

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 Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

水稻幼苗鎘逆境生理之研究：硫與熱休克之效應

Studies on the Cd Stress in Rice Seedlings:

Effect of Sulfur or Heat Shock



郭俊伶

Chun-ling Kuo

指導教授：高景輝 教授

Advisor: Professor Ching Huei Kao

中華民國 97 年 6 月

June, 2008

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

水稻幼苗鎘逆境生理之研究：硫或熱休克之效應

Studies on the Cd Stress of Rice Seedlings:

Effect of Sulfur or Heat Shock

本論文係郭俊伶君 (R95621111) 在國立臺灣大學農藝學系、所完成之碩士學位論文，於民國 97 年 6 月 23 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：

高景輝 教授 (論文指導教授)

(Professor Ching-Huei Kao)

國立台灣大學農藝學系教授

Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University

高景輝

宋濟民 博士 (Dr. Jih-Min Sung)

弘光科技大學食品營養學系教授

Professor, Department of Food and Nutrition, Hung Kuang University

宋濟民

陳宗禮 博士 (Dr. Chung-Li Chen)

國立中興大學農藝學系教授

Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University

陳宗禮

黃定鼎 博士 (Dr. Ding-ding Huang)

佛光大學生命學研究所教授

Professor, Graduate Institute of Somatology and Life Studies, Fo Guang University

黃定鼎

洪傳揚 博士 (Dr. Chwan-Yang Hong)

國立台灣大學農化學系助理教授

Assistant professor, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

洪傳揚

謝辭

終於，我也面臨寫謝辭的此刻！

還記得兩年前研究所放榜那天下午，懷著忐忑不安又堅定的心情敲了老師房門後，就這麼進入 214 大家庭。如果說大學四年所擁有的是源源不絕的學識和恣意的青春奔放，那麼研究所兩年與我為伍的就是夏悶熱冬溫暖的溫室，以及夜歸時和煦的月光與滿天星斗了。回想那時繼續升學的初衷，是為了接受更進一步更紮實的學術磨練，這兩年的我也確實達成這個短期目標。一路走來最要感謝的莫過於從小栽培我到大的父母，謝謝你們忍受許多頓餐桌上相看兩不厭對望進食的無奈，以及兒女不在家時的冷清孤單。還要感謝老師，兩年來常因實驗和修課的事讓你煩惱了，就連回到家也還幫寶貝學生思考試驗設計哪邊有缺失，只為了讓我們的試驗進行更順利。您教課真的教得很棒！也謝謝 R214 每一位來來去去曾經一起打拚的同胞們：奕婷、炤暉、登國、雅婷、雅琳、庭邵，謝謝你們！讓實驗室的每一個白天與夜晚變得如此歡樂有趣。

要感謝的人實在太多了。謝謝每一位在夜晚聽我抱怨實驗不順，進度延宕，開導我並幫我修改實驗方法的人。也謝謝每一位在人候室覺得我東西很多騎車很危險，而曾經幫我提過水耕液和材料的陌生人或是好朋友，因為你們，讓我覺得人間還是很有溫情的。更謝謝 91 級一起畢業的所有好同學們，與你們一同在夜晚討論煩惱論文進度，於白天為口試準備事宜奔波，這樣的革命情感都將成為人生中奇特的經歷之一。度過論文撰寫與修改的痛苦過程後，還想感謝一位永遠在背後默默支持我的人。謝謝你在我煩躁不安與崩潰大哭時給我擁抱，以及無數個白天夜晚陪我趕報告趕實驗，到溫室處理材料。當我寫論文寫到發脾氣不想繼續時，也總和顏悅色提醒我要堅持下去才能成功。真的謝謝你！謝謝你陪我度過這段對研究生來說最難熬的日子！最後想謝謝在台大六年所認識的每一個人，因為你，使我的人生增添更多樣色彩，而不單是空白。

今天，我想用力為自己拍手喝采！告訴自己：「你真的做到了！」

俊伶 linlinn 2008/7



中文摘要

本論文係以水稻品種台中在來1號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1) 為材料，探討 (一) 水稻在缺硫與鎘之雙重逆境對鎘毒害之影響與 (二) 水稻幼苗熱休克前處理對鎘逆境所誘導之銨離子累積與 PAL 活性增加之影響。

幼苗在缺硫下生長，至第三片葉片完全展開後進行鎘處理。試驗結果顯示，缺硫處理降低水稻幼苗地上部株高、鮮重和乾重，但不影響根長、根鮮重與根乾重。缺硫處理也降低水稻幼苗葉片蛋白質和葉綠素含量。不論以 3,3'-diamino - benzidine 染色觀察或化學分析都發現，缺硫會導致幼苗葉片與根部 H_2O_2 累積。但分析水稻幼苗第二片葉片與根中 ABA 含量，發現對照與缺硫處理間沒有顯著差異。缺硫處理亦可降低水稻幼苗含硫化合物，如：non-protein thiols、cysteine (Cys) 與 reduced 型式 glutathione (GSH) 之含量，與降低 ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR)、catalase (CAT) 之活性，然而缺硫處理增加 superoxide dismutase (SOD) 活性。試驗結果也顯示，缺硫之水稻幼苗會使後續之鎘毒害加重。外加 GSH、Cys 處理可降低缺硫幼苗所表現之鎘毒害。試驗結果似乎說明缺硫之水稻幼苗由於抗氧化物 (cysteine 與 glutathione) 含量與抗氧化酵素 (APX、GR、CAT) 活性之降低，是造成後續鎘毒害加劇的可能原因。

鎘逆境會誘導幼苗第二片葉片中 NH_4^+ 含量與 phenylalanine ammonia-lyase (PAL) 比活性增加，而熱休克前處理 (HS，黑暗下 $45^\circ C$) 則降低鎘所誘導 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性增加。在 $30^\circ C$ 黑暗下 (non-HS) 進行 H_2O_2 (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 前處理亦可降低鎘所誘導 NH_4^+ 累積與 PAL 比活性之增加。在 HS 狀況下處理 GSH 合成抑制劑 buthionine sulfoximine 與 NADPH oxidase 合成抑制劑 imidazole 可促進 NH_4^+ 累積與 PAL 比活性之增加。在 non-HS 狀況下，外加 ascorbate 及其合成前驅物 galactono-1,4-lactone 可降低鎘所誘導 NH_4^+ 累積與 PAL 比活性之增加。

關鍵字：水稻、鎘、缺硫、熱休克、銨離子



英文摘要

In this thesis, rice (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1) seedlings were cultivated hydroponically in green house and were used to study Cd toxicity of rice seedlings under sulfur deficient conditions. Also included this thesis is the effect of heat shock on Cd-induced accumulation of ammonium ion and increase specific activity in leaves of rice seedlings.

Length, dry weight and fresh weight of shoot and the contents of chlorophyll and protein content were reduced under sulfur-deficient conditions. Moreover, sulfur-deficient treatment resulted in accumulation of H₂O₂ in roots and leaves. However, sulfur deficiency had no effect on abscisic acid content. Sulfur containing compounds, such as non-protein thiols, cysteine and glutathione, were reduced in leaves of rice seedlings grown under sulfur-deficient conditions. Sulfur-deficient seedlings had lower activity of APX, GR and CAT, but higher activity of SOD than sulfur-sufficient seedlings. Exogenous application of glutathione, cysteine to sulfur-deficient rice seedlings reduced cadmium toxicity of rice seedlings. Results suggest that decrease in the contents of cysteine and glutathione and activities of APX, GR and CAT is the possible reasons of increase in cadmium toxicity in of rice seedlings under sulfur deficient conditions.

Cd treatment resulted in an accumulation of NH_4^+ and increase in PAL activity in leaves of rice seedlings. Rice seedlings were pretreated with heat shock (HS, 45°C, dark) at the time when the third leaves were fully expanded and then treated with CdCl_2 . The results indicated that CdCl_2 induced NH_4^+ accumulation and increased PAL activities in leaves of rice seedlings. HS pretreatment decreased Cd-induced NH_4^+ accumulation and PAL specific activity. H_2O_2 (0.5 mM) and GSH (1 mM) pretreatments under non-HS conditions also had the same effects as HS pretreatment. Pretreatments with GSH inhibitor, buthionine sulfoximine, or NADPH oxidase inhibitor, imidazole, under HS condition resulted in enhancing Cd-induced NH_4^+ accumulation and PAL specific activity. Under non-HS condition, pretreatments with ascorbate and its precursor galactono-1,4-lactone reduced Cd-induced NH_4^+ accumulation and decrease PAL specific activity.

Key words : rice, cadmium, sulfur deficiency, heat shock, NH_4^+

目錄

論文口試委員審定書.....	i
謝辭.....	ii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
縮寫字對照.....	xii
前言.....	1
一、鎘危害.....	4
二、鎘對植物體之生理影響及病徵.....	5
三、鎘與活化氧族的生成.....	5
四、鎘與植物的抗氧化系統.....	6
五、硫的重要性.....	8
六、綜合逆境.....	9
七、PAL 與 NH_4^+ 與逆境關係.....	10
八、熱休克反應與逆境抵禦.....	10
九、論文研究方向.....	11
材料方法.....	12
一、材料種植、處理與採收方式.....	12
二、水稻幼苗生長之分析.....	14
三、化學成分分析.....	14
四、酵素活性分析.....	21
五、供試藥劑原液之配置.....	24
六、數據統計分析.....	24
結果.....	25
討論.....	45
參考文獻.....	50

圖目錄

- 圖 1. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對地上部與根部之長度 (A)、鮮重 (B) 與乾重 (C) 的影響。.....26
- 圖 2. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片蛋白質 (A) 與葉綠素含量 (B) 之影響。.....27
- 圖 3. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片 H_2O_2 含量 (A, B) 與地下部 H_2O_2 含量 (C) 之影響。.....28
- 圖 4. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片 NPT (A)、Cys (B)、GSH (C) 與 AsA (D) 含量之影響。.....30
- 圖 5. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A, B)、APX (C, D)、GR (E, F) 與 CAT (G, H) 活性之影響。.....31
- 圖 6. 光照下 PQ (10 μ M) 與氯化鎘 (5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗第二片缺硫切離葉片對黃化 (A, B) 與葉綠素含量 (C) 之影響。.....32
- 圖 7. 氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) 對 TN1 水稻幼苗的第二片葉片黃化之影響。.....33
- 圖 8. 不同濃度 GSH (0、0.5、1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片黃化影響。..... 35
- 圖 9. 不同濃度 Cys (0、0.5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片黃化影響。.....36
- 圖 10. Cys (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片 GSH 含量之影響。.....37
- 圖 11. 氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 TN1 水稻幼苗對第二片葉片 NH_4^+ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。.....38

圖 12. 熱休克 (45°C) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH ₄ ⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 之影響 。	39
圖 13. H ₂ O ₂ (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH ₄ ⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。	40
圖 14. IMD (0.1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (6 天) 的幼苗第二片葉片 NH ₄ ⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響 。	41
圖 15. BSO (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH ₄ ⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。	43
圖 16. AsA (0.5 mM) 與 GalL (0.5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH ₄ ⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。	44



表目錄

表 1. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片與根 ABA 含量之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。對照與缺硫處理間沒有顯著差異。.....29



縮寫字對照

ABA	abscisic acid
ADI	acceptable daily intakes
AsA	ascorbic acid
APX	ascorbate peroxidase
CAT	catalase
Cys	cysteine
DHA	dehydroascorbate
DHAR	dehydroascorbate reductase
DAB	3,3- diamino-benzidine-HCl
γ -EC	γ -L-glutamyl-L-cysteine
γ -ECS	γ -Glutamylcysteine synthetase
ELISA	enzyme-liked immunosorbent assay
Gall	galactono-1,4-lactone
GR	glutathione reductase
GS	glutathione synthetase
GSH	glutathione
HS	heat shock
hsp	heat shock proteins
NPT	non-protein thiols
$O_2^{\cdot -}$	superoxide
OH^{\cdot}	hydroxyl radical
MDA	malondialdehyde
OAS	O-acetylserine
OASTL	O-acetylserine(thiol) lyase
PAL	phenylalanine ammonia-lyase
PQ	paraquat
PVP	polyvinyl pyrrolidone
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
TN1	Taichung Native 1
WHO	world health organization

前言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是目前重要的禾本科作物之一，也是世界上超過三分之一人口的主要熱量來源。為了達成未來10~20年食品的安全需求量，目前急切需要增加產量以及維持糧食供需平衡。然而，作物栽培的生育過程中經常遭遇各種生物性及非生物性的逆境，進而影響最終收穫產量。在農地不斷循環利用過程中，土壤肥力必日漸衰退，故以肥料施加方式以補所需元素之不足。然而肥料施用太過或不足皆會對植物體造成傷害，近年來由於肥料使用習性之改變，因此土壤中硫含量有日漸匱乏之虞 (Tandon, 1995)，植物因而常生長在缺硫狀況下。硫為大量元素之一，植物根部以硫酸根 (SO_4^{2-}) 型式吸收硫後，經長途運輸至器官各部進一步合成利用。硫不僅參與蛋白質及輔酶合成，為胺基酸 methionine 與cysteine 以及抗氧化物 GSH 之成分，光合作用中光反應所需之 ferredoxin 含有硫元素。硫並參與重金屬逆境保護作用 (Alscher *et al.*, 1997)，在植物生理中扮演重要角色。缺乏時，勢必對植物生長發育有所影響。

重金屬一般泛指比重接近或高於 5.0 g cm^{-3} 的金屬，常見的重金屬有銅、鋅、鉻、鎘、鉛、砷、鎳等。台灣地區農地土壤污染嚴重，水稻多以水田栽培，灌溉系統用水常循環利用，然而農地規劃不良，田區附近常有工廠，如此一來灌溉用水遭工業廢水重金屬污染機會大增。依據歷年土壤重金屬含量調查顯示，台灣地區農田約有一千公頃遭受銅、鋅、鉻、鎘、鉛、汞、砷、鎳等八種重金屬污染，使得表土中含量已達五級，其中以鎘污染最常耳聞 (張尊國, 2002)。土壤中鎘含量超過 10 ppm 即達環境污染值。作物栽培於鎘污染農地不僅妨礙作物生長狀況及產量，累積於稻穀內的鎘經人類攝食後亦會產生不良影響，最著名事件為 1955年日本富川縣神通川流域的「痛痛病」(Itai-itai disease) 事件。當地居民因食入鎘污染之稻米和魚貝，而產生骨質疏鬆、骨頭疼痛及腎小管功能失調等病症 (Watanabe

et al., 2000)。鎘逆境會引起水稻葉片抗氧化酵素活性改變，誘導氧化傷害與脂質過氧化作用發生，造成細胞氧化逆境 (Kuo and Kao 2004)。

作物栽培於田間必同時面臨多種生物及非生物逆境，逆境間不同交互作用之結果，或許使植物體產生抗性而更適應環境，也可能使生長受阻，最終造成單位面積產量下降。因此，研究逆境時不應只針對作物在個別逆境下的生長狀況，而應綜觀生育過程可能遭遇到之逆境。

熱休克 (heat shock, HS) 係給予作物高於最適生長溫度 5~15 °C 的短時間處理。Phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) 為酚類化合物合成的重要酵素，主要作用途徑是催化 phenylalanine 轉變為 *trans*-cinnamate，過程中釋放銨離子 (NH₄⁺)。鎘逆境所誘導水稻葉片 NH₄⁺ 含量增加被認為與 PAL 比活性升高有關 (Hsu and Kao, 2004)。水稻幼苗經熱休克前處理可誘導 H₂O₂ 累積，並進一步誘導抗氧化物 GSH、ascorbate (AsA) 含量與抗氧化酵素 ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR) 活性增加，提升抗氧化系統能力 (Hsu and Kao, 2007c)。

近年來，本研究室致力於水稻幼苗與鎘逆境之相關研究。曾探討過：(一) 氯化鎘影響水稻幼苗根生長之機制 (Chen and Kao, 1995a; Chen and Kao, 1995b)。(二) 氯化鎘對水稻切離葉片乙烯形成之影響 (Chen and Kao, 1995c)。(三) 氯化鎘對水稻切離葉片之毒害與脂質過氧化作用之關係 (Chien and Kao, 2000; Chien and Kao, 2001)。(四) 氯化鎘對水稻切離葉片之毒害與銨離子之關係 (Chien *et al.*, 2002; Hsu and Kao, 2003a)。(五) 水稻品種間蛋白質與胺基酸含量對鎘耐受性之影響 (Hsu and Kao, 2003b)。(六) 一氧化氮與水稻切離葉片氯化鎘耐受性間關係 (Hsu and Kao, 2004)。(七) 抗氧化酵素與氯化鎘耐受性之關係 (Kuo and Kao, 2004)。(八) ABA 與水稻幼苗鎘耐受性之關係 (Hsu and Kao, 2003c; Hsu and Kao, 2005; Hsu *et al.*, 2006)。(九) 多元胺與鎘逆境之關係 (Hsu and Kao, 2003d; Hsu and Kao, 2007a)。(十) 過氧化氫累積對水稻幼苗鎘毒害之調控 (Hsu and Kao, 2007b)。(十一) 熱休克與水

稻幼苗鎘逆境之關係 (Hsu and Kao, 2007c)。而本論文則繼續探討缺硫情況下鎘對水稻毒害之影響，以及水稻幼苗熱休克前處理對鎘逆境所誘導之銨離子累積與 PAL 活性增加之影響。



前人研究

一、鎘危害

重金屬一般泛指比重接近或高於 5.0 g cm^{-3} 的金屬，常見的重金屬有銅、鋅、鉻、鎘、鉛、汞、砷、鎳等，其中鎘 (cadmium, Cd) 的工業用途極廣，早在數十年前已應用於電鍍、鎳鎘電池以及製造塑膠穩定劑原料中，採礦、磷礦生產的肥料及工業廢水是鎘污染的主要來源。近年來台灣西部沿海地下水的大量抽取利用、再灌溉，使得鎘污染農地面積有日益擴大的趨勢 (張尊國, 2002)。土壤中鎘含量超過 10 ppm 即達環境汙染值，依據行政院環保署歷年土壤重金屬含量調查顯示，全台 116 萬餘公頃農土中，約有一千公頃遭受重金屬污染之威脅，319 公頃農地土壤重金屬調查與場址列管計畫，其中又以台中及彰化為台灣農地受重金屬污染最嚴重地區 (鄒裕民, 2007)。

作物栽培於鎘污染農地不僅妨礙作物生長狀況及產量，累積於稻穀內的鎘經人類攝食後亦會產生不良影響，故桃園縣觀音鄉的鎘污染土地強制休耕，以免造成更大的禍害。鎘經攝取後在人體內具累積性，不易經代謝而排出體外。依聯合國世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 公告之數據，鎘的每日容許攝取量 (acceptable daily intakes, ADI) 為 0.05 mg。動物研究證據顯示，鎘中毒可能會造成呼吸系統、心血管系統病變，並導致腎臟異常，影響腎小管功能，產生蛋白尿、糖尿等病症。鎘中毒亦會對骨骼產生危害 (Kim *et al.*, 2003)。1955年日本富川縣神通川流域著名的「痛痛病」 (Itai-itai disease) 事件，便是由於礦山排出之廢水中含鎘，流入河川後累積於稻米和魚貝體內，農民食用這些食物後累積至鎘中毒劑量，產生骨質疏鬆、骨頭疼痛及腎小管功能失調病症，中毒者四肢軀幹疼痛終日呻吟哀號，故名「痛痛病」 (Watanabe *et al.*, 2002)。

二、鎘對植物體之生理影響及病徵

鎘在植物體中主要累積於液胞與 apoplast (Cosio *et al.*, 2005)，鎘所誘導產生之傷害以老葉特別明顯，葉片黃化為鎘毒害最常見之病徵 (Das *et al.* 1997)。鎘會抑制植物生長，對根尖產生傷害，降低水份及其他金屬離子 (例如： Fe^{2+}) 吸收，降低植物體內光合作用效率，同化產物供應減少導致葉片黃化與乾物重下降，及擾亂微量元素的分配利用 (Das *et al.*, 1997; Sanitádi Toppi and Gabbrielli, 1999; Wu and Zhang, 2002; Hsu and Kao, 2007a)。本研究室以水稻為材料所建立的試驗系統，不論以氯化鎘處理切離葉片或水稻幼苗，皆會導致黃化現象及葉綠素與蛋白質含量降低 (Chien and Kao, 2000; Hsu and Kao, 2003a, 2005)。除此之外，鎘逆境引起水稻葉片抗氧化酵素活性改變，造成細胞間氧化傷害與脂質過氧化作用，最終引起氧化逆境 (Kuo and Kao 2004)。

三、鎘與活化氧族的生成

自然界中許多因素皆會導致氧化傷害的產生，例如：強光、乾旱、高溫、寒害、病原菌入侵、重金屬、殺草劑等，皆會導致活化氧族 (reactive oxygen species, ROS) 生成。ROS 是一群性質極為活潑，氧化能力很強的含氧物的總稱，逆境發生時膜通透性增大，內膜系統可能膨脹、收縮或破損，引起細胞膜脂質過氧化作用，當膜系受到破壞時會發生離子滲漏現象，更進一步導致蛋白質變性、核酸降解、老化之氧化傷害。ROS 產生之處有五，分別為葉綠體、粒線體、glyoxisomes、peroxisomes 與細胞壁，並可區分為超氧自由基 (superoxide, $\text{O}_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot}) 與過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 三類。正常狀態下，葉綠體行光合作用時在光反應步驟會形成 ATP 與 NADPH。NADPH 為碳反應利用後形成 NADP^+ ， NADP^+ 再與光反應傳遞之電子結合回復成 NADPH，如此週而復始循環。逆境下碳反應受阻， NADP^+ 減少，光系統中電子無法完全被接受，使 NADP^+ 回復成 NADPH，於是多餘的電子與氧結合，產生 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 再經由 superoxide

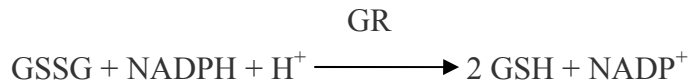
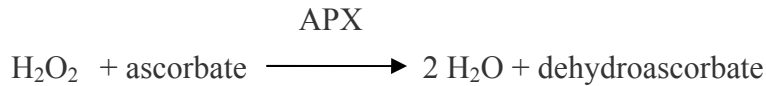
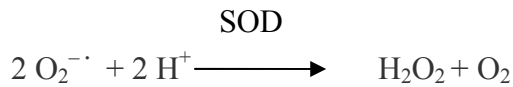
dismutase (SOD) 或自發轉換為毒性較弱之 H_2O_2 。

H_2O_2 在植物中的角色視其濃度而定，高濃度時是對植物產生氧化傷害之 ROS，但於低濃度時則扮演訊息傳遞角色，參與不同的訊息傳導路徑，例如：離層酸 (abscisic acid, ABA) 調節之氣孔開閉機制 (Pei *et al.*, 2000)、生長素 (auxin) 調控之向地機制 (Joo *et al.*, 2001)、細胞死亡 (de Pinto *et al.*, 2002) 等。鎘所誘導之細胞死亡或毒害被認為與 H_2O_2 累積有關 (Fojtova and Kovacak, 2000; Cho and Seo, 2005; Hsu and Kao, 2007)。水稻幼苗鎘毒害現象之產生，是由於水稻葉片中 H_2O_2 的累積 (Hsu and Kao, 2007b)。此外， H_2O_2 含量的增加可以誘導植物發生某些適應性的生理代謝變化，產生交叉保護作用以提高植物抗逆性。Ryoung 和 Daniel (2004) 研究發現，缺鉀玉米植株中的 H_2O_2 含量提高，累積部位集中於根部，並促進鉀離子通道吸收效率。 H_2O_2 亦會誘導水稻發芽種子胚中抗氧化酵素 APX 的基因表現 (Morita *et al.*, 1999)。

鎘毒害被認為與氧化逆境相關，因為鎘會誘導 ROS 生成 (Sandalio *et al.*, 2001; Schützendübel *et al.*, 2001; Kuo and Kao, 2004)，提高 H_2O_2 (Cho and Seo, 2005; Hsu and Kao, 2007b) 與 MDA 含量 (Das *et al.*, 1997; Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999; Wu and Zhang, 2002; Hsu and Kao, 2007b)。外加鎘處理亦會增加細胞膜脂質過氧化程度 (Sandalio *et al.*, 2001)，提高細胞間氧化傷害 (Lozano-Rodriguez *et al.*, 1997; Chien *et al.*, 2002; Kuo and Kao, 2004)，在水稻及菜豆中皆被觀察到。

四、鎘與植物的抗氧化系統

為減輕 ROS 的危害，植物體本身具有抗氧化系統以作逆境防禦，抗氧化系統中含抗氧化酵素與抗氧化物兩大類 (Noctor and Foyer, 1998; Asada, 1999)。抗氧化酵素包括 superoxide dismutase (SOD)、ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR) 和 catalase (CAT)，催化反應式如下：



常見的抗氧化物則有還原態 glutathione (GSH)、ascorbic acid (AsA)。Neill 等人 (2002) 認為 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 轉化為毒性較弱之 H_2O_2 後，可藉 GSH - AsA cycle 清除 H_2O_2 。首先 APX 在將 H_2O_2 代謝為 H_2O 的過程，同時將 AsA 轉換為 dehydroascorbate (DHA)，中間牽涉到 dehydroascorbate reductase (DHAR) 作用，DHAR 同時催化 GSH 轉變為 GSSG，GSSG 再轉變為 GSH 則需 GR 參與作用，同時讓 NADPH 氧化成 NADP^+ 。

逆境下所產生的 ROS，可藉低分子量的抗氧化物及抗氧化酵素清除 (Asada, 1999; Scandalios, 2002; Mittler *et al.*, 2004)。過量表現 SOD 基因可保護植物，降低氧化傷害 (Gupta *et al.*, 1993)。鎘處理會改變抗氧化酵素，例如：SOD、APX、GR、CAT、POX 的活性 (Somashekaraiah *et al.*, 1992; Dixit *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2001; Vitoria *et al.*, 2001; Kuo and Kao, 2004)。GSH 為水溶性、低分子量的抗氧化物，GSH 在細胞間扮演的角色有許多，不僅參與抗氧化系統，在 GSH - AsA cycle 中清除 ROS (Noctor and Foyer, 1998; Foyer and Noctor, 2003, 2005)，GSH 可視為逆境指標 (Tausz *et al.*, 2004)。鎘處理會降低水稻、菜豆與向日葵中抗氧化物 GSH 與 AsA 生合成 (Nussbaum *et al.*, 1988; Gallego *et al.*, 1999; Hsu and Kao, 2007b)。鎘對植物

體造成之毒害，最先會觀察到 GSH 含量之下降 (Schüzendübel and Polle, 2002)。

五、硫的重要性

在自然界的眾多金屬元素中，目前已知有十六種元素為植物生長所必需，常稱為必要元素。依植物所需多寡，可區分為大量元素及微量元素。除碳、氫、氧之外，多數營養元素來自土壤中。但就栽培觀點而言，沒有可不斷維持高土壤活力，長期蓄積足量營養元素供作物各生育時期吸收利用之完美田區，因此必須適時施用肥料以補不足。但植物內部的營養狀態受許多複雜因素影響，例如：根活性、溫度、光線、通氣性、離子運輸蛋白等因素，皆會影響養份自土壤中吸收效率。過去，硫元素普遍存在氮、磷、鉀三肥料中，例如：硫酸銨、過磷酸鈣 (single super phosphate, $\text{CaH}_4\text{O}_2\text{P}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。過磷酸鈣由硫酸處理磷礦石而得，主要有效成分是磷酸二氫鈣、磷酸氫鈣和少量磷酸，並含有無水硫酸鈣。但近年來肥料施用型式改變，尿素及重鈣 (triple super phosphate, $\text{CaH}_6\text{P}_2\text{O}_9$) 之施用逐漸取代過去慣用之硫酸銨、過磷酸鈣。重鈣不含硫酸鐵及硫酸鋁，幾乎全部由磷酸鈣組成，因此土壤中硫含量有日漸匱乏之虞 (Tandon, 1995)，植物因而常生長在缺硫狀況下。

硫為大量元素之一，以硫酸根 (SO_4^{2-}) 型式為植物根部吸收後，經長途運輸送到器官各部進一步合成利用。硫參與蛋白質及輔酶合成，蛋白質中若干胺基酸 (methionine、cysteine) 以及抗氧化物 GSH 之成分亦含硫，光合作用中光反應所需之 ferredoxin 含有硫元素。硫並參與重金屬逆境保護作用 (Alscher *et al.*, 1997)，在植物生理中扮演重要角色。

硫的同化過程中會形成許多重要的含硫化合物，其中 *O*-acetylserine (OAS) 經 *O*-acetylserine(thiol) lyase (OASTL, EC 4.2.99.8) 催化形成 cysteine (Cys)。Cys 和 glutamine 經 γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -ECs) 作用後形成 γ -L-glutamyl-L-cysteine (γ -EC)， γ -EC 接著與 glycine 經 glutathione synthetase 催化形成 GSH。

缺硫時，植物生長受阻，且地上部生長受阻較地下部明顯。缺硫時病徵與缺氮相似，葉片會有黃化現象產生，不論新葉或老葉皆然，但以新葉較為明顯 (Robson and Pitman, 1983)，在水稻 (Cereal Knowledge Bank website, <http://www.knowledgebank.irri.org/>)、黑胡椒 (Nybe and Nair, 1989)、番茄 (Gupta and Sanderson, 1993) 與甘藍 (Stuiver *et al.*, 1997) 皆觀察到此現象。在禾穀類及豆科作物中，缺硫導致含硫蛋白質及含硫胺基酸含量下降 (Randall and Wrigley, 1986)，以及 GSH 合成量減少 (Noctor and Foyer, 1998; Asada, 1999)。玉米缺硫時高親合性硫離子運輸蛋白 ZmST1;1 表現量上升，促進 SO_4^{2-} 自根中吸收 (Quaggiotti *et al.*, 2003)，以利硫的同化作用順利進行，合成 Cys (Akiko *et al.*, 2003)。

硫可有效減輕水稻中鎘毒害所引起的生長抑制及氧化傷害現象 (Astolfi *et al.*, 2004)。水稻生長於缺硫狀態，其韌皮部滲出液中之 GSH 含量降低 (Kuzuhara *et al.*, 2000)。缺硫狀態下同時遭遇鎘毒害，會誘導硫合成相關酵素如：ATP-Sulfurylase 活性升高，以增加抗氧化物 GSH 的合成量 (Nussbaum, 1998)。Hassan 等人 (2005) 研究發現，含硫成分較高的水稻種子在鎘逆境下，生長出之幼苗比種子含硫成分低的幼苗合成更多 GSH，可抵禦氧化逆境、降低 MDA 含量，減輕因鎘毒害而產生之生長抑制。於水稻中過量表現菸草的 OASTL 相關基因，可提高含硫化合物含量而對抗鎘毒害 (Harada *et al.*, 2001)。

六、多重逆境

相較於實驗室中固定光照強度、時間、溫度與病蟲害控制等生長條件，作物在田間栽培的生育過程中經常遭遇各種生物性及非生物性的逆境，進而影響最終收成產量。常見的生物逆境包括病蟲害、雜草等，非生物逆境主要有溫度（熱害、寒害）、水分（乾旱和淹水）、鹽分、環境污染（例如重金屬污染、臭氧、UV 傷害）。不同逆境因子間通常相互關聯而非單一發生，例如缺水常伴隨著鹽鹼和高溫逆境。Mittler (2006) 提出多重逆境概念，認為不同逆境間具有交互作用，在不

同交互作用下植物體或許因產生抗性而更適應環境，也可能因為多重逆境同時發生使生長受阻，更甚者造成植株死亡。因此，研究逆境時不應只針對作物在個別逆境下的生長狀況，而應綜觀可能遭遇到的逆境。此概念亦為本篇論文研究的出發點，欲探討缺硫與鎘雙重逆境同時發生對鎘逆境毒害之影響。

七、PAL 與 NH_4^+ 與逆境關係

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) 為酚類化合物合成的重要酵素，主要作用途徑是催化 phenylalanine 轉變為 *trans*-cinnamate，過程中釋放銨離子 (NH_4^+)。 NH_4^+ 為氮素同化作用之中間產物 (Mifflin and Lea, 1976)，但是高含量 NH_4^+ 會對植物細胞產生危害 (Marchner, 1995; Givan, 1979)。鎘逆境促使脂質過氧化作用發生，誘導水稻葉片中 NH_4^+ 含量提高 (Hsu and Kao, 2003a)。 NH_4^+ 含量的提高被認為與 PAL 比活性上升有關 (Hsu and Kao, 2004)。 PAL 活性之提高可視作植物體遭受環境逆境的指標 (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a, 2000b)。
光照下巴拉刈處理所產生之 ROS，會誘導水稻葉片中 NH_4^+ 累積以及 PAL 活性上升 (Chien *et al.*, 2002)。馬鈴薯塊莖中因傷口而誘導提升之 PAL 比活性被認為與 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 形成有關 (Kumar and Knowles 2003)。

八、熱休克反應與逆境抵禦

熱休克 (heat shock, HS) 處理係指給予作物高於最適生長溫度 5~15 °C 的短時間處理。熱休克前處理對後續逆境如：鹽害 (Harrington and Alm, 1988; Kuznetsov *et al.*, 1993)、冷害 (Lafuente *et al.*, 1991; Sebehat *et al.*, 1996)、重金屬 (Wollgiehn and Neumann, 1995) 及氧化傷害 (Banzet *et al.*, 1998)，具交叉保護作用 (Lanciloti *et al.*, 1996)，有效提高植物對後續逆境的容忍力。熱休克處理後誘導熱休克蛋白 (heat shock proteins, hsps) 生成，hsps 屬 chaperone 的一種，可修飾蛋白質摺疊型式，改變蛋白質構型，進而調控下游基因的轉錄及轉譯作用及酵素活性，影響

作物對逆境耐受性 (Sato and Yokoya, 2008)。Kang and Saltveit (2003) 研究發現，hsp 中 hsp 23 的作用與 PAL 活性降低有關。對萵苣進行熱休克處理後可降低原本因傷口誘導而提升之 PAL 活性，減少 PAL 蛋白質表現以及酚類化合物的累積量，延緩組織褐化現象 (Loaiza-Velarde *et al.*, 1997; Loaiza-Velarde and Saltveit, 2001; Saltveit, 2001; Reinaldo *et al.*, 2003)，在菸草中也有相同結果 (Moriwaki *et al.*, 1999)。熱休克前處理亦可調控荷蘭芹受到紫外線與真菌傷害時，酚類化合物的合成反應 (Walter 1979)。經熱休克前處理所誘導提升之 SOD、CAT 與 APX 活性，可抵禦後續逆境 (Kang and Saltveit, 2003)。於鎘逆境發生前先給予熱休克前處理可增加 H₂O₂ 含量，提高 APX、GR 酵素活性，以及抗氧化物 GSH 含量，因此提高水稻幼苗對後續鎘逆境毒害之耐性 (Hsu and Kao, 2003)。

九、論文研究方向

本篇論文共分兩部分，第一部分以多重逆境概念為研究出發點，欲探討缺硫與鎘毒害雙重逆境對水稻幼苗生長之影響。第二部分著重於水稻幼苗熱休克前處理對鎘逆境所誘導之銨離子累積與 PAL 活性增加之影響。

材料方法

本論文共分兩大部分，第一部分探討缺硫狀態下水稻幼苗鎘逆境生理之研究，第二部分著重於熱休克效應與水稻幼苗抵抗鎘逆境之關係。使用材料皆為台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1)，以水耕方式種植材料。

一、材料種植、處理與採收方式

挑選飽滿且均一的水稻種子，經 2.5% 次氯酸鈉消毒後，以蒸餾水洗滌，將種子放置於墊有濕潤吸水紙之培養皿中，於 37°C 黑暗生長箱中催芽 24 小時後，將種子鋪於 150 mL 燒杯內之鐵質網架上，燒杯外包圍一層錫箔紙，以水耕方式種植材料。對照 (即正常) 處理之水耕液採用木村式 (戶刈義次 1963) 水耕液 (A、B 液半量，C 液全量，不含 $\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7$) 栽培，若為缺硫處理 (-S) 則將硫酸離子以硝酸離子或氯離子取代，水耕液均以二次蒸餾水配置，其配方如下：

(一) 對照組水耕液之配方

A :	in 1 L	→ 即為 Stock A
(500 X)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.10 g
	KNO_3	9.25 g
	MgSO_4	33.00 g
	KH_2PO_4	12.40 g

B :	in 1 L	→ 即為 Stock B
(500 X)	Fe-citrate	7.5 g
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	30.0 g
	1N HCl	500 mL

C :	in 1 L	→ 再稀釋 10 倍為 Stock C
(10,000 X)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.34 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.58 g
	Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0.13 g

(二) 缺硫處理水耕液之配方

A :	in 1 L	→ 即為 Stock A
(500 X)	KNO ₃	9.3 g
	KH ₂ PO ₄	12.4 g
	NH ₄ Cl	9.8 g
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	61.2 g

B :	in 1 L	→ 即為 Stock B
(500 X)	Fe-citrate	7.5 g
	Ca(NO ₃) ₂	30.0 g
	1N HCl	500 mL

C :	in 1 L	→ 再稀釋 10 倍為 Stock C
(10,000 X)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.40 g
	ZnCl ₂	0.27 g
	CuCl ₂ · 4H ₂ O	0.09 g

幼苗生長的水耕液中，不論對照組或是缺硫處理，每公升皆含 1 mL Stock A、1 mL Stock B 與 1 mL Stock C，並將 pH 值調整至 4.7~4.8，栽培期間每隔三天更換一次水耕液，置於自然光照之人工氣候室中（日溫 30°C / 夜溫 25°C）生長。第一部分的試驗材料，待第三片葉片完全展開後將材料分成兩部分。一部份材料切下第二片葉片或植株，分析對照與缺硫植株之差異，另一部分材料則進行鎘處理，或者先進行一些藥劑之前處理再進行鎘處理。鎘處理是在水耕液中添加氯化鎘 (5 μ M)。鎘處理適當時間 (6 或 7 天) 後，取出幼苗檢視鎘之毒害 (通常是以黃化程度與葉綠素含量來做為毒害指標)，進行後續分析試驗。切離葉片試驗則於第三片葉片完全展開時切下第二片葉片 (10 片)，葉片置於含有 20 mL 化學藥劑 [CdCl₂ 或 paraquat (PQ)] 之培養皿中，於 27°C 光線下處理 24 小時，然後檢視黃化程度與測定葉綠素含量。

第二部分熱休克試驗之水稻幼苗生長在正常處理之水耕液中，於第三葉片完全展開後，進行熱休克處理。熱休克處理 (HS) 方式是以水稻幼苗植株自人工氣候室取回後，置於 45°C 黑暗生長箱中處理三小時，對照組 (non - HS) 則於 30°C 黑暗生長箱中同樣處理三小時。HS 處理或 non - HS 處理後進行添加或不添加氯化鎘處理。於處理適當時間後切下第二片葉片進行化學分析。上述所有試驗均以 10 片葉片為一重複、每處理重複四次分析。

二、水稻幼苗生長之分析

將水稻幼苗分離成地上部或根部。地上部或根長度以尺丈量，然後將地上部與根分離後立即秤重為其鮮重 (FW)，秤完重量再將材料放進 65°C 烘箱中烘乾兩天，取出秤重即為乾重 (DW)。

三、化學成分分析

(一) 葉綠素含量測定

葉綠素含量測定係以 Wintermans 與 De Mots (1965) 之方法修改。取水稻第二片葉片 10 片，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80) 研磨萃取後，取均質萃取液 40 μ L 加入 960 μ L ethenol (100%)，混合均勻後於 4°C 黑暗中靜置 30 分鐘，再以 4°C、1000 g 條件離心 15 分鐘，取出上清液。上清液以分光光度計測定波長 665 nm、649 nm (A_{665} 、 A_{649}) 之吸光值，空白組以 ethanol (95%) 代替進行相關步驟。

葉綠素濃度 (mg Chl mL^{-1}) 採 $(6.1 \times A_{665} + 20.04 \times A_{649})$ 公式估算，樣品葉綠素含量 (mg g^{-1} FW) 為葉綠素濃度 (mg Chl mL^{-1}) $\times 1 \text{ mL} \times 50$ (稀釋倍數) \div 樣品原始鮮重 (g) $\div 1000$ 。

(二) 蛋白質含量測定

蛋白質含量測定係以 Bradford (1976) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨萃取後，取均質萃取液以 4°C、17600 g 條件離心 20 分鐘，取 20 μ L 上清液加入 5 mL dye solution，攪拌靜置十分鐘後以分光光度計測定波長 595 nm (A_{595}) 之吸光值，空白組以 sodium phosphate buffer 代替進行相關步驟。

Dye solution 之配置方法係以 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 粉末溶於 50 mL ethanol (95%, v/v) 中，加入少許二次水攪拌至完全溶解後，再加入 100 mL phosphoric acid (85%, v/v)，最後以二次蒸餾水定量到 1 L，並以 Whatman No.1 濾紙過濾後存放於褐色瓶中 4°C 冷藏備用。

樣品蛋白質含量 (mg g^{-1} FW) 計算方式為 $A_{595} \div 0.01$ (K , $\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 100$ (稀釋倍數) $\div 1000 \div$ 樣品原始鮮重 (g)。

(三) 組織化學法檢定過氧化氫

過氧化氫含量之組織化學法分析係根據 Orozco - Cardenas and Ryan (1999)

方法修改而成。將處理過後之水稻切離葉片切口浸泡於 2 mL 3,3 - diamino-benzidine-HCl (DAB, $1 \mu\text{L mL}^{-1}$, pH 3.8) 染劑中，置於 27°C 及光照下的生長箱中 24 小時，將葉片取出放入 95% 酒精中並煮沸 30 分鐘，直到綠色部分退去，將酒精倒掉再將葉片移入新的 95% 酒精中。產生棕色點部位即為過氧化氫存在部位，顏色越深表示過氧化氫含量越高，並將組織化學染色處理後的葉片，以掃描方式擷取圖片。

(四) 過氧化氫含量測定

過氧化氫含量測定係以 Jana 與 Choudhuri (1981) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80, 內含 1 mM hydroxylamine) 研磨萃取後，取均質萃取液以 4°C、6000 g 條件離心 25 分鐘，取 2 mL 上清液加入 1 mL TiCl_4 [0.1% (v/v) 溶於 20% (v/v) H_2SO_4]，震盪均勻於室溫下以 1000 g 條件離心 15 分鐘，以分光光度計測定波長 410 nm (A_{410}) 之吸光值，空白組以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80, 內含 1 mM hydroxylamine) 代替進行相關步驟。

樣品過氧化氫含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 計算方式為 $A_{410} \div 0.28$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 1.5$ (稀釋倍數) \div 樣品原始鮮重 (g)。

(五) 脫落酸 (Abscisic acid, ABA) 含量測定

Enzyme - liked immunosorbent assay (ELISA)

脫落酸含量測定係以 Walker-Simmons (1987) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 1.5 mL 80% methanol (內含 2% acetic acid) 冰浴研磨萃取後，置於 4°C 黑暗下 48 小時，之後以 4°C、5000 g 條件離心 10 分鐘，取 1 mL 上清液以低溫真空壓縮機 (Speed Vac, Savant) 進行抽乾。抽乾後依序加入 0.5 mL 100% methanol 與 0.5 mL 0.2 N $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 後，震盪均勻使其完全溶解，

於 4°C 下靜置 10 分鐘後過 polyvinyl polypyrrolidone (PVP) 管柱，接著以 6 mL 二次蒸餾水清洗 PVP 管柱並收集濾液，並加入 100 μL 100% acetic acid。

接下來將濾液緩慢通過 C₁₈ 管柱 (Sep - Pak[®] Cartridges, Waters)，以 4 mL 20% methanol (內含 2% acetic acid) 清洗 C₁₈ 管柱，主要目的為去除雜質，之後再加入 4 mL 55% methanol (內含 2% acetic acid)，並收集濾液，濾液即含脫落酸，將其置於真空壓縮機進行抽乾。加入 200 μL TBS buffer 於抽乾之樣品內，以溶出樣品中脫落酸。

取出 100 μL 樣品或不同濃度脫落酸標準液，加入已塗脫落酸單株抗體之 well 中，再加入 100 μL tracer，以膠紙密封於 4°C 黑暗靜置三小時後，將 well 中液體倒出，以 200 μL wash solution 清洗三次，每次十分鐘，之後將清洗液倒出，每 well 加入 200 μL reaction buffer，以 ELISA reader 測定 37 °C 下波長 405 nm (A₄₀₅) 之吸光值，每十分鐘讀值一次，取最適當之讀值計算脫落酸含量。

標準曲線係以不同濃度脫落酸溶液，以上述方法波長 405 nm (A₄₀₅) 之吸光值後換算結合百分率 (% binding)，求得標準曲線。樣品亦可求得結合百分率，與標準曲線比對後即可得樣品脫落酸含量，以 pmol g⁻¹ FW 表示。結合百分率以下列公式估得：

$$\frac{\text{標準 ABA 溶液或樣品在 } A_{405} \text{ 下吸光值} - 1 \mu\text{M ABA 在 } A_{405} \text{ 下吸光值}}{\text{無 ABA 時在 } A_{405} \text{ 下吸光值} - 1 \mu\text{M ABA 在 } A_{405} \text{ 下吸光值}} \times 100\%$$

TBS buffer、trace solution、wash solution 與 reaction buffer 皆為 agidia[®] 公司生產的 Phytodetek[®] ABA kit，配置方法如下：

(1) TBS buffer

50 mM tris、146 mM NaCl、1mM MgCl₂、0.02% sodium azide (pH 7.5)。

(2) trace solution

一瓶 tracer 先加 1 mL 蒸餾水，五分鐘後每瓶 tracer 再加入 4 mL tracer dilute 備用，此溶液應新鮮配置。

(3) wash solution

1000 mL (pH 7.4) 應含有 8.0 g NaCl、1.15 g sodium phosphate、0.20 g potassium phosphate、0.20 g KCl、0.05 g Tween - 20、0.20 g sodium azide。

(4) reaction buffer

PNP (p - nitrophenyl phosphate disodium salt) substrate tablet (5 mg/錠) 溶於 5 mL substrate dilute (pH 9.8, 1000 mL 中含有 0.10 g MgCl₂、0.20 g NaNO₃、97.0 g diethanolamine)。

(六) AsA 含量測定

AsA 含量測定係以 Laws et al. (1983) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 1 mL trichloroacetic acid (TCA, 5%, w/v) 研磨萃取後，取均質萃取液以 15000 g 條件離心 20 分鐘，取 200 μ L 上清液加入 200 μ L sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.40) 於室溫下混合均勻，接著再加入 200 μ L 二次水靜置 15 分鐘後，再依序加入 200 μ L 二次水、400 μ L TCA (10%, w/v)、400 μ L phosphoric acid (44%) 與 400 μ L 2,2 - bipyridyl (4%, w/v)，溶於 70%ethanol 中，震盪均勻後加入 200 μ L FeCl₃ (3% w/v)，於 37°C 水浴搖晃一小時後接著以 10000 g 條件離心 5 分鐘，取上清液以分光光度計測定波長 525nm (A₅₂₅) 之吸光值，空白組以 TCA (5%, w/v) 代替進行相關步驟。

樣品 AsA 含量 (μ mol g⁻¹ FW) 計算方式為 $A_{525} \div 8.092 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 5 (\text{稀釋倍數}) \div \text{樣品原始鮮重 (g)}$ 。

(七) GSH 與 GSSG 含量測定

GSH 與 GSSG 含量測定係以 Smith (1985) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 1 mL sulfosalicylic acid (SSA, 5%, v/v) 研磨萃取，均質萃取液以 15000 g 條件離心 10 分鐘，進行 total glutathione (GSH + GSSG) 與 GSSG 含量分析。

1. GSH + GSSG 含量分析

取上述離心後上清液 10 μL 加入 15 μL SSA 進行稀釋，將總體積 25 μL 稀釋液注入 8 \times 12 Microplate 樣品槽中，每個 well 依序加入 175 μL sodium phosphate buffer (143 mM, pH 7.5, 內含 6.3 mM EDTA 與 0.3 mM NADPH)、20 μL 6 mM 5,5 - dithiobis (2 - nitrobenzoic acid) (DTNB)，最後加入 20 μL GR (0.5 unit well⁻¹) 後，立刻將 plate 放入 ELISA reader 中，測定 600 秒內波長 412 nm (A_{412}) 吸光值之變化。

標準曲線之建立則以 GSH 或 GSSG (10 μM) 加二次蒸餾水配置，以標準曲線換算得樣品中 GSH + GSSG 濃度。樣品 GSH + GSSG 含量 (nmol g⁻¹ FW) 計算方式為實測含量 \times 250 (稀釋倍數) \div 1000 \div 樣品原始鮮重 (g)。

2. GSSG 含量分析

取上述離心後上清液 200 μL 加入 4 μL 2 - vinylpuridine 與 6 μL triethanolamine (TEA, 30 mM) 於室溫下至少反應一小時以除去樣品中的 GSH，之後以 15000 g 條件離心 5 分鐘，取上清液 10 μL 加入 15 μL SSA 進行稀釋，將總體積 25 μL 稀釋液注入 8 \times 12 microplate 樣品槽中，每個 well 依序加入 175 μL sodium phosphate buffer (143 mM, pH 7.5, 內含 6.3 mM EDTA 與 0.3 mM NADPH)、20 μL 6 mM DTNB，最後加入 20 μL GR (0.5 unit well⁻¹) 後，立刻將 plate 放入 ELISA reader 中，測定 600 秒內波長 412 nm (A_{412})

吸光值之變化。

標準曲線之建立則以 GSH 或 GSSG (10 μ M) 加二次蒸餾水配置，以標準曲線換算得樣品中 GSSG 濃度。樣品 GSSG 含量 (nmol g^{-1} FW) 計算方式為實測含量 \times 250 (稀釋倍數) \div 1000 \div 樣品原始鮮重 (g)。

3. GSH 含量分析

樣品 GSH 含量 (nmol g^{-1} FW) 計算方式為 GSH + GSSG 含量減去 GSSG 含量。

(八) Cys 含量測定

Cys 含量測定係以 Gaitonde (1967) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 5 mL perchloric acid (5%, v/v) 冰上研磨萃取，均質萃取液以 4°C、17600 g 條件離心 20 分鐘，取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL acetic acid 與 0.5 mL acid ninhydrin reagent (內含 0.25 g ninhydrin、6 mL acetic acid 與 4 mL 濃鹽酸，於室溫下混合約 20–30 分鐘)，充分攪拌之後試管以塑膠蓋封住，於 100°C 水浴中反應 10 分鐘，於自來水中冷卻中止反應。以分光光度計測定波長 560 nm (A_{560}) 之吸光值，空白組以 5% (v/v) perchloric acid 代替進行相關步驟。

樣品 Cys 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 計算方式為 $A_{560} \div 14.21$ (K, $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) \times 10 (稀釋倍數) \div 樣品原始鮮重 (g)。

(九) Non-protein thiols 含量測定

Non-protein thiols (NPT) 含量測定係以 Del Longo (1993) 與 Rama Devi 和 Prasad (1998) 之方法修改而來。取水稻第二片葉片 10 片，以 1 mL sulfosalicylic acid (5%, v/v) 研磨萃取，均質萃取液以 4°C、8000 g 條件離心 15 分鐘，取 100 μ L 上清液加入 1 mL tris-HCl (0.2 M, pH 8.2) 與 75 μ L DTNB 溶

於 0.2 M tris-HCl, pH 8.2 中), 靜置 20 分鐘後以分光光度計測定波長 412 nm (A_{412}) 之吸光值, 空白組以 5% (v/v) sulfosalicylic acid 代替進行相關步驟。

樣品 NPT 含量 ($\mu\text{mol GSH eq g}^{-1}$ FW) 計算方式為 $A_{412} \div 12.58$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 10$ (稀釋倍數) \div 樣品原始鮮重 (g)。

(十) 銨離子 (NH_4^+) 含量測定

NH_4^+ 含量分析係以 Weatherburn (1967) 之方法修改。取水稻第二片葉片 10 片, 以 3 mL H_2SO_4 (0.3 mM, pH 3.5) 研磨萃取後, 以 4°C 、17600 g 條件離心 30 分鐘, 取 200 μL 上清液加入 3.8 mL H_2SO_4 (0.3 mM, pH 3.5) 後, 再依序加入呈色劑 A 液與 B 液, 並於 37°C 水浴震盪 20 分鐘, 最後以分光光度計測定波長 625 nm (A_{625}) 之吸光值, 空白組則以 H_2SO_4 (0.3 mM, pH 3.5) 取代進行相關步驟。

呈色劑 A 液是將 5 g phenol 先以二次蒸餾水攪拌溶解至透明狀再加入 20 mg sodium nitroprusside 中, 最後以二次水定量至 100 mL。呈色劑 B 液是將 5 g NaOH 加入 40 mL sodium hypochloride 中, 以二次水定量至 100 mL。樣品 NH_4^+ 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 計算方式為 $A_{625} \div 3.19$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 15$ (稀釋倍數) \div 樣品原始鮮重 (g)。

四、酵素活性分析

(一) SOD 活性分析

SOD 活性分析係以 Paoletti et al. (1981) 之方法修改。取水稻第二片葉片 10 片, 以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.40) 冰浴研磨萃取後, 以 4°C 、15000 g 條件離心 30 分鐘, 取出上清液。取 20 μL 上清液以 (Bradford 1976) 方法得到蛋白質總量。另取 200 μL 上清液依序加入 1.6 mL triethanolamine - diethanolamine (TEA - DEA) buffer (100 mM, pH 7.4)、80 μL

NADH (7.5mM, 新鮮配置)、50 μ L EDTA/MnCl₂ (100 mM/50 mM, pH 7.4), 最後加入 1 mL 2-mercaptoethanol (10 mM) 啟動反應後, 震盪均勻以分光光度計測定十分鐘內波長 340 nm (A_{340}) 之吸光值變化量, 即樣品 ΔA_{340} 。分光光度計以空白比色管進行歸零動作, 空白組則以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.40) 取代進行相關步驟, 並以其吸光值變化量作為基準值 (起始 ΔA_{340})。

每單位酵素活性 (Unit) 定義為: 每分鐘 SOD 抑制 50% NADH 之氧化速率多寡。樣品 SOD 比活性 (Unit mg^{-1} protein) 計算方式為: (起始 ΔA_{340}) - (樣品 ΔA_{340}) \div 10 min \times 15 (稀釋倍數) \div 蛋白質含量 (mg)。

(二) APX 活性分析

APX 活性分析係以 Nakano 與 Asada (1981) 之方法修改。取水稻第二片葉片 10 片, 以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80) 冰浴研磨萃取後, 以 4°C、12000 g 條件離心 20 分鐘, 取出上清液。取 20 μ L 上清液以 (Bradford, 1976) 方法得到蛋白質總量。另取 100 μ L 上清液依序加入 1 mL potassium phosphate buffer (150 mM, pH 7.0)、1 mL ascorbate (1.5mM, 新鮮配置)、400 μ L EDTA (0.75 mM), 最後加入 0.5 mL H₂O₂ (5 mM) 後震盪均勻, 以分光光度計測定一分鐘內波長 290 nm (A_{290}) 之吸光值變化量, 即樣品 ΔA_{290} , 空白組則以蒸餾水取代進行相關步驟。

每單位酵素活性 (Unit) 定義為: 每分鐘消耗 1 μ mol AsA 表示。樣品 APX 比活性 (Unit mg^{-1} protein) 計算方式為: $\Delta A_{290} \div 2.8$ (K, $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) \times 3 (反應體積) \times 40 (稀釋倍數) \div 蛋白質含量 (mg)。

(三) GR 活性分析

GR 活性分析係以 Foster 與 Hess (1981) 之方法修改。取水稻第二片葉片

10 片，以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80) 冰浴研磨萃取後，以 4°C、12000 g 條件離心 20 分鐘，取出上清液。取 20 μ L 上清液以(Bradford 1976) 方法得到蛋白質總量。另取 200 μ L 上清液依序加入 1 mL tris - HCl buffer (150 mM, pH 7.5)、0.3 mL MgCl₂ (30 mM)、0.5 mL GSSG (3 mM, 新鮮配置)，最後加入 1mL NADPH(5 mM, 新鮮配置) 後震盪均勻，以分光光度計測定一分鐘內波長 340 nm (A₃₄₀) 之吸光值變化量，即樣品 ΔA_{340} ，空白組則以蒸餾水取代進行相關步驟。

每單位酵素活性 (Unit) 定義為：每分鐘內波長 A₃₄₀ 之變化量。樣品 GR 比活性 (Unit mg⁻¹ protein) 計算方式為： $\Delta A_{290} \times 20$ (稀釋倍數) $\div 1$ (min) \div 蛋白質含量 (mg)。

(四) CAT 活性分析

CAT 活性分析係以 Kato 與 Shimizu (1965) 之方法修改。取水稻第二片葉片 10 片，以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.80) 冰浴研磨萃取後，以 4°C、12000 g 條件離心 20 分鐘，取出上清液。取 20 μ L 上清液以(Bradford 1976) 方法得到蛋白質總量。另取 200 μ L 上清液依序加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0)、0.1 mL H₂O₂ (1M, 新鮮配置)，震盪均勻後以分光光度計測定一分鐘內波長 240 nm (A₂₄₀) 之吸光值變化量，即樣品 ΔA_{240} ，空白組則以蒸餾水取代進行相關步驟。

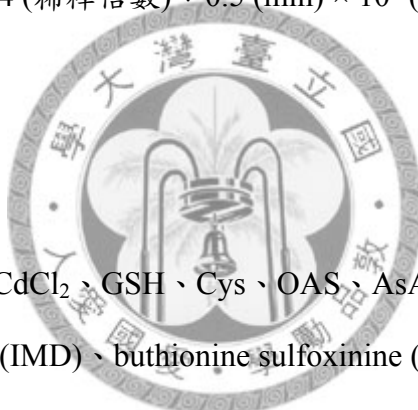
每單位酵素活性 (Unit) 定義為：每分鐘消耗 1 μ mol H₂O₂ 表示。樣品 CAT 比活性 (Unit mg⁻¹ protein) 計算方式為： $\Delta A_{240} \div 40$ (K, mM⁻¹ cm⁻¹) $\times 3$ (反應體積) $\times 20$ (稀釋倍數) $\div 1$ (min) \div 蛋白質含量 (mg)。

(五) PAL 活性分析

PAL 活性分析係以 Hyoto 與 Fujinami (1965) 之方法修改。取水稻第二片

葉片 10 片，以 4 mL N - (2 - Hydroxyethyl) piperazine - N' - 3 - propane sulfonic acid (EPPS, 50 mM, pH 8.5) 冰浴研磨萃取後，以 4°C、12000 g 條件離心 20 分鐘，取 20 μ L 上清液以 (Bradford 1976) 方法得到蛋白質總量。另取 1 mL 上清液依序加入 1 mL EPPS (100 mM, pH 8.5)、1 mL L - phenylalanine (30 mM)，震盪均勻後於 40°C 水浴 30 分鐘，接著以分光光度計測定波長 290 nm (A_{290}) 之吸光值空白組則以 EPPS (50 mM, pH 8.5) 取代進行相關步驟。

每單位酵素活性 (Unit) 定義為每小時 1 nmol *trans* - cinnamic acid 之生成量表示。樣品 PAL 比活性 (Unit mg^{-1} protein) 計算方式為： $A_{290} \div 9500 (\text{K}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3 (\text{反應體積}) \times 4 (\text{稀釋倍數}) \div 0.5 (\text{min}) \times 10^6 (\text{換算為 nmol}) \div \text{蛋白質含量 (mg)}$ 。



五、供試藥劑原液之配置

供試藥劑原液 PQ、 CdCl_2 、GSH、Cys、OAS、AsA、galactono - 1,4 - lactone (GalL)、 H_2O_2 、imidazole (IMD)、buthionine sulfoximine (BSO) 均以二次蒸餾水配置所需濃度，唯 Cys 須先以 HCl 溶解後，再以二次水定量至所需體積。

六、數據統計分析

每一試驗處理均有四個重複，結果取其平均值加上標準偏差 (standard error) 表示，統計分析以 Student's t - test 或 least significant difference (LSD) 方法進行，比較不同處理間平均質之差異。統計分析軟體為 SAS (Statistical Assay System) 8.2 版進行統計分析。每一試驗結果至少行三次，每次試驗結果均呈現類似趨勢，論文中僅以一次試驗結果呈現。

結果

一. 缺硫與鎘逆境對水稻幼苗生理之影響

本論文以 TN1 幼苗為材料，探討缺硫 (-S) 與鎘逆境對水稻幼苗生理之影響。缺硫之水稻幼苗地上部長度 (圖 1A)、鮮重 (圖 1B) 與乾重 (圖 1C) 皆下降，但對水稻幼苗根長度 (圖 1A)、鮮重 (圖 1B) 與乾重 (圖 1C) 影響不顯著。缺硫並降低水稻幼苗第二片葉片之葉綠素含量 (圖 2A) 與蛋白質含量 (圖 2B)。DAB 為大分子聚合物，會與 H_2O_2 形成褐色沉澱，以 DAB 組織化學法檢測第二片葉片 H_2O_2 含量發現，缺硫會造成水稻幼苗第二片葉片 H_2O_2 累積 (圖 3A)。而以化學分析法也發現缺硫增加第二片葉片 (圖 3B) 與根部 H_2O_2 含量 (圖 3C)。分析水稻幼苗第二片葉片與根中 ABA 含量，發現對照與缺硫處理間沒有顯著差異 (表 1)。

進一步分析缺硫對幼苗葉片含硫化合物 NPT、Cys 與 GSH 含量之影響，缺硫處理第二片葉片中的 NPT (圖 4A)、Cys (圖 4B) 含量皆下降。缺硫對抗氧化系統之影響，可由抗氧化物含量及抗氧化酵素活性變化窺之。缺硫使 GSH (圖 4C) 含量下降，但是對抗氧化物 AsA (圖 4D) 影響不顯著。缺硫同時提高抗氧化酵素 SOD 活性與比活性 (圖 5A, B)，降低 APX (圖 5C, D)、GR (圖 5E, F) 與 CAT (圖 5G, H) 活性與比活性。以上試驗結果確認缺硫處理確實改變水稻幼苗之生理狀態。

為了解缺硫處理對水稻幼苗逆境生理之影響，先在光照環境下以 PQ (10 μ M) 與氯化鎘 (5 mM) 處理 TN1 水稻第二片切離葉片 24 小時，以了解黃化程度與葉綠素含量之影響。試驗結果發現，不論是以 PQ 或是氯化鎘處理，缺硫之切離葉片其黃化與葉綠素含量下降之程度均較對照為嚴重 (圖 6A, 6B, 6C)。進一步以氯化鎘 (5 μ M) 處理缺硫與對照處理之 TN1 水稻幼苗 (6 天)，發現缺硫與鎘同時處理使第二片葉片黃化程度較對照幼苗經鎘處理為明顯 (圖 7)。以上試驗結

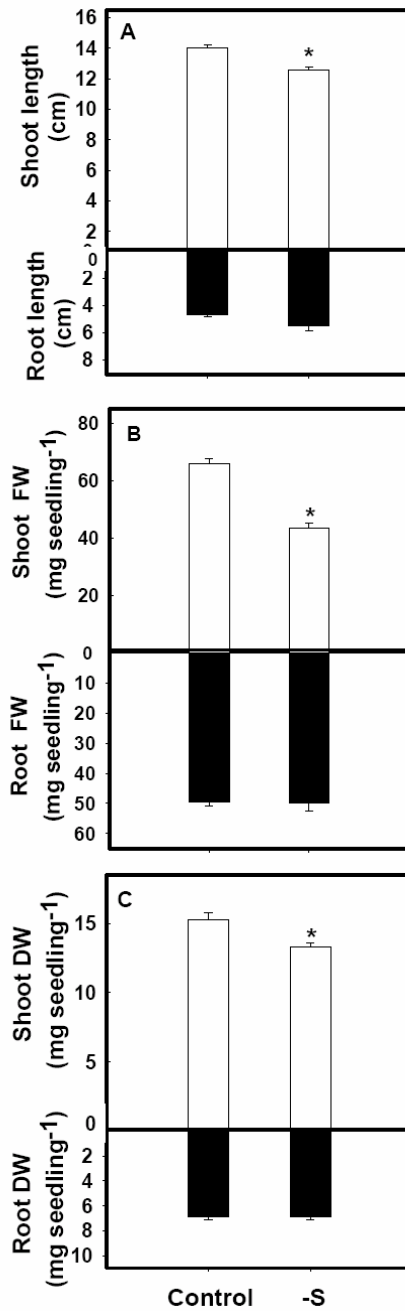


圖 1. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對地上部與根部之長度 (A)、鮮重 (B) 與乾重 (C) 的影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。星號表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

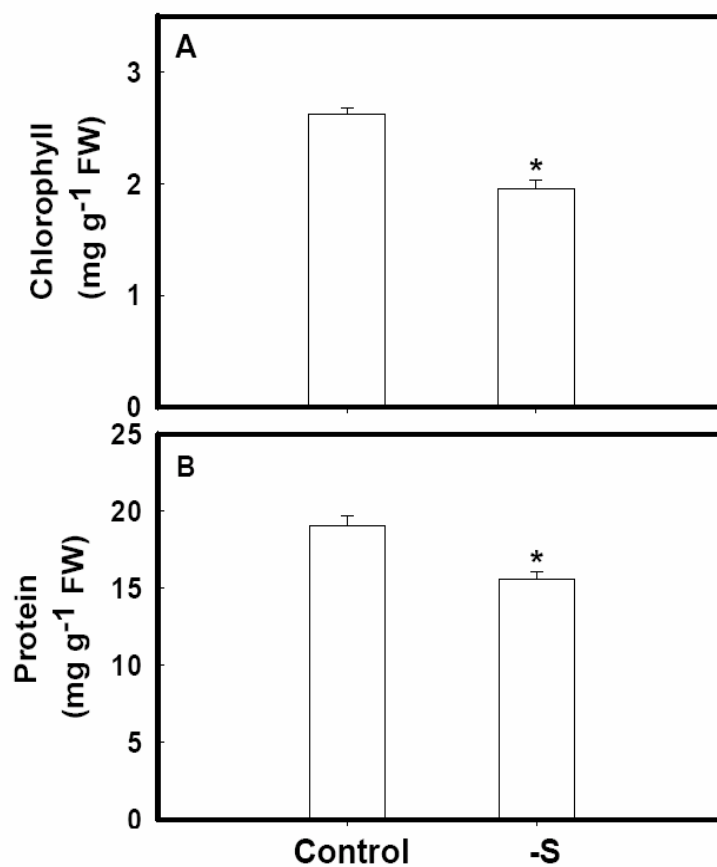


圖 2. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片蛋白質 (A) 與葉綠素含量 (B) 之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。星號表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

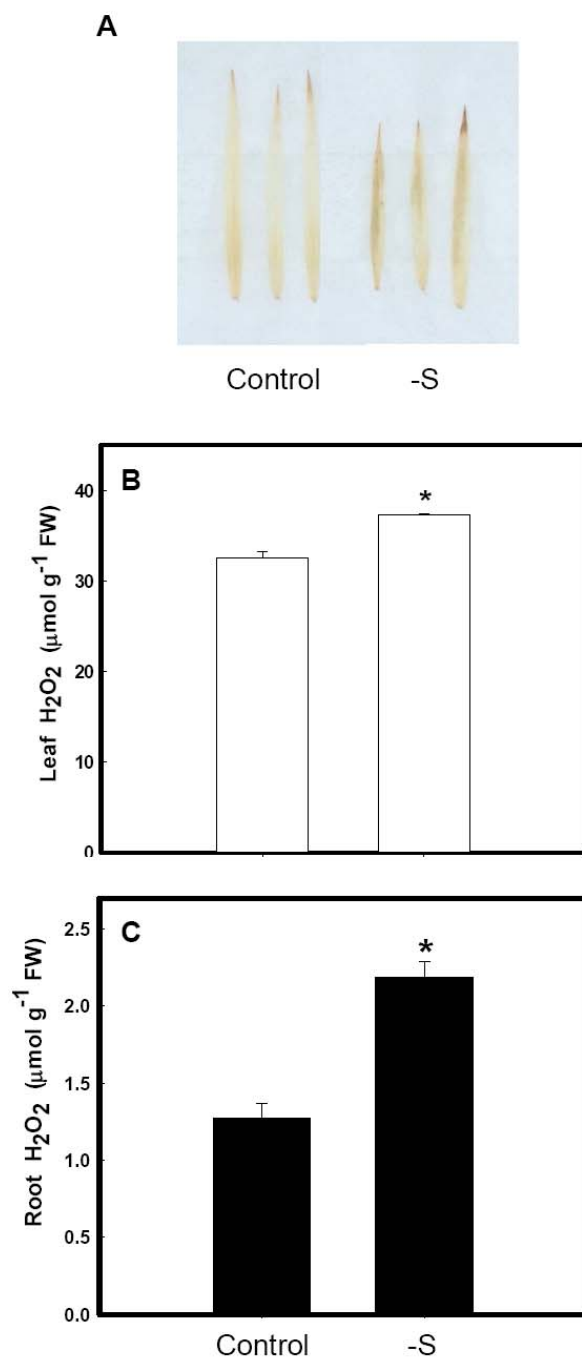


圖 3. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片 H₂O₂ 含量 (A, B) 與地下部 H₂O₂ 含量 (C) 之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。(A) 以組織化學法檢測 H₂O₂。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。星號表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

表 1. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片與根 ABA 含量之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。對照與缺硫處理間沒有顯著差異。

Treatment	ABA (pmol g ⁻¹ FW)	
	Leaves	Roots
Control	418.0 ± 2.8	281.2 ± 19.2
-S	456.4 ± 32.8	317.3 ± 11.7

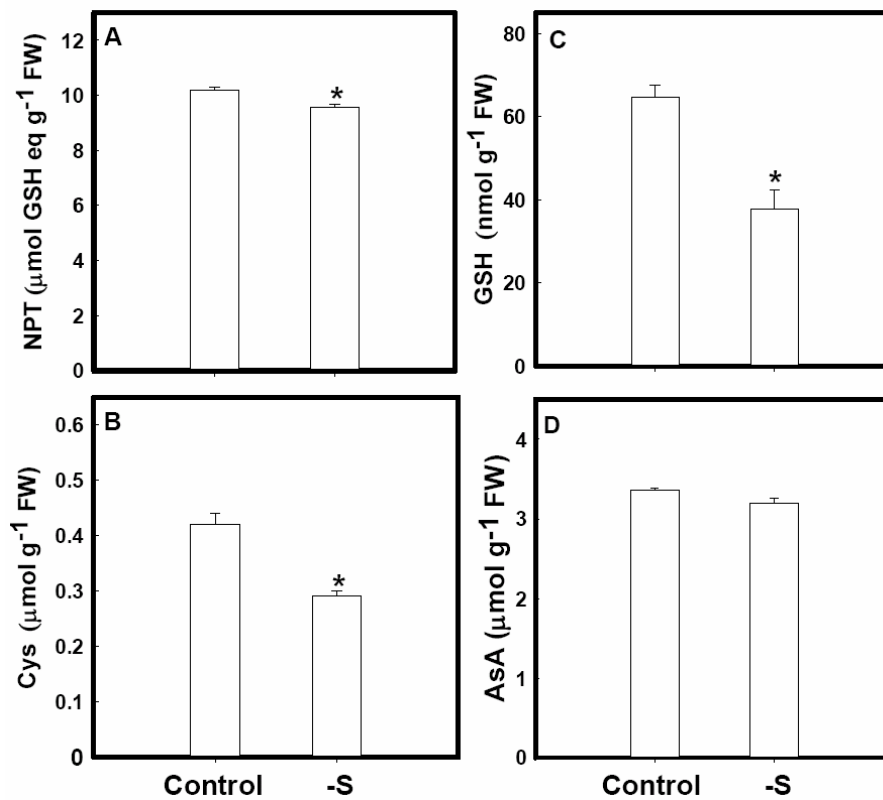


圖 4. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片 NPT (A)、Cys (B)、GSH (C) 與 AsA (D) 含量之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。星號表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

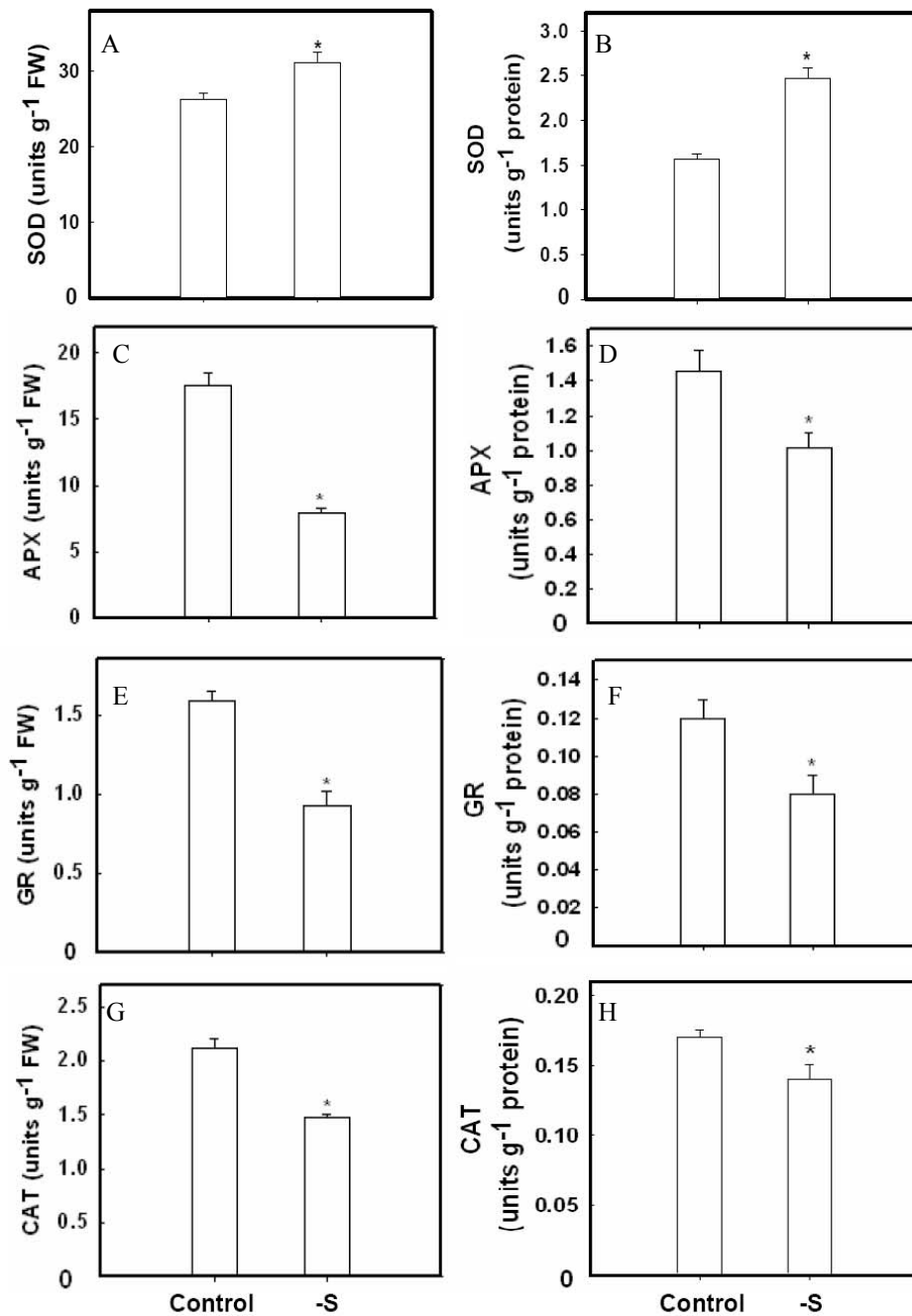


圖 5. TN1 水稻幼苗缺硫處理 (-S) 對第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A, B)、APX (C, D)、GR (E, F) 與 CAT (G, H) 活性之影響。幼苗第三片葉片長到完全展開後進行各項測定。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 t-test 統計方法進行顯著性測驗。星號表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

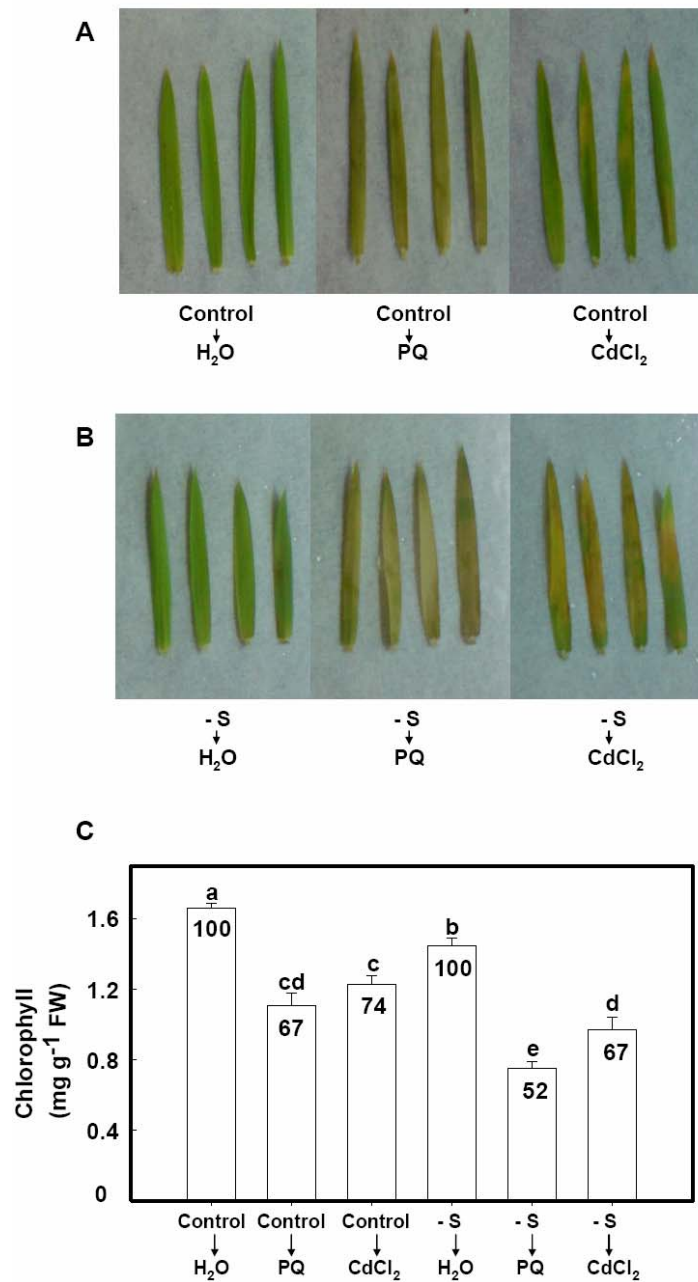


圖 6. 光照下 PQ (10 μ M) 與氯化鎘 (5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗第二片缺硫切離葉片 (-S) 對黃化 (A, B) 與葉綠素含量 (C) 之影響。幼苗第三片葉片完全展開後，切取第二片葉片。切離之第二片葉片在光照下以 PQ (10 μ M) 與氯化鎘 (5 mM) 處理 24 小時。(C) 的每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗，相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。柱內數字為相對值。

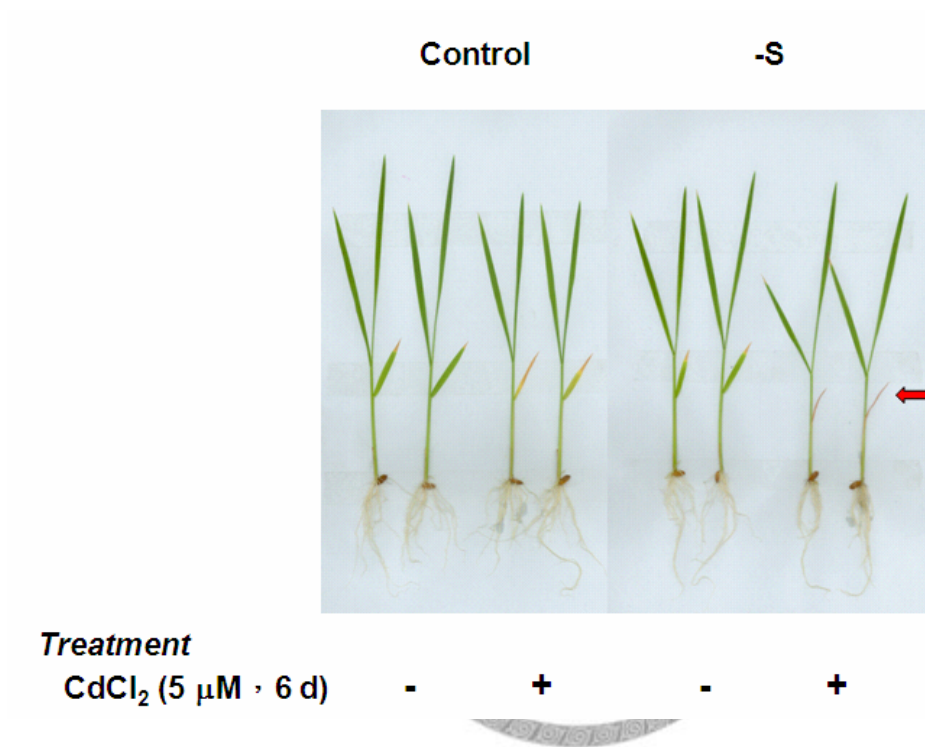


圖 7. 氯化鎘 (5 μM) 與缺硫處理 (-S) 對 TN1 水稻幼苗的第二片葉片黃化之影響。幼苗第三片葉片完全展開後以氯化鎘處理 6 天。紅色箭頭所指為第二片葉片。

顯示，缺硫之水稻幼苗會使後續之鎘毒害加重。

接著以外加方式給予水稻幼苗含硫化合物 GSH 與 Cys 處理。對缺硫水稻幼苗前處理不同濃度 GSH (0、0.5、1 mM) 6 小時，可有效減輕後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (6 天) 的幼苗第二片葉片黃化傷害 (圖 8)。不同濃度 Cys (0、0.5 mM) 前處理缺硫與對照 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 後，不論是正常硫處理或是缺硫水稻幼苗皆可減輕後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (6 天) 的幼苗第二片葉片黃化傷害 (圖 9)。檢測 Cys (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理缺硫水稻幼苗 (6 小時) 的幼苗第二片葉片中 GSH 含量 (圖 10)，發現 Cys 和 GSH 前處理過後確實提升第二片葉片中 GSH 含量。

二. 水稻幼苗熱休克前處理對鎘逆境下 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性之影響

此部分試驗同樣以 TN1 為材料來探討。以氯化鎘 (5 μ M) 處理之 TN1 水稻幼苗，隨處理天數增加，第二片葉片中 NH_4^+ 含量 (圖 11A) 與 PAL 比活性 (圖 11B) 隨之提高。未經氯化鎘 (5 μ M) 處理之對照組亦有類似的上升趨勢，唯鎘處理之 TN1 水稻幼苗第二片葉片中 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性的上升幅度較大。

氯化鎘 (5 μ M) 處理誘導提升之第二片葉片中 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性，可經由熱休克 (45°C) 前處理 (3 小時) 而降低 (圖 12A, 12B)，顯示熱休克對水稻幼苗後續鎘毒害具保護作用。此外，第三片葉片完全展開後，幼苗在無熱休克 (30°C 黑暗進行) 下，以 H_2O_2 (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 前處理 TN1 水稻幼苗 3 小時，會降低後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片所增加之 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性 (圖 13A, 13B)。

Imidazol (IMD) 為 NADPH oxidase 合成抑制劑。位於細胞膜上的 NADPH oxidase 會促進活化氧族 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的形成， $\text{O}_2^{\cdot -}$ 再自發性或經 SOD 作用轉換為 H_2O_2 ，使用 IMD 間接抑制鎘所誘導之 H_2O_2 累積 (Olmos *et al.*, 2003)。幼苗在熱休克前處理 IMD (0.1 mM) 3 小時，造成後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (6 天) 的幼苗第二片葉片所增加之 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性 ((圖 14A, 14B) 加劇，印證

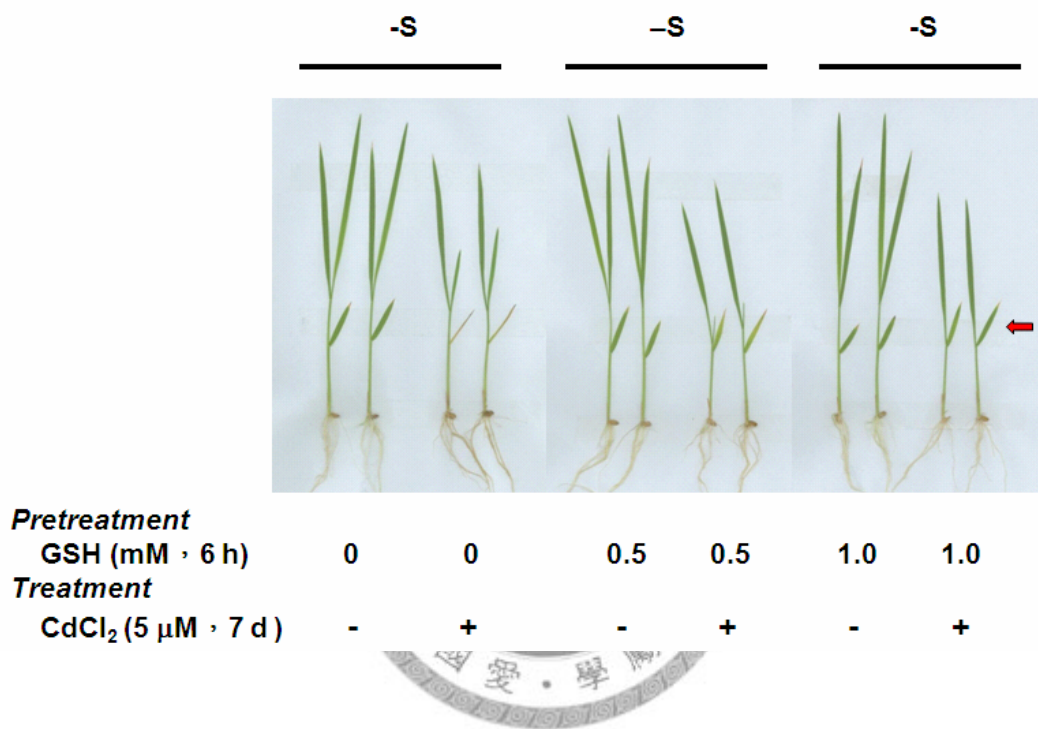


圖 8. 不同濃度 GSH (0、0.5、1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片黃化影響。幼苗第三片葉片完全展開後進行前處理。紅色箭頭所指為第二片葉片。

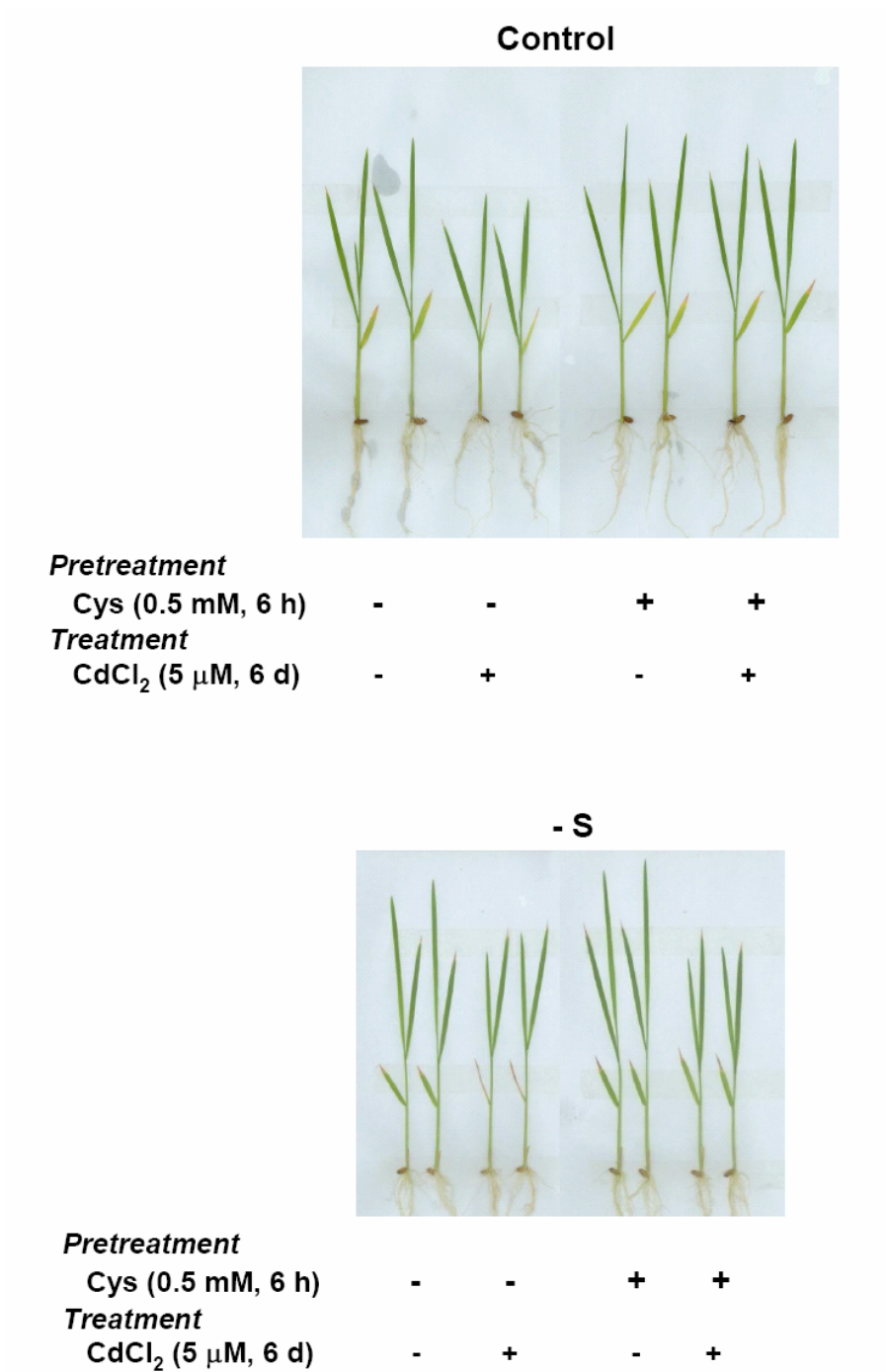


圖 9. 不同濃度 Cys (0、0.5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片黃化影響。幼苗第三片葉片完全展開後進行前處理。

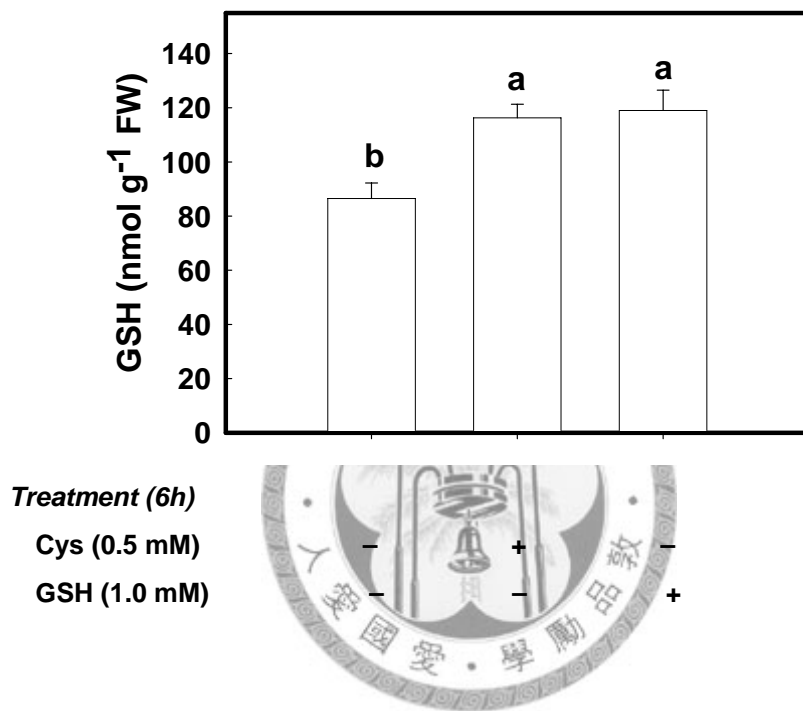


圖 10. Cys (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (6 小時) 對後續氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) 6 天的幼苗第二片葉片 GSH 含量之影響。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗，相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

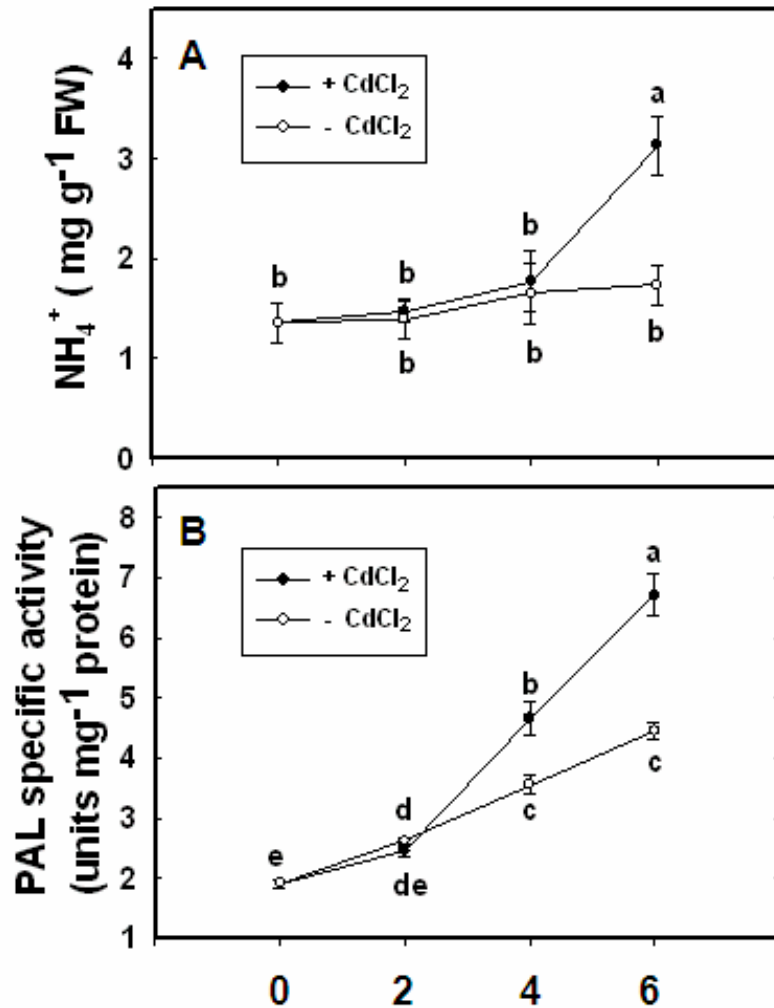


圖 11. 氯化鎘 (5 μ M) 與缺硫處理 (-S) TN1 水稻幼苗對第二片葉片 NH_4^+ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

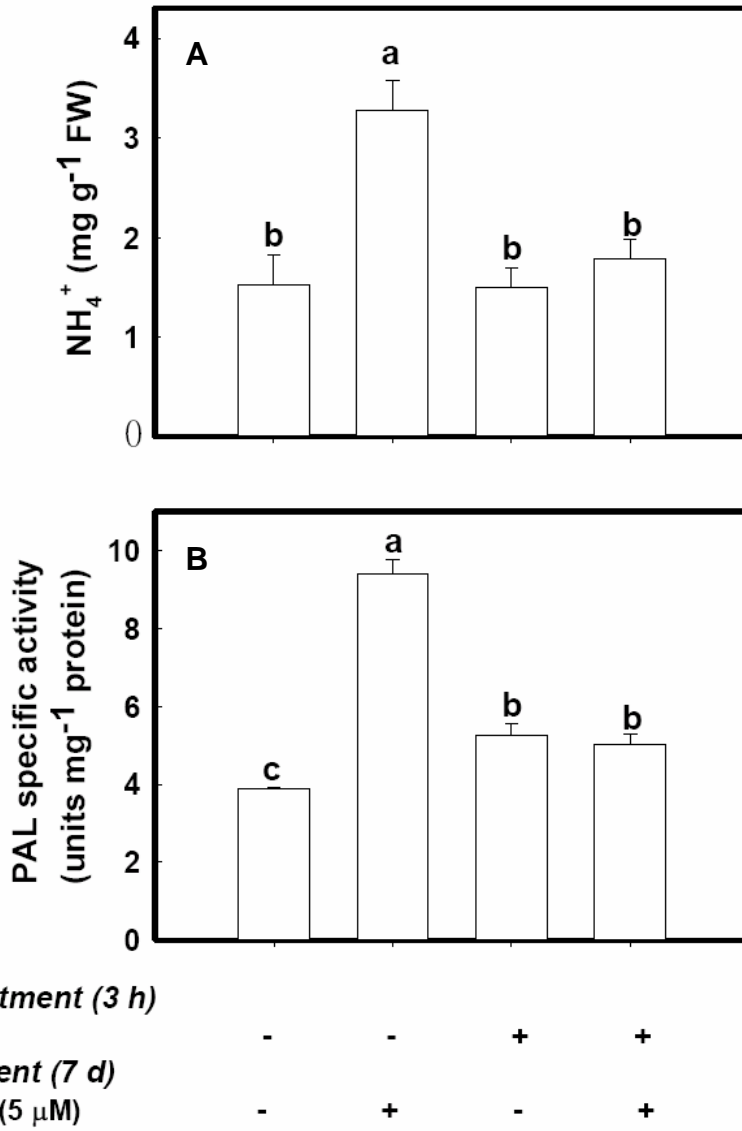


圖 12. 熱休克 (45°C) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH₄⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 之影響。幼苗第三片葉片完全展開後進行處理。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

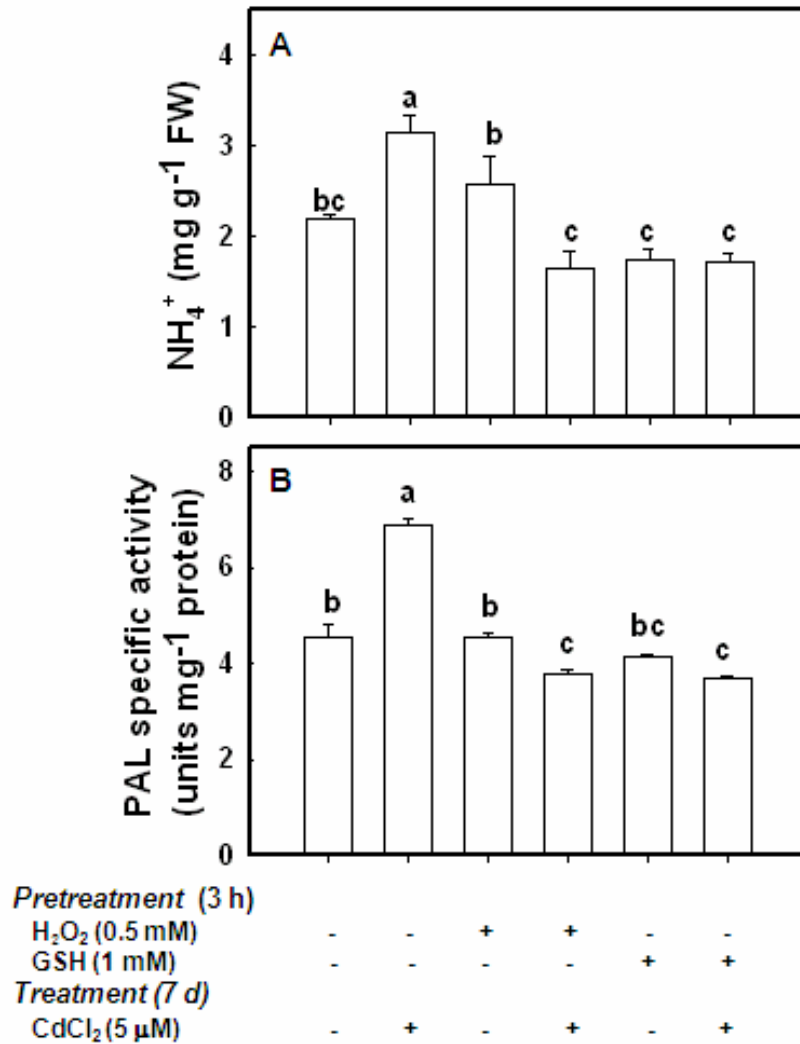


圖 13. H₂O₂ (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH₄⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。幼苗第三片葉片完全展開後，幼苗在 30°C 黑暗下進行前處理。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

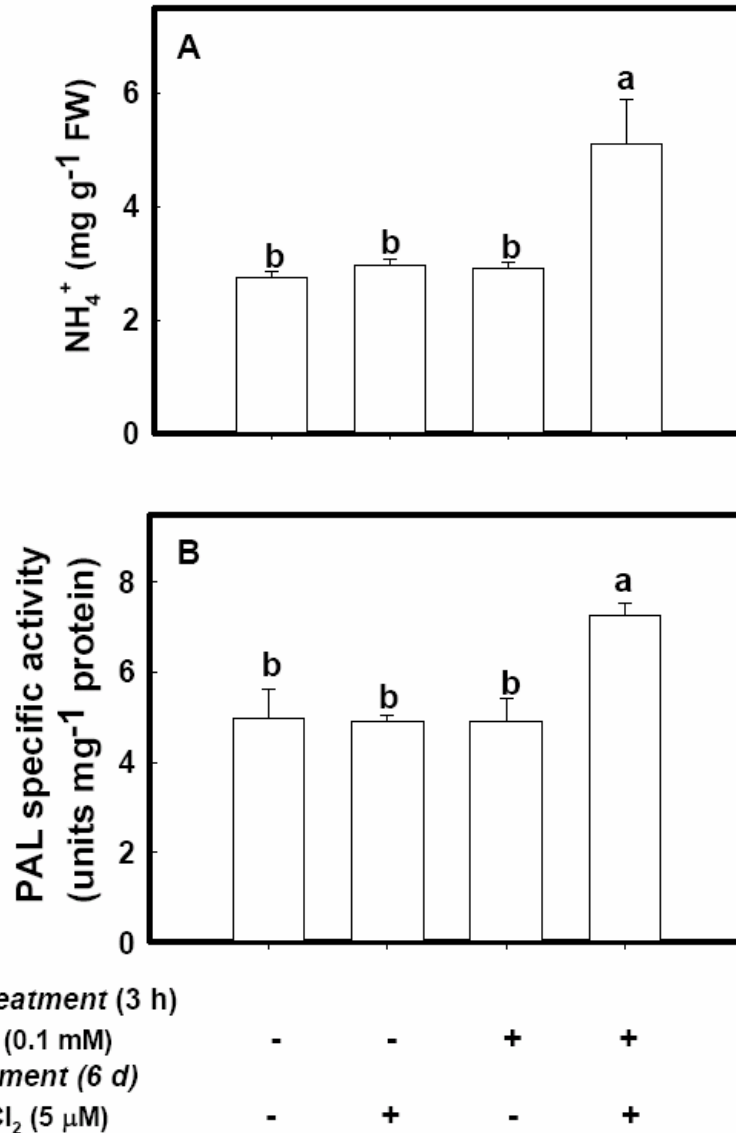


圖 14. IMD (0.1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時) 對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (6 天) 的幼苗第二片葉片 NH_4^+ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。幼苗第三片葉片完全展開後，幼苗在 45°C 黑暗下進行前處理。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

H₂O₂ 在水稻幼苗克服鎘毒害中所扮演角色之重要性。

另一方面，前處理 GSH 也可減輕水稻幼苗鎘毒害，BSO 為 GSH 合成抑制劑，抑制 GSH 合成過程中 γ -ECs 之活性。水稻幼苗在熱休克前處理時添加 BSO (0.5 mM)，會提高後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片所增加之 NH₄⁺ 含量與 PAL 比活性 (圖 15A, 15B)。但同時前處理 BSO (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 3 小時，則抵銷 BSO 對使 NH₄⁺ 含量與 PAL 比活性 (圖 15A, 15B) 之影響。

以另一個抗氧化物 AsA 的合成前驅物 GalL 處理。第三片葉片完全展開之水稻幼苗在無熱休克下，分別進行 AsA (0.5 mM) 與 GalL (0.5 mM) 3 小時前處理，可降低後續氯化鎘 (5 μ M) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片所增加之 NH₄⁺ 含量與 PAL 比活性 (圖 16A, 16B)。



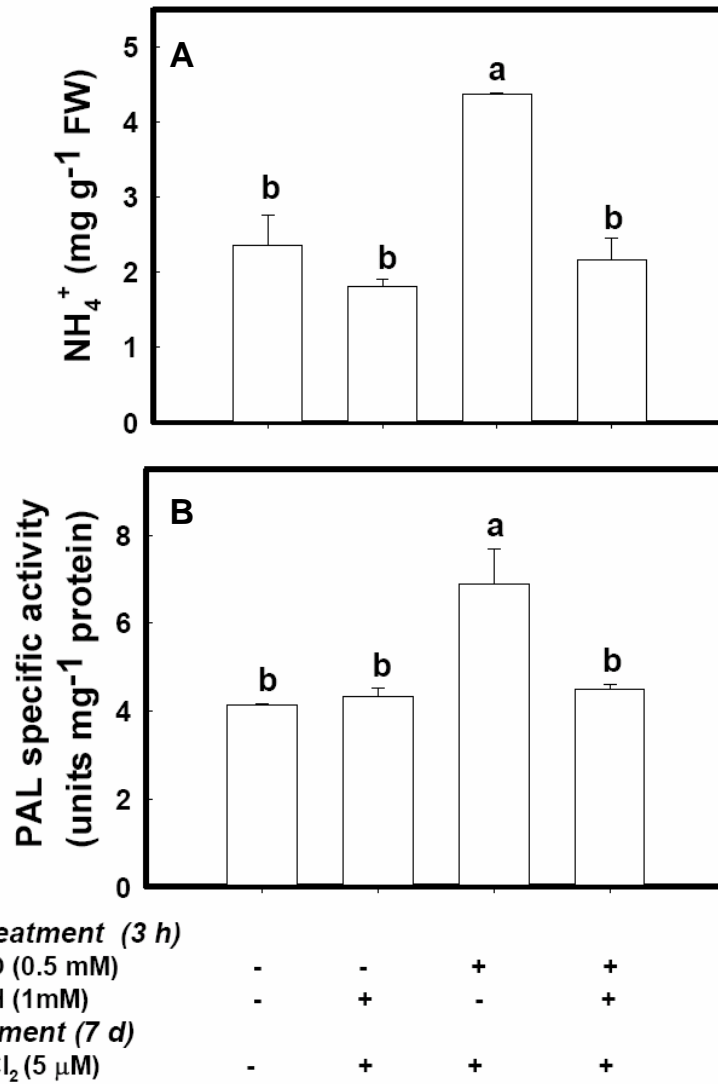
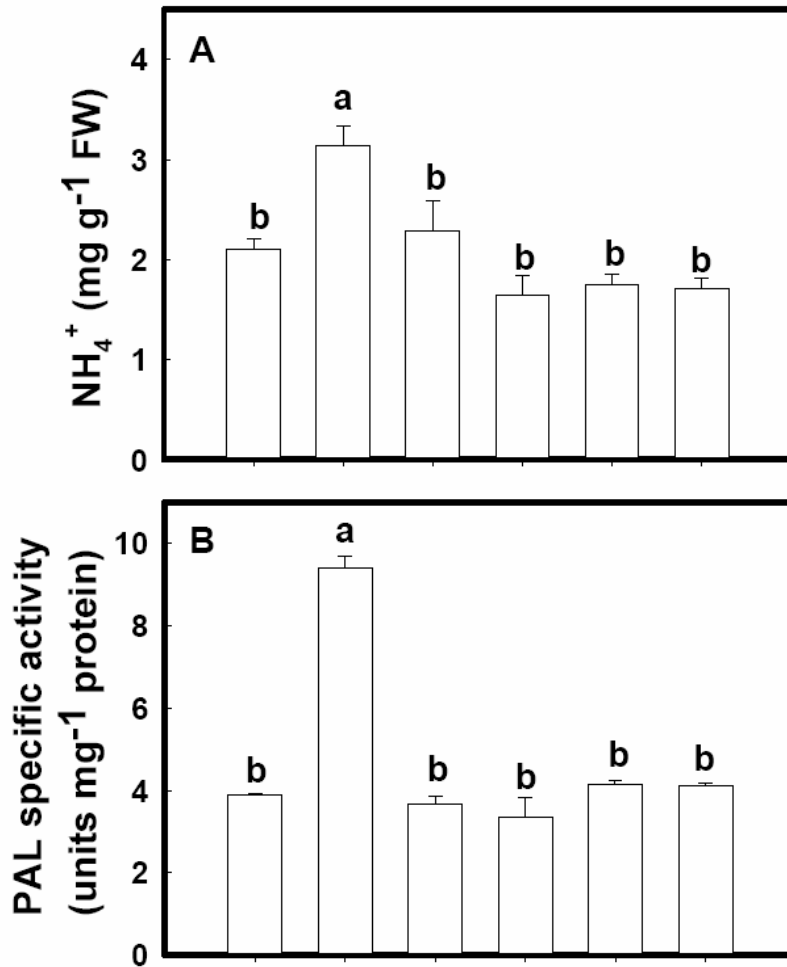


圖 15. BSO (0.5 mM) 與 GSH (1 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時)，對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH_4^+ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。幼苗第三片葉片完全展開後，幼苗在 45°C 黑暗下進行前處理。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。



Pretreatment (3 h)

AsA (0.5 mM) - - + + - -

GaL (0.5 mM) - - - - + +

Treatment (7 d)

CdCl₂ (5 μM) - + - + - +

圖 16. AsA (0.5 mM) 與 GaL (0.5 mM) 處理 TN1 水稻幼苗 (3 小時)，對後續氯化鎘 (5 μM) 處理 (7 天) 的幼苗第二片葉片 NH₄⁺ 含量 (A) 與 PAL 比活性 (B) 變化之影響。幼苗第三片葉片完全展開後，幼苗在 30°C 黑暗下進行前處理。每一處理重複數為 4，垂直線距表示標準機差 (standard error, S.E.)，以 LSD 統計方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

討論

一、鎘對缺硫水稻幼苗毒害之影響

硫為巨量元素 (macro-element) 之一，參與植物生長發育過程，在抵禦環境逆境中扮演重要角色，其中包含重金屬逆境 (Alscher *et al.*, 1997)。雖然硫對植物體合成過程中的重要性已受到重視 (Hawkesford, 2000)，但是硫有效性與鎘逆境的相關研究 (Popovic *et al.*, 1996; Nocito *et al.*, 2002) 目前仍處發展階段。缺硫時，不論新葉或老葉皆有黃化現象產生 (Robson and Pitman, 1983)。Stefania 等人 (2004) 研究發現，缺硫抑制玉米幼苗生長，降低葉片鮮重與乾重，以及葉綠素含量與硫含量。本論文試驗結果發現，水稻幼苗於缺硫狀態下會抑制地上部生長，降低蛋白質與葉綠素含量。

H_2O_2 在植物中的角色視其濃度而定，高濃度時是對植物產生氧化傷害之 ROS，但於低濃度時則扮演訊息傳遞角色，參與不同的訊息傳導路徑，其中鎘所誘導之細胞死亡或毒害被認為與 H_2O_2 累積有關 (Fojtova and Kovacak, 2000; Cho and Seo, 2005; Hsu and Kao, 2007)。缺鉀玉米植株中的 H_2O_2 含量提高，累積部位集中於根部 (Ryoung and Daniel, 2004)，本論文試驗結果發現，缺硫時亦有相同結果， H_2O_2 累積於水稻幼苗第二片葉片與根部。

H_2O_2 含量增加可誘導植物發生某些適應性的生理代謝變化，產生交叉保護作用以提高植物抗逆性。 H_2O_2 會誘導水稻發芽種子胚中抗氧化酵素的基因表現 (Morita *et al.*, 1999)。四個抗氧化酵素中，SOD 催化將 $O_2^{\cdot -}$ 轉變為 H_2O_2 ，而 APX 與 CAT 催化過程則清除 H_2O_2 (Gillhan and Dodge, 1984)，GR 催化過程可促進抗氧化物 GSH 生成。高等植物中，APX 在清除 ROS 避免細胞遭受氧化傷害機制中扮演重要角色 (Shigeoka *et al.*, 1980)。缺硫時，SOD 活性與比活性提升，APX、GR、CAT 活性與比活性之降低，應是造成水稻幼苗第二片葉片與根部 H_2O_2 累積的主因。

近年來，Cys 參與細胞間抵禦逆境的機制逐漸受到重視。Cys 為抗氧化物 GSH 的合成前驅物，亦為含硫胺基酸之一，欲提升細胞間 GSH 含量必先使 Cys 合成量上升。阿拉伯芥中 Cys 合成量增加為鎘耐受性提升主因 (Dominguez-Solis *et al.*, 2001; Howarth *et al.*, 2003; José *et al.*, 2004)。GSH 為細胞間保護物質，也是非硫基蛋白質 (-SH) 主要儲存源 (Noctor, 2006)，和金屬螯合素 (phytochelatin) 一樣可與重金屬結合，將鎘、砷、銅等重金屬結合後侷限於液胞中 (Cobbett, 2000; Pilon-Smits, 2005)。缺硫導致禾穀類及中含硫蛋白質及胺基酸含量下降 (Randall and Wrigley, 1986)。水稻生長於缺硫狀態，其韌皮部滲出液中之 GSH 含量降低 (Kuzuhara *et al.*, 2000)。鎘逆境下於含有高濃度硫的水耕液中生長，水稻幼苗可合成較多 GSH，抵禦氧化逆境，減輕因鎘毒害而產生之生長抑制 (Muhammad *et al.*, 2005)。本論文試驗結果，缺硫導致水稻幼苗第二片葉片之含硫化合物 NPT、Cys、GSH 含量下降，與前人研究吻合。Astolfi 等人 (2004) 研究發現，硫可有效減輕水稻中鎘毒害所引起的生長抑制及氧化傷害現象。本論文中，缺硫之水稻幼苗遭遇鎘逆境時，加劇葉片黃化現象。但若對缺硫水稻幼苗前處理 Cys 和 GSH，則可有效減輕後續氯化鎘處理的幼苗第二片葉片黃化傷害，顯示 Cys 與 GSH 對氯化鎘毒害的保護作用。

Paraquat (PQ) 為殺草劑，會阻斷電子傳遞系統，抑制光合作用，產生 $O_2^{\cdot-}$ 及其他 ROS，造成細胞間氧化逆境，最終造成植物枯死 (Dodge, 1971; Elstner *et al.*, 1988)。菜豆中缺鎂可提高後續 PQ 毒害之耐受性 (Cakmak and Marschner, 1992)。但本論文研究結果，水稻缺硫之第二片切離葉片外加 PQ 處理，則是加強 PQ 毒害。鎘對植物體造成之毒害，最先會觀察到 GSH 含量之下降 (Schüzendübel and Polle, 2002)，缺硫原本便使 GSH 含量降低，故後續遭鎘逆境時更加劇毒害。本論文結果說明缺硫之水稻幼苗由於抗氧化物 (Cys 與 GSH) 含量與抗氧化酵素 (APX、GR、CAT) 活性之降低，可能是造成後續 PQ 與鎘毒害 (氧化傷害) 加劇之主因。

高等植物中，ABA 被視作逆境荷爾蒙，許多非生物逆境都會誘導植物體內 ABA 含量增加 (Zeevaart and Creelman, 1988; Xu *et al.*, 1995)，例如：臭氧、寒害。冷害、乾旱、鹽害 (Lin *et al.*, 1986; Guy, 1990; La Rosa *et al.*, 1987; Zeevaart and Creelman, 1988) 等。向日葵中缺氮及菸草中缺乏鈣、鉀、鎂、磷時也會誘導植物內生 ABA 含量上升 (Eva *et al.*, 1975; Mizrahi and Richmond, 1972)。ABA 會抑制植物生長 (Zeevaart and Cradman, 1988)。缺硫時不影響水稻幼苗第二片葉片及根中 ABA 含量。該結果說明缺硫對水稻幼苗地上部生長影響不是經由 ABA 所調控。

二、熱休克對鎘所誘導水稻幼苗葉片銨離子累積與 PAL 比活性增加之影響

熱休克是指給予作物高於最適生長溫度 5~15 °C 的短時間處理。熱休克前處理與後續逆境處理間，具有交叉保護作用 (Lanciloti *et al.* 1996)。PAL 催化 phenylalanine 轉變為 *trans*-cinnamate，過程中釋放銨離子 (NH₄⁺)。水稻幼苗於鎘逆境下葉片中 NH₄⁺ 含量提高 (Hsu and Kao, 2003)。NH₄⁺ 含量的提高被認為與 PAL 比活性上升有關 (Hsu and Kao, 2004)。本論文試驗結果發現，以氯化鎘 (5 μM) 處理之 TN1 水稻幼苗，隨處理天數增加，PAL 比活性 (圖 13B) 隨之提高，待 PAL 比活性提升後第二片葉片中 NH₄⁺ 含量 (圖 13A) 才隨之提升，驗證 NH₄⁺ 含量之提高與 PAL 比活性上升息息相關。

以熱休克前處理方式，確實降低鎘所誘導水稻幼苗葉片銨離子累積與 PAL 比活性增加。水稻幼苗經熱休克前處理可誘導 H₂O₂ 累積，並進一步誘導抗氧化酵素 GR 與 APX 比活性提高，以及抗氧化物 GSH 和 AsA 含量增加，因而抵禦後續鎘逆境 (Hsu and Kao, 2007)。在非熱休克環境下前處理 H₂O₂，可降低鎘所誘導水稻幼苗葉片銨離子累積與增加 PAL 比活性，和熱休克前處理有相同效應。為進一步印證 H₂O₂ 之重要性，論文中於熱休克前處理時同時使用抑制劑 IMD。IMD 為 NADPH oxidase 合成抑制劑，位於細胞膜上的 NADPH oxidase 會促進活化氧

族 $O_2^{\cdot-}$ 的形成， $O_2^{\cdot-}$ 再自發性或經 SOD 作用轉換為 H_2O_2 。菸草細胞 (BY-2 line) 中，使用 IMD 間接抑制鎘所誘導之 H_2O_2 累積 (Olmos *et al.*, 2003)。在熱休克狀態下前處理 IMD，造成後續氯化鎘處理的幼苗第二片葉片所增加之 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性加劇。

GSH 本身為重要含硫化物，可做為逆境指標 (Michael *et al.*, 2004)。

Vaidyanathan 等人 (2003) 發現，水稻耐鹽品種中的 GSH 含量會提高。而乾旱逆境下，小麥劍葉中 GSH 含量提高 (Herbinger *et al.*, 2002)，在玉米寒害容忍機制研究中亦觀察到此現象 (Leipner *et al.*, 1999)。在非熱休克環境下前處理抗氧化物 GSH，降低鎘所誘導水稻幼苗葉片銨離子累積與增加 PAL 比活性，BSO 為 GSH 合成抑制劑，抑制 GSH 合成過程中 γ -ECs 之活性。熱休克前處理時同時處理 BSO，確實造成後續氯化鎘處理的幼苗第二片葉片所增加之 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性加劇，但於前處理 BSO 時補充 GSH，則可抵銷 BSO 對 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性之影響。以上試驗結果更加確立 H_2O_2 與 GSH 對鎘逆境之保護作用。

除 GSH 外，另一抗氧化物 AsA 亦在 GSH-AsA cycle 中扮演重要角色，負責清除 ROS (Noctor and Foyer, 1998; Foyer and Noctor, 2003, 2005)。阿拉伯芥突變體 *soz1* 中 AsA 合成量下降，使其不耐臭氧逆境，但外加 AsA 及其合成前驅物 GalL，則可提高對臭氧逆境之耐受性 (Conklin *et al.*, 1996)。菸草中轉入 ascorbate oxidase，使 AsA 代謝增加，因而不耐臭氧逆境 (de Tullio *et al.*, 2003)。本論文中，水稻幼苗在無熱休克下進行 AsA 與 GalL 前處理，可降低後續氯化鎘處理的幼苗第二片葉片所增加之 NH_4^+ 含量與 PAL 比活性 (圖 18A, 18B)，顯示 AsA 與其合成前趨物 GalL 對水稻幼苗鎘毒害亦具保護作用。

綜合本論文及本實驗室前人研究之結果，熱休克前處理改變鎘所誘導 NH_4^+ 累積與 PAL 比活性增加之可能機制為：

熱休克 $\rightarrow H_2O_2$ 累積 \rightarrow GSH、AsA 含量增加 \rightarrow 降低鎘所誘導 NH_4^+ 累積
APX、GR 活性提升 \rightarrow PAL 比活性增加

目前台灣農業可耕地面積日益減少，作物栽培於鎘污染農地不僅防礙作物生長狀況及產量，累積於稻穀內的鎘經人類攝食後亦會產生不良影響。綜合上述試驗結果，吾人發現硫不僅影響水稻幼苗生長發育，在抵禦鎘逆境方面之角色亦不可忽視，在水稻生育過程中，應於農地與肥料中補充適當硫含量。本研究中，鎘對植物體產生之危害可經熱休克前處理，或是 H_2O_2 及抗氧化物外加前處理而獲得減緩。回歸田間栽培措施觀之，於鎘污染地區噴灑或外加抗氧化物或可減輕重金屬汙染之害，但是外加劑量與時機則有待進一步研究，最好的辦法當然是避免汙染地區農作物之栽種。水稻是目前重要的禾本科作物，也是世界上超過三分之一人口的主要卡路里來源，「提高水稻單位面積總產量」在一片糧食危機聲浪中成為農藝人急欲解決之難題，作物生理領域廣闊，相關研究仍待每一位先進及後輩們共同努力。



參考文獻

張尊國. 2002. 台灣地區土壤污染現況與整治政策分析. 永續 (析) 091-021 號.

<http://old.npf.org.tw/PUBLICATION/SD/091/SD-B-091-021.htm>

鄒裕民. 2007. 合理化施肥台灣農地污染與復育問題. 品種與技術 57: 51-55.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of reactive oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:501-639.

Akiko MN, Eri I, Akiko WT, Tomoyuki Y, Hideki T. 2003. Transcriptome Profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol* 132:597-605.

Alscher R, Donahue JL, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol Plant* 100:224-233.

Astolfi S, Zuchi S, Passera C. 2004. Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. *Biol Plant* 48:413-18.

Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphylides C. 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J* 13:519-527.

- Cakmak I and Marschner H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98:1222–1227.
- Chen SL and Kao CH. 1995a. Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regul* 17:67–71.
- Chen SL and Kao CH. 1995b. Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. *Plant Growth Regul* 16:249–252.
- Chen SL and Kao CH. 1995c. Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Sci* 104:135–138.
- Chien HF and Kao CH. 2000. Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium. *Plant Sci* 156:111–115.
- Chien HF, Wang JW, Lin CC, Kao CH. 2001. Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regul* 33:205–213.
- Chien HF, Lin CC, Wang JW, Chen CT, Kao CH. 2002. Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damages. *Plant Growth Regul* 36:41–47.
- Cho UH and Seo NH. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci* 168:113–120.

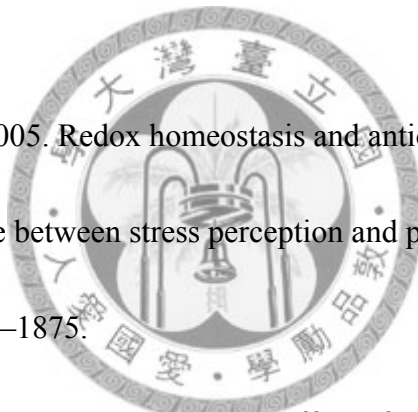
- Cobbett CS. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123:825–832.
- Conklin P L, Williams E H, Last R L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid–deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9970–9974.
- Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *J of Exp Bot* 56:765–775.
- Das P, Sammantaray S, Rout GR. 1997. Studies on cadmium toxicity: a review. *Environ Pollut* 98:29–36.
- De Pinto MC, Tommasi F, De Gara L. 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright–Yellow 2 cells. *Plant Physiol* 130: 698– 708.
- De Tullio MC, Liso R, Arrigoni O. 2003. Ascorbic Acid Oxidase: An Enzyme in Search of a Role. *Planta* 216:918–928.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot* 52:1101–1109.
- Dodge AD. 1971. The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavour* 30:130–135.

Dominguez—Solis JR, Gutierrez—Alcala G, Vega JM, Romero LC, Gotor C. 2001. The cytosolic O–acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* 276:9297–9302.

Elstner EF. 1982. Oxygen activity and oxygen toxicity. *Ann Rev Plant Physiol* 33:73–96.

Foyer CH and Noctor G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119:355–364.

Foyer CH and Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17:1866–1875.



Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1999. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Biol Plant* 42:49–55.

Givan CV. 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem* 18:375–382.

Gupta AS, Webb RP, Holaday AS, Allen RD. 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase overexpression plants. *Plant Physiol* 103:1067–1073.

- Guy CL. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:187–223.
- Harrington HM and Alm DM. 1988. Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 88:618–625.
- Hassan MJ, Wang ZQ, Zhang GP. 2005. Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice. *J Plant Nut* 28:1785–1800.
- Harada E, Choi YE, Tsuchisaka A, Obata H, Sano H. 2001. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J Plant Physiol* 158:655–661.
- Hawkesford MJ. 2000. Plant responses to sulphur deficiency, the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S–utilization efficiency. *J Exp Bot* 51:131–8.
- Herbinger K, Tausz M, Wonisch A, Soja G, Sorger A, Grill D. 2002. Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiol and Biochem* 40:691–696.
- Hsu YT and Kao CH. 2003a. Accumulation of ammonium ion in cadmium tolerant and sensitive cultivars of *Oryza sativa*. *Plant Growth Regul* 39:271–276.

Hsu YT and Kao CH. 2003b. Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regul* 40:147–155.

Hsu YT and Kao CH. 2003c. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Environ* 26:867–874.

Hsu YT and Kao CH. 2003d. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biol Plant* 46:73–78.

Hsu YT and Kao CH. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul* 42:227–238.

Hsu YT and Kao CH. 2005. Abscisic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings. *Physiol Plant* 124:71–80.

Hsu YT, Kuo MC, Kao CH. 2006. Cadmium–induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant Soil* 287:267–277.

Hsu YT and Kao CH. 2007a. Cadmium–induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant Soil* 291:27–37.

Hsu YT and Kao CH. 2007b. Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Soil* 298:231–241.

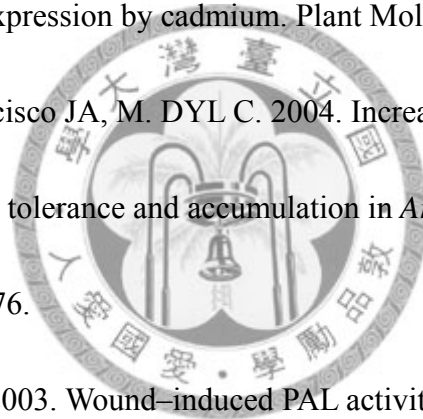
Hsu YT and Kao CH. 2007c. Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant Soil* 300:137–147.

Howarth JR, Dominguez—Solis JR, Gutierrez—Alcala G, Wray JL, Romero LC, Gotor C. 2003. The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Mol Biol* 51:589–598.

José RDS, M.C. LM, Francisco JA, M. DYL C. 2004. Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol J* 2:469–476.

Kang H and Saltveit ME. 2003. Wound-induced PAL activity is suppressed by heat-shock treatments that induce the synthesis of heat—Shock proteins. *Physiol Plant* 119: 450–455.

Kim SC, Cho MK, Kim SG. 2003. Cadmium-induced non-apoptotic cell death mediated by oxidative stress under the condition of sulfhydryl deficiency. *Toxicol Lett* 144:325–336.



Kumar, G.N.M. and N.R. Knowles. 2003. Wound-induced superoxide production and PAL activity decline with potato tuber age and wound healing ability. *Physiol Plant* 117:108–117.

Kuo MC and Kao CH. 2004. Antioxidative enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Bot Bull Acad Sin* 45:291–299.

Kutz A, Muller A, Hennig P, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EW. 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 30:95–106.

Kuznetsov VV, Rakitin VY, Borisova NN, Rotschupkin BV. 1993. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants? *Plant Physiol Biochem* 31:181–188.

Kuzuhara Y, Isobe A, Awazuhara M, Fujiwara T, Hayashi H. 2000. Glutathione levels in phloem sap of rice plants under sulfur deficient conditions. *Soil Sci Plant Nutr* 46:265–270.

Lafuente MT, Belver A, Guye MG, Saltveit ME. 1991. Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiol* 95: 443–449.

Lanciloti DF, Cwik C, Brodl MR. 1996. Heat shock proteins do not provide

thermoprotection to normal cellular protein synthesis, α -amylase mRNA and endoplasmatic reticulum lamellae in barley aleurone layers. *Physiol Plant* 97: 513–523.

Lappartient AG and Touraine B. 1996. Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola (the role of phloem-translocated glutathione). *Plant Physiol* 111:47–157.

La Rosa PC, Hasegawa PM, Rhodes D, Clithero JM, Watad AA, Bressan RA. 1987.

Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol* 85:174–181.

Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P. 1999. Effect of growing-season on the photosynthetic apparatus and leaf antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environ Exp Bot* 42:129–139.

Lin TS, Sucoff E, Brenner M. 1986. Abscisic acid content and components of water status in leaves of *Populus deltoids*. *Can J Bot* 64:2295–2298.

Loaiza-Velarde JG and Saltveit ME. 2001. Heat shock applied either before or after wounding reduce browning of lettuce leaf tissue. *J Am Soc Hort Sci* 126:227–234.

Loaiza-Velarde JG, Toma's-Barberan F, Saltveit ME. 1997. Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound induced phenolic metabolism in

iceberg lettuce. *J Am Soc Hort Sci* 122:873–877.

Lozano–Rodriguez E, Hernández LE, Bonay P, Carpena–Ruiz R. 1997. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J Exp Bot* 48:123–128.

Marchner H. 1995. Mineral nutrition in higher plants. Acad. Inc., London, UK

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49:649–667.

Menezes–Benavente, Teixeira FK, Kamei CLA, Margis–Pinheiro M. 2004. Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of Brazilian indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 166:323–331.

Maria C de Pinto, Franca T, Laura De Gara. 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright–yellow 2 cells. *Plant Physiol* 130:698–708.

Michael T, Helena S. Dieter G. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress–response concept valid? *J of Exp Bot* 55: 1955–1962.

Mifflin BJ and Lea PJ. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem*

15:873–885.

Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends in Plant Sci 11:15–19.

Mizrahi Y and Richmond AE. 1972. Abscisic acid in relation to mineral deprivation. Plant Physiol 1972 50:667–670.

Moriwaki M, Yamakawa T, Washino T, Kodama T, Igarashi Y. 1999. Suppressed phenylalanine ammonia-lyase activity after heat shock in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* containing an *Arabidopsis* HSP182–parsley PAL2 chimera gene. J Biosci Bioeng 87:588–593.

Muhammad JH, Ziqiang Wang, and Guoping Zhang. 2005. Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice. J of Plant Nut 28:1785–1800.

Neumann D, Lichtenberger O, Tschiersch K, Nover L. 1994. Heat shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. Planta 194:360–367.

Nocito FF, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA. 2002. Cadmium induced sulfate uptake in maize roots. Plant Physiol 129:1872–1879.

Noctor G, Arisi A, Jouanin L, Kunert K, Rennenberg H, Foyer C. 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. J Exp Bot 49:623–647.

Noctor G and Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279.

Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ* 29:409–425.

Nussbaum S, Schmutz D, Brunold C. 1988. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. *Plant Physiol* 88:1407–1410.

Nybe EV, Nair PCS. 1989. Relationships of foliar nutrient levels with yield in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Tropical Agriculture* 66:345–349.

Olmos E, Martinez—Solano JR, Piqueras A, Hellin E. 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* 54:291–301.

Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JL. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406:731–734.

Pilon—Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15–39.

Popović M, Kevrešan S, Kandrač J, Nikolić J, Petrović N, Kastori R. 1996. The role of sulphur in detoxication of cadmium in young sugar beet plants. *Biol Plant* 38:281–287.

Quaggiotti S, Abrahamshon C, Malagoli M, Ferrari G. 2003. Physiological and

molecular aspects of sulphate uptake in two maize hybrids in response to S-deprivation. *J Plant Physiol* 160:167–173.

Randall PJ and Wrigley CW. 1986. Effects of sulfur supply on the yield, composition, and quality of grain from cereals, oilseeds, and legumes. *Adv Cereal Sci Technol* 8:171–206.

Reinaldo CV, Hirokyu N, Trevor S, Mikal ES. 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiol plant* 123:82–91.

Robson AD and Pitman MG. 1983. Interactions between nutrients in higher plants, pp. 147–80. In *Encyclopaedia Plant Physiology* Vol. 15, eds A. Lauchli and R. L. Bielecki, 870 pp. Springer-Verlag, Berlin

Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol* 109:1427–1433.

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plant *J Exp Bot* 52:2115–2126.

Sanità di Toppi LS and Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ and Exp Bot* 41:105–130.

Sato Y and Yokoya S. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27:329-34.

Scandalios JG. 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27:483–486.

Schützendübel A and Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal–induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365.

Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld– Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium–induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* 127:887–898.

Sebehat A, Weiss D, Lurie S. 1996. The correlation between heat shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruits. *Plant Physiol* 110:531–537.

Seo M and Koshiba T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis. *Trends in Plant Science* 7:41–48.

Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161:1135–1144.

- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S. 1980. Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Archiv of Biochem and Biophys* 201:121–127.
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad APK. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* 85:85–89.
- Stuiver CEE, De Kok LJ, Westerman S. 1997. Sulfur deficiency in *Brassica oleracea* L.: Development, biochemical characterization, and sulfur/nitrogen interactions. *Russian J Plant Physiol* 44:505–513.
- Tandon R. 1995. Board games: Governance and accountability. pp In M. Edwards & D. Hulme (Eds.), *NGO Performance and Accountability*. London: Earthscan (Chapter 4).
- Tausz T, Šrceelj H, Grill D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress–response concept valid? *J Exp Bot* 55:1955–1962.
- Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)—differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci* 165:1411–1418.
- Victoria N, Jens F, Stefan K, Monika A, Holger H, Rainer H. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic

pathways provides response specificity. *The Plant J* 33:633–650.

Walter WM, Purcell AE. 1979. Evaluation of several methods for analysis of sweet potato phenolics. *J Agric Food Chem* 27:942–6.

Watanabe T, Zhang ZW, Moon CS, Shimbo S, Nakatsuka H, Matsuda–Inoguchi N, Hogashikawa K, Ikeda M, 2000. Cadmium exposure of women in general populations in Japan during 1991–1997 compared with 1997–1981. *Int Arch Occup Environ Health* 73:26–34.

Wollgiehn R, Neumann D. 1995. Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. *J Plant Physiol* 146:736–742.

Wu FB and Zhang GP. 2002. Genotypic differences in effect of Cd on growth and mineral concentrations in barley seedlings. *Bulletin of Environ Contamination and Toxicol* 69:219–227.

Xu Q, Henry RL, Guikena JA, Paulsen GM. 1995. Association of high–temperature injury with increased sensitivity of photosynthesis to abscisic acid in wheat. *Environand Exp Bot* 35:441–454.

Zeevaart JAD, Creelman RA. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:439–473.