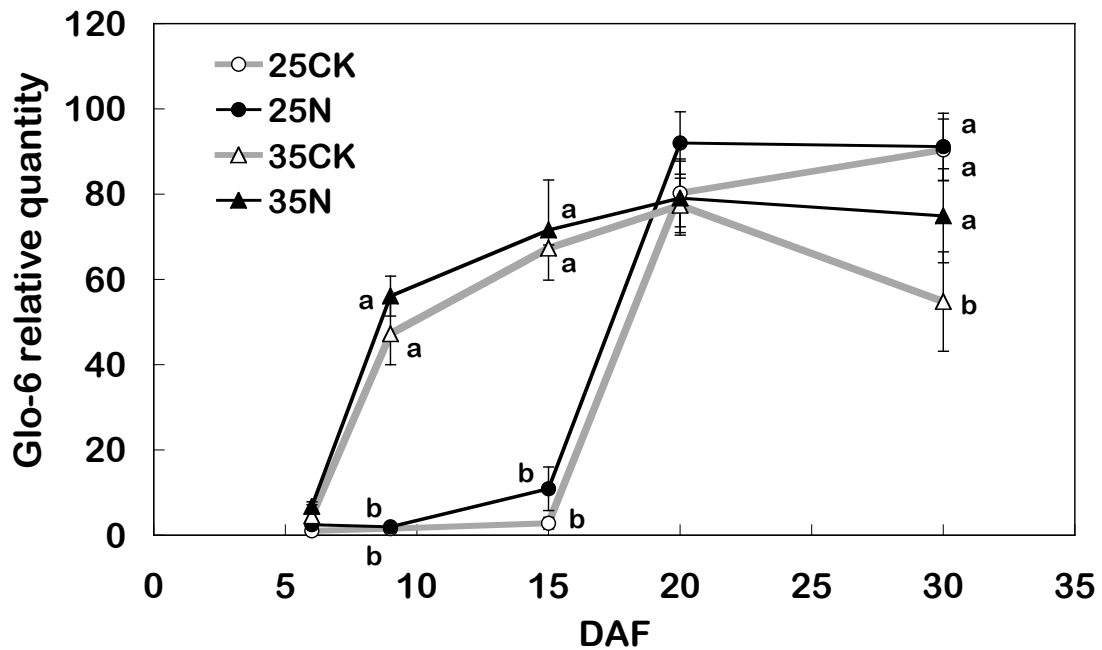


圖 24、高溫與氮素處理對 TK 9 穎果充實期的 globulins 的含量。A. globulins-4 (protein disulfide-isomerase) 。 B. globulins-6 (19kDa globulin precursor) 。數值為三重複之 mean \pm SE。25CK：常溫處理組；25N：常溫氮素組；35CK：高溫處理組；35N：高溫氮素組。圖上相同字母表示在 LSD 測驗下 $\alpha = 0.05$ 之顯著水準下無顯著差異。

陸、討論

一、氮素恢復高溫所降低的產量構成要素

劍葉光合作用所產生的碳水化合物，認為是提供穎果充實的主要來源之一（林, 2008），本研究圖 1 可以看出在常溫或高溫的環境下，氮肥都可提高水稻劍葉的葉綠素值，但是高溫對劍葉老化的加速在此次試驗並不顯著。Satake 在 1995 的研究指出，水稻對溫度最敏感的時間第一個是開花期，第二是孕穗期。水稻在開花期遭遇高溫，會降低水稻花粉的數量或在柱頭上的發芽（Matsui *et al.*, 2000, 2001），此次試驗結果發現高溫處理的確降低了水稻穀粒的稔實率（圖 3 A）、結實率（圖 3 B），而氮素處理在常溫下的穎果稔實率與結實率沒有顯著差異，但是在高溫下則可以恢復部分稔實率與結實率，雖還不足以恢復到常溫的程度，但已顯示氮素處理有助於水稻開花與穎果充實期抵抗高溫逆境。

前人研究指出，一般認為提高氮素量可以提高水稻的產量，本試驗結果顯示，在常溫下的氮素處理（25N）的確提高穎果充實後期的鮮重與成熟糙米乾重（圖 4），而高溫處理會使穎果充實提早且速率提高、提早（Jiang *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2005; 林, 2005），而高溫的氮素處理使穎果充實前期的鮮重有顯著的提升，而最後糙米乾重並沒有顯著的差異（圖 4）。高溫下的氮素效應雖然從糙米乾重來看沒有差異，但是顯著提昇的稔實率與結實率對產量已經有相當大的幫助。

二、氮素處理改善高溫下穎果外觀品質

前人研究顯示，種子種（果）皮上的葉綠素可以提供能量（ATP/NADPH）（Ruuska *et al.*, 2004）與氧氣（Rolletschek *et al.*, 2004）給種子內部低氧區域利用，本試驗圖 5 顯示，高溫處理（35CK）下使穎果的種（果）皮在 15 DAF 開始有黃化情形，20 DAF 則呈現整顆白色，表示其能量與氧氣的供給逐漸失去失去作用，充實期提早結束，而高溫氮素處理（35N）的穎果在 20 DAF，其背部維管束仍維持綠色，在圖 7 的葉綠素含量試驗中，15、20 DAF 也顯示 35N 的含量顯著高於 35CK，表示能量與氧氣供給的時間比起 35CK 長，也顯示氮素延長了穎果在高溫下的充實期。雖然 35N 最後糙米乾重沒有比 35CK 高，但從圖 6 C、D 可看出 35N 比起 35CK，白垩質的程度有所改善，而白垩質是因為澱粉粒的堆疊遭到破壞造成空隙，經過光線的照射所產生（Tashiro., 1991），暗示 35N 相較 35CK 延長的充實期可能有助於澱粉粒的堆疊。

三、氮素減緩穎果遭遇高溫後產生的氧化逆境與能量維持

高溫逆境使植物誘導一系列 ROS 的產生與代謝，過氧化氫（ H_2O_2 ）是其中一個重要的中間性分子，甚至可作為一種逆境訊息傳導物，其可與 heat shock factors 作用，引發後續抵抗高溫逆境的基因表現及生理反應（Miller and Mittler, 2006）。Calvin-cycle 的酵素對於過氧化氫相當敏感，會影響細胞內能量的產生，高濃度的過氧化氫甚至會抑制二氧化碳的固定（ CO_2 fixation）與損害 DNA，導致細胞死亡（Scandalios, 1993; Kaiser and Bassham, 1979），故過氧化氫含量可作為細胞損害程度的一種指標。圖 8 A. 顯示 25N、35N 的過氧化氫濃度比 25CK、35CK 低，而常溫組雖然在濃度上是呈現逐漸下降的趨勢，但是在圖 8 B 每粒穎果的過氧化氫含量顯示是一個逐漸累積的趨勢，並對照在圖 5 的穎果充實

期外觀，常溫的 15、20 DAF 是穎果充實快速期（rapid grain-filling phase, RGFP），可能是其鮮重的快速累積使得過氧化氫濃度下降，反觀高溫處理組的濃度與充實期外觀，由於充實期的提早，鮮重明顯高於常溫組（圖 4），一開始濃度雖然較低，但是到充實後期的濃度比常溫組高（圖 8 A），而且圖 8 B 中 35CK 的過氧化氫含量在充實期各階段都顯著高於常溫組，35N 則是到 20 DAF 才高於常溫組，但是仍然比 35CK 低，表示高溫下的氮素處理的確對穎果內部氧化逆境有改善之功能。

在能量狀態的表現上，由於前人的研究指出，種子充實過程是處於一個低氧的環境，其氧氣含量的分佈也關係著能量的分佈（Rollestchek *et al.*, 2004），而高溫處理會使種子內部氧氣含量更低（Rollestchek *et al.*, 2007），代表水稻穎果在高溫處理下可能會造成一個比常溫含量更低的低氧環境，其能量分子來源會更加缺乏。圖 9 A 以 ATP 濃度顯示常溫組是呈現先上升後下降的趨勢，而高溫組的濃度則是逐漸下降，從圖 9 B 以每粒穎果顯示常溫組的 ATP 是呈現逐漸累積，而高溫組則是先上升後下降。無論從濃度或每粒穎果的角度來看高溫組的能量狀態，到充實後期都是呈下降的趨勢，並且對照圖 4 的高溫組，表示到充實後期的確是邁向細胞死亡的情形，而常溫組在圖 9 B 的 ATP 累積情形也符合穎果快速充實期需要大量的能量來合成與累積儲存物質。氮素的效應在常溫下可以看到 ATP 含量顯著的提升（圖 9 A、B），顯示似乎有一條透過施加氮素而調節其氮代謝來產生能量的路徑。在 Stoimenova 等人在 2007 年的研究指出，水稻與玉米的根在低氧的環境下可由 nitrite 代替氧氣，當做粒線體細胞膜上電子傳遞鏈的電子受體（electron acceptor）來產生 ATP，nitrite 轉變成 nitric oxide (NO) 到細胞質中經過 hemoglobin (Hb) 作用變成 nitrate，再經過 nitrate reductase (NR) 作用變回 nitrite，另外在 Rolletschek 等人 2007 年的研究中發現，種子充實的過程

有 NO 的產生，並且 NO 的含量與氧氣成反比，外加的 NO 會使種子內生氧氣含量下降，表示 NO 會抑制氧氣在種子內的含量，推測植物在低氧環境下可能透過此氮代謝途徑來獲取 ATP (Igamberdiev and Hill, 2009)，故吾人推測施加氮素則是提供水稻穎果更多的氮源來進行此氮代謝途徑來產生更多的 ATP，其與 NO 間的關係值得進一步的探討。

四、氮素透過提昇穎果內氨基酸含量來減緩高溫逆境反應

由於細胞的酸化會引起 PCD (Drew *et al.*, 2000)，所以本研究測量水稻糙米的 pH 值可以看出溫度處理間 PCD 程度之不同。圖 10 顯示高溫處理下的 pH 值顯著低於常溫處理組，而 35CK 死米的 pH 比完整粒更低，常溫與高溫處理下的氮素效應在完整粒中沒有顯著差異，但是在高溫組的死米之間，雖然沒有顯著差異，但是從平均值來看，35N 的 pH 值比 35CK 有所提高。在 pH 值試驗中證實高溫處理下的確會降低水稻穎果的 pH 值，表示高溫逆境有提高細胞酸化程度的可能，另外比對 amino nitrogen 的分析結果 (圖 11 A、B)，高溫處理組的成熟糙米中，free amino acids 含量的確高於常溫組，可以呼應前面高溫下糙米 pH 值下降的結果。

由於高溫組的 amino nitrogen 含量趨勢明顯與常溫組不同 (圖 11 B)，有提早且提高的情形，故本研究進一步分析其中各種氨基酸的變化。透過 HPLC-FLD 測量 25 種氨基酸的結果，發現 glutamate 和 alanine 兩種氨基酸變化量最大的。因為 glutamate 是穎果儲存性蛋白質的合成原料之一，所以在常溫下的量本來就不低，但是高溫處理後，到 9 DAF 的含量顯著提高，9 DAF 之後 glutamate 含量快速下降，氮素的處理可以維持到 15 DAF 之後再下降，應該與延長的充實期有關 (圖 5)，35CK 的成熟糙米中，glutamate 含量明顯高於常溫組甚至

35N (圖 12 A)，由於 glutamate 屬於酸性，表示高溫處理下成熟糙米可能仍殘留許多 glutamate 未合成蛋白質與貢獻了部分降低 pH 值。常溫組的 alanine 含量即便加了氮素也沒有顯著的變化 (圖 12 B)，但是高溫處理會明顯提高 alanine 含量，35N 的含量更明顯高於 35CK，表示水稻穎果在高溫下的氮源利用傾向走合成 alanine 的路徑。前人研究顯示在低氧逆境下，植物組織會有大量的 alanine 累積 (Reggiani *et al.*, 1988; Kikuchi *et al.*, 1999; Kinnersley and Turano, 2000)，如水稻種子在浸水發芽時也是處於一個低氧環境，鞘葉 (coleoptiles) 也有大量的 alanine 累積 (Kato-Noguchi and Ohashi, 2006)，又因為 Rolletschek 等人 (2002) 發現種子充實處於一個低氧環境，2007 年又發現高溫會造成種子內氧氣含量更低，因此推測 alanine 的上升與高溫及水稻穎果內部的低氧氣含量有關。

上述提到除了利用 Nitrite 的路徑來合成 ATP，糖解作用 (glycolysis) 也是在低氧環境下產生 ATP 的方法之一，糖解作用的產物是 pyruvate，pyruvate 的代謝途徑可能透過 lactate dehydrogenase (LDH) 與 pyruvate decarboxylase (PDC) 產生 lactate 與 ethanol，兩者皆會造成細胞酸化的情形，pyruvate 可以透過 alanine amino transferase (AlaAt) 與 glutamate 產生 alanine 與 α -ketoglutarate (Gibbs and Greenway, 2003)，由於 alanine 的 pH 值屬於中性，其累積不會造成細胞質酸化，而且可以平衡細胞的膨壓 (Kato-Noguchi and Ohashi, 2006)，透過 ^{14}C 與 $^{15}\text{NO}_3^-$ 同位素分析發現，植物在低氧環境下會傾向合成 alanine，累積在細胞內作為碳與氮源的貯積 (Smith and Rees, 1979; Fan *et al.*, 1997)。Kikuchi 等人在 1999 年的研究發現，AlaAt 表現在水稻穎果靠近糊粉層的胚乳細胞，其位置與水稻穎果累積與合成儲存性蛋白質的區域相符合 (Leesawatwong, 2005)，表示 alanine 的累積也與儲存性蛋白質的合成有關。綜合上述前人研究與圖 12 B，推測水稻穎果在常溫充實過程下適應某種程度的低氧

環境，所以 alanine 在充實期的含量表現平緩，高溫可能使水稻穎果內部氧氣含量下降，造成一個低氧逆境，而水稻穎果透過 AlaAt 合成大量的 alanine 來適應低氧逆境，代謝 pyruvate 以利於糖解作用的進行和紓緩細胞酸化，而合成大量的 alanine 也可能是造成水稻穎果在高溫下缺氮原因之一，施加氮素則會傾向把氮源的利用往 alanine 的合成進行，以利於低氧環境下碳與氮源的平衡和合成儲存性蛋白質。

五、氮素對水稻穎果儲存性蛋白質的影響

1、Glutelins and Prolamins

水稻穎果中，glutelins 是主要的儲藏性蛋白質（簡等, 1997），研究發現高溫下會影響其含量，因品種的不同而有不同趨勢，對成熟穀粒而言，glutelins 都是呈現減少的趨勢（林, 2005）。圖 15 A、B 顯示在成熟穀粒 35CK 和 25CK 間沒有顯著差異，但是氮素處理（25N）下 α -glutelins 和 β -glutelins 顯著提昇。圖 15 A、B 顯示高溫處理的穎果在充實前期 6、9、15 DAF，比起常溫的 glutelins 有顯著的提升，而 35N 與 35CK 之間表現出顯著的差異。glutelins 含量快速累積時期，可與氨基酸含量下降的趨勢相呼應（圖 12），常溫下，glutamate 與 alanine 在充實後期含量快速下降，常溫處理的 glutelins 含量快速上升；高溫處理下，glutamate 與 alanine 在 9 DAF 到達累積最高點，然後含量快速下降，同時也是 glutelins 快速累積的時期，顯示水稻穎果在高溫下會先快速累積 glutelins。prolamins 在高溫的影響下也會提早累積，但是累積速率不及 glutelins，而且到成熟期糙米中含量還會下降許多，氮素的影響在後期 20、30 DAF 才有顯著差異，可以將 prolamins 的含量恢復到 25CK 的水平（圖 16）。前人研究指出，prolamins 含量過高可能造成口感偏硬且外觀顏色偏黃，與口感呈現

負相關，且人體對 prolamins 的消化率較低，故營養價值較低（簡等, 1997）。此次試驗是在開花時的時候施加氮素，由於 prolamins 的合成時間較 glutelins 晚，所以在穎果充實早期多貢獻在 glutelins 上，後期為恢復 prolamins 的含量。此外，Lisle 等人在 2000 年指出，稻米氮素含量的減低，會使胚乳內澱粉及蛋白質的堆疊（packing）狀態改變，產生白堊質的現象，推測由於 prolamins 位於水稻穎果蛋白質體 I（Pb-I），本研究所發現之高溫下穎果 prolamins 含量降低，可能造成蛋白質體的缺乏，進而影響到胚乳內澱粉粒的堆疊而促進白堊質的發生。

2、Albumins and Globulins

Albumins - Alb-7

水溶性蛋白質 albumins 與 globulins 雖然在水稻穎果儲存性蛋白質所佔有的含量少，但是多屬於活性蛋白質，故其重要性也不容小覷（簡等, 1997; 潘, 2005）。本試驗根據本實驗室建立之儲存性蛋白質定序資料比對結果（潘, 2005），挑選出三個有差異性且已知的 albumins 進行分析，分別是 Alb-7、Alb-8 和 Alb-14。Alb-7 推測為 ATP 合成酵素相關蛋白質（ATP synthase β chain），圖 19 顯示高溫會誘導 Alb-7 含量上升，與圖 9 B 高溫組充實前期 ATP 含量提高的結果相呼應，後期 Alb-7 含量累積停止，ATP 含量也逐漸下降，施加氮素在此沒有明顯的差異。

Albumins - Alb-8

Alb-8 定序的身分推測為 alanine amino transferase（AlaAt），高溫處理會使 Alb-8 的表現量提高，與高溫下穎果內 alanine 含量的提升相符（圖 12 B），氮素

的處理在高低溫的表現皆不顯著，而 35N 的 alanine 含量高於 35CK，推測應該與酵素的活性有關。前人研究發現，將 AlaAt 轉殖到植物根部組織可以提高氮素的利用效率 (NUE)，增加植物的 biomass 與產量 (Miyashita *et al.*, 2007)，而 AlaAT 現在被認為多與低氧逆境相關，逆境下的碳氮平衡與利用相當重要 (Shrawat *et al.*, 2008)，故推測在本次試驗中，高溫處理對水稻造成的低氧逆境，誘導穎果提高 alanine amino transferase 表現以利於逆境下的碳氮平衡，而氮素的添加則有助於平衡反應的進行。

Albumins - Alb-14

Alb-14 定序出來的身分推測為 16.9 kDa heat shock protein (HSP)，生物體遭遇到溫度提昇的逆境時，皆可觀察到有 HSP 的產生來保護細胞運作 (Lindquist, 1986)，例如高溫處理後的植物復原中，有 HSP 的產生來保護 mRNA (Nover *et al.*, 1991)。依據分子量的不同分成 high molecular-mass (HMM) 和 low molecular-mass (LMM) 的 HPS，而水稻的 16.9 kDa HSP 為 LMM，其特性為可普遍存在於細胞中的各種胞器內 (Yeh, 1995)。圖 21 顯示常溫處理下，穎果內的 HSP 表現量穩定，氮素處理 (25N) 有些為提高含量，而高溫處理下則顯著提高充實後期的 HSP 含量，表示充實後期的高溫逆境更為險峻，對照圖 12 B. 的 alanine 含量，推測充實前期透過合成 alanine 之路徑來減緩高溫逆境，但是隨著穎果的充實，快速消耗 alanine 與其他氨基酸來累積儲藏物質，水稻穎果進而轉由產生 HSP 來保護穎果內組織，研究發現小麥種子在發芽時也會產生 HSP 來保護胚的發育 (Helm, 1989)，故推測充實後期產生的 HSP 也可能用於保護胚細胞的完整性。

Globulins - Glb-4

鹽溶性儲藏蛋白質在高溫下的差異表現方面，Glo-4 定序出的來的身分推測為 protein disulfide isomerase (PDI)，在水稻穎果充實中扮演區分 proglutelins 與 prolamins polypeptides 的角色 (Takemoto *et al.*, 2002)，除此之外，PDI 也扮演了在逆境下維持 chaperone 的活性來結合目標 polypeptides 與蛋白質的摺疊 (Ray, 2003)，PDI 的表現量也可當做一種逆境的指標。在玉米的研究中，PDI 的功能也與胚乳中蛋白質體的形成相關 (Li and Larkins 1996)。常溫下 PDI 表現量與 glutelins、prolamins 開始快速累積的時間相當 (圖 24 A 與 15、16)，高溫處理下則顯著提高 PDI 的含量，除了與高溫下 glutelins、prolamins 快速累積的時間相似外，也顯著高於在常溫下的含量 (圖 24 A.)，推測除了與儲存蛋白質的合成功能相關之外，也可能與維持高溫逆境下 chaperone 的活性有關。

Globulins - Glb-6

Glo-6 定序出的來的身分推測為 19 kDa globulin precursor，為 globulins 合成的重要前驅物，常溫下於 15 DAF 後開始快速累積，而高溫下則會提早累積。19 kDa globulin 又稱為 α -globulin，其富含 glutamate 與 arginine，但缺乏人體必須氨基酸 lysine，提高 lysine 含量為育種改良的目標之一，以 lysine 取代 arginine 之位置對蛋白質的摺疊影響最小，而 α -globulins 與 glutelins 中的酸性 subunits 共處於蛋白質體上相同之位置，故 globulins 也存在於 Pb-II 之中 (Shorrosh *et al.*, 1992)，推測其含量多寡也會影響到 Pb-II 的堆疊。氮素的效應在常溫下沒有顯著差異，但是在高溫下的成熟糙米當中，35N 的含量顯著高於 35CK，表示高溫下添加氮素有助於 globulins 的合成。

柒、結論

根據本試驗各項分析結果顯示，水稻穎果的氮素利用與流動在高溫下的改變可能有個兩階段：一是高溫下穎果內能量的缺乏，造成儲藏物質合成途徑受影響。二是碳與氮素之間的競爭影響儲藏性蛋白質的累積。綜合以上試驗結果與討論，本論文推論出一水稻穎果充實期於高溫逆境下氮素利用途徑與米質影響模式圖（附圖 3）。詳細說明如下：

一、高溫下穎果內能量的缺乏，造成儲藏物質合成途徑受影響

種子充實過程中，內部處於一個低氧環境，高溫處理可能造成水稻穎果內的氧氣含量降低，造成低氧逆境，使得原先產生 ATP 的途徑受到阻礙，進而轉由其他途徑來獲取 ATP，例如糖解作用（glycolysis）與 nitrite-driven ATP synthesis。低氧逆境下使穎果內提高糖解作用，造成澱粉累積遭到破壞，以獲取足夠的 ATP 與 NADPH，同時前人研究發現在低氧逆境下，植物組織可以透過 nitrite 代替氧氣，當做粒線體內膜上電子傳遞鏈的電子接受者，產生內外膜氫離子濃度差經過 ATP synthase 來產生 ATP，而 nitrite 接受電子後產生的 NO 會抑制氧氣的含量，NO 經過 hemoglobin 還原成 nitrate，又因為前人研究也發現種子內充實過程有大量 NO 產生，其含量與氧氣成反比，增加 nitrite-driven ATP synthesis 在水稻穎果內之可能性。本試驗結果顯示高溫處理下穎果內的 ATP 含量減少，添加氮素後穎果內 ATP 與 alanine 的含量顯著上升，同時過氧化氫的含量也顯著下降，表示添加氮素後可平衡碳與氮源的利用，以致於降低氧化逆境現象的發生，延緩 PCD 的發生與延長穎果充實期。

二、碳與氮素之間的競爭影響儲藏性蛋白質的累積

糖解作用產生的 pyruvate 透過 alanine amino transferase 與 glutamate 代謝成 alanine 與 α -ketoglutarate 以避免細胞的酸化。nitrite-driven ATP synthesis 會消耗掉 NO_3^- ，而 NO_3^- 也是合成 glutamate 的原料。在高溫下碳（pyruvate 代謝）與氮（nitrite-driven ATP synthesis）彼此競爭使得中間物 glutamate 與 alanine 在穎果充實前期含量快速升高，同時穎果也要累積儲藏性蛋白質，而 glutamine 在高溫下含量降低（data not shown），推測是為了增加 glutamate 的含量，但是充實期的提早結束仍然造成穎果缺氮情形，限制儲藏性蛋白質的合成，其中以 prolamins 最為明顯，其次為 globulins。prolamins 存在於 Pb-I 之中，Pb-I 的累積時間要在 15 DAF 左右，而 Gobulins 存在於 Pb-II 中。穎果充實期的提早結束與 prolamins 和 globulins 的減少，可能造成 Pb-I 和 II 與澱粉粒堆疊不完全，同時糖解作用破壞澱粉粒結構，造成白堊質的發生。

高溫處理添加氮素後，品質上讓白堊質有些微降低，產量上讓稔實率與結實率顯著提高，其原因可能由於 alanine、ATP、prolamins 與 globulins 的含量顯著提高，推測氮素添加對碳與氮的平衡有所助益，使穎果充實完全，白堊質降低。

本試驗的結果提供水稻穎果在高溫下可能的氮素利用途徑，但是仍有許多相關路徑有待未來加以確認。

捌、參考文獻

- 小葉田亨、安原宏宣。(2005)。温暖化する気象条件下での早期栽培イネにおける品質・収量低下に対する技術的対応. 日本作物學會紀事 74: 80-93
- 戸刈義次。(1963)。作物學試驗法。東京農業技術學會印行。第159-176頁
- 朱鈞、盧虎生。(1984)。一、二期作水稻穀粒充實特性與產量構成要素之關係. 台灣省農業試驗所特刊 16: 165-179
- 林韶凱。(2005)。高溫與水稻穎果基因表現及稻米品質形成相關性之研究. 國立台灣大學農藝學系博士論文
- 林韶凱、盧虎生。(2004)。稻米品質之形成及蛋白質之功能. 科學農業 52: 76-83
- 孫太升、趙華、宋慶乃。(2004)。乳白米粒等劣質稻米的性狀成因和日本防止發生的方法. 中國稻米 4: 43-45
- 程方民、張嵩午。(1999)。水稻籽粒灌漿過程中稻米品質動態變化及溫度影響效應. 浙江大學學報(農業與生命科學版) 24: 347-350
- 黃基倬。(1995)。水稻穀粒充實期間溫度對稻米品質及貯藏性蛋白質累積之影響。碩士論文。國立台灣大學農藝學研究所。台北。台灣。
- 潘成玉。(2005)。氮素對水稻穀粒蛋白質表現及品質形成之影響。碩士論文。國立台灣大學農藝學研究所。台北。台灣。
- 盧虎生、劉韻華、中央氣象局第三組農業氣象科。(2006)。臺灣優質水稻栽培之環境挑戰與因應措施. 作物、環境與生物資訊 3: 297-306
- 簡珮如、盧虎生、朱鈞。(1997)。稻米貯藏性蛋白質性質與品質改進. 科學農業 45: 200-206
- Alpi A, Beevers H (1983) Effects of O₂ concentration on rice seedlings. Plant Physiol 71: 30-34**
- Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 223-250**

- Drew MC, He CJ, Morgan PW** (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* **5**: 123-127
- Fan T-W-M, Higashi R-M, Frenkiel T-A, Lane A-N** (1997) Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerant rice coleoptiles. *J. Exp. Bot.* **48**: 1655-1666
- Furuta M, Yamagata H, Tanaka K, Kasai Z, Fujii S** (1986) Cell-free synthesis of the rice glutelin precursor. *Plant Cell Physiol* **27**: 1201-1204
- Gibbs J, Greenway H** (2003) Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* **30**: 1-47
- Guglielminetti L, Perata P, Alpi A** (1995) Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiol* **108**: 735-741
- Helm KW, Petersen NS, Abernethy RH** (1989) Heat shock response of germinating embryos of wheat : effects of imbibition time and seed vigor. *Plant Physiol* **90**: 598-605
- Hoshikawa K** (1967) Studies on the development of endosperm in rice. 1. Process of endosperm tissue formation. *Jpn. J. Crop Sci.* **36**: 151-161
- Huebner FR, Bietz JA, Webb BD, Juliano BO** (1990) Rice cultivar identification by high-performance liquid-chromatography of endosperm proteins. *Cereal Chem* **67**: 129-135
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Ann Bot (Lond)* **103**: 259-268
- Iida S, Amano E, Nishio T** (1993) A rice (*Oryza sativa* L.) having a low content of glutelin and high content of prolamine. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 353-356

- Jabs T** (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* **57**: 231-245
- Jacobson MD** (1996) Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**: 83-86
- Jana S, Choudhuri M** (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat Bot* **12**: 345-354
- Jiang H, Dian W, Wu P** (2003) Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme. *Phytochemistry* **63**: 53-59
- Kaiser WM, Bassham JA** (1979) Carbon metabolism of chloroplasts in the dark: Oxidative pentose phosphate cycle versus glycolytic pathway. *Planta* **144**: 193-200
- Kato-Noguchi H, Ohashi C** (2006) Effects of anoxia on amino acid levels in rice coleoptiles. *Plant Prod Sci* **9**: 383-387
- Kikuchi H, Hirose S, Toki S, Akama K, Takaiwa F** (1999) Molecular characterization of a gene for alanine aminotransferase from rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol Biol* **39**: 149-159
- Kinnersley AM, Turano F** (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Cri Rev Plant Sci* **19**: 479-509
- Kondo M, Ishimaru T, Sanoh Y, Umemoto T** (2005) Research directions on grain ripening under high temperature in rice.(in Japanese). *Agric. Technol.* **60**: 462-470
- Koukalova B, Kovarik A, Fajkus J, Siroky J** (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett* **414**: 289-292

- Krishnan HB, Okita TW** (1986) Structural relationship among the rice glutelin polypeptides. *Plant Physiol* **81**: 748-753
- Kuwada Y** (1909) On the development of pollen and the embryo sac, and the formation of the endosperm, etc. of *oryza sativa* L. *Bot. Mag.(Tokyo)* **23**: 334-343
- Lásztity R** (1984) The chemistry of cereal proteins. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Leesawatwong M, Jamjod S, Kuo J, Dell B, Rerkasem B** (2005) Nitrogen fertilizer increases seed protein and milling quality of rice. *Cereal Chem* **82**: 588-593
- Li CP, Larkins BA** (1996) Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize floury-2 mutant. *Plant Mol Biol* **30**: 873-882
- Lindquist S** (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**: 1151-1191
- Lin SK, Chang MC, Tsai YG, Lur HS** (2005) Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics* **5**: 2140-2156
- Lisle AJ, Martin M, M.A. F** (2000) Chalky and translucent rice grains differ in starch composition and structure and cooking properties. *Cereal Chem* **77**: 627-632
- Macnicol PK, Jacobsen JV** (1992) Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. *Plant Physiol* **98**: 1098-1104

- Masumura T, Mitsukawa N, Tanaka K, Fujii S** (1991) Rice storage proteins : Genetic analysis of accumulation process. In Y.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. **14**: 495-507
- Matsui T, Omasa K, Horie T** (2000) High temperature at flowering inhibit swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Prod. Sci. **3**: 430-434
- Matsui T, Omasa K, Horie T** (2001) The difference in sterility due to high temperature during the flowering period among japonica rice varieties. Plant Prod. Sci. **4**: 90-93
- Matsushita S** (1958) Studies on the nucleic acids in plants. II. Variation of the ribonucleic acid contents of wheat and rice grains during ripening processes. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto. Univ **14**: 24-29
- Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G** (1989) Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance ro anoxia. Plant Physiol **90**: 29-32
- Miller G, Mittler R** (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? Ann Bot **98**: 279-288
- Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG** (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **49**: 1108-1121
- Moore S, Stein W** (1948) Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. Biol Chem **176**: 367-388
- Morita S, Shiratsuchi H, Takahashi J, Fujima K** (2004) Effect oh high temperature on grain ripening in rice plants. - analysis of the effect of

high night and high day temperatures applied to the panicle and other parts of the plant. *Jpn. J. Crop Sci.* **73**: 77-83

Nagata K, Takita T, Yoshinaga S, Terashima K, Fukuda A (2004) Effect of air temperature during the early grain-filling stage on grain fissuring in rice. *Jpn. J. Crop Sci* **73**: 336-342

Napolitano M, Shain D (2005) Quantitating adenylate nucleotides in diverse organisms. *Biochem Biophys Methods* **63**: 69-77

Nover L, Neumann D, Scharf KD (1991) Intracellular localization and related function of heat shock proteins. In *Heat Shock Response*. Edited by Nover, L.: 373-408

Noctor G, Foyer CH (1998) Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal. Chem.* **264**: 98-110

Perez CM, Joliano BO, Liboon SP, Alcantara LM, Cassman KG (1996) Effects of late nitrogen fertilizer application on head rice yield, protein content, and grain quality of rice. *Cereal Chem* **73**: 556-560

Perata P, Guglielminetti L, Alpi A (1997) Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Ann Bot* **79**: 49-56

Rahman M, Grover A, Peacock WJ, Dennis ES, Ellis MH (2001) effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *aust. J. Plant. Physiol* **28**: 1231-1241

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in

response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol* **53**: 741-754

Reggiani R, Cantu A-C, Brambilla I, Bertani A (1988) Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. *Plant Cell Physio* **29**: 981-987

Reggiani R, Nebuloni M, Mattana M, Brambilla I (2000) Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. *Amino Acids* **18**: 207-217

Rolletschek H, Borisjuk L, Koschorreck M, Wobus U, Weber H (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J Exp Bot* **53**: 1099-1107

Rolletschek H, Weschke W, Weber H, Wobus U, Borisjuk L (2004) Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains. *J Exp Bot* **55**: 1351-1359

Rolletschek H, Koch K, Wobus U, Borisjuk L (2005) Positional cues for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo. *Plant J* **42**: 69-83

Rolletschek H, Borisjuk L, Sanchez-Garcia A, Gotor C, Romero LC, Martinez-Rivas JM, Mancha M (2007) Temperature-dependent endogenous oxygen concentration regulates microsomal oleate desaturase in developing sunflower seeds. *J Exp Bot* **58**: 3171-3181

Rosario AR, Briones VP, Vidal AL, Juliano BO (1968) Composition and endosperm structure of development and mature rice kernel. *Cereal Chem* **45**: 225-235

- Ruuska SA, Schwender J, Ohlrogge JB** (2004) The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol* **136**: 2700-2709
- Sambrook J, EF Fritsch, TM Maniatis** (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S, Buttke TM** (1994) Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* **269**: 798-801
- Sarker SC, Ogawa M, Takahashi M, Asada K** (1986) The processing of a 57-kDa precursor peptide to subunits of rice glutelin. *Plant Cell Physiol* **27**: 1579-1586
- Sato K** (1964) Studies on starch contained in the tissues of rice plant. 10. Starch distribution in the tissues of flower and caryopsis with their development of growth. *Nippon Sakumotsu Gakkai Kiji.* **33**: 29-34
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* **101**: 7-12
- Shorrosh BS, Wen L, Zen KC, Huang JK, Pan JS, Hermodson MA, Tanaka K, Muthukrishnan S, Reeck GR** (1992) A novel cereal storage protein: molecular genetics of the 19 kDa globulin of rice. *Plant Mol Biol* **18**: 151-154
- Shrawat AK, Carroll RT, DePauw M, Taylor GJ, Good AG** (2008) Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotech J* **6**: 722-732

- Smith AM, Rees TA** (1979) Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. *Planta* **146**: 327-334
- Sousa CAF de, Sodek L** (2002) The metabolic response of plants of oxygen deficiency. *Braz. J. Plant Physiol.* **14**: 83-94
- Streb P, Feierabend J** (1996) Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rice leaves. *Bot Acta* **109**: 125-132
- Stoimenova M, Igamberdiev AU, Gupta KJ, Hill RD** (2007) Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* **226**: 465-474
- Takemoto Y, Coughlan SJ, Okita TW, Satoh H, Ogawa M, Kumamaru T** (2002) The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol* **128**: 1212-1222
- Terada S** (1928) Embryological studies in *Oryza sativa* L. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University* **19**: 245-260
- Tashiro T, Wardlaw I** (1991) The effect of high temperature on kernel dimensions and type and occurrence of kernel damage in rice. *Aust J Agri Res* **42**: 485-496
- van Dongen JT, Roeb GW, Dautzenberg M, Froehlich A, Vigeolas H, Minchin PE, Geigenberger P** (2004) Phloem import and storage metabolism are highly coordinated by the low oxygen concentrations within developing wheat seeds. *Plant Physiol* **135**: 1809-1821

- Walburg G, Larkins BA** (1983) Oat Seed Globulin: Subunit Characterization and Demonstration of its Synthesis as a Precursor. *Plant Physiol* **72**: 161-165
- Wen TN, Luthe DS** (1985) Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiol* **78**: 172-177
- Wintermans J, De Mots A** (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem Biophys Acta* **109**: 448-453
- Wopereis-Pura M, Watanabe H, Moreira J, Wopereis MCS** (2002) Effect of late nitrogen application on rice yield, grain quality and profitability in the Senegal River valley. *Europ. J. Agron.* **17**: 191-198
- Yamagata H, Tanaka K, Kasai Z** (1982) Evidence for a precursor form of rice glutelin subunits. *Agric. Boil. Chem.* **46**: 321-322
- Yamakawa H, Hirose T, Kuroda M, Yamaguchi T** (2007) Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using dna microarray. *Plant Physiol* **144**: 258-277
- Yeh CH, Yeh KW, Wu SH, Chang LPF, Chen YM, Lin CY** (1995) A Recombinant Rice 16.9-kDa Heat Shock Protein Can Provide Thermoprotection in Vitro. *Plant Cell Physiol* **36**: 1341-1348
- Yoshinaga S, Nagata K, Manabe Y, Kobayashi H, Takanashi JI** (1997) Effects of cultivation methods of rice on chemical content of brown rice and palatability of cooked rice in the Shikoku area. *Shikoku Nat. Agric. Exper. Station.* **61**: 75-81
- Young TE, Gallie DR** (2000) Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Mol Biol* **42**: 397-414

Zakaria S, Matsuda T, Tajima S, Nitta Y (2002) Effect of high temperature at ripening stage on the reserve accumulation in seed in some rice cultivars. Plant Prod. Sci. 5: 160-168

