

國立臺灣大學生物資源農學院農藝學系

碩士論文

Department of Agronomy

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

乙烯和多元胺對高溫下水稻穀粒發育的關係

Correlation among Ethylene, Polyamines, and  
Development of Rice Grains Growing under High  
Temperature

陳滢如

Ying-Ju Chen

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

# 誌謝

兩年前，剛考上研究所，從來沒進過實驗室，唯一的實驗經驗只有實驗課的情況下，懵懵懂懂的開始了這個研究。

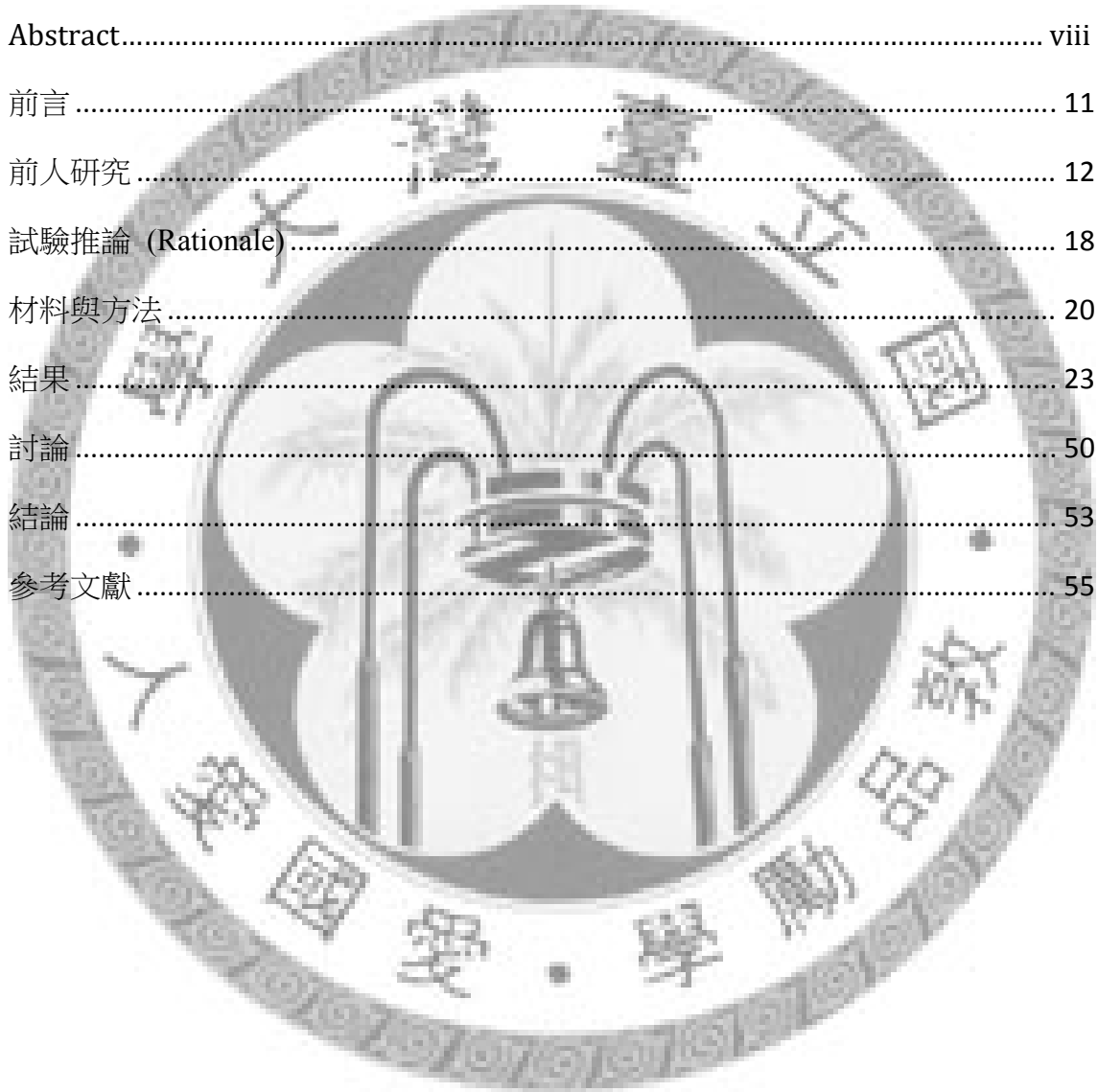
感謝我的指導教授盧虎生老師的耐心指導，老師嚴謹的態度，讓我了解重視細節的重要性，也讓我能夠從一次又一次的實驗失敗中，將實驗繼續下去。感謝朱鈞老師和張孟基老師在實驗及論文的完成過程中，給予許多的指導和建議。論文初稿承蒙陳宗禮老師、張素貞老師與羅正宗老師的細心指正並給予許多寶貴的意見，使論文的內容更加的完整充實，在此表示由衷的感謝。

感謝實驗室的佳諭、成玉、雪玉、雅貞、瑩瑋、芹如、學謙、佳伶、柏宏等學長姐們，在實驗上提供的意見以及生活上的幫助。實驗室總是話題提供者的以健，每周五放輕鬆的夥伴嘉玲和陳玄，還有一出現就很有爆點的佳勳，跟你們一起聊天和出遊真的很有趣，研究所生活變得豐富起來。細心又貼心的芳瑜，總是很有衝勁的凡萱，謝謝你們在實驗上提供的幫助，還有你們分享的好笑或很酷的東西，陪伴我度過許多挫折不開心的日子，和我有共同喜好的景雯，和你一起在實驗室分享日劇、雜誌的生活，讓我能夠有點期待的度過一些等待實驗結果的晚上。學無止盡的好夥伴們宗樺、瑩姿、妙珊、庭姿、祥霖，很喜歡這種可以一起玩耍又能一起念書激勵的感覺，最期待每周四的吃飯時間，一起分享生活上的點點滴滴，大學時代能夠和你們認識真的覺得很幸運。還有社團的好友們，凱兒定期的車車出遊團，一直都是最令人期待的旅行，謝謝你在一樣忙碌的研究所生活中不忘揪團，家偉和昱伶每周二的午餐團，總是會出現一些很莫名又讓人欲罷不能的話題。鈺珊、韻如和羽穎，每次和你們一起分享出國夢總是可以聊得很開心，如果以後大家都在不同的地方，但是還是能夠在 MSN 上分享自己所在的天空和生活，真的是很棒的事。

最後最感謝的當然是我的爸媽，還有我妹，總是對我在外面的忙碌和很少回家很包容，在我面對許多選擇的關卡的時候，總是支持我每個決定，也支持我想出國工作的夢想，給我很多的鼓勵，願將此論文獻給我最愛的家人。

# 目錄

口試委員審定書.....	i
誌謝.....	iii
中文摘要.....	vi
Abstract.....	viii
前言.....	11
前人研究.....	12
試驗推論 (Rationale).....	18
材料與方法.....	20
結果.....	23
討論.....	50
結論.....	53
參考文獻.....	55



# 圖表目錄

圖 1. TK9 水稻在開花期遭受高溫對於充實率的影響。.....	24
圖 2. 高溫處理對於水稻上下穗位乙烯釋放量的影響。.....	26
圖 3. 高溫對穀粒充實期間穎果充實速率的影響。.....	31
圖 4. 高溫對於劍葉 SPAD 值的影響。.....	32
圖 5. 高溫對穀粒充實期穗乙烯釋放量的影響。.....	34
圖 6. 高溫對上下穗位穀粒重量的影響。.....	35
圖 7. 處理乙烯抑制劑及釋放劑對穀粒重量的影響。.....	37
圖 8. 高溫對上下穗位穀粒外觀完整米與白垩質米粒比例的影響。.....	38
圖 9. 外加乙烯釋放劑和抑制劑對完整米率和白垩質米粒比例的影響。.....	40
圖 10. HPLC 之 Polyamines 分析圖譜。.....	41
圖 11. 高溫對穀粒充實期總多元胺含量的影響。.....	43
圖 12. 高溫對穀粒充實期 putrescine 濃度的影響。.....	45
圖 13. 高溫對於穀粒充實期間 spermidine 濃度的影響。.....	47
圖 14. 高溫對於穀粒充實期間 spermine 濃度的影響。.....	49

# 中文摘要

為了瞭解在高溫下乙烯、多元胺對於穀粒發育的影響，本試驗採用栽培種台稈九號作為試驗材料，並區隔為上下穗位探討。對水稻抽穗前 6 天到開花後 8 天的各發育時期作 4 小時 35/30°C(日/夜)高溫處理發現，在高溫處理下的開花期水稻乙烯釋放量均明顯提升，但在抽穗前 3 天的時期高溫處理結果，乙烯釋放量下降。另外也收取水稻在 35/30°C 高溫處理下生長的穗計算充實率，結果發現在高溫下水稻上下穗位的平均充實率均比上穗位下降。

在穀粒充實期方面，35/30°C 高溫處理從水稻開花後第六天開始，水稻在高溫處理下，開花後第九天出現一個乙烯釋放量的高峰，而在第 15 天出現第二個高峰期，且全充實期乙烯釋放量均高於控制組。在 25/20°C 控制組下，在開花後 15 天和開花後 18 天出現乙烯釋放量的高峰，在穀粒的粒重方面，35/30°C 高溫生長下的穀粒粒重較控制組輕。為了進一步了解乙烯的釋放量提早且提升是否對於穀粒的重量及品質造成影響，我們使用乙烯抑制劑及乙烯釋放劑對穀粒充實期中最敏感的時期開花後 12 天~開花後 16 天作處理。結果發現在 25/20°C 控制組中使用乙烯釋放劑 ethephon 會造成穀粒粒重下降，白堊質比例提升，而在 35/30°C 高溫對照組中使用乙烯抑制劑 Ag(NO<sub>3</sub>) 則會使穀粒白堊質的面積下降。

在 35/30°C 高溫下充實的穀粒，總多元胺的含量較 25/20°C 控制組低。35/30°C 高溫下，Putrescine 含量則是在開花後第 12 天達到高峰，之後急速下降，25/20°C 控制組則是在開花後 15 天到達高峰，之後緩慢下降。Spermidine 在 35/30°C 高溫下全充實期在穀粒內含量均低於 25/20°C 控制組。Spermine 在 35/30°C 高溫下全充實期在穀粒內的含量均高於 25/20°C 控制組。這樣的情況在上下穗位中均有一致的結果。

綜合本研究結果發現，在高溫下水稻穀粒乙烯釋放量會增加且提早，而相對

於乙烯，多元胺的含量則是下降，顯示高溫下乙烯與多元胺的濃度失衡，而造成穀粒充實不良而粒重下降且產生白堊質。因此，乙烯和多元胺在穀粒發育過程中的平衡對於能否正常發育有著相當的重要性。

關鍵字：台梗9號、高溫、乙烯、充實率、穀粒品質、多元胺



# Abstract

Global warming is an important problem in this world. In Taiwan, the average temperature increased  $1.1^{\circ}\text{C}$  in the past century. Rice is known to be sensitive to high temperature, especially during grain filling stage. Some research revealed that rice had lower filling spikelet rate and chalky appearance under high temperature. Plant hormones involve in regulation of grain development. Reports showed that high ethylene evolution led to grain abortion or abnormal grain. And polyamines, as precursor competitors of ethylene, also play an important role on the grain filling stage. Nevertheless, few documents have been dealing with the role of ethylene and polyamines during grain filling stage under high temperature. The objective of this study was to explore the correlation among ethylene, polyamines, and grain filling under high temperature.

Cultivar TK9 was used as plant material. Panicles were sampled and separated into two groups, superior spikelets and inferior spikelets. Superior spikelets in general have higher grain yield and better quality than inferior spikelets. Physiological characteristics were determined and compared between superior and inferior spikelets under high temperature. First, the ethylene evolution rate was measured on booting stage to flowering stage under high temperature. Then we chose the panicles that were on the stage of 6 days before heading to 8 days after flowering, and transferred the plant material to  $35/30^{\circ}\text{C}$  (day/night) for 4 hours. Plant materials were also chosen on the day of heading and transferred to  $35/30^{\circ}\text{C}$  (day/night) until mature in order to count the filling spikelet rate. At the grain filling stage, panicles were chosen at the 6 days after flowering, and transferred to  $35/30^{\circ}\text{C}$  (day/night) until mature.

The results showed that spikelets fertility decreased under high temperature.

During the stage of 6 days before heading to 8 days after flowering, ethylene evolution rate increased under high temperature. Superior spikelets and inferior spikelets behaved similarly. There was significant negative correlation between ethylene evolution rate and spikelets fertility under high temperature.

At the grain filling stage, the results indicated that grain filling rate increased but stopped earlier under high temperature. Grain weight and grain quality also decreased under high temperature. In both superior spikelets and inferior spikelets ethylene evolution rate increased under high temperature. The result also showed significant negative correlation between ethylene evolution and grain yield. In order to clarify relationship between ethylene and grain yield,  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$  (ethylene inhibit agent) was applied under high temperature and ethephon (ethylene release agent) was applied under control temperature for 5 days on the panicle at the 12 days after flowering. Application of  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$  improved grains quality and increased weight, but application of ethephon decreased grains quality and weight. The results indicated that ethylene may have strong effect on the grain yield and quality under high temperature. Content of total polyamines were decreased under high temperature. Content of spermine increased under high temperature, while putrescine and spermidine decreased. The decrease in total polyamines content may induce negative effect on the grain yield and quality under high temperature.

In conclusion, this study found that an increased ethylene evolution rate might be related to the spikelets sterility under high temperature at the booting to flowering stage. At the grain filling stage, ethylene evolution rate increased and total polyamines decreased and may negatively affect the grain yield and quality under high temperature. In conclusion, the change of ethylene had temporal correlation with that of polyamines,



suggestion a correlative relationship in the regulation of caryopsis development under high temperature.

Key words : TK9 、 high temperature 、 ethylene 、 grain filling rate 、 grain quality 、 polyamines



# 前言

台灣的水稻栽培品種主要是以粳型稻(japonica type)為主,根據前人研究指出,粳型稻在穀粒發育期間遭遇超過 26°C 以上的高溫,會造成水稻充實率下降(Masui et al. 1997),成熟後的穀粒易產生白垩質(Tashiro and Wardlaw, 1991)。白垩質的產生是由於該處澱粉粒的結構較為鬆散,使光線不易透過而使外觀較為不透明。穀粒一旦發生白垩質的現象,外觀品質降低,在碾米的過程中也容易造成碎粒,降低碾米品質,另外,將使食米食味降低。而台灣位於亞熱帶及熱帶的氣候,尤其中南部的稻米生產區,穀粒充實期遭遇高溫幾乎為不可避免的現象。因此,研究高溫對於水稻穀粒發育的影響有相當的重要性。

植物荷爾蒙是一種在植物體內濃度極低,但在植物的生長發育中扮演重要角色的有機物質。乙烯(ethylene)是植物荷爾蒙之一,植物遭遇淹水、缺氧、高溫等逆境時,乙烯的含量會升高,造成葉片下表皮伸長或是提早老化。在近年來的研究中也指出,乙烯可能也調控種子發育過程,但是對於乙烯在高溫下的濃度變化以及對於穀粒發育的影響尚未有相關研究。

多元胺(polyamines)也是植物荷爾蒙之一,在逆境下,多元胺會有累積以降低逆境傷害的功用。乙烯和多元胺在植物體共用一個近乎相同的生合成途徑,在老化的相關研究中發現(Pandey et al., 2000),乙烯和多元胺會調控彼此濃度的變化。前人研究也指出(Yang et al., 2008),多元胺在水稻穀粒發育過程中,在上穗位中濃度比下穗位含量更高,此可能與一般上穗位的穀粒生育比下穗位的穀粒發育佳有關,但是在高溫下,穀粒中多元胺的含量變化也尚未有相關研究。

因此,本研究主要探討在高溫下水稻穀粒發育過程中,乙烯和多元胺的濃度變化,對於穀粒發育及品質的影響,另外,也將水稻的上穗位以及下穗位區分來做比較,以更明確的了解乙烯和多元胺對於高溫下穀粒發育的影響。

# 前人研究

## 一、全球暖化

全球暖化是由於溫室氣體 CO<sub>2</sub>、甲烷等在大氣層中的含量累積，使遠紅外線的吸收增加，而導致地球氣溫上升的現象。根據前人研究指出，大氣中的 CO<sub>2</sub> 含量已經由工業革命前的 280 ppm 上升到現在的 390 ppm (Adams et al., 1990)，而在過去三十年，平均氣溫已經上升 0.6°C，也比過去一世紀高了 0.8°C (Hansen et al., 2006)。氣溫變化對於作物生產的影響包括生長發育過程生理活動的變化，而這樣的變化最終會導致作物產量及品質下降 (Mendelsohn et al., 1994; Peng et al., 2004)。

而在台灣地區，根據聯合國的報告指出，台灣的平均氣溫從 1901 年到 2000 年總共上升了 1.1°C，暖化速率近乎全球平均值的兩倍，這樣的結果也導致夏天高溫的日數有持續增長的趨勢。台灣的水稻栽培種主要為粳型稻(japonica type rice)，粳型稻最適合於溫帶環境生長，且充實期均溫不超過 25°C。在這樣的情況下，台灣的粳稻栽培也將面臨產量及品質不佳的挑戰。

## 二、高溫與水稻產量的關係

水稻的產量構成要素主要是由單位面積穗數、稔實率、一穗粒數以及千粒重決定。在水稻抽穗之後，產量受到稔實率以及粒重的影響較大。

在 Osada 等人(1973)年的研究中發現，在高溫且乾旱的環境下，秈稻(indica type rice)空穎率有提高的趨勢，且高溫對於是否造成穎花不稔的影響是較為重要的。在開花的時期受到高溫的影響，會影響穎花的授粉成功與否，且主要的原因被認為是由於花粉的散出受到抑制、花粉本身活性下降、以及花粉管發育出現問題等 (Satake and Yoshida, 1978)。

在粳稻(japonica type rice)方面，Matsui 等人(1997)的研究也發現，在高溫下，抗性較高的品種 Koshihikari 花粉的釋放較為順利，而抗性較低的 Akihikari 則有許多花藥並未打開，且花粉管發育的情況也較差，因此認為在花粉散出前活性已下降。

花藥的開裂可能是導致水稻穎花授粉失敗的重要原因之一(Matsui et al., 2005)，而花藥的開裂以及花粉活性可能和植物荷爾蒙的調控相關。在花粉的發育過程中植物荷爾蒙的含量會發生變化(Durand and Durand, 1990)，透過 microarray 對發育中的水稻 microspores 分析發現，GA 以及 jasmonic acid 相關基因在過程中有大量表現(Wang et al., 2005)。在阿拉伯芥中，jasmonic acid 和 auxin 被發現能夠調控花藥開裂(Sanders et al., 2000; Ishiguro et al., 2001; Cecchetti et al., 2008)。乙烯也被發現在菸草中會調控花藥開裂的時間(Rieu et al., 2003; Wang and Kumar, 2007)。

乙烯是一種氣體的植物荷爾蒙，植物遭遇淹水、乾旱、冷害、或是出現傷口時、都會有乙烯的釋放，另外乙烯也是老化相關荷爾蒙。在高溫逆境的情況下，乙烯是否有釋放量的變化並造成水稻穎花花藥開裂障礙或花粉缺乏活性而導致授粉失敗造成空穎，尚未有相關研究。因此本研究透過測定開花時期乙烯釋放量來探討乙烯在穎花授粉時期所扮演的角色。

### 三、高溫與水稻穀粒品質的關係

台灣的水稻栽培種為粳型稻(japonica type rice)，粳型稻適宜生長的环境為均溫約 25°C，充實期均溫約 21~24°C 的环境，超過此溫度則造成水稻穀粒粒重下降、水稻外觀品質不良的影響(Tashiro and Wardlaw, 1991)。水稻的穀粒外觀品質，主要可以分為以下數種，完整米、背白粒、腹白粒、心白粒、死米，背白粒、腹白粒及心白粒通稱為白堊質粒。白堊質粒和死米是由於澱粉粒在胚乳細胞內的排列較為鬆散，使光線無法穿透而產生折射造成不透明的外觀。

在高溫的情況下，水稻穀粒完整米率下降，白垩質米和死米的比率上升，造成這種現象的原因之一可能為高溫呼吸作用增加而消耗較多碳水化合物；在其他的研究中也顯示，高溫下莖葉中碳水化合物的殘留較多。然而 Morita 等人(2004)的研究中指出，在水稻穀粒充實期中，如果只有莖葉暴露在高溫下的情況，穀粒的粒重及白垩質產生的情況較不嚴重，反之只有穀粒暴露在高溫的情況下，粒重的下降以及白垩質的產生相對的較為明顯，這樣的結果可以推測，高溫的情況下碳水化合物的供應減少的影響並不明顯。另外，在 Yamakawa 等人(2007)對高溫下充實期間的水稻穀粒作 *microarray* 的分析發現，高溫的情況下，合成儲藏性澱粉以及蛋白質的相關酵素基因活性下降，而分解澱粉的相關酵素(如  $\alpha$ -amylase)的活性上升。推測在高溫的情況下，穀粒內部合成澱粉之酵素活性的下降對於穀粒品質的影響較大。

胚乳細胞是禾穀類作物儲藏澱粉及蛋白質的位置，前人研究中也發現，高溫的情況下，玉米的胚乳細胞數目會下降(Jones et al., 1985; Commuri and Jones, 1999)，且細胞數目的下降影響了玉米穀粒的最終重量。在小麥裡的研究也發現，高溫會降低胚乳細胞數目以及澱粉粒的含量(Nicolas et al., 1984)。在水稻的研究方面，Morita 等人(2005)發現，在高夜溫及日溫的情況下，水稻胚乳細胞數目會增加，但面積卻縮小。因此，禾穀類作物生長在極端氣溫的環境下，胚乳細胞分裂會受影響，而導致澱粉及蛋白質儲藏不佳，影響產量。

#### 四、乙烯和穀粒發育的關係

植物荷爾蒙調控植物的生長發育，也參與在穀粒的發育過程中(Lur and Setter, 1993)。在乾旱逆境的情況下，發育中的小麥穀粒內生 ABA 和乙烯的釋放量會發生變化(Yang et al., 2006)。

近年來的研究顯示，乙烯除了逆境及老化之外，也參與了禾穀類作物穀粒胚乳發育過程的調控(Young et al., 1997)。Beltrano 等人(1994)利用乙烯抑制劑 Ag<sup>+</sup>、AVG 以及乙烯釋放劑 ethephon 對小麥穗處理的結果顯示，增加乙烯的釋放促進了穗的老化，使平均粒重降低，反之，抑制乙烯釋放則能延遲老化，增加平均粒重。Yang 等人(2006)以秈稻和雜交稻作為材料，將水稻穗分為上穗位以及下穗位，上穗位平均品質較好且粒重較下穗位大，結果顯示上穗位的乙烯釋放量以及 ACC 濃度比下穗位來的低，為了進一步證實乙烯對於穀粒發育過程的影響，而處理乙烯釋放劑，結果顯示釋放劑的處理導致上穗位細胞分裂數目、細胞分裂速率、充實速率以及粒重下降，對下穗位處理乙烯抑制劑則會使細胞分裂數目、細胞分裂速率、充實速率以及粒重上升。

禾穀類作物在穀粒發育的過程中，胚乳細胞會進行 program cell death(PCD) (Lopes and Larkins, 1993; Young and Gallie, 1999)，若胚乳細胞的 PCD 過程異常，則可能導致穀粒外觀不佳及重量下降。

乙烯和胚乳細胞 PCD 之間是否有關連性？Young 等人(1997)透過玉米的 mutant *shrunk2*(一種 ADP-Glc pyrophosphorylase 基因的突變系，其澱粉含量降低，導致玉米胚乳提早敗育)的研究發現，mutant 的胚乳乙烯釋放量高於 wild type，此外也發現胚乳細胞 DNA 的降解提早且更為嚴重。在使用了乙烯抑制劑 CEPA 以及 AVG 處理 mutant 植株之後，DNA 的降解較未處理時減輕。為了更進一步瞭解禾穀類種子在發育過程中 PCD 發生的時期和乙烯釋放量的關係，在小麥中的研究也發現(Young and Gallie, 1999)，對栽培種小麥(chinese spring)進行穀粒的發育過程乙烯釋放量分析，以及乙烯抑制劑 AVG、1-MCP 及乙烯釋放劑 ethephone 的外加處理，結果指出在正常的穀粒發育過程中，就會有乙烯的釋放，對照胚乳細胞 DNA 降解發現，乙烯是促使小麥胚乳細胞發生 PCD 現象的因子之一。

而近年也有其他的研究顯示，對乙烯合成相關的 gene family 作 RT-PCR 的

分析結果，胚乳和胚中的 *gene family* 大量表現的時間點不盡相同(Gallie and Young, 2004)；另外，在大麥的穀粒中，以 *cDNA array* 分析，乙烯相關基因在胚乳細胞在整個發育過程裡和 ABA 有互相調控的作用，透過這樣的調控機制，使穀粒胚乳細胞能夠正常的執行細胞凋亡的過程，而不至於導致穀粒敗育(Sreenivasulu et al., 2006)。

#### 五、多元胺和穀粒發育的關係

多元胺泛指植物體內的二元胺、三元胺、四元胺，其中 putrescine、spermidine、spermine 是最普遍存在的多元胺。多元胺生合成過程中，前驅分子 S-adenosylmethionine(SAM)轉變為 S-adenosylmethionine decarboxylase 後再逐步合成為 putrescine、spermidine、spermine。但 SAM 也可經由轉變為 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase(ACC)再合成乙烯。乙烯通常被認為和老化有關，多元胺則被認為可以延緩老化(Altman et al., 1977)。在 Flores 等人(1982)的研究證實了在滲透壓的處理下，會導致 putrescine 的含量累積。在遭遇鹽害的情況下，polyamines 的累積能夠對抗此逆境(Jimenez-Bremont et al., 2007; Tassoni et al., 2008)。Yang 等人(2007)在水稻的研究發現，透過對於乾旱逆境有不同抗性的品種，分析在乾旱的情況下不同品種間的多元胺濃度發現，抗性較高的品種有較高的多元胺累積量；此外，多元胺的累積也有助於保護乾旱逆境下的植株，使其得到較好的恢復(Peremarti et al., 2009)。前人研究中亦指出，多元胺在植物遭遇冷害逆境的情況下會有累積的現象，而降低在冷害逆境下的傷害(Nadeau et al., 1987; Cuevas et al., 2008)。

多元胺也參與種子的發育，Imai 等人(2004)使用阿拉伯芥之缺乏 spermidine synthase 的突變系研究中指出，多元胺對於種子的發育有相當的必要性。缺乏多元胺的種子均無法發芽。Urano 等人(2005)使用缺乏 arginine decarboxylase(ADC) gene 的突變株所做的實驗也得到相同的結果，但不同在於缺乏 spermidine synthase 造成

的 putrescine 累積對胚會有致死性的影響，而缺乏 ADC 可透過外加多元胺的方式使種子恢復活性。在玉米的種子中，也發現在正常發育的玉米種子中，多元胺的濃度高於於敗育的種子(Liang and Lur, 2002)，而多元胺和細胞分裂相關(Herimer and Mizrahi, 1979)，多元胺的濃度下降，可能因此造成儲積蛋白質和澱粉的細胞分裂數目下降，使儲積能力降低而影響穎果發育。Yang 等人(2008)對水稻上下穗位作多元胺的濃度分析發現，在品質較佳的上穗位，多元胺的含量較高，反之在下穗位品質較差，多元胺的含量也較低。由此推測多元胺確實在種子的發育過程中也扮演重要的角色。但在高溫的情況下，內生多元胺的濃度是否有所變化目前尚未有相關的研究指出。





# 試驗推論 (Rationale)

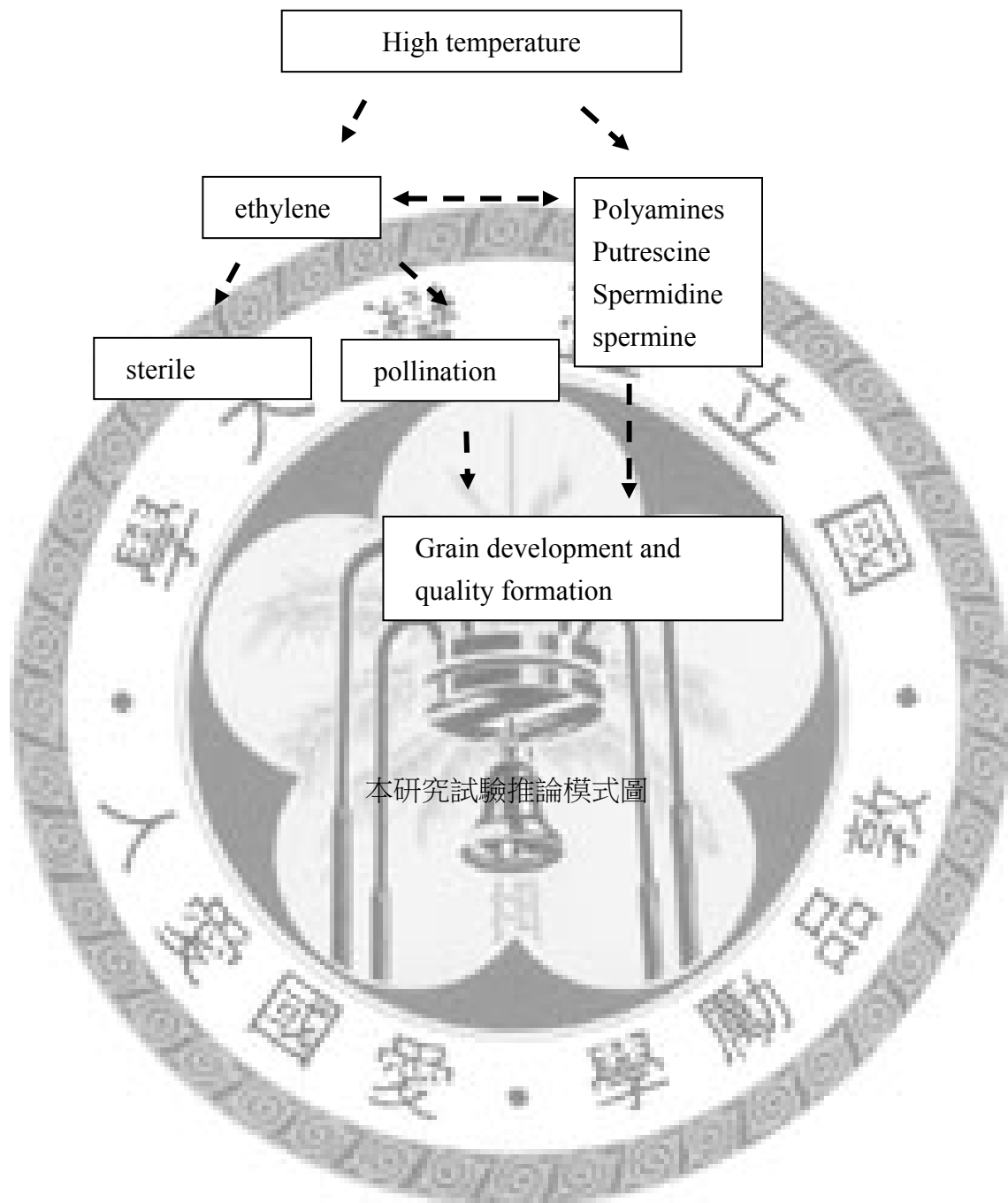
## 一、開花時期高溫、乙烯及授粉間之關係

開花授粉期是水稻對高溫最敏感的時期。根據前人研究，由在花粉發育時期以及開花授粉時期觀察到乙烯含量的變化，可推測乙烯和花粉的發育以及開花授粉的過程是有關連性的。但是水稻在這些時期中若是遭受高溫，其乙烯的含量變化與水稻授粉的相關性仍是未知。為了瞭解在此敏感時期中高溫、乙烯、及授粉間之關係，本論文採用開花前六天至開花後八天的水稻穎花，以上下穗位區分，分別測定乙烯含量，比較在不同發育時期遭受高溫的情況下乙烯含量變化，來探討乙烯所扮演的角色。

## 二、穀粒充實期高溫、乙烯和多元胺間之關係

在前人研究中已經證實乙烯和多元胺對於禾穀類作物的穀粒胚乳發育過程扮演重要的調控角色，若乙烯和多元胺的含量失衡，則常造成穎果之異常發育或敗育。充實期遭遇高溫的穀粒會形成死米或白堊質，前人研究中指出這樣的現象和碳水化合物的供應以及胚乳細胞提早凋亡相關，並指出在下穗位的情況會較上穗位更為嚴重，但對於荷爾蒙在高溫下對於胚乳的發育調控的角色則尚未有相關研究。

因此，本試驗透過分析穀粒之不同發育期的乙烯及多元胺含量變化，來探討此二植物荷爾蒙在發育過程中所扮演的角色；之後，透過含量變化的結果決定使用荷爾蒙生合成抑制劑或釋放劑，更進一步推論乙烯和多元胺和穀粒發育的關聯性。在分子階層上，透過分析乙烯及多元胺合成及代謝路徑上的相關酵素基因表現，探討在高溫的情況下，穀粒內部此二荷爾蒙的生合成以及代謝是否發生轉變，進而推論其與穀粒在高溫下不良發育之關係。



本研究試驗推論模式圖

# 材料與方法

## 一、 試驗材料栽培與取樣

本實驗以粳型稻品種台梗 9 號 (*Oryza sativa* cv TK9) 為材料。首先選取種子，將市售漂白水(6%次氯酸鈉溶液)和一次水以 1:6 (v/v) 的比例混合後，浸泡種子 30 分鐘後，以自來水洗淨，放置於含水培養皿中，放置於 37°C 生長箱中催芽 2 天。將發芽種子移入鐵架上，置入有木村氏水耕液的燒杯中。燒杯外包鋁箔紙以避光。待生長到約 3 葉齡時移入方型塑膠桶中，雙本植，一盆共 6 株，移入玻璃溫室栽種。肥料施用量以氮肥(硫酸銨)、磷肥(過磷酸鈣)、鉀肥(氯化鉀)等三要素，以田間栽培建議量的 2 或 3 倍為基肥施用。栽培過程中插秧後 30 天為第一次追肥，第一次追肥後 15 天為第二次追肥，再經過 15 天施穗肥。在玻璃溫室中生長到幼穗發育至劍葉葉環下約 10 公分時即移入台灣大學生農學院人工氣候室，在日溫 25°C，夜溫 20°C 的自然光室中繼續生長。以一穗中開出第一朵花為開花第一天，將穗標記，待植株開花後六天，選取半數植株移入日溫 35°C，夜溫 30°C 自然光室中繼續生長至成熟。由於穀粒受高溫影響產生白堊質主要是發生在開花後(day after flowering)20 天內，因此取樣的方式為選取開花後 9、12、15、18、21、24 及成熟時期的穗，將穗分為上穗位以及下穗位，分類方式參考 Mohapatra *et al.*, 1993 年的定義，以及實際觀察區分。以全穗全部開花完全為 7 天為基準，前 3 天開花者歸類為上穗位，後 4 天開花者歸類為下穗位，晚於第 7 天開花者除去不計。以 25/20°C 為控制組，35/30°C 為高溫對照組。

## 二、 穎果鮮重測定

取開花後 9、12、15、18、21、24 天及成熟穎果，隨機取樣三次，每次取 10 顆穎果稱重，平均後得到穎果鮮重。

### 三、 開花時期取樣

選取在 25/20°C 中生長的開花前 6 天，開花前 3 天，開花第 0 天，開花第 2 天，開花後第 4 天，開花後第 6 天，開花後第 8 天等不同生長時期的水稻花穗，移入 35/30°C 中處理 4 小時，採收花穗分為上下穗位並進行乙烯釋放量分析。開花前天數判定以 Sakai (1943) 方法判定。

### 四、 乙烯釋放量分析

乙烯釋放量依 Yang 等人(2006)的方法進行。選取開花後 6、9、12、15、18、21、24 及成熟的穗，分為上穗位及下穗位，置入玻璃管中，放置十分鐘以讓因切斷穗所產生之傷口造成的乙烯釋放，再以血清塞塞住玻璃瓶口，放置在室溫下黑暗中 4 小時。以氣相色層分析儀 (GC-14B, Shimazu, Japan)，以火焰離子偵測器(FID)測定，再以積分儀記錄。乙烯偵測條件為，注射口溫度 140°C，管柱溫度 80°C，偵測器溫度 200°C，Porapak S 管柱(80 - 100 mesh)，使用 1 ppm 之標準乙烯氣體為標準品。

### 五、 多元胺含量測定

多元胺含量測定以 Flores and Galston (1982) 方法修改而成。取 0.3 g 不同發育期樣品的種子剝殼後，以液態氮磨碎之後，加入冰 perchlorid acid (PCA) 1.5 mL，放置於 4 °C 冰箱中萃取隔夜。以 12000 xg 離心 20 分鐘後，吸取上清液 1 mL，置入試管中。標準液以 putrescine 含量 100 nmol，spermidine 含量 75 nmol，spermine 含量 150 nmol 配置成標準液，一樣取 1 mL 置入試管中。在標準液及試樣中均內加 50 nmol 之 1.6-Hexanediamine，作為內標準品。加入 1 mL 2 N NaOH 溶液，再加入 15 µL benzoyl chloride (在通風櫥中操作)，劇烈震盪 30 秒。室溫下靜置 30 分鐘，加入 2 mL 飽和食鹽水中止反應。再加入 3 mL 乙醚，上下倒置使混合均勻，以 3000 xg，4 °C 離心 20 分

鐘。吸取1 mL乙醚到新管，以離心冷凍乾燥機抽乾後，加入200  $\mu$ L冰甲醇，放置-20 $^{\circ}$ C冰箱中等待分析。HPLC以5  $\mu$ m ODS HYPERSIL管柱(250 x 4.6 mm, Thermo)，分析條件為流動相採用0 ~ 15 min，55 ~ 58%甲醇(v/v)，15 ~ 15.2 min 58 ~ 60%甲醇，15.2 ~ 20 min 60 % ~ 75 %甲醇，20 ~ 22 min 75~76%甲醇，22.1 ~ 25 min 100%甲醇，流速為1.2 mL/min，標準品putrescine為100 nmol，spermidine為75 nmol，spermine為150 nmol為標準液，以1,6-Hexanediamine為內標準品，回收率約在75% ~ 95%。

#### 六、 乙烯抑制劑與釋放劑外加處理試驗

選取開花後 12 天的穗，在 35/30 $^{\circ}$ C 溫室中的花穗均勻塗上約 0.5 mL 濃度  $10^{-4}$  M 的  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$ ，在 25/20 $^{\circ}$ C 溫室中的花穗則塗上 0.5 mL，濃度  $10^{-3}$  M 的 ethephon，均以去離子水為控制組，每日塗 1 次，共處理 6 天，停止處理並搬回 25/20 $^{\circ}$ C 溫室。成熟後收取種子秤乾重及觀察稻米外觀。

# 結果

## 一、充實率

比較上下穗位的充實率發現高溫降低了穗的充實率(圖 1)。在 25/20°C 控制組上穗位，充實率約為 94.12%，下穗位為 87.40%。在 35/30°C 對照組高溫下生長的上穗位，充實率下降到 87.68%，而下穗位則下降到 82.76%。

## 二、乙烯對在花粉發育時期及開花期之變化

在 25/20°C 控制組的開花前後上下穗位乙烯變化量可以發現，乙烯釋放量最高的時期，在上穗位的部分是在開花前三天(圖 2a)，而下穗位的部分則是在開花第 0 天(圖 2b)。經過高溫處理四小時後，開花前後各生育時期乙烯釋放量均顯著提升，上穗位的部分在開花前三天時釋放量下降(圖 2a)，而下穗位的部分在開花第零天及開花後第二天的時期乙烯釋放量下降(圖 2b)。

## 三、水稻充實期粒重變化量

在水稻充實期粒種變化的部分，25/20°C 控制組上穗位和 35/30°C 對照組上穗位比較(圖 3a)，35/30°C 對照組的穀粒充實速率較快，但約在開花後 20 天就重量的累積就停止，但在 25/20 控制組的部分，則在開花後 24 天之後仍能累積。相同的情況也發生在下穗位(圖 3b)。

## 四、水稻充實期葉綠素 SPAD 值的變化量

測量水稻劍葉在充實期的 SPAD 值變化(圖 4)，在高溫下 SPAD 值變化並無顯著差異。

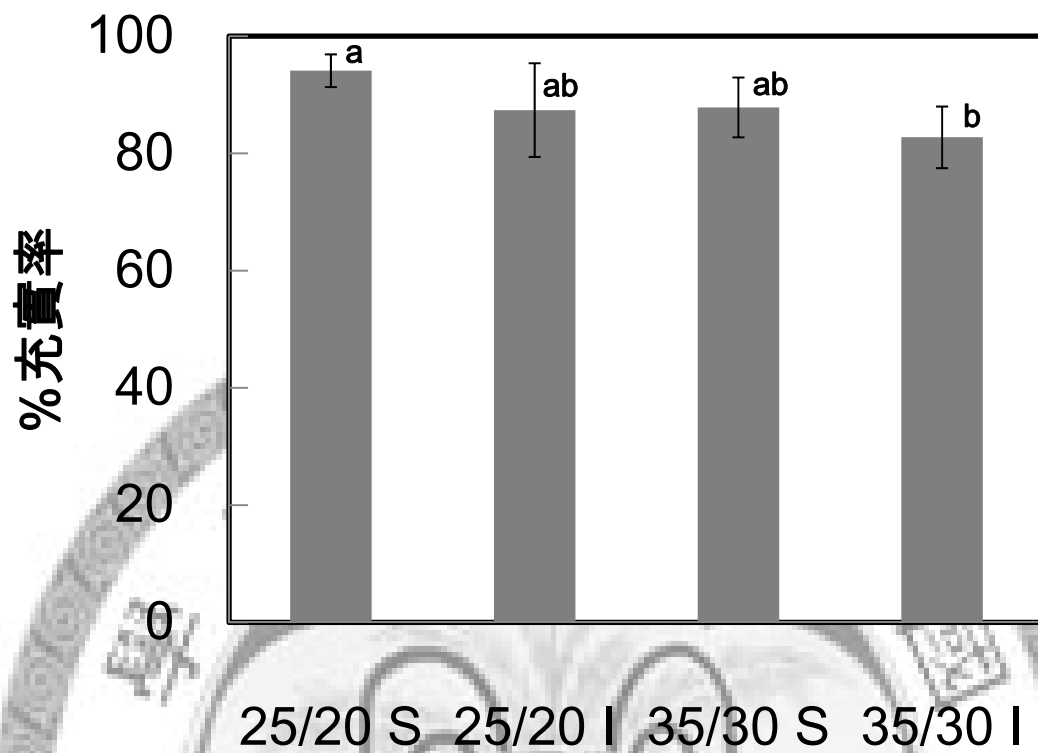
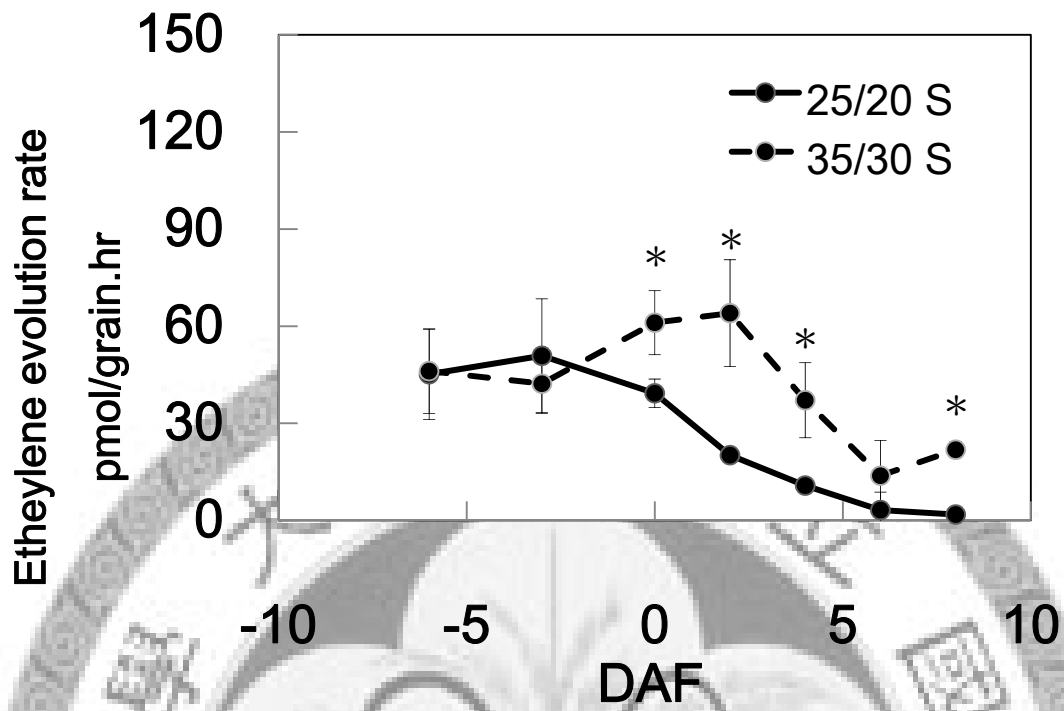
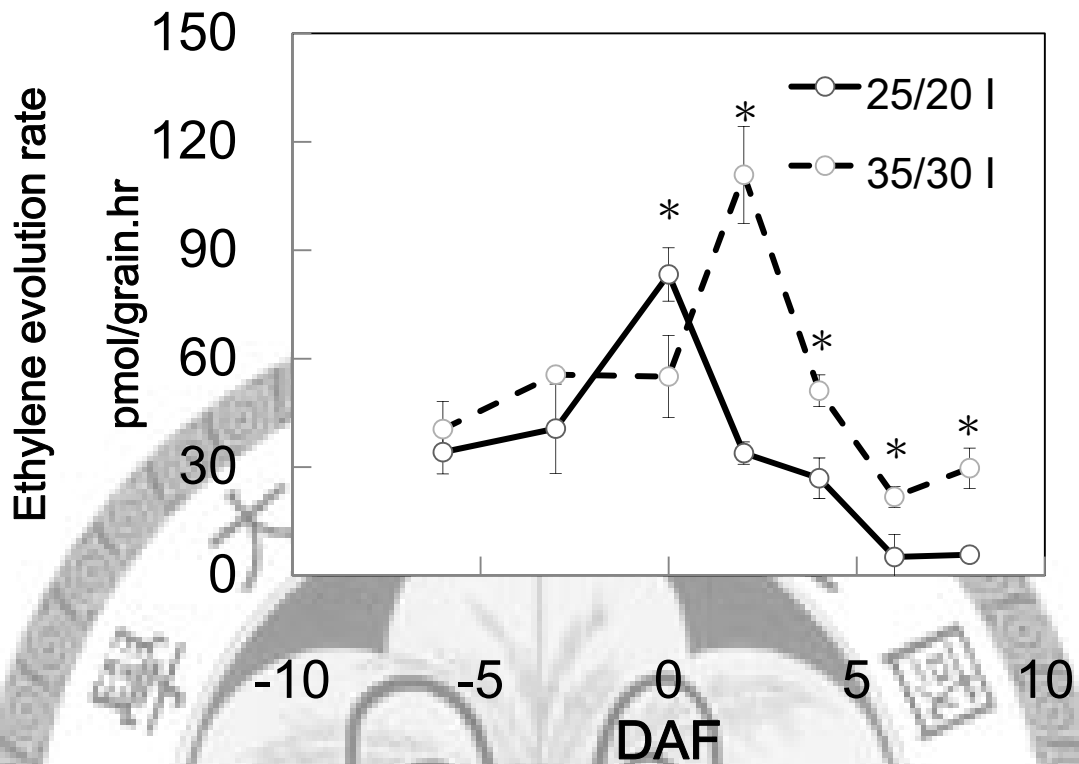


圖 1. TK9 水稻在開花期遭受高溫對於充實率的影響。  
 25/20 S 為控制組上穗位，25/20 I 為控制組下穗位，35/30 S 為高溫上穗位，35/30 I 為高溫下穗位。



(a)





(b)

圖 2. 高溫處理對於水稻上下穗位乙烯釋放量的影響。  
 (a) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組高溫處理 4 小時，上穗位開花前 6 天到開花後 8 天各發育時期乙烯變化量。  
 (b) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組高溫處理 4 小時，下穗位開花前 6 天到開花後 8 天各發育時期乙烯變化量。

#### 四、水稻充實期乙烯釋放變化量

25/20°C 控制組的上下穗位在充實期的乙烯釋放變化如圖 5a、b。在開花後第 15 天和開花後第 18 天，釋放量明顯的提升，下穗位的釋放量又高於上穗位。另外，上穗位的乙烯釋放量的增加略早於下穗位，在開花後第 12 天就出現釋放量開始提高的現象。在 35/30°C 高溫對照組的部分(圖 5a、b)，從開花後第九天開始，在上下穗位，乙烯的釋放量均有明顯的增加，但在開花後 21 天之後，乙烯釋放量急速的下降。比較 25/20°C 控制組和 35/30°C 高溫對照組的上穗位分析結果發現(圖 5a)，在開花後 9 天到 18 天的區段，高溫下的上穗位乙烯釋放量比 25/20°C 控制組的高出許多，且在開花後 21 天就幾乎不再釋放乙烯，而 25/20°C 控制組的上穗位則是在開花後 24 天乙烯釋放量逐漸下降。在下穗位的部分(圖 5b)，35/30°C 對照組的乙烯釋放量在開花後第 9 天開始提升，且持續到開花後 18 天；而 25/20°C 控制組則是在開花後 15 天到 18 天達到釋放量的高峰。比較 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組的情況發現，無論是上穗位或下穗位，在高溫下乙烯的釋放量都有提早且提高的現象。

#### 五、乙烯釋放劑及乙烯抑制劑的處理結果

在粒重方面，35/30°C 對照組的水稻成熟穀粒，其上下穗位平均粒重均低於 25/20°C 控制組的穀粒粒重(圖 6)。為進一步瞭解穎果內生乙烯的可能功能，進行外加處理。對 25/20°C 控制組的穀粒作外加乙烯釋放劑的處理結果(圖 7a)，外加乙烯釋放劑的穀粒平均粒重較未處理的穀粒下降。對 35/30°C 高溫水稻外加乙烯抑制劑處理結果發現，處理抑制劑後的穀粒平均粒重較為提升(圖 7b)。

25/20°C 控制組的穀粒和 35/30°C 高溫對照組的穀粒外觀比較發現(圖 8)，在高溫下充實的穀粒，對上下穗位糙米外觀之面積小於 50% 的白堊質粒以及大於 50% 白堊質的比率都較 25/20°C 控制組的穀粒高。如果對 25/20°C 控制組處理乙烯釋放劑 ethephon (圖 9a)，面積小於 50% 的白堊質比率升高，面積大於 50% 的白堊質則沒有明顯的增加。如對 35/30°C 高溫對照組的穀粒作外加乙烯抑制劑  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$  的處理(圖 9b)，面積大於 50% 的白堊質下降，但在完整米率的部分則沒有顯著差異。

#### 六、穎果多元胺濃度變化

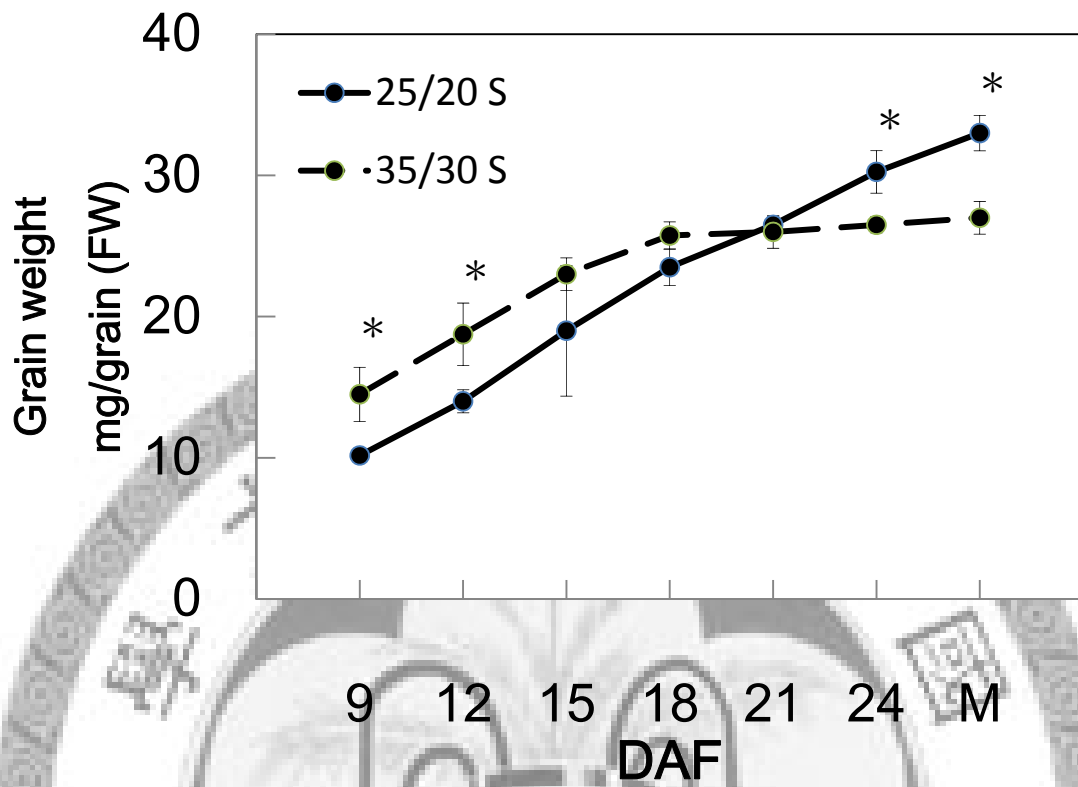
基於多元胺與乙烯之生合成途徑對前驅分子之競爭性，本試驗進一步分析穎果中多元胺濃度的變化。在總多元胺的含量方面，35/30°C 對照組和 25/20°C 控制組上穗位的部分(圖 10a)，35/30°C 對照組的總多元胺含量低於 25/20°C 控制組，另外在下穗位的部分(圖 10b)，也得到和上穗位相似的結果。

對多元胺分析結果顯示穎果總多元胺中 spermidine 的濃度最高，putrescine 其次，spermine 最低。在 25/20°C 控制組的方面，上穗位 putrescine 的含量在開花後 9~12 天到達高峰，之後便下降(圖 12a)；下穗位則是在 12~18 天達到高峰(圖 12b)。spermidine 的含量和 spermine 的含量也和 putrescine 的趨勢類似(圖 13a、b)，但 spermine 的濃度變化較不明顯。35/30°C 的處理方面，上穗位的 putrescine(圖 12a)和 spermidine(圖 13a)含量在開花後 9~15 天的時期為高峰，之後逐漸下降；而下穗位(圖 12 & 13b)在開花後 12~18 天為高峰期。Spermine 的含量變化則略有不同，上穗位的含量在開花後 15 天逐漸提升(圖 14a)，第 18 天達到巔峰，開花後 21 天開始下降，而下穗位(圖 14b)則是在開花後第 15 天開始提升，到 21 天時下降。

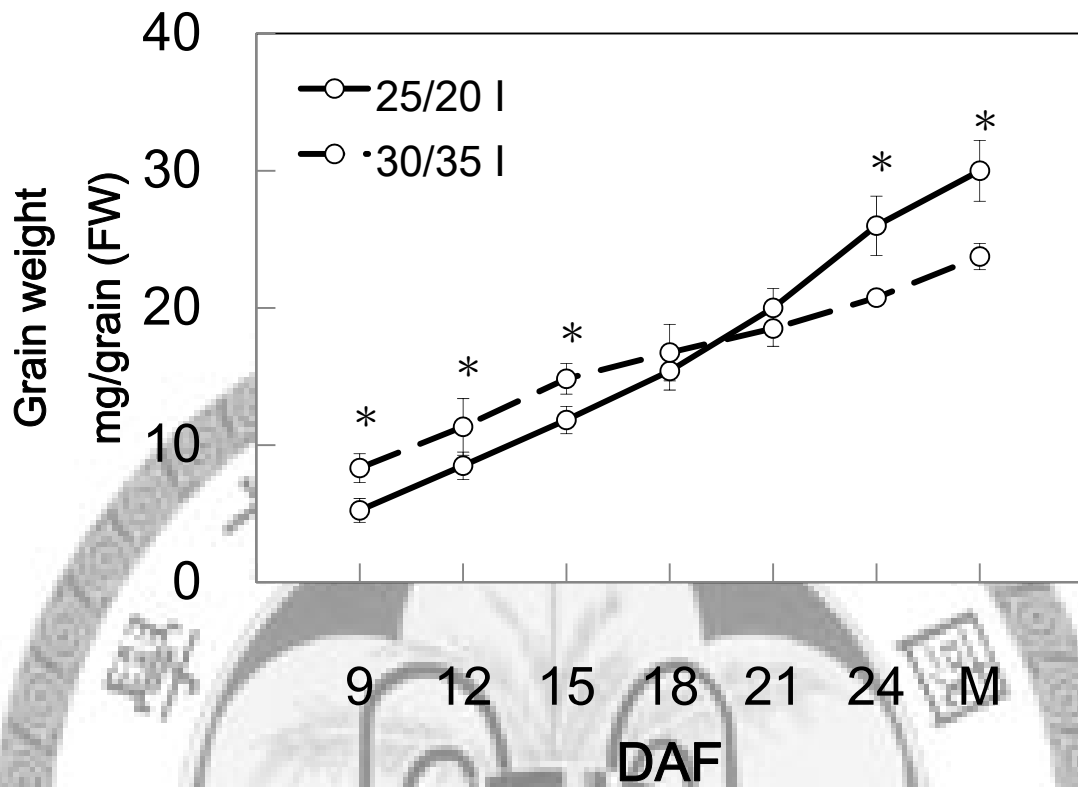
比較 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組上穗位(圖 12a)，35/30°C 對照組 putrescine 含量在 9~12 天的部分高於 25/20°C 對照組，但在開花後 15 天則急速下降。Spermidine 的含量的部分，35/30°C 對照組則是低於 25/20°C 控制組的含量(圖 13a)。

但在 spermine 方面，35/30°C 對照組的含量卻有累積的現象(圖 14a)，在穀粒的發育過程中一直高於 25/20°C 控制組，且在開花後第 18 天時達到高峰。而在下穗位的部分，35/30°C 對照組的 putrescine 含量在開花後 9~15 天高於 25/20°C 控制組(圖 12b)，但在開花後 15 天後開始下降的速率高於 25/20°C 控制組。Spermidine 的含量的部分，25/20°C 控制組與 35/30°C 對照組的高峰期都是在開花後 15~18 天(圖 13b)，但 35/30°C 高溫對照組下的含量顯著的低於 25/20°C 控制組的含量。Spermine 的表現則不同於 putrescine 和 spermidine，在 35/30°C 高溫對照組(圖 14b)，開花後 15 天開始累積 spermine 直到開花後 24 天，且在整個生育時期含量均高於 25/20°C 控制組的下穗位。





(a)



(b)

圖 3. 高溫對穀粒充實期間穎果充實速率的影響。  
 (a)25/20°C控制組和 35/30°C對照組的上穗位穀粒充實速率圖。(b)25/20°C控制組和 35/30°C對照組的下穗位穀粒充實速率圖。

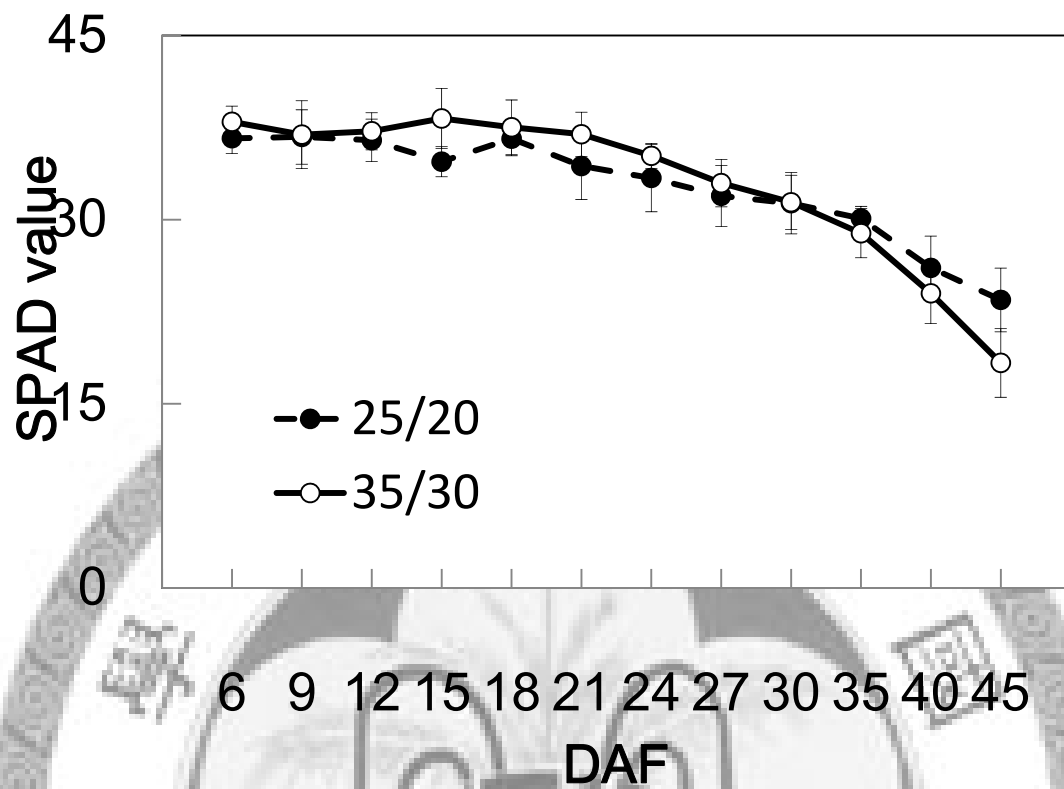
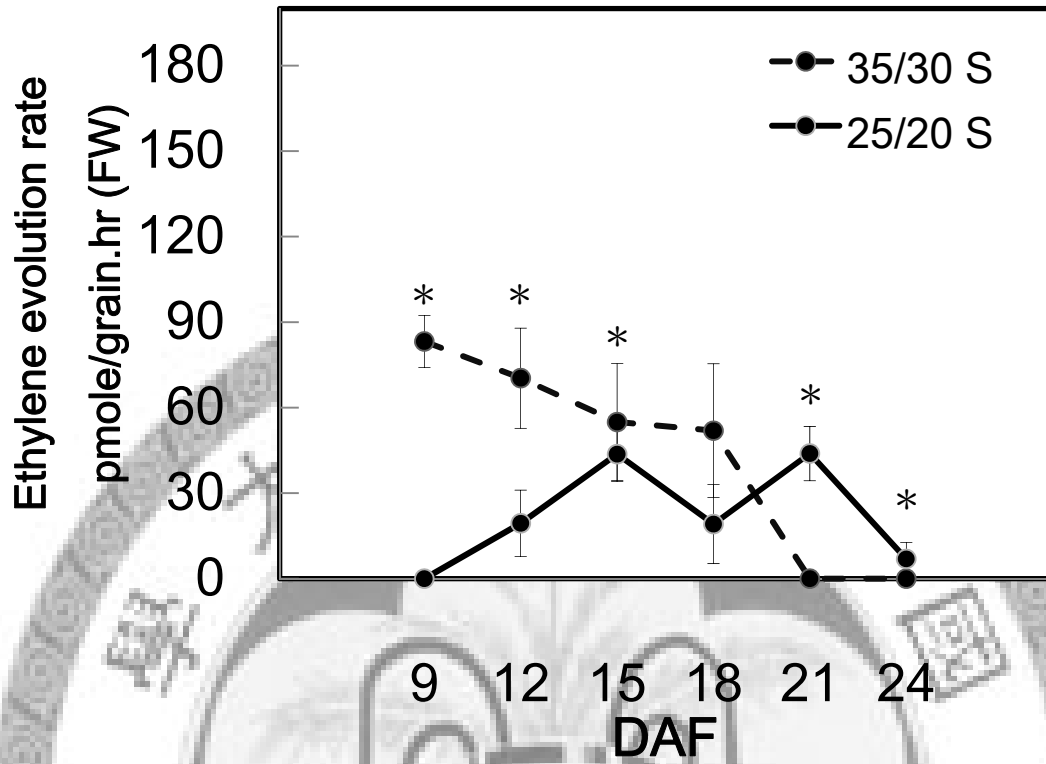
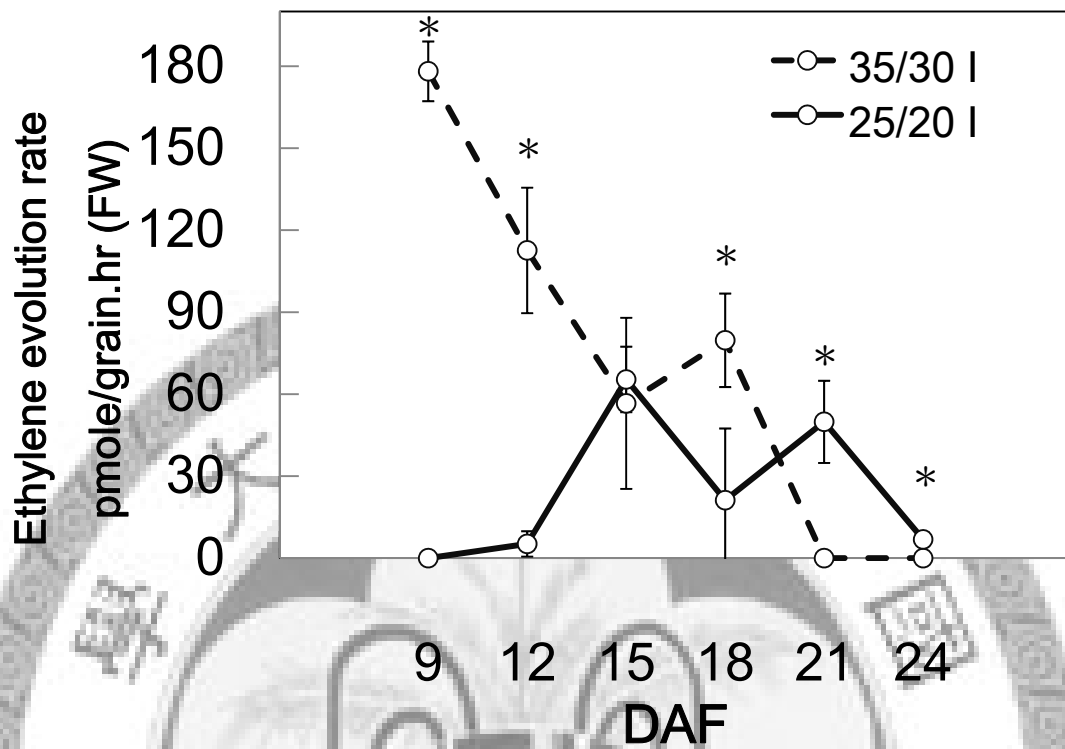


圖 4. 高溫對於劍葉 SPAD 值的影響。



(a)





(b)

圖 5. 高溫對穀粒充實期穗乙烯釋放量的影響。

(a)25/20°C控制組和 35/30°C對照組上穗位開花後 9~24 天乙烯釋放量變化。(b)

25/20°C控制組和 35/30°C對照組下穗位開花後 9~24 天乙烯釋放量變化。

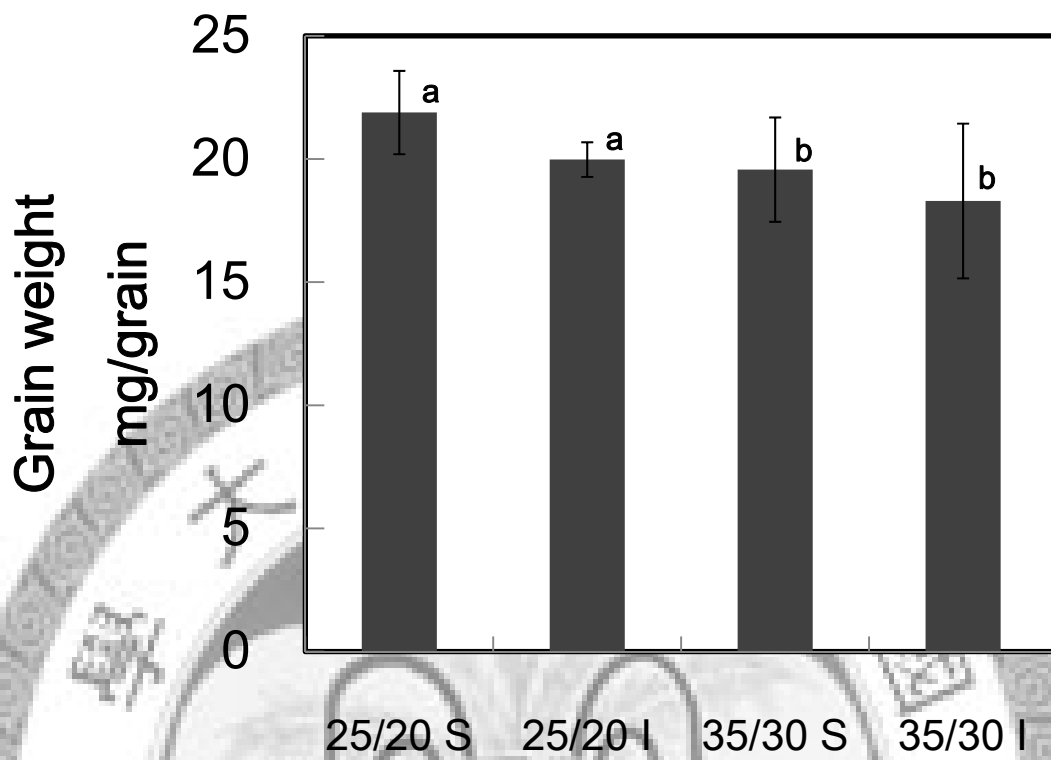
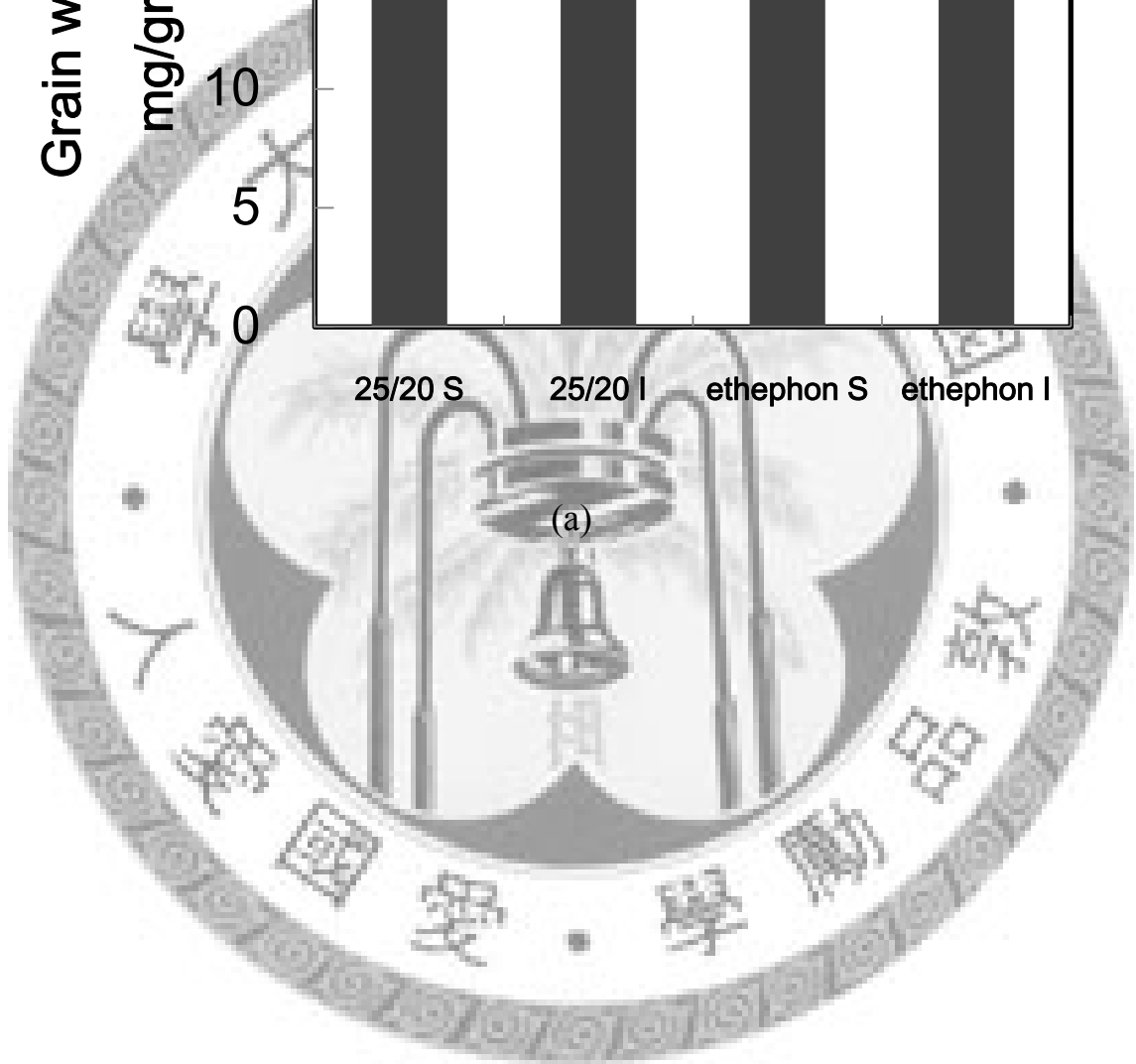
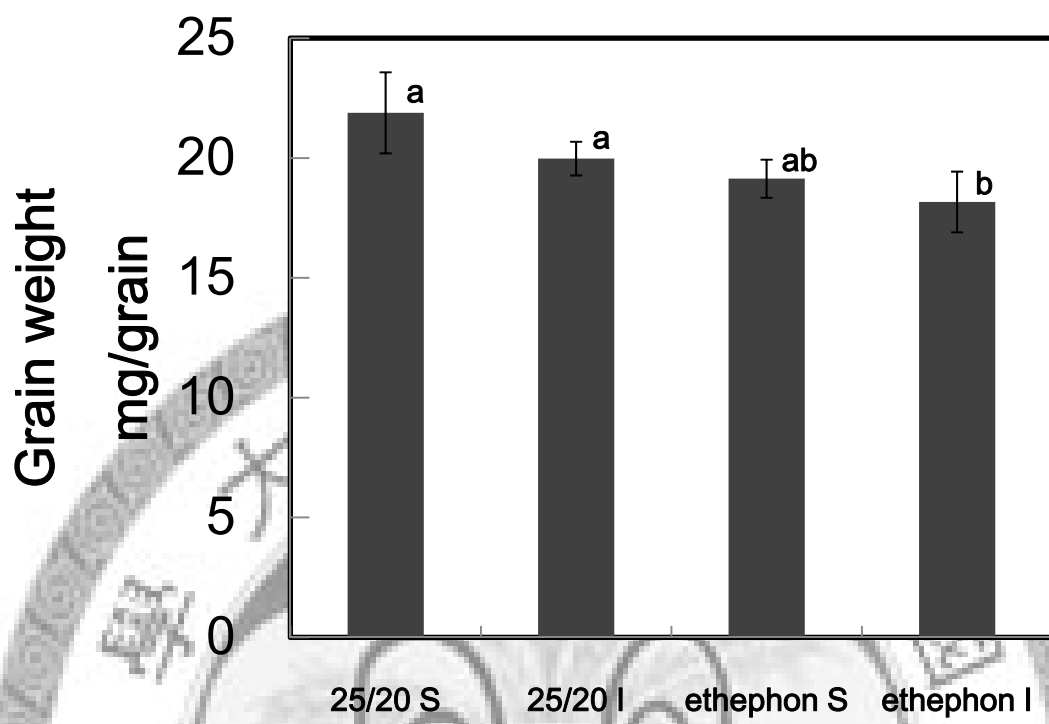


圖 6. 高溫對上下穗位穀粒重量的影響。



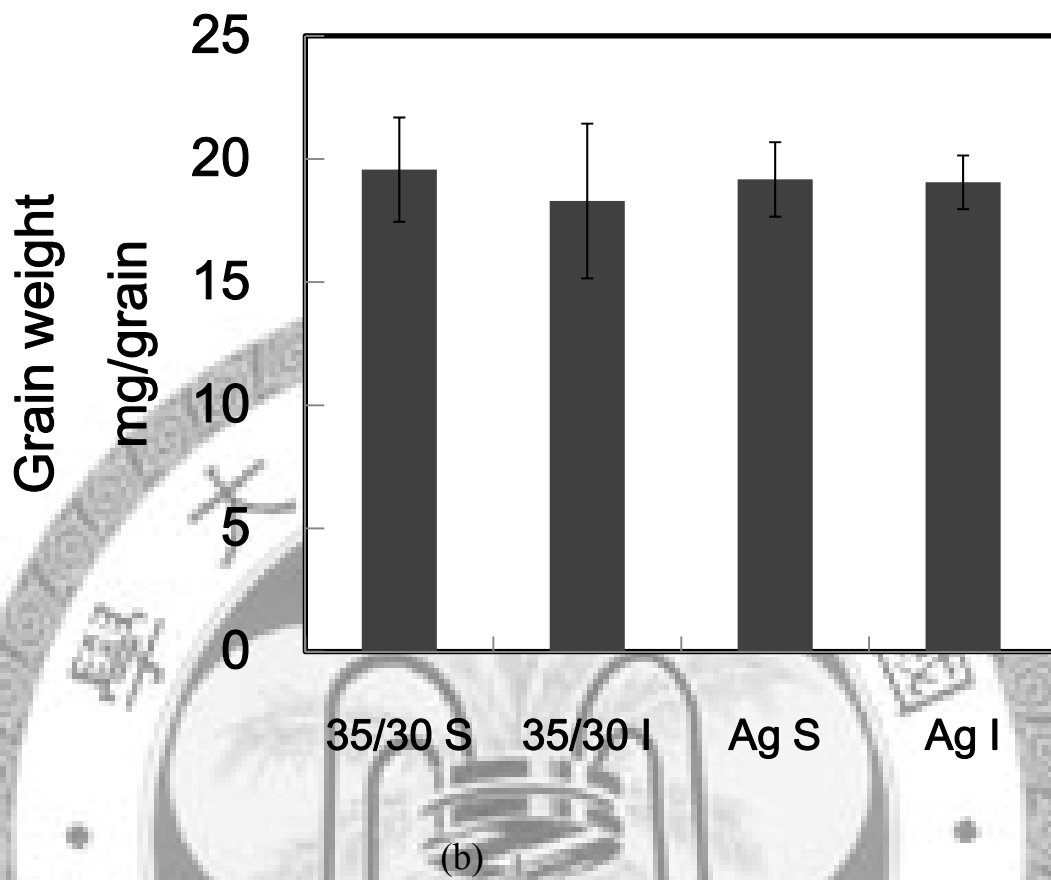


圖 7. 處理乙烯抑制劑及釋放劑對穀粒重量的影響。  
 (a)25/20 處理 ethephon 和未處理穀粒重。(b)35/30°C 對照組處理  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$  和未處理的穀粒重。

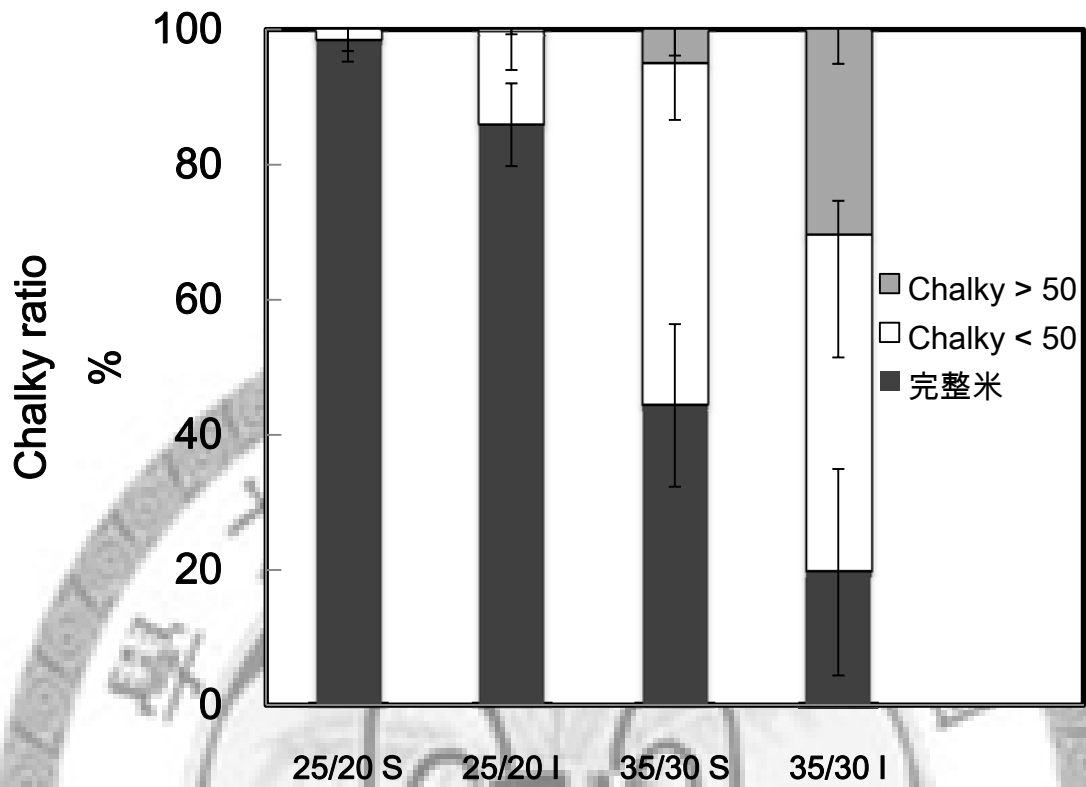
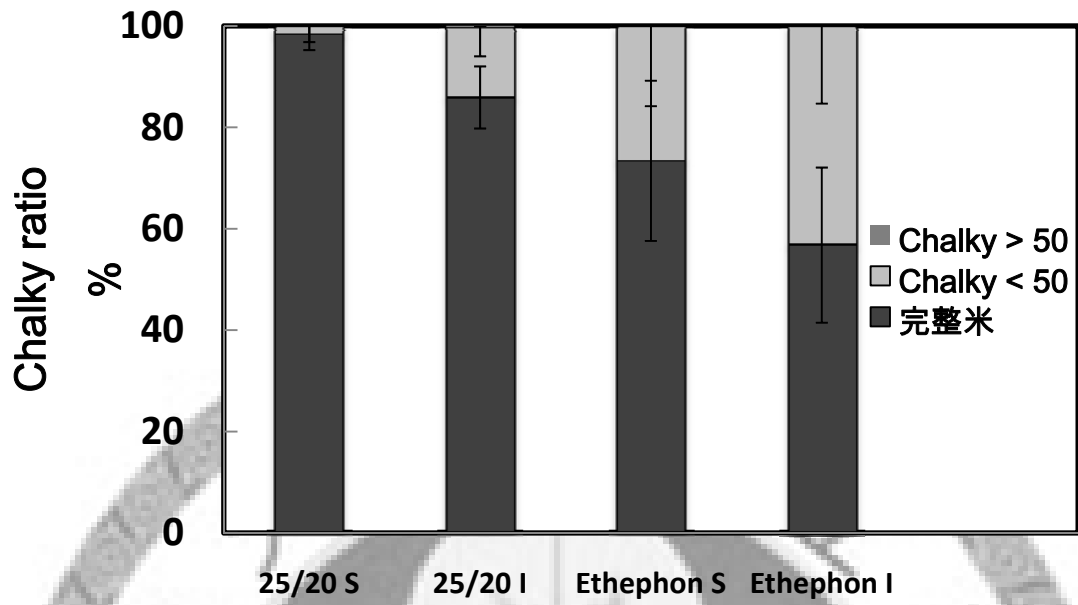
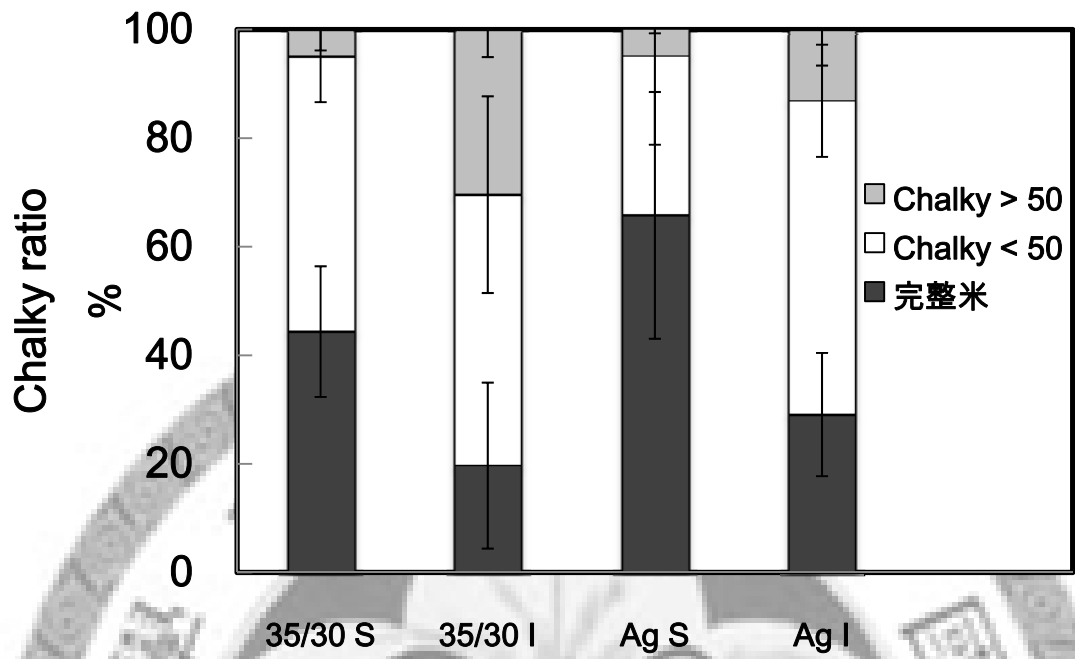


圖 8. 高溫對上下穗位穀粒外觀完整米與白垩質米比例的影響。





(b)

圖 9. 外加乙烯釋放劑和抑制劑對完整米率和白垩質米粒比例的影響。  
 (a)25/20°C控制組處理 ethephon 和未處理米粒外觀實米與白垩質米比率。(b)35/30°C  
 對照組處理 Ag(NO)<sub>3</sub> 和未處理的米粒外觀實米與白垩質米比率。

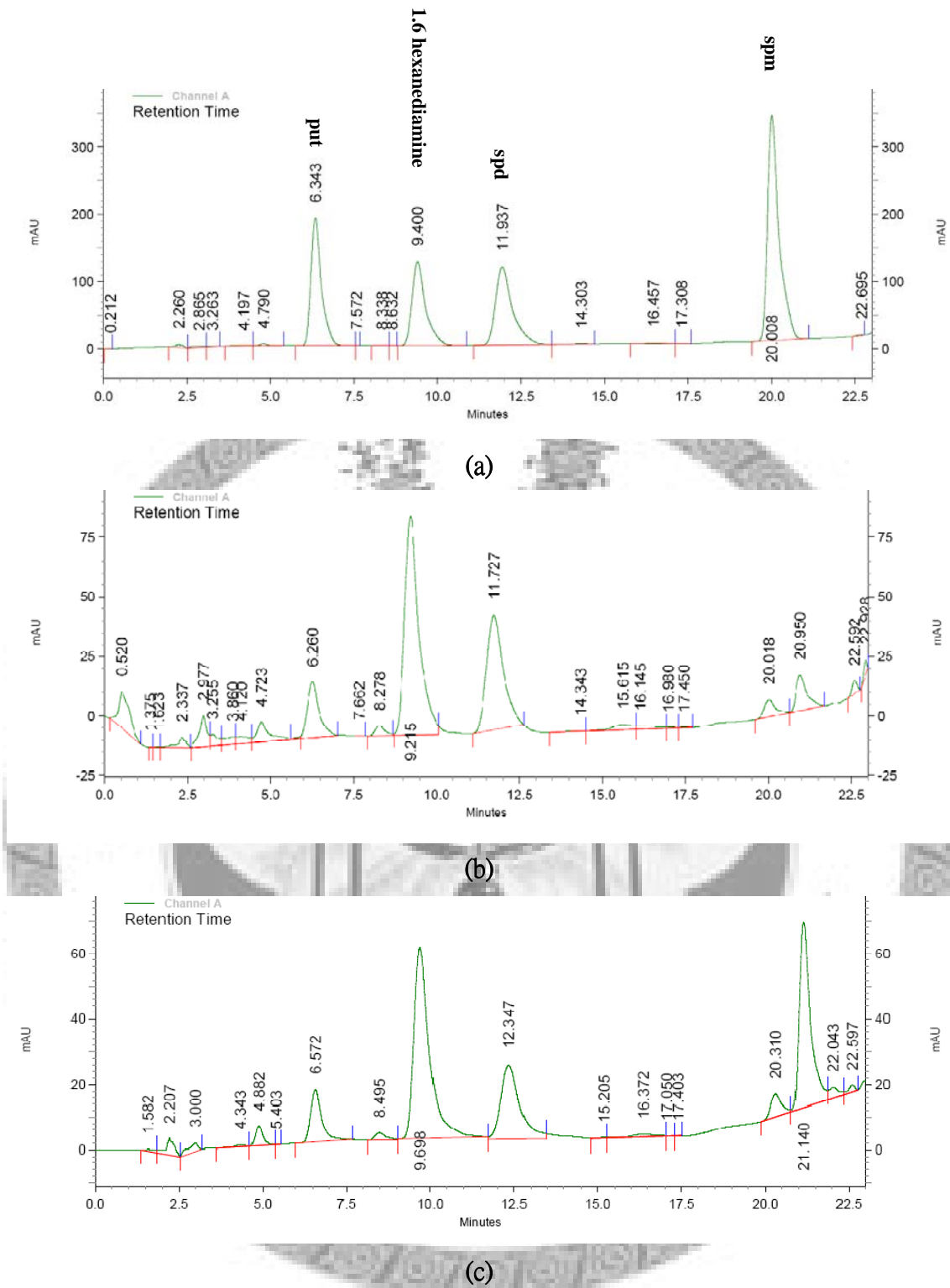
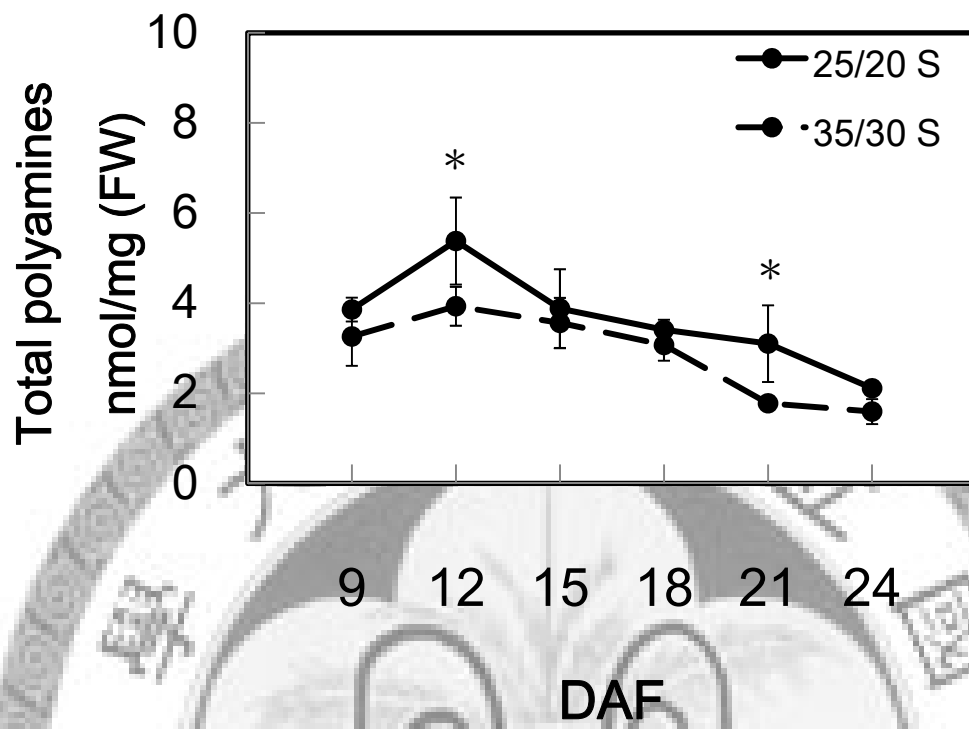


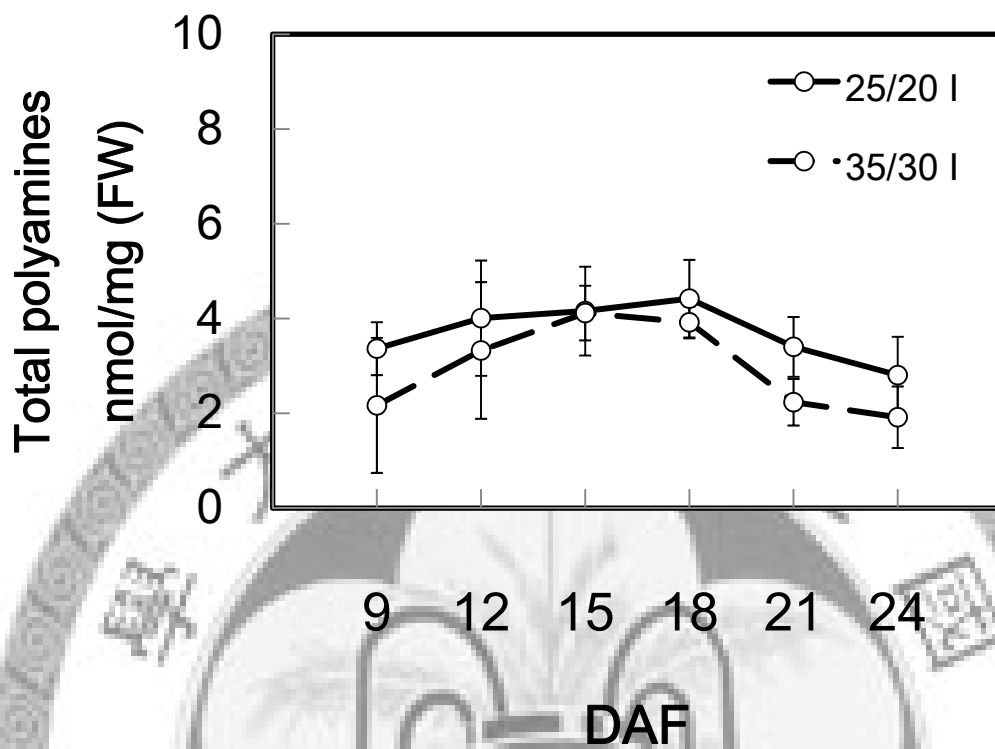
圖 10. HPLC 之 Polyamines 分析圖譜。

(a)標準品分析圖譜。(b)25/20°C控制組下穗位開花後 15 天樣品分析圖譜。(c)35/30°C對照組下穗位開花後 15 天樣品分析圖譜。





(a)

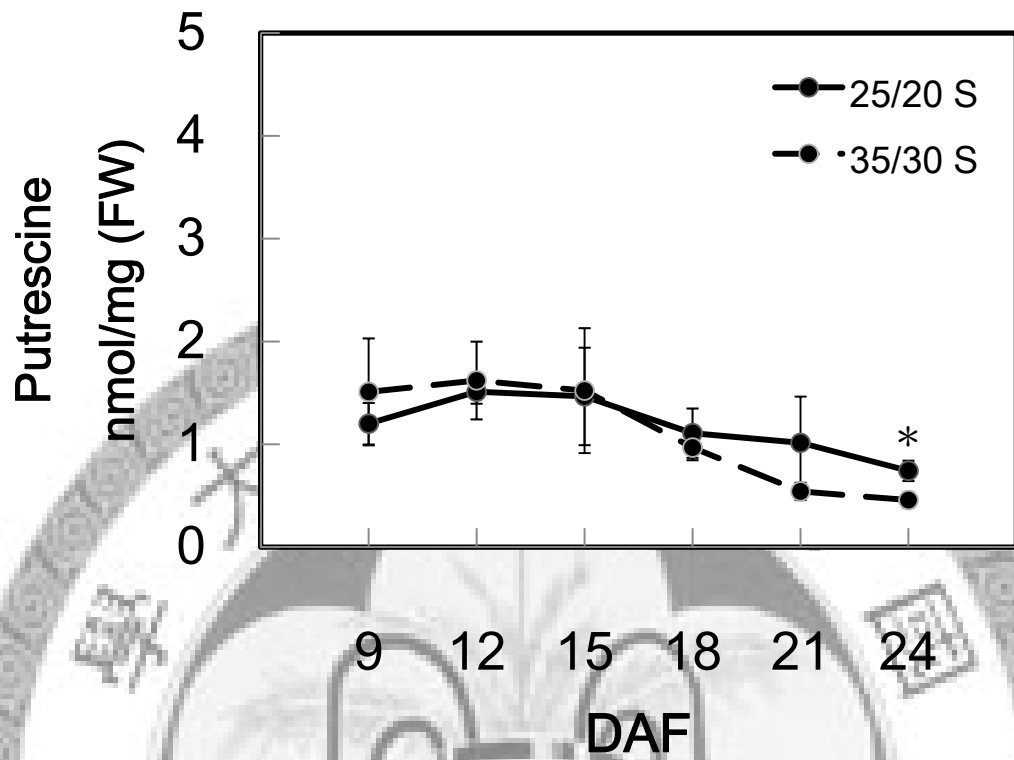


(b)

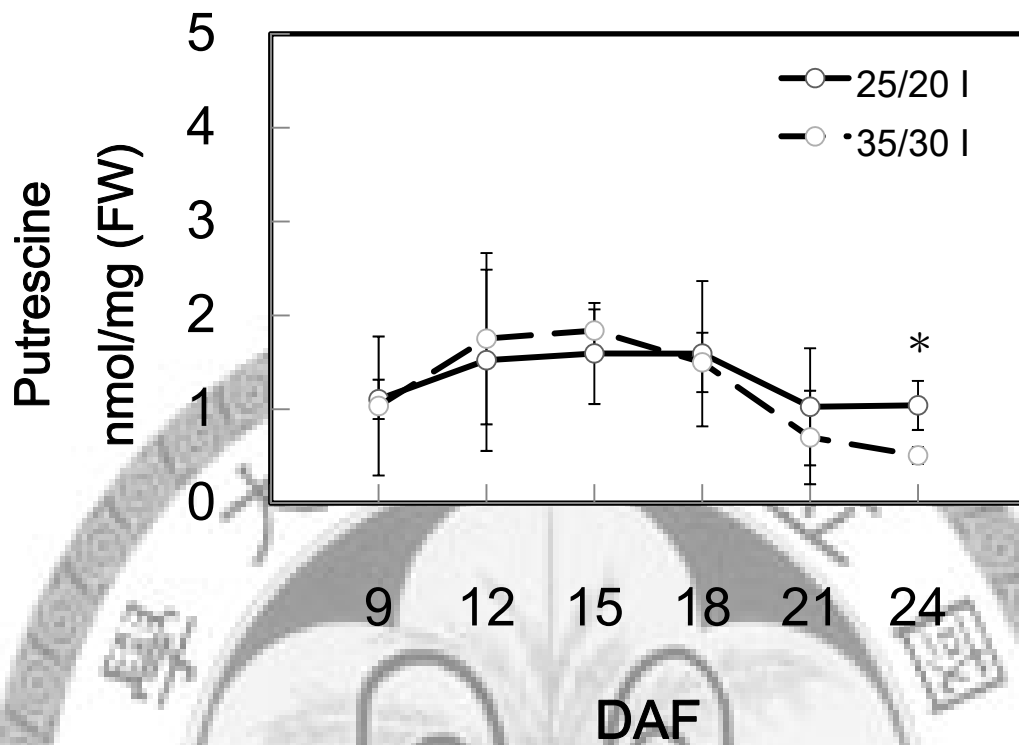
圖 11. 高溫對穀粒充實期總多元胺含量的影響。

(a) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組上穗位穀粒發育過程多元胺總濃度變化。

(b) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組下穗位穀粒發育過程多元胺總濃度變化。

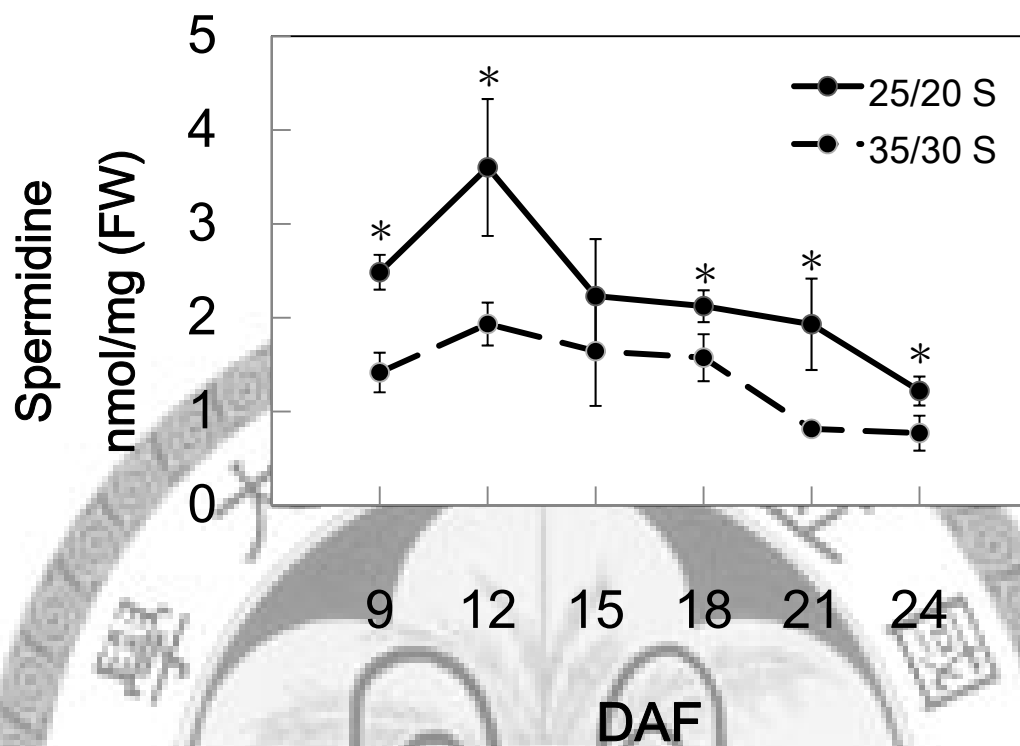


(a)

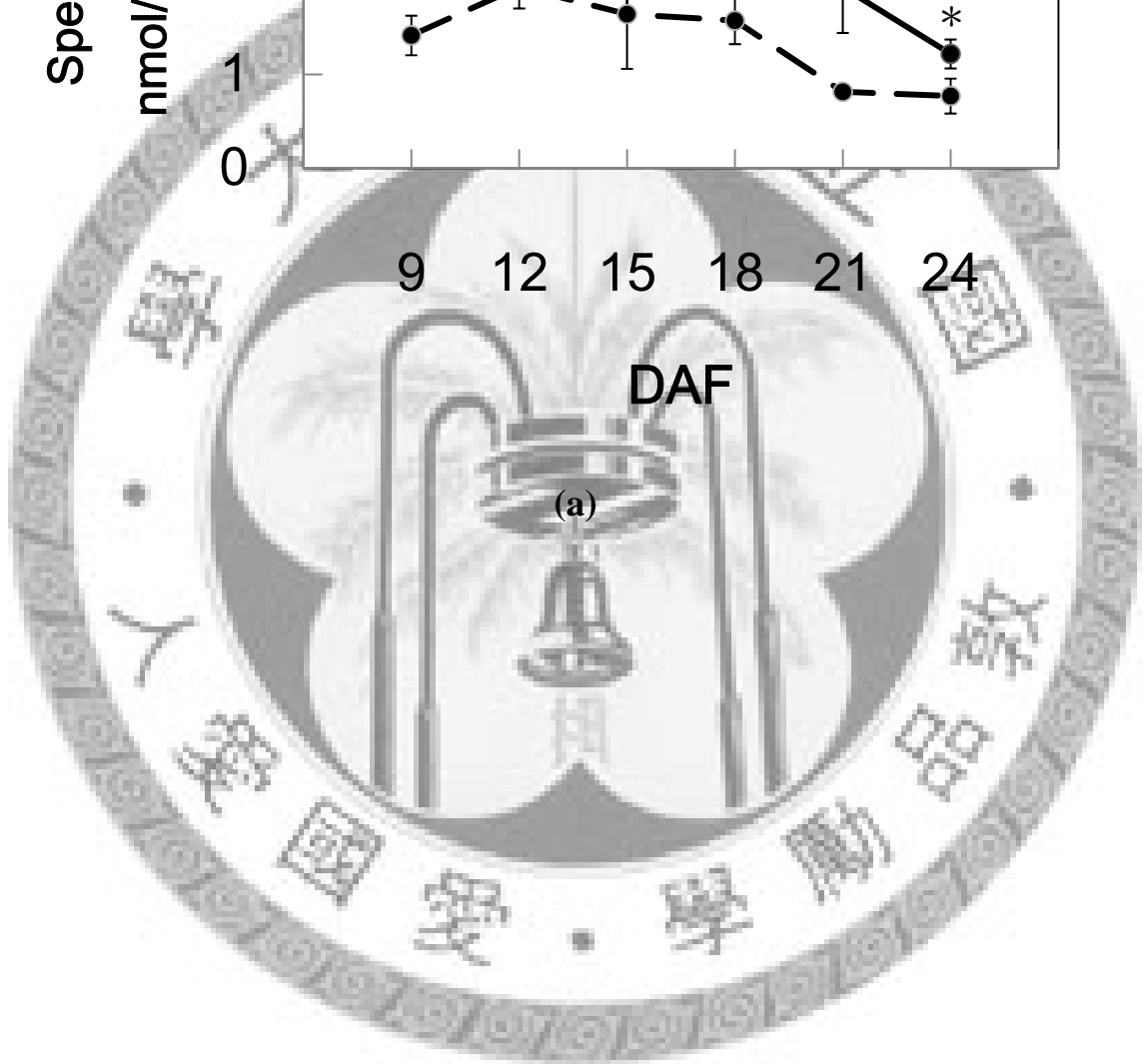


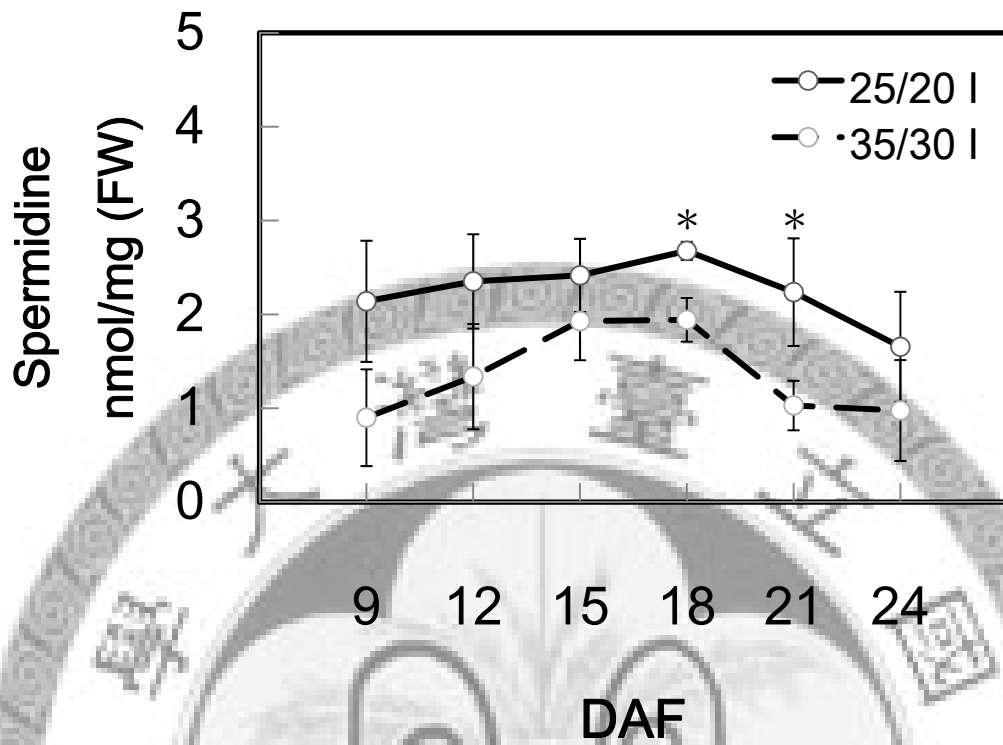
(b)

圖 12. 高溫對穀粒充實期 putrescine 濃度的影響。  
 (a) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組上穗位穀粒發育過程 putrescine 濃度變化。  
 (b) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組下穗位穀粒發育過程 putrescine 濃度變化。



(a)



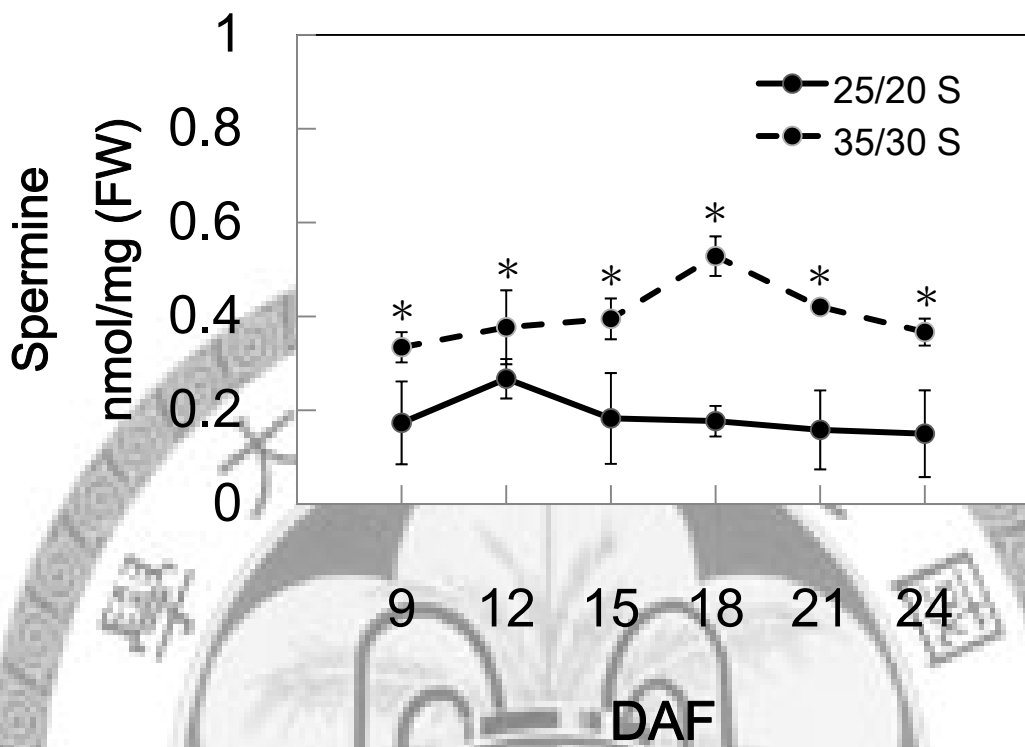


(b)

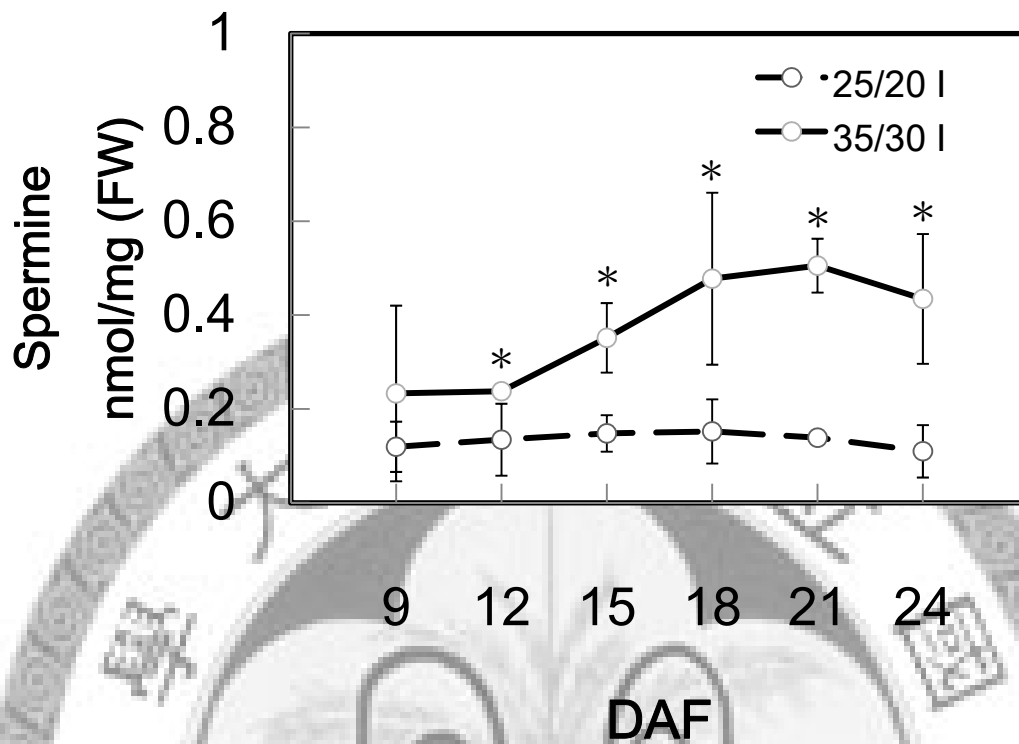
圖 13. 高溫對於穀粒充實期間 spermidine 濃度的影響。

(a)25/20°C控制組和 35/30°C對照組上穗位穀粒發育過程 spermidine 濃度變化。

(b) 25/20°C控制組和 35/30°C對照組下穗位穀粒發育過程 spermidine 濃度變化。



(a)



(b)

圖 14. 高溫對於穀粒充實期間 spermine 濃度的影響。  
 (a) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組上穗位穀粒發育過程 spermine 濃度變化。  
 (b) 25/20°C 控制組和 35/30°C 對照組下穗位穀粒發育過程 spermine 濃度變化。



# 討論

## 一、高溫對於水稻結實率與產量的影響

本試驗所選擇的是栽培種粳稻台梗 9 號，根據前人研究，粳稻在高溫下授粉率有品種間的差異(Matsui et al. 1997)。另外根據 Satake 等人(1978)在秈稻(indica type)的研究中發現，影響水稻稔實率最劇烈的時期是在抽穗前 9 天到抽穗後 5 天之內，因此本研究選擇的天數在抽穗前 6 天到開花後 6 天的時期測量乙烯變化量。結果發現，在 25/20°C 控制組上穗位的部分，抽穗前 3 天的乙烯釋放量達到最高，而在下穗位的部分則是在抽穗當天乙烯釋放量最高。但在 35/30°C 高溫對照組的溫室裡受到高溫處理 4 小時的水稻，則是在開花前三天的時間點乙烯釋放量較 25/20°C 控制組低，而其他生育時期則升高。前人研究指出(Naik and Mohapatra, 1999)，對開花期的水稻使用乙烯抑制劑能夠有效的提升花粉活性，反之使用乙烯釋放劑 CEPA 則會降低花粉活性，使空穎率提高。另外，乙烯也被發現能夠調控花藥的開裂(Rieu et al., 2003)，在前人研究中，高溫下充實率較高的秈稻品種，高溫下花藥的開裂較為順利(Satake and Yoshida 1978)，而在粳稻的研究方面，也被證實在高熱高濕的環境下，花藥基部的開裂較長的品種有比較高的授粉率。在本研究的結果中也發現，在抽穗當天開始接受 35/30°C 高溫處理的穗，充實率較 25/20°C 下降。因此，我們可推測，高溫下水稻在花粉發育過程中，乙烯釋放量提高，導致花粉活性下降，以及影響花藥的開裂，使受粉失敗率上升，導致空穎。

## 二、穀粒發育時期和 ethylene 變化量

前人研究中發現，乙烯能夠調控穀粒的發育過程，進而影響穀粒產量(Young et al., 1997; Yang et al., 2006)。根據本實驗研究結果發現，在開花後六天移入 35/30°C 高溫溫室的水稻，無論在上下穗位，乙烯的釋放量較常溫高且提早，且下穗位的

乙烯提升又比上穗位高。在 25/20°C 控制組方面，下穗位的乙烯釋放量也高於上穗位。根據前人研究，開花時間的先後會影響穀粒的重量(Mohapatra et al., 1993)，而這樣的差別和乙烯的釋放有相關性(Yang et al., 2006)。因此我們可以推論，在高溫的情況下，乙烯釋放量的提高使平均粒重下降(圖六 a)。

在穀粒品質方面，高溫會導致穀粒外觀產生白堊質(Tashiro and Wardlaw, 1991)，而造成穀粒白堊質的原因可能和碳水化合物的供應相關。在高溫的情況下，小麥穀粒中澱粉合成路徑上的相關酵素soluble starch synthase、ADPglucose pyrophosphorylase的活性下降，sucrose synthase 和 UDPglucose pyrophosphorylase 的活性則較不受影響。類似的情況也發生在水稻中，根據Yamakawa等人的研究發現，在高溫的情況下，granule-bound starch synthase I、branching enzymes活性都下降，而 $\alpha$ -amylase活性則上升。因此，澱粉生合成減弱以及amylopectin中直鍊澱粉含量增加都被認為和穀粒白堊質相關。因此推測，乙烯的上升，這樣的變化導致酵素活性改變，使穀粒在高溫下澱粉生合成效率下降，澱粉儲存降低。

乙烯也被認為和穀粒中胚乳細胞的program cell death(PCD)有關。在Young等人(1997)的研究中，透過玉米的mutant *shrunken2*(一種ADP-Glc pyrophosphorylase基因的突變系，其澱粉含量降低，導致玉米胚乳提早敗育)，發現提早敗育的玉米穎果有伴隨乙烯上升，以及DNA降解提早的情況發生。另外，在小麥中做的研究也發現(Young and Gallie, 1999)，使用乙烯抑制劑處理的小麥，對於控制組的同一發育時期，DNA的降解情況較為降低。但使用乙烯處理則會造成DNA降解時間提早且加強。另外在本實驗室的研究中發現(Lin, 2008)，在高溫的情況下，DNA降解的時間提早。因此，我們可以推論，在高溫的情況下，乙烯的升高使得DNA降解現象提早發生，因此縮短了穀粒能夠累積乾物質的時間，造成白堊質粒與粒重下降。

### 三、多元胺對高溫下穀粒發育的影響

多元胺具有調節禾穀類作物種子發育的功能，在本實驗室的研究指出，玉米中多元胺的含量和玉米穎果的敗育相關(Liang and Lur, 2002)。在水稻方面，Yang 等人(2008)的研究也指出，水稻品質較好的上穗位，其 spermidine 和 spermine 的含量較高，putrescine 含量較低，而在品質較差的下穗位，其 spermidine 和 spermine 的含量都較低，putrescine 含量較高。

前人於阿拉伯芥的研究中也指出多元胺對於種子發育的重要性，其中 spermidine synthase 對於種子的發育有相當的重要性(Imai et al., 2004)，而在 2005 年對於缺乏生成 putrescine 的 Arginine decarboxylase(ADC) gene 突變系所做的研究指出，缺乏 putrescine 會導致種子失去活性，但能夠透過外加 putrescine 來恢復(Urano et al., 2005)，惟在 Imai 等人的研究中，缺乏 spermidine 無法透過同樣的程序回復，因此，spermidine 對於種子的發育是較為重要的。而在本研究中，高溫下雖然有 spermine 的累積，但 spermidine 的含量顯著下降，由於 spermidine 也是穎果含量最高的多元胺(圖 13)，推測 spermidine 可能與高溫下穀粒的外觀白垩質及粒重下降相關。

另外在本研究中，也發現在高溫的情況下，乙烯釋放量提早且上升，而多元胺的總量下降(圖 5 & 圖 11)，基於乙烯和多元胺在生合成路徑上有共通的前驅物 SAM，因此，推論在高溫的情況下，SAM 轉變為 ACC 再轉變為乙烯的路徑較為加強，也因而導致總多元胺含量下降。

綜合本研究的結果，在高溫下，乙烯釋放量的上升影響了水稻的充實率。而在穀粒充實過程中，高溫下水稻穀粒充實的速率較快，但乾物質的累積也較早停止。葉綠素值 SPAD 的結果顯示在高溫下葉綠素值較高，但下降速率較快也較早，可說明在高溫下葉片有提早老化的現象。而高溫下的乙烯釋放量提早且提高，多元胺的含量則下降，可能因此影響了穀粒的粒重及造成穀粒白垩質的發生。乙烯對於穀粒發育的影響在本實驗中已透過乙烯抑制劑及乙烯釋放劑得到證明，在多

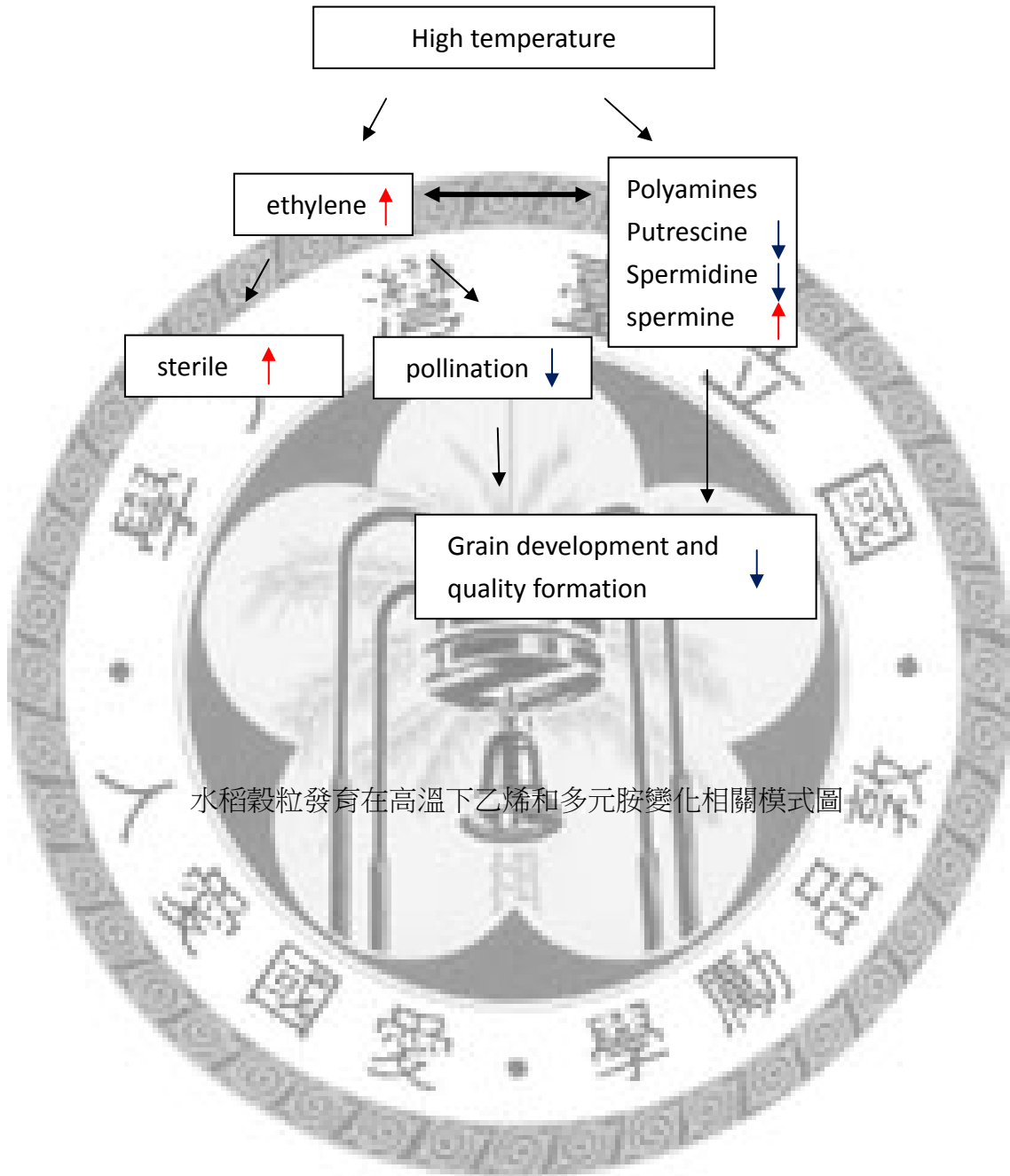
元胺方面，何種多元胺的含量對於高溫下水稻穀粒發育的影響較大，則需更進一步的研究探討。

## 結論

根據本試驗結果，乙烯和多元胺對於高溫下水稻穀粒發育過程可以分為以下兩個時期探討。

在水稻孕穗期到開花完全期，在高溫下乙烯釋放量提高，而下穗位的釋放量又高於上穗位。充實率的方面，高溫下上下穗位充實率都下降，而下穗位的下降更為明顯，因此可以推論，高溫下在水稻孕穗到開花期間，乙烯的釋放量提高對於充實率會造成不良的影響，可能透過影響花粉活性，或是花藥未開裂而導致授粉率下降。

而高溫下發育的穀粒重量會下降，且外觀會出現白垩質。在水稻穀粒充實期，高溫下乙烯釋放量上升，而多元胺的含量下降，乙烯和多元胺在生合成途徑上對前驅物有競爭性，這樣的結果顯示了在高溫下乙烯和多元胺是有消長的關連性的，而這樣的關連性會影響穀粒的發育。另外我們也透過乙烯的抑制劑及釋放劑發現抑制乙烯的情況下，穀粒的重量會提升，白垩質面積會下降，而處理釋放劑則會得到相反的結果。因此我們可以推論，在高溫下乙烯的上升和多元胺的下降，對於穀粒的重量及外觀會造成負面的影響。



水稻穀粒發育在高溫下乙烯和多元胺變化相關模式圖

## 參考文獻

- Adams RM, Rosenzweig C, Peart RM, Ritchie JT, McCarl BA, Glycer JD, Curry RB, Jones JW, Boote KJ, Allen LH (1990) Global climate change and United-States agriculture. *Nature* 345: 219-224
- Altman A, Kaur-Sawhney R, Galston AW (1977) Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol* 60: 570-574
- Beltrano J, Carbone A, Montaldi ER, Guamet JJ (1994) Ethylene as promoter of wheat-grain maturation and ear senescence. *Plant Growth Regul* 15: 107-112
- Bui AQ, O'Neill SD (1998) Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. *Plant Physiol* 116: 419-428
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G, Costantino P, Cardarelli M (2008) Auxin regulates Arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20: 1760-1774
- Commuri PD, Jones RJ (1999) Ultrastructural characterization of maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to high temperature during endosperm cell division. *Plant Cell Environ* 22: 375-385
- Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcazar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A (2008) Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol* 148: 1094-1105
- Duffus CM, Binnie J (1990) Sucrose relationships during endosperm and embryo development in wheat. *Plant Physiol Biochem* 28: 161-165
- Durand R, Durand B (1990) Sexual determination and sexual-differentiation. *CRC Crit Rev Plant Sci* 9: 295-316
- Flores HE, Galston AW (1982) Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science* 217: 1259-1261
- Gallie DR, Young TE (2004) The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Genet Genomics* 271: 267-281
- Galston AW, Sawhney RK (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 94: 406-410

- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M (2006) Global temperature change. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14288-14293
- Hawker JS, Jenner CF (1993) High-temperature affects the activity of enzymes in the committed pathway of starch synthesis in developing wheat endosperm. *Aust J Plant Physiol* 20: 197-209
- He GC, Kogure K, Suzuki H (1990) Development of endosperm and synthesis of starch in rice grain .3. starch property as affected by the temperature during grain development. *Jpn J Crop Sci* 59: 340-345
- Heby O (1981) Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19: 1-20
- Herimer Y, Mizrahi Y (1979) Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells *FEBS Lett* 104: 146-149
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T (2004) Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiol* 135: 1565-1573
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I, Okada K (2001) The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 2191-2209
- Iwai T, Miyasaka A, Seo S, Ohashi Y (2006) Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiol* 142: 1202-1215
- Jimenez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodriguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol Biochem* 45: 812-821
- Jones RJ, Roessler J, Ouattar S (1985) Thermal environment during endosperm cell-division in maize - effects on number of endosperm cells and starch granules. *Crop Sci* 25: 830-834
- Kowles RV, Phillips RL (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7010-7014
- Liang YL, Lur HS (2002) Conjugated and free polyamine levels in normal and aborting maize kernels. *Crop Sci* 42: 1217-1224
- Lin CJ (2008) The physiological pathway of high temperature effects on rice quality formation during grain-filling stage. Department of Agronomy

National Taiwan University Master Thesis

- Lopes MA, Larkins BA (1993) Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5: 1383-1399
- Lur HS, Setter TL (1993) Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). *Plant Physiol* 103: 273-280
- Lyakh VA, Kravchenko AN, Soroka AI, Dryuchina EN (1991) Effects of high-temperatures on mature pollen grains in wild and cultivated maize accessions. *Euphytica* 55: 203-207
- Mascarenhas JP (1990) Gene activity during pollen development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 317
- Matsui T, Kobayasi K, Kagata H, Horie T (2005) Correlation between viability of pollination and length of basal dehiscence of the theca in rice under a hot-and-humid condition. *Plant Prod Sci* 8: 109-114
- Matsui T, Omasa K, Horie T (1997) High temperature-induced spikelet sterility of japonica rice at flowering in relation to air temperature, humidity and wind velocity conditions. *Japan J Crop Sci* 66: 449-455
- Mendelsohn R, Nordhaus WD, Shaw D (1994) The impact of global warming on agriculture: A ricardian analysis. *Am Econ Rev* 84: 753-771
- Miller ME, Chourey PS (1992) The maize *Invertase-Deficient miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 4: 297-305
- Mohapatra PK, Patel R, Sahu SK (1993) Time of flowering affects grain quality and spikelet partitioning within the rice panicle. *Aust J Plant Physiol* 20: 231-241
- Morgan JM (1980) Possible Role of Abscisic-Acid in Reducing Seed Set in Water-Stressed Wheat Plants. *Nature* 285: 655-657
- Morita S, Shiratsuchi H, Takahashi J, Fujita K (2004) Effect of high temperature on grain ripening in rice plants  
—Analysis of the effects of high night and high day temperatures applied to the panicle and other parts of the plant—. *Jpn. J. Crop Sci.* 73: 77-83
- Morita S, Yonemaru J, Takanashi J (2005) Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa* L.). *Ann Bot* 95: 695-701
- Nadeau P, Delaney S, Chouinard L (1987) Effects of cold hardening on the regulation of polyamine levels in wheat (*Triticum aestivum* L.) and alfalfa



- (*Medicago sativa L.*). Plant Physiol 84: 73-77
- Naik PK, Mohapatra PK (1999) Ethylene inhibitors promote male gametophyte survival in rice. Plant Growth Regul 28: 29-39
- Naik PK, Mohapatra PK (2000) Ethylene inhibitors enhanced sucrose synthase activity and promoted grain filling of basal rice kernels. Aust J Plant Physiol 27: 997-1008
- Nicolas ME, Gleadow RM, Dalling MJ (1984) Effects of drought and high-temperature on grain-growth in wheat. Aust J Plant Physiol 11: 553-566
- Osada A, Sasiprapa V, Rahong M (1973) Abnormal occurrence of empty grains of indica rice plants in the dry, hot season in Thailand. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 42: 103-109
- Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. J Biosci 25: 291-299
- Peng S, Huang J, Sheehy JE, Laza RC, Visperas RM, Zhong X, Centeno GS, Khush GS, Cassman KG (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 9971-9975
- Peremarti A, Bassie L, Christou P, Capell T (2009) Spermine facilitates recovery from drought but does not confer drought tolerance in transgenic rice plants expressing *Datura stramonium* S-adenosylmethionine decarboxylase. Plant Mol Biol 70: 253-264
- Pillai MA, Akiyama T (2004) Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. Mol Genet Genomics 271: 141-149
- Prasad PVV, Boote KJ, Allen LH (2006) Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor (L.) Moench*] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. Agricultural and Forest Meteorology 139: 237-251
- Rieu I, Wolters-Arts M, Derksen J, Mariani C, Weterings K (2003) Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. Planta 217: 131-137
- Sakai K (1943) Zytologisch-histologische untersuchungen uber die sterilitatserscheinungen bie reispflanzen nordnippons im Jahre 1941. Hokkaido Agr. Exp. Sta. Report 40: 1-17

- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW, Goldberg RB (2000) The arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12: 1041-1061
- Satake T, Yoshida S (1978) High temperature-induced sterility in indica rices at flowering. *Japan. Jour. Crop Sci.* 47: 6-17
- Sreenivasulu N, Radchuk V, Strickert M, Miersch O, Weschke W, Wobus U (2006) Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA- regulated maturation in developing barley seeds. *Plant J* 47: 310-327
- Tang RS, Zheng JC, Jin ZQ, Zhang D, Huang H, Chen LG (2008) Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Growth Regul* 54: 37-43
- Tashiro T, Wardlaw IF (1991) The effect of high-temperature on kernel dimensions and the type and occurrence of kernel damage in rice. *Aust J Agric Res* 42: 485-496
- Tassoni A, Franceschetti M, Bagni N (2008) Polyamines and salt stress response and tolerance in *Arabidopsis thaliana* flowers. *Plant Physiol Biochem* 46: 607-613
- Tiburcio AF, Masdeu MA, Dumortier FM, Galston AW (1986) Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. *Plant Physiol* 82: 369-374
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett* 579: 1557-1564
- Wada T, Ito T, Ito M, Takeoka Y (1992) Light microscopic observations on pollen and anther in rice (*Oryza-Sativa L*) .2. stages from early microspore to mature pollen. *Jpn J Crop Sci* 61: 136-144
- Wada T, Ogawa K, Ito T, Suzuki H, Takeoka Y (1990) Light microscopic observations on pollen and anther development in rice (*Oryza-Sativa L*) .1. stages from pollen mother cells to tetrads. *Jpn J Crop Sci* 59: 769-777
- Wang Y, Kumar PP (2007) Characterization of two ethylene receptors *PhERS1* and *PhETR2* from petunia: *PhETR2* regulates timing of anther dehiscence. *J Exp Bot* 58: 533-544
- Wang Z, Liang Y, Li C, Xu Y, Lan L, Zhao D, Chen C, Xu Z, Xue Y, Chong K (2005)

- Microarray analysis of gene expression involved in anther development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58: 721-737
- Wang Z, Mambelli S, Setter TL (2002) Abscisic acid catabolism in maize kernels in response to water deficit at early endosperm development. *Ann Bot (Lond)* 90: 623-630
- Wuriyangan H, Zhang B, Cao WH, Ma B, Lei G, Liu YF, Wei W, Wu HJ, Chen LJ, Chen HW, Cao YR, He SJ, Zhang WK, Wang XJ, Chen SY, Zhang JS (2009) The ethylene receptor *ETR2* delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *Plant Cell*
- 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
- Yang J, Yunying C, Zhang H, Liu L, Zhang J (2008) Involvement of polyamines in the post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice. *Planta* 228: 137-149
- Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L (2006) Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New Phytol* 171: 293-303
- Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J Exp Bot* 58: 1545-1555
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Liu K, Wang P (2006) Post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice in relation to abscisic acid and ethylene. *J Exp Bot* 57: 149-160
- Yoshida S (1981) Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, Philippines
- Young TE, Gallie DR (1999) Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 39: 915-926
- Young TE, Gallie DR, DeMason DA (1997) Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiol* 115: 737-751
- Zhang H, Tan G, Yang L, Yang J, Zhang J, Zhao B (2009) Hormones in the grains and roots in relation to post-anthesis development of inferior and superior spikelets in japonica/indica hybrid rice. *Plant Physiol Biochem* 47: 195-204
- Zhang XS, O'Neill SD (1993) Ovary and gametophyte development are

coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. Plant Cell 5: 403-418

