

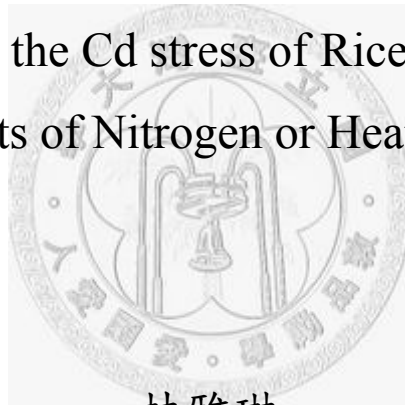
國立臺灣大學生物資源暨農學院農藝學系

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：氮或熱休克之效應

Studies on the Cd stress of Rice Seedlings:
Effects of Nitrogen or Heat Shock



林雅琳

Ya-Lin Lin

指導教授：高景輝 教授

Advisor: Ching Huei Kao, Professor

中華民國九十七年六月

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：氮或熱休克之效應

Studies on the Cd stress of Rice Seedlings:

Effects of Nitrogen or Heat Shock

本論文係林雅琳君（R95621112）在國立臺灣大學農藝學系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 (Professor Ching Huei Kao) (論文指導教授)

國立台灣大學農藝學系教授

Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University

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

黃定鼎 博士 (Dr. Dinq-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

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

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

誌 謝

24 個月的碩士養成班，即將要圓滿結業囉！24 個月的學習與生活、歡笑與淚滴，在這樣不長也不短的時間內，我和許多的貴人們相遇了。在此，我要向你們大聲地說：謝謝你，謝謝你帶給我的美好事物，使我的生命更美更好。

親愛的爸比與媽咪，謝謝你們從小的養育及精神支持，又感謝每日的溫情等候，讓我可以努力地做完實驗後，回到點著溫暖燈火的家。我的姐姐、妹妹、弟弟，謝謝你們可以和我連手讓家裡總是每天吵轟轟、熱鬧鬧地，以及同樣屬於溫情等候幫的阿嬤，甘溫啦！

從科學理論到實際地操作試驗，在這段光陰內體會到研究室氛圍中系統性的邏輯，並學習到做研究的方法。學問研究、時間管理、禮儀等不及繁載，老師不論是言教或身教都教導了我許多。因為有老師給予學習機會，這兩年的研究所生活才能順利地展開，自身獨立思考也大為進步。老師，真誠地謝謝您！

謝謝老師、宋濟民 老師、黃定鼎 老師、陳宗禮 老師、洪傳揚 老師，對於論文內容，不吝地給予寶貴的意見，使得論文能夠更加地完善與充實。感謝人工氣候室劉麗飛 老師、王淑珍 老師提供的設備，讓水稻試驗能夠順利地進行。謝謝黃文達 老師，辛勤地教導進行鍋分析。

研究室的伙伴們，感謝你們的陪伴，這段與你們相處的日子，真的非常開心。奕婷學姐、炤曄、劉雅婷，那些一起呷飯呷很久、出遊的時光；庭邵、昱齊、陳玄，關心與支持，帶來愛、勇氣、希望、與歡笑；雲洋學長，教導認真的面對實驗。研究所的同學們：小小，是我基因表現實驗的特別家教；馬仔，統計分析靠你。還有小滋、俊伶、仕珏學妹、毅竹學弟、宗樺學弟、阿亮、伊婷，謝謝你們的參與和幫助；等等...許多許多的朋友們，有你們在研究所生活中，給予我有形與無形中的許多事物，謝謝你們！

最後，再次謝謝所有幫助過我的人，因為有你們，我才能完成這本論文與渡過快樂的研究所生活～

ya-o

雅琳 080710

中文摘要

本論文係以水稻台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1) 為試驗材料, 探討: (一) 缺氮狀態下鎘對水稻幼苗之影響; (二) 熱休克處理 (HS) 幼苗對鎘所誘導 glutamine synthetase (GS) 與 protease 活性改變之影響。

缺氮處理之水稻幼苗, 地上部生長受抑制、鮮乾重減少, 但不影響根長與根之鮮乾重。缺氮處理亦造成葉綠素、蛋白質及硝酸根離子含量降低, 並出現明顯葉片黃化現象。水稻幼苗經缺氮處理誘導葉片累積 H_2O_2 , 降低抗氧化物 ascorbate (ASC) 含量與抗氧化酵素 ascorbate peroxidase、glutathione reductase、catalase 活性, 但增加 superoxide dismutase 活性。逆境荷爾蒙脫落酸累積於缺氮水稻幼苗葉片, 可能與造成缺氮植株之矮化有關。與正常幼苗相比較, 缺氮幼苗經氯化鎘處理, 葉片、地上部與根部會顯著地累積較多鎘, 而水稻幼苗鎘毒害加劇。以 ASC 處理缺氮幼苗可減緩氯化鎘之毒害。因此推測缺氮幼苗加劇鎘毒害之可能機制與缺氮造成抗氧化能力下降及鎘之吸收增加有關。

鎘處理導致水稻幼苗葉片內 GS 活性下降, protease 比活性上升。HS (45°C 黑暗下 3 小時) 會抑制鎘所誘導 GS 與 protease 活性變化。HS 對鎘所誘導 GS 與 protease 活性變化之效應可因 NADPH oxidase 抑制劑 imidazole 處理而抵消。Buthionine sulfoximine (BSO) 為還原態 glutathione (GSH) 合成抑制劑。BSO 處理可去除 HS 對鎘所誘導 GS 與 protease 活性改變之效果, 而 BSO 作用又可被外加 GSH 抵消。在無熱休克處理 (non-HS) 下外加 H_2O_2 或 GSH, 可抑制因鎘誘導 GS 或 protease 活性之改變。L-galactono-1,4-lactone (GalL) 為合成 ASC 之前趨物。non-HS 下外加 ASC 或 GalL 亦可部份恢復鎘所導致之 GS 與 protease 活性改變。說明 HS 可有效抑制鎘誘導水稻幼苗葉片 GS 與 protease 活性之變化, 係經由抗氧化系統作用所造成。

英 文 摘 要

Rice (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) seedlings were used to investigate (a) the effect of nitrogen deficiency on Cd toxicity and (b) the effect of heat shock (HS) on Cd-induced changes in GS activity and protease specific activity.

The N-deficient treatment caused reduction in length, fresh weight and dry weight of shoot, but had no effect on root. Nitrogen deficiency also caused reduction in chlorophyll, protein, and nitrate contents, and chlorosis in leaves. Rice seedlings grown under nitrogen deficient conditions resulted in an increase in hydrogen peroxide content, decrease in ascorbate (ASC) content, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, and catalase activities, as well as increase in superoxide dismutase activity in leaves. Absciscic acid accumulated in N-deficient leaves, this may lead to the reduction of shoot growth. The cadmium concentration was higher in the leaves, shoot, and root of N-deficient seedlings than that in leaves, shoot, and root of control seedlings. Addition of ascorbate to N-deficient rice seedlings alleviated cadmium toxicity. On treatment with cadmium chloride, N-deficient rice seedlings had more severe toxic symptoms than those of control, which is most likely related to low antioxidant ability and high cadmium concentration in leaves of rice seedlings grown under N-deficient conditions.

CdCl₂ treatment resulted in a decrease in GS activity and an increase in protease specific activity. HS pretreatment (45°C for 3 h in the dark) protected against Cd-induced changes in GS and protease in rice seedlings. Exogenous application of imidazole (NADPH oxidase inhibitor) under HS condition counteracts the effect of HS on the activity of GS and the specific activity of protease. Buthionine sulfoximine (BSO) is an inhibitor of reduced glutathione (GSH) synthesis. BSO pretreatment reduced HS

effect on Cd-induced changes in GS and protease. The effect of BSO was reversed by the application of GSH. Exogenous application of H_2O_2 or GSH under non-HS condition was able to inhibit the changes of GS and protease induced by $CdCl_2$. L-Galactono-1,4-lactone (GalL) is a precursor of ASC biosynthesis. Pretreatment of rice seedlings with ASC or GalL under non-HS condition protected against the Cd effect on the activity of GS and the specific activity of protease. In conclusion, HS-reduced the changes of GS and protease by $CdCl_2$ is most likely mediated through antioxidant systems.



目 錄

口試委員會審定書	i
誌 謝	ii
中 文 摘 要	iii
英 文 摘 要	iv
圖 表 目 錄	vii
縮 寫 字 對 照	ix
 前 言	1
一、鎘逆境與植物生長	3
二、氧化逆境與活化氧族	5
三、植物之抗氧化系統	5
四、鎘可以誘導氧化逆境	7
五、多重逆境之概念	8
六、缺氮逆境對植物之傷害	9
七、氮素與鎘逆境之關係	11
八、熱休克與逆境之關係	11
九、GS 與 protease 以及氧化逆境之關係	12
十、本研究室過去對鎘逆境之研究	15
 材 料 與 方 法	18
一、植物種植、選取與處理	18
二、外表性狀分析	20
三、化學成份分析	21
四、酵素活性分析	29
五、統計分析	33
 結 果	34
一、鎘對缺氮水稻幼苗毒害之影響	34
二、熱休克對水稻後續鎘逆境誘導 GS 與 protease 活性變化之影響	50
 討 論	59
一、鎘對缺氮水稻幼苗毒害之影響	59
二、熱休克對水稻後續鎘逆境誘導 GS 與 protease 活性變化之影響	62
三、未來研究方向	65
 參 考 文 獻	66

圖表目錄

圖目錄

圖 1. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗地上部與根部長度(A)、鮮重(B)與乾重(C)之影響..	35
圖 2. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響	36
圖 3. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片 NO_3^- (A, B)與蛋白質含量(C, D)之影響	37
圖 4. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片(A, B, C)與根部(D, E) H_2O_2 含量之影響	38
圖 5. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片 GSH (A, B)、GSSG (C, D)與 GSH + GSSG (E, F)含量之影響.....	39
圖 6. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片 ASC (A, B)、DHA (C, D)與 ASC + DHA (E, F)含量之影響.....	40
圖 7. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A, B)、GR (C, D)、APX (E, F)、CAT (G, H)活性之影響	41
圖 8. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響—以 RT-PCR 檢測 OsRab16A 基因表現(A)與 ELISA 法(B)測定脫落酸含量	43
圖 9. 缺氮 (-N) 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響	44
圖 10. 缺氮 (-N) 與氯化鎘長期處理 (24 天) 對水稻幼苗植株外觀之影響	45
圖 11. 缺氮 (-N) 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片(A)、地上部(B)與根部(C)鎘含量之影響	46
圖 12. 缺氮 (-N) 後外加 ASC 前處理於後續-N 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響.....	48
圖 13. 缺氮 (-N) 後外加 ASC 前處理對水稻幼苗第二片葉片 ASC 含量(A)與 ASC / DHA 比值(B)之影響.....	49
圖 14. 氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響	51
圖 15. HS 前處理與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響.....	52
圖 16. non-HS 與 H_2O_2 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響.....	53
圖 17. HS 與 IMD 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響	54
圖 18. non-HS 與 GSH 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響.....	55
圖 19. HS 與 BSO 或 GSH 共同前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響.....	57
圖 20. non-HS 與 GalL 或 ASC 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease	

比活性(B)變化之影響.....	58
圖 21. 缺氮水稻幼苗鎘毒害加劇之可能機制.....	62
圖 22. HS 抑制鎘所誘導 GS 與 protease 活性變化之可能機制.....	64

表目錄

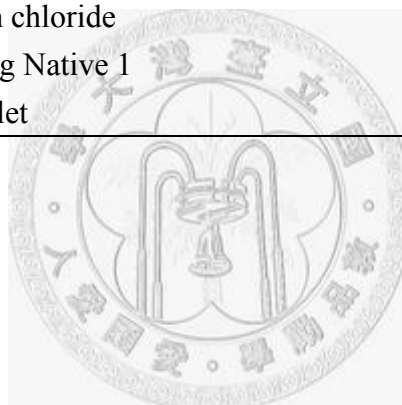
表 1. 正常幼苗生長用水耕液 (half-strength)	19
表 2. 缺氮幼苗生長用水耕液 (half-strength)	20
表 3. ELISA 法之試劑配製.....	27
表 4. 基因引子序列	28
表 5. PCR 反應條件	28



縮 寫 字 對 照

縮寫名	全名
-N	nitrogen deficiency
ACC	1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid
ABA	abscisic acid
APX	ascorbate peroxidase
ASC	ascorbate
BSO	buthionine sulfoximine
CAT	catalase
CdCl ₂	cadmium chloride
DAB	3,3-diaminobenzidine-HCl
Dea	diethanolamine
DEPC	diethylpyrocarbonate
DHA	dehydroascorbate
DHAR	dehydroascorbate reductase
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	dithiothreitol
DW	dry weight
γ-EC	γ-glutamylcysteine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FW	fresh weight
Gall	L-galactono-1,4-lactone
GR	glutathione reductase
GS	glutamine synthetase
GSH	reduced glutathione
GSSG	oxidized glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HS	heat shock
IMD	imidazole
IRRI	International Rice Research Institute
LSD	least significant difference
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NO ₃ ⁻	nitrate
non-HS	non-heat shock

縮寫名	全名
PC	phytochelatin
PNP	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate disodium
POD	peroxidase
PVP	polyvinyl pyrrolidone
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAS	statistical analysis system
SE	standard error
SOD	superoxide dismutase
SSA	sulfosalicylic acid
TBS	tris-buffered saline
TCA	trichloroacetic acid
Tea	triethanolamine
TiCl ₄	titanium chloride
TN1	Taichung Native 1
UV	ultraviolet



前言

鎘為現今廣泛存在的一種重金屬污染物。隨著採礦與工業活動的發達，含鎘污染物之不當排放造成環境污染。台灣的鎘污染問題十分嚴重，水稻田常傳出遭受鎘金屬污染之情形。鎘污染抑制植物之生長，並會經由食物鏈危害人體健康，因此研究鎘逆境之機制為當今首要之議題。

當作物生長在田間時，通常不會只遭遇單一逆境，而是好幾個逆境同時發生。最近的研究指出，植物對於多重逆境之反應是很獨特的，不能只是簡單地視為不同逆境之加總，這突顯了多重逆境於研究上之重要性(Mittler, 2006)。鎘逆境可產生氧化逆境對植物造成毒害。氮素則為植物生長之必需元素，一旦缺乏氮素時會影響植物之代謝與發育。研究報導指出，植物缺乏營養元素會誘導活化氧族之累積，改變抗氧化系統之反應(Shin et al., 2005; Molassiotis et al., 2006; Tewari et al., 2006)。缺氮之水稻幼苗，若再遭遇一個鎘逆境，是否會加強水稻鎘逆境傷害為本論文所欲探討之主題。

植物遭受逆境時會造成傷害，但是於短暫時間內使植物曝露於非致死之高溫（即熱休克處理），卻可以增加對後續遭遇逆境（例如：鹽害、寒害、高溫、乾旱、重金屬、UV 光、病原菌等）之抗性(Lurie and Klein, 1991; Saltveit, 1991; Gong et al., 2001; Kang and Saltveit, 2001; Sato et al., 2001; Allan et al., 2006)。鎘逆境可能會改變 glutamine synthetase (GS) 活性與 protease 比活性。GS 為氮素同化作用的重要酵素，GS 活性若降低可能造成銨離子累積，高濃度之銨離子累積則會對細胞產生傷害。逆境生成之活化氧族會對蛋白質進行修飾，被修飾的蛋白質可經 protease 作用而降解。文獻指出活化氧族與 GS 活性調控有關，亦可改變 protease 之比活性(Casano et al., 1990; Casano and Trippi, 1992; Roche et al., 1993; Casano et al., 1994; Strocher et al., 1997; Subbaiah et al., 2000; Balestrasse et al., 2006)。抗氧化系統表現之增加，

可減緩氧化逆境之傷害。熱休克抑制鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性改變之影響，很可能與抗氧化系統之作用有所關聯。

本研究室曾探討許多關於鎘逆境之主題：(一) 氯化鎘對水稻切離葉片與乙烯形成之關係(Hou and Kao, 1993; Chen and Kao, 1995c)；(二) 氯化鎘抑制水稻幼苗根伸長之作用(Chen and Kao, 1995a, 1995b)；(三) 氯化鎘對水稻毒害與銨離子累積之關係(Chien and Kao, 2000; Chien et al., 2002; Hsu and Kao, 2003a)；(四) 氯化鎘使水稻切離葉片產生氧化逆境(Chien et al., 2001; Chien et al., 2002)；(五) 脫落酸與水稻鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2003c, 2005)；(六) 鎘耐受性不同水稻品種之蛋白質與胺基酸含量變化(Hsu and Kao, 2003b)；(七) 活化氧族與水稻鎘耐受性之關係(Kuo and Kao, 2004; Hsu and Kao, 2007c)；(八) 一氧化氮與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2004)；(九) 高溫下氯化鎘誘導銨離子累積與脫落酸之關係(Hsu et al., 2006)；(十) 多元胺與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2007a)；(十一) 熱休克處理與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2007b)。本論文係延續過去之研究，進一步地探討缺氮與氯化鎘雙重逆境對水稻幼苗鎘毒害之影響，以及熱休克對鎘所誘導 GS 與 protease 酵素活性改變之影響。

前人研究

在十九世紀末與二十世紀初，由於採礦與工業活動的發達，重金屬對環境產生的污染日益嚴重。鎘為現今廣泛存在環境中的一種重金屬污染物，只要累積少量即可對植物造成毒害，並經由食物鏈危害人體健康，因此鎘污染之環境議題在世界上受到極大的重視。

鎘一般廣泛使用於合金、鍍金、鎳鎘電池及作為油漆、陶瓷的成份，含鎘污染物之不當排放使得土地遭受污染。在台灣，鎘污染問題便十分嚴重，水稻田常有發現受鎘重金屬污染的情形。台灣著名的鎘污染案例有：1988 年，桃園觀音鄉及蘆竹鄉之高銀及基力化工廠；2001 年，雲林縣虎尾鎮之台灣色料廠；2002 年，彰化市、和美鎮東西二圳沿岸工廠(張, 2002)。這是由於早期河流沿岸工業廢水排放不當，含有重金屬之廢水不僅污染週遭環境，農民引用被污染的水灌溉稻田更造成當地「鎘米」事件之發生。這些受重金屬污染之鎘米被人體食用後，會產生鎘金屬中毒現象，造成著名之病症—「痛痛病」。此病症早期出現在日本富山縣，吃了鎘米的當地居民會產生腎小管性蛋白尿、骨軟化及骨骼關節劇烈疼痛等症狀，使得生病的人十分痛苦，故稱之痛痛病(Fassett, 1975)。稻米為台灣最重要的糧食作物，再加上土壤之鎘重金屬污染問題，研究水稻之鎘逆境實為當今極其重要且不可被忽視的研究方向。

一、鎘逆境與植物生長

現今存在於大自然的 90 種元素內有 53 種為重金屬(Weast, 1984)。重金屬的定義為密度大於或等於 5 g cm^{-3} 之金屬。在常見的幾種重金屬中，有些是植物生長的必須元素，有些則不被植物需要，且對植物體有或多或少的毒性(Nies, 1999)。鎘(密度 8.6 g cm^{-3}) 為非必須元素且是毒性最強的重金屬之一。一般沒有被污染的

土壤含有 0.04~0.32 μM 的鎘，當土壤中的鎘濃度如果達到 0.32~1 μM 即視為受到鎘污染(di Toppi and Gabbrielli, 1999)。由於鎘有很高的毒性又在水中有很大溶解度(Pinto et al., 2004)，因此生長在污染土地上的植物就很容易吸收鎘，累積於植物體內對生長造成抑制。鎘對植物造成之毒害，就型態、生理、生化與構造方面均會產生不良的影響。

文獻指出，葉片產生黃化萎凋、捲曲為受到鎘毒害很明顯的外表特徵(Chen and Kao, 1995c; Chien and Kao, 2000; Chien et al., 2002; Hsu and Kao, 2003a, 2003b, 2003c, 2004, 2005, 2007b, 2007c)，本論文亦以葉片黃化程度表示水稻幼苗受鎘毒害之指標。鎘毒害特徵還包括植株地上部矮化，降低種子萌芽率、鮮乾重、分蘗數、作物產量(Bingham et al., 1976)。植物根系是最先接觸到鎘的部位，因此鎘對於根所產生的毒害也是最先發生(Li et al., 2005)，根部變褐色且抑制根之生長皆為鎘毒害所造成的型態變化(Chen and Kao, 1995a, 1995b; Mattioni et al., 1997; Lagriffoul et al., 1998; Moreno-Caselles et al., 2000; Carrier et al., 2003; Yeh et al., 2004)。鎘抑制植物生長原因可能與抑制細胞分裂，使細胞分裂期延長、染色體斷裂、抑制 DNA 和 RNA 合成酶活性、影響植物基因組模板的穩定度使 DNA 合成受阻等有關(Mo and Li, 1992; Liu et al., 2006)。

鎘逆境下，植物之光合作用會被抑制(Alcantara et al., 1994; di Toppi and Gabbrielli, 1999)，以及抑制葉綠素之生合成與降低二氧化碳固定酵素之活性(Stobart et al., 1985; Defilippis and Ziegler, 1993)。鎘會干擾鈣、鎂、磷、鉀營養元素之吸收利用(Das et al., 1997)，抑制根部的 Fe(III) reductase 造成缺鐵現象(Alcantara et al., 1994)，減少硝酸鹽的吸收與轉運(Hernandez et al., 1996)。鎘亦會使植物水分的狀態產生改變(Das et al., 1997)，影響細胞膜的通透性造成水分含量減少(Barcelo et al., 1986; Poschenrieder et al., 1989; Costa and Morel, 1994)。豆科植物之根瘤經鎘處理後，會減少氮素固定與銨的同化作用(Balestrasse et al., 2003)。鎘會

降低小麥與向日葵根部細胞膜上的 ATPase 活性，並造成脂質過氧化而改變膜的功能性(Fodor et al., 1995)。

在細胞結構方面，隨著水稻處理鎘濃度之提高，葉片細胞的細胞核、葉綠體、粒線體結構會被破壞(Xiong and Yang, 2006)。如核膜破裂、核仁消失、核內腔擴大、核出現空泡，葉綠體膜破壞、葉綠餅堆疊鬆散、類囊體受損，粒線體膜結構損壞、脊突(cristae)解體等皆是鎘毒害所造成結果(Brune et al., 1995; Siedlecka and Krupa, 1999; Talarico, 2002)。

二、 氧化逆境與活化氧族

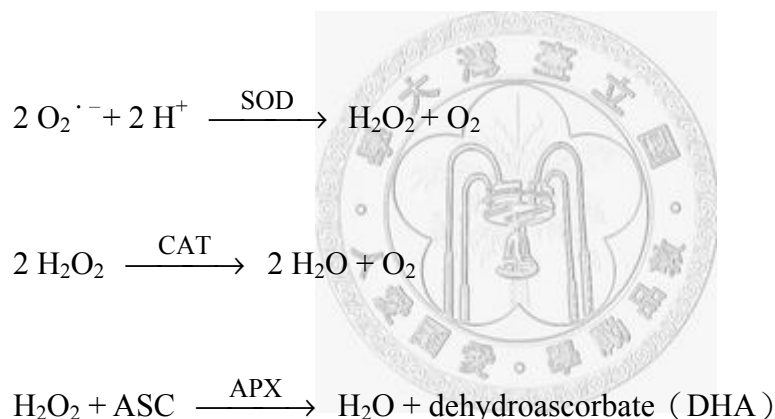
植物隨時有可能遭受各種不同的逆境，如空氣污染、乾旱、高溫、強光、重金屬、鹽害、寒害、UV 輻射、營養缺乏等等(Benavides et al., 2005)。在正常代謝情況下，植物進行呼吸作用或光合作用，會短暫地產生一些活化氧族(Asada and Takahashi, 1987)，但是當植物遭受逆境時，可能誘導活化氧族大量增加。活化氧族(reactive oxygen species, ROS)包括單線態氧(singlet oxygen, 1O_2)、超氧自由基(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)、氫氧自由基(hydroxyl radical, $HO\cdot$)，由氧分子不完全的還原而產生，具有很強的活性。活化氧族中 H_2O_2 濃度低的時候，可能作為重要的訊息傳導分子(Kovtun et al., 2000; Apel and Hirt, 2004; del Rio et al., 2006)，改變基因表現或調控特殊的防禦蛋白；但是高濃度的活化氧族會攻擊細胞內的大分子，如蛋白質、脂質、核酸等，而對細胞造成傷害(Mittler, 2002)。

三、 植物之抗氧化系統

對於逆境所誘導活化氧族之累積，植物以抗氧化物與抗氧化酵素來建立防禦系統。植物體內之抗氧化物主要包括水溶性分子 ascorbate (ASC)、還原態

glutathione (GSH) (Noctor and Foyer, 1998)，以及脂溶性分子 α -tocopherol、flavonoids、alkaloids、carotenoids 等。ASC 可以清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $HO\cdot$ 、 1O_2 (Buettner and Jurkiewicz, 1996)，另外還可配合 ascorbate peroxidase (APX) 酵素反應，將 H_2O_2 還原為水，且可以幫助還原態 α -tocopherol 再生成 (Padh, 1990)。GSH 可以清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $HO\cdot$ 、 1O_2 ，另外可以參與 ASC 與 $NADP^+$ 的再生成及保護酵素之硫氫基 (Foyer et al., 1994)。

植物的抗氧化酵素主要包括 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、APX、glutathione reductase (GR) (Bowler et al., 1992; Asada, 1999; Mittler, 2002)。這些抗氧化酵素的反應式如下：



SOD 為植物對抗 ROS 的第一道防線。 $O_2^{\cdot-}$ 可經由 SOD 作用快速地轉變為 H_2O_2 。在植物體內已知 SOD，可依不同的金屬輔因子 (cofactor) 分為三類：Cu/ZnSOD、MnSOD、FeSOD (Bannister et al., 1987)。Cu/ZnSOD 存在於細胞質、葉綠體基質 (stroma)，MnSOD 存於粒線體基質，FeSOD 存於葉綠體基質 (Bowler et al., 1992)。CAT 位於過氧化體 (peroxisome)，可清除 H_2O_2 。APX 為參與 ASC-GSH 循環 (或稱 Halliwell-Asada 循環) 之酵素，有多種同功酵素位於細胞質、過氧化體、葉綠體基質、類囊體膜 (thylakoid membrane)、粒線體，可清除 H_2O_2 。CAT

與 APX 對 H_2O_2 的親和力不同，APX 親和力較強 (μM) 為負責一般程度 H_2O_2 之清除，CAT 的親和力較弱 (mM) 為負責清除逆境誘導之大量 H_2O_2 (Mittler, 2002)。ASC-GSH 循環中，APX 會消耗 ASC，而再生 ASC 時需要 dehydroascorbate reductase (DHAR) 作用並產生 GSSG (Foyer and Halliwell, 1976)。GR 可將氧化態 GSSG 轉變為還原態 GSH，此酵素主要位於細胞質、細胞壁、與葉綠體。

四、 鎘可以誘導氧化逆境

許多重金屬會誘導氧化逆境對植物造成毒害，且參與在許多不同的活化氧族產生機制。 Fe^{3+} 與 Cu^{2+} 為過渡金屬並具有很高的氧化還原能力，可直接參與在知名的 Haber-Weiss 反應，把 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 轉變為 $\text{HO}\cdot$ (Halliwell, 1982)。沒有氧化還原能力的金屬，如鎘、鉛、汞，則是會減少抗氧化物 GSH 含量，或干擾電子傳遞鏈間接地誘導 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及 $^1\text{O}_2$ 之產生。當植物遭受鎘逆境時可能會誘導氧化逆境之發生而造成毒害，經由誘導活化氧族的生成，或減少酵素型或非酵素型的抗氧化物質 (Somashekaraiah et al., 1992; Shaw, 1995; Stohs and Bagchi, 1995; Gallego et al., 1996; Balestrasse et al., 2001; Sandalio et al., 2001; Fornazier et al., 2002; Cho and Seo, 2005)。

鎘誘導豌豆、白楊、阿拉伯芥、水稻累積 H_2O_2 (Dixit et al., 2001; Schutzendubel et al., 2002; Cho and Seo, 2005; Hsu and Kao, 2007c)。鎘還會造成脂質過氧化現象 (lipid peroxidation)，於豌豆、大麥、向日葵、阿拉伯芥、大豆根瘤、菜豆與水稻均觀察到此現象 (Dixit et al., 2001; Groppa et al., 2001; Wu et al., 2003; Balestrasse et al., 2004; Kuo and Kao, 2004; Cho and Seo, 2005; Metwally et al., 2005)。然而在豌豆的過氧化體中脂質過氧化速率是減緩的 (Romero-Puertas et al., 1999)，另在胡蘿蔔則沒有發生脂質過氧化 (di Toppi et al., 1998)。

鎘逆境發生時，抵禦氧化逆境最重要的抗氧化系統，隨著不同物種會有不同反應。在向日葵葉子中，鎘造成 SOD、CAT、APX、GR、DHAR 活性改變。鎘處理增加菜豆 guaiacol peroxidase 與 APX 活性(Chaoui et al., 1997)，抑制 SOD 與 CAT 活性(Somashekaraiah et al., 1992)。植物處理鎘後，CAT 活性通常會降低(Dalurzo et al., 1997; Sandalio et al., 2001; Fornazier et al., 2002; Shim et al., 2003)，但在抗性品種之小蘿蔔 (radish) 中，CAT、GR、SOD 同功酶的活性會隨著鎘濃度增加而提高(Vitoria et al., 2001)。豌豆給予鎘處理後，SOD、CAT、APX、GR 活性增加(Dixit et al., 2001)，但 CAT、APX 在高鎘濃度時活性降低(Sandalio et al., 2001)，這些抗氧化酵素的轉錄層次也會產生變化(Romero-Puertas et al., 2004)。松樹根曝露於 50 μM 鎘濃度下 48 小時，SOD、CAT、APX 活性顯著受到抑制(Schutzendubel et al., 2001)。白楊處理鎘後，APX、CAT 活性被抑制(Schutzendubel et al., 2002)。對鎘敏感水稻 TN1 經鎘處理後，會提高 SOD、APX、GR、CAT、peroxidase (POD) 活性(Kuo and Kao, 2004)。除了造成抗氧化酵素之變化外，抗氧化物也會有所改變。鎘會造成許多植物 GSH 含量減少，如向日葵、豌豆、大豆(Rauser, 1995; Balestrasse et al., 2001; Dixit et al., 2001)，但在蘆葦的 GSH 含量則是會上升(Iannelli et al., 2002)。鎘誘導 GSH 含量的減少可能是轉變為植物螯合素 (phytochelatin, PC)，在菸草、燕麥、小麥分別有觀察到 PC 累積或運移情形(Vogelilange and Wagner, 1990; Salt and Rauser, 1995; Stolt et al., 2003)。

五、多重逆境之概念

非生物逆境為全球農業發展帶來巨大的損失(Boyer, 1982)，因此研究非生物逆境成為一個很重要的議題。實際上在田間所遭遇的非生物逆境不會只是單一逆境，通常是好幾個同時發生。最近的研究指出作物對於乾旱及高熱的雙重逆境的反應是很獨特的(Rizhsky et al., 2004)，不單只是簡單地拆開為兩個逆境再把它加總起來，此突顯了研究多重逆境的重要性。又作物育種方面，發展作物對兩種不同

逆境的抵抗性更是眾所皆知的育種目標之一。為了更接近實際田間發生情形，研究作物對於多重逆境的抵抗性是很重要的一件事。

當植物遭受多重逆境時，有可能會產生衝突性的反應。Mittler (2006)在其文獻報告舉例說明，在熱逆境發生時，植物會打開氣孔以蒸散作用冷卻葉片；然而熱逆境與乾旱逆境一起發生時，植物則不能打開氣孔，導致葉溫升得更高(Rizhsky et al., 2002)。鹽害或重金屬逆境與熱逆境一起發生時，蒸散作用加強的結果會導致鹽或重金屬吸收的增加。寒害或乾旱與強光一起發生時，會增加活化氧族的累積(Mittler, 2002)。乾旱與重金屬逆境同時發生時，會使得毒害的效果加劇(Barcelo and Poschenrieder, 1990)。當缺乏養份時，由於能量和資源的不足，植物很難應付高熱、寒害或乾旱逆境。另外由於鐵、銅、鋅、鎂為一些關鍵酵素所需要的元素(如 SOD 或 APX)，限制這些元素的可利用率，會使得植物在遭遇一些非生物逆境時較單獨只有非生物逆境發生更嚴重的傷害(Ranieri et al., 2001)。植物為了要適應多重逆境，避免衝突反應的產生，必須得發展出一套獨特的能夠因應每個逆境之反應。

六、 缺氮逆境對植物之傷害

氮素是植物生長所不可或缺的元素，氮素的可利用率會影響植物許多代謝與發育過程。當植物擁有充足的氮源時，會有很好的生長；但是一旦缺氮時，會對植物造成生長抑制。根據 IRRI 網站上對於水稻缺氮特徵之描述，缺乏氮素會影響所有產量構造要素、使植株矮化、老葉或整個植株變黃、葉片尖端呈現淡綠色且黃化、嚴重缺氮時葉片死亡、除了新葉外之葉片為窄短且直立、田間呈現黃色、減少分蘗、減少穀粒數目(IRRI, 2003)。由於氮素是可移動元素，缺氮時會發生氮素移動的情形，老葉會發生枯黃，以維持正在發育部位(如：新葉)的功能性。正常情形下，植物會有較高的地上部／地下部比值，缺氮會誘使根部伸長，而抑制地上部的生長(Finkemeier et al., 2003)。缺氮還會使鮮乾重下降(Mizrahi and

Richmond, 1972; Tewari et al., 2004; Li et al., 2006; Kovacik et al., 2007)，葉面積變小、葉片黃化並降低葉綠素、蛋白質含量(Mei and Thimann, 1984; Finkemeier et al., 2003; Huang et al., 2004; Kandlbinder et al., 2004; Erley et al., 2007)，在植物本身的含氮量方面會減少對氮素吸收(Erley et al., 2007)、amino-N、protein-N 減少(Mei and Thimann, 1984)、硝酸態氮及銨態氮含量降低(Darrall and Wareing, 1981; Li et al., 2006)。

缺乏氮素可能會誘導 H_2O_2 累積於玉米葉片、根以及阿拉伯芥根中(Tewari et al., 2004; Shin et al., 2005; Zhao et al., 2007)。誘導抗氧化物 GSH 含量下降或不變，ASC 含量增加，抗氧化酵素 GR、DHAR、CAT、APX 活性下降或不變，SOD、POD 活性發生改變(Finkemeier et al., 2003; Kandlbinder et al., 2004; Tewari et al., 2004)。植物荷爾蒙脫落酸 (abscisic acid, ABA) 在逆境發生時扮演重要角色，已知會被萎凋、鹽害、疾病等逆境所誘導，在缺氮的菸草與向日葵亦有發現 ABA 累積的情形 (Mizrahi and Richmond, 1972; Goldbach et al., 1975)。另一種植物荷爾蒙細胞分裂素 (cytokinin) 在缺氮的植株內可能會減少，因而影響植物的生長(Horgan and Wareing, 1980; Darrall and Wareing, 1981)。

植物生長所需的數種元素以氮、磷、鉀最為重要，其中氮素可以供給葉片的生長，一旦缺氮會使光合作用能力下降，導致作物減產(Erley et al., 2007)。缺氮還可能改變植物體內的 phenylpropanoid pathways，這是由於氮素減少使得蛋白質的合成量降低，剩餘的碳骨架可能轉向合成酚類化合物 (phenolics)，並誘導 PAL 活性上升。酚類化合物是一種重要的抗氧化物，其累積可能會幫助抵抗後續病原菌之攻擊或強光造成之傷害(Kovacik et al., 2007)。

其他如氮素代謝酵素，nitrate reductase、GS 的活性在缺氮時會下降，水分含量在缺氮時也會減少(Li et al., 2006; Kovacik et al., 2007)。

七、 氮素與鎘逆境之關係

當植物遭受鎘逆境時，許多大量（包括氮素）與微量元素之吸收與分配會因鎘而受到干擾(Gussarsson et al., 1996; Hernandez et al., 1997; Gouia et al., 2000)。氮素也可能直接或間接地受鎘影響其代謝過程(Boussama et al., 1999a; Boussama et al., 1999b)。此外，Maier 等人(2002)發現含鎘土地上對馬鈴薯施加硝酸鈣會比硫酸銨使塊莖累積更多的鎘，且硝酸鈣會降低塊莖產量，而硫酸銨則對產量有提升的效果。在油菜和水稻也有類似之情形(Eriksson, 1990; Hassan et al., 2008)，但是對菠菜施加硫酸銨或是對萵苣施加銨態氮卻增加鎘的累積(Florijn et al., 1992; Willaert and Verloo, 1992)。

上述文獻均指出，隨著添加不同形式之氮肥，會改變鎘毒害的程度。Finkemeier 等人(2003)指出受到重金屬污染的土地，常有缺氮之現象，因此探討缺氮與鎘雙重逆境對植物之影響很具有生態意義。從多重逆境的角度而言，植物缺乏氮素後，如果再遭遇一個鎘逆境，是否會增強水稻鎘逆境傷害是本論文想要探討瞭解的問題。

八、 熱休克與逆境之關係

過去許多研究指出，熱休克前處理可以減緩後續遭遇逆境之毒害。一般熱休克處理是指於短暫時間內使植物暴露在高於生長適溫 5 至 15°C 之環境，可以增加棉花、玉米、小麥於鹽害之耐性(Kuznetsov et al., 1993; Gong et al., 2001; Song et al., 2005)，保護番茄、小黃瓜、水稻、玉米、蘋果與菸草細胞免於受到後續低溫傷害(Lurie and Klein, 1991; Saltveit, 1991; Gong et al., 2001; Kang and Saltveit, 2001; Sato et al., 2001; Allan et al., 2006)，加強玉米植株對乾旱之耐性(Gong et al., 2001)，減緩黑豆 (*Vigna mungo*)、水稻幼苗之鎘毒害(Kochhar and Kochhar, 2005; Hsu and Kao, 2007b)，提供小麥對鎘、鋁、鐵重金屬之耐性(Orzech and Burke, 1988)，抑制荷蘭

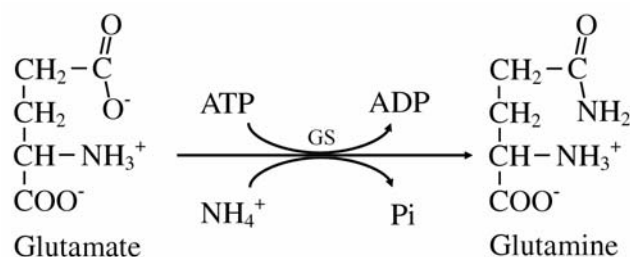
芹於 UV 逆境或遭遇真菌之反應(Walter, 1989)，使番茄增加對病原菌之耐性(Kuun et al., 2001)，減少光抑制對大麥之傷害(Stapel et al., 1993)，增加芥菜、阿拉伯芥、玉米、小麥與蘆薈於高溫之耐性(Dat et al., 1998a; Dat et al., 1998b; Gong et al., 2001; Kocsy et al., 2004; Larkindale et al., 2005; Velikova and Loreto, 2005)。

熱休克提高植物對後續逆境之耐性，可能作用機制如下：(一)誘導 ABA 含量增加(Shakirova et al., 1996);(二)促進 H_2O_2 累積(Dat et al., 1998a; Dat et al., 1998b; Larkindale et al., 2005; Volkov et al., 2006; Hsu and Kao, 2007b);(三)增加抗氧化物 GSH 含量(Nietosotelo and Ho, 1986; Orzech and Burke, 1988; Neumann et al., 1994);(四)誘導抗氧化酵素活性提高(Lurie and Klein, 1991; Saltveit, 1991; Kang and Saltveit, 2001; Sato et al., 2001; Hsu and Kao, 2007b);(五)促進形成熱休克蛋白(Heckathorn et al., 2004; Kochhar and Kochhar, 2005; Volkov et al., 2006)。本研究室先前結果指出，熱休克可以促進 H_2O_2 少量地累積，藉由 H_2O_2 作為訊息分子誘導抗氧化系統反應來抵禦鎘逆境，使得水稻減緩後續鎘逆境之毒害(Hsu and Kao, 2007b)。

九、GS 與 protease 以及氧化逆境之關係

鎘對植物產生之毒害現象還包括了銨離子之累積(Lauriere and Daussant, 1983; Streit and Feller, 1983; Peeters and Vanlaere, 1992)。銨離子是植物氮素代謝的一個中間產物，高濃度的銨離子累積會對細胞產生傷害。銨離子累積原因可能是鎘逆境誘導蛋白質分解酵素活性提高，造成胺基酸累積並經由脫銨作用產生銨離子(Chugh et al., 1992; Boussama et al., 1999a)。另外可能造成植物累積銨離子的原因為 GS 活性之降低，在水分逆境、過量銅毒害、及黑暗下誘導之老化均有觀察到此現象(Thomas, 1978; Backer et al., 1986; Peeters and Vanlaere, 1992; Chen et al., 1997; Chen and Kao, 1998; Lin and Kao, 1998)。本研究室過去研究顯示，鎘逆境會使水稻

產生銨離子累積，而累積之原因與鎘促使 GS 活性降低有關(Chien and Kao, 2000; Chien et al., 2002)。GS 為氨(銨)同化作用中的重要酵素，伴隨 ATP 參與使 glutamate 加上銨離子轉變為 glutamine，其反應式如下：



GS 酵素活性一般是受轉錄層次之調控(Hirel et al., 1987; Walker and Coruzzi, 1989; Edwards et al., 1990; Roche et al., 1993; Sukanya et al., 1994)，不過也會受到降解速率之影響。

在植物中蛋白質之降解通常與各個生長發育階段有關，如種子萌芽、分化及形態發生、老化、程序性細胞死亡(programmed cell death)(Huffaker, 1990; Vierstra, 1996; Beers et al., 2000; Palma et al., 2002)。近來有許多文獻指出，蛋白質水解(proteolysis)亦與活化氧族造成的氧化逆境有關(Solomon et al., 1999)。當細胞內的蛋白質結構經過自由基之氧化修飾，這些經氧化修飾後的蛋白質會較容易被蛋白質水解系統辨視而降解(Grune et al., 1997)。通常用來辨認活化氧族對蛋白質氧化修飾的特徵為分子上羰基(carbonyl group)之形成，一般正常生理作用即會有少量的產生，但遭遇氧化逆境時蛋白質羰基化程度則會顯著地增加，如玉米於寒害誘導之氧化逆境(Prasad, 1996; Kingston-Smith and Foyer, 2000)、豌豆與大豆老化之根瘤(Matamoros et al., 1999)、黃瓜置於誘導自由基產生之系統(Juszczuk et al., 2008)、馬鈴薯之 Rubisco 萃取液曝露於臭氧逆境(Eckardt and Pell, 1995)、小麥於水分逆境(Tambussi et al., 2000)、豌豆於鎘逆境(Romero-Puertas et al., 2002)。

為了避免被自由基修飾之氧化態蛋白質堆積於細胞內造成毒害(Davies, 2001; Shringarpure et al., 2001)，細胞需要蛋白質水解系統來降解氧化態蛋白質。蛋白質水解酶(protease)屬於植物體內之蛋白質分解系統。玉米於缺氧逆境(Subbaiah et al., 2000)、油菜於乾旱或寒害逆境(Stroeher et al., 1997)、燕麥於光氧化逆境或是處理活化氧族(Casano et al., 1990; Casano and Trippi, 1992; Casano et al., 1994)、番茄葉片與向日葵於鎘逆境(Pena et al., 2006; Djebali et al., 2008)等，這些誘導氧化逆境發生的狀況皆會提高 protease 之表現或活性。但是綠豆於鹽害逆境或番茄根部於鎘逆境下，不會改變或降低 protease 活性(Sheoran and Garg, 1978; Djebali et al., 2008)。

就 GS 而言，細菌 GS 被氧化修飾為 GS 降解的第一個步驟(Levine, 1983; Rivett and Levine, 1990)；當電子傳遞鏈功能被抑制後會減少 $O_2^{\cdot-}$ 及 H_2O_2 之生成(Elstner and Frommeyer, 1978)，而豌豆在光照下葉綠體的 GS 降解需要電子傳遞鏈的功能(Stieger and Feller, 1997)；小麥葉綠體 GS 很容易受到活化氧族攻擊而斷裂，其中 Haber-Weiss 反應可能在 GS 降解過程扮演了重要的角色(Palatnik et al., 1999)；將大豆富含 GS 之根萃取液加到產生 $HO\cdot$ 自由基的環境中，發現 GS 會產生氧化作用且氧化態 GS 比起未氧化之 GS 更容易被降解(Ortega et al., 1999)。上述的結果顯示 GS 降解確實是需要活化氧族參與的。

鎘逆境抑制 GS 活性使得銨離子累積的原因，可能是 GS 結構被自由基修飾，氧化修飾後的 GS 經 protease 作用分解，無法進行銨離子同化反應，進而產生銨離子累積現象。由於熱休克可以增加植物對於逆境之耐性，探討熱休克前處理對後續鎘逆境所導致 GS 與 protease 活性變化的影響為本論文欲進行的另一個研究方向。

十、 本研究室過去對鎘逆境之研究

關於水稻幼苗與鎘逆境之研究，過去本研究室已探討過的主題包括：

（一）氯化鎘對水稻切離葉片與乙烯形成之關係。

氯化鎘會促使水稻切離葉片形成乙烯，其原因為鎘會促進 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 轉變為乙烯，並可能和多元胺之累積有所關聯(Hou and Kao, 1993)。水稻幼苗經高溫 45°C 前處理，可減少氯化鎘促進乙烯之形成；相反地，經低溫 4°C 前處理，會增加鎘促進乙烯之形成(Chen and Kao, 1995c)。

（二）氯化鎘抑制水稻幼苗根伸長之作用

氯化鎘會抑制水稻幼苗根之伸長，與脯胺酸之累積有關，其可能機制是脯胺酸會誘導位於細胞壁上之 POD 活性提高，增加細胞壁之堅固性而抑制根部伸長(Chen and Kao, 1995a)。添加抗氧化物質 GSH 與前趨物 glutamate 或 cysteine 會減緩氯化鎘對水稻幼苗根之抑制，給予 GSH 合成抑制劑 buthionine sulfoximine (BSO) 則會使鎘之抑制根長程度加劇(Chen and Kao, 1995b)。

（三）氯化鎘對水稻毒害與銨離子累積之關係

給予鎘耐受性較差的水稻 TN1 幼苗氯化鎘處理，銨離子會很快發生累積現象，而鎘耐受性較好的水稻 TNG67 幼苗則不會發生(Hsu and Kao, 2003a)。經鎘處理之 TN1 水稻切離葉片會有銨離子累積現象，銨離子累積和 GS 活性降低有關，但鎘對於葉片造成之毒害可能不是由銨離子造成，銨離子之累積應是毒害的結果(Chien and Kao, 2000; Chien et al., 2002)。

(四) 氯化鎘使水稻切離葉片產生氧化逆境

氯化鎘誘導水稻發生氧化逆境，產生脂質過氧化現象，降低抗氧化酵素活性。添加自由劑清除劑或金屬螯合劑可以減緩鎘之毒害，顯示鎘造成水稻切離葉片毒害可能與鐵所參與自由基形成有關(Chien et al., 2001)。鎘造成水稻 TN1 銨離子累積與 GS 活性降低現象，可能機制是鎘誘導氧化逆境發生，使 GS 遭受自由基攻擊而活性降低(Chien et al., 2002)。

(五) 脫落酸與水稻鎘耐受性之關係

水稻 TNG67 幼苗對於鎘有較好的耐受性，可能原因是其體內會誘導 ABA 形成，減低蒸散速率而減少對鎘的吸收，因而降低鎘造成之毒害(Hsu and Kao, 2003c)。經植物荷爾蒙 gibberellin 合成抑制劑 paclobutrazol 處理之植株會變矮，但對於鎘逆境有較好之耐性，這是由於 ABA 會發生累積情形，提供了保護的作用(Hsu and Kao, 2005)。

(六) 鎘耐受性不同水稻品種之蛋白質與胺基酸含量變化

水稻 TN1 幼苗對鎘耐受性較差之原因可能與氯化鎘處理會提高 protease 比活性、增加蛋白質分解速率、造成胺基酸之累積現象有關(Hsu and Kao, 2003b)。

(七) 活化氧族與水稻鎘耐受性之關係(Kuo and Kao, 2004; Hsu and Kao, 2007c)

水稻 TN1 幼苗給予氯化鎘處理會發生氧化逆境，造成活化氧族累積與脂質過氧化現象，提高抗氧化酵素活性(Kuo and Kao, 2004)，而誘導氧化逆境發生的原因主要是由於 H_2O_2 之累積(Hsu and Kao, 2007c)。

(八) 一氧化氮與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2004)

一氧化氮參與許多植物生理反應，在水稻切離葉片系統中，發現一氧化氮提供了抵抗鎘逆境毒害之作用，可能機制與一氧化氮具有捕捉活化氧族之能力有關(Hsu and Kao, 2004)。

(九) 高溫下氯化鎘誘導銨離子累積與脫落酸之關係(Hsu et al., 2006)

高溫下水稻幼苗對於鎘之耐受性較差，鎘會增加葉片 ABA 之含量進而誘導銨離子累積(Hsu et al., 2006)。

(十) 多元胺與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2007a)。

多元胺在所有生物體內皆可發現，調控許多植物生長生理反應，亦減緩鎘逆境對水稻造成之毒害，可以避免 H_2O_2 之累積與減少對鎘之吸收而達到保護的效果(Hsu and Kao, 2007a)。

(十一) 熱休克處理與鎘耐受性之關係(Hsu and Kao, 2007b)

短暫的熱休克處理能少量產生 H_2O_2 ，以誘導 APX、GR 活性提高，增加後續對鎘逆境之耐受性(Hsu and Kao, 2007b)。

材 料 與 方 法

本論文共分為二大部份，試驗材料使用水稻台中在來一號 (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1, TN1)，第一部份探討在缺氮狀態下鎘對水稻幼苗之影響。第二部份則探討熱休克處理水稻幼苗對鎘所誘導 GS 與 protease 活性改變之影響。

一、 植物種植、選取與處理

第一部份之缺氮試驗，取外形飽滿及大小均一之水稻穀粒，以 2.5% 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite) 溶液浸泡消毒 15 分鐘後，再以自來水沖洗穀粒至無殘留氣味。將穀粒均勻播於鋪二層濕潤濾紙之 20 cm 培養皿，置於 37°C 黑暗之催芽箱催芽 24 小時後，撒播已露白種子於 150 mL 燒杯之三腳網架上，燒杯內盛有半量木村氏水耕液，燒杯外以鋁箔紙包覆避光。種植於自然光照之人工氣候室內，日溫 30°C / 夜溫 25°C，相對濕度 80%，每 3 天更換一次水耕液。水稻幼苗生長之水耕液分為正常 (表 1) 與缺氮 (表 2) 二種水耕液。待水稻幼苗生長至第三葉片完全展開後 (約 8~12 天)，選取整齊一致植株給予鎘處理 (5 μ M CdCl₂，直接加入水耕液) 6 天。或另於鎘處理前給予 0.5 mM ASC 處理 6 小時，再進行鎘處理。收取處理之第二葉片、地上部、或根部進行各項化學與酵素分析，以 10 片葉片、10 株地上部、5 或 10 株根部為一重覆，每一處理重覆 4 次。由於缺氮會導致葉片鮮重改變與植物水分之損失 (Li et al., 2006; Kovacik et al., 2007) 進而可能影響結果之判讀，因此本論文分別以鮮重、10 片葉片、或 5 株根部為基準來表示各項分析結果。

第二部份之熱休克試驗，催芽及幼苗生長環境同前試驗，給予水稻幼苗正常水耕液，待水稻幼苗生長至第三葉片完全展開後 (約 8~12 天)，選取整齊一致植株進行黑暗下 3 小時 45°C 熱休克處理 (HS) 或 30°C 無熱休克處理 (non-HS)，然後再給予鎘處理 (5 μ M CdCl₂) 6 至 9 天。此外，在鎘處理前同時於熱休克 3 小時

內分別給予 0.1 mM imidazole (IMD)、0.5 mM BSO 與 1 mM GSH 前處理；或在鎘處理前同時於 non-HS 3 小時分別給予 0.1 mM 或 0.3 mM H₂O₂、1 mM GSH、0.5 mM L-galactono-1,4-lactone (GalL)、0.5 mM ASC 前處理。收取處理之第二葉片進行各項化學與酵素分析，以 10 片葉片為一重覆，每一處理重覆 4 次。

幼苗生長水耕液配製：

(一) 正常水耕液

每 1000 mL 正常水耕液 (表 1)，內含 stock A 液 1 mL、stock B 液 1 mL、stock C 液 1 mL，以蒸餾水配製而成，pH 4.7~4.8。

表 1. 正常幼苗生長用水耕液 (half-strength)

A : in 1 L → stock A		
(500X)	(NH ₄) ₂ SO ₄	24.1 g
	KNO ₃	9.25 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	67.5 g
	KH ₂ PO ₄	12.4 g
B : in 1 L → stock B		
(500X)	Fe-citrate	7.5 g
	Ca(NO ₃) ₂	30.0 g
	HCl (1 N)	500 mL
C : in 1 L → 再稀釋 10 倍為 stock C		
(10,000X)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.34 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.58 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.13 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g

(二) 缺氮水耕液

每 1000 mL 缺氮水耕液 (表 2)，內含 stock A 液 1 mL、stock B 液 1 mL、stock C 液 1 mL，以蒸餾水配製而成，pH 4.7~4.8。

表 2. 缺氮幼苗生長用水耕液 (half-strength)

A :	in 1 L	→ stock A
(500X)	Na ₂ SO ₄	25.9 g
	KCl	6.9 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	67.5 g
	KH ₂ PO ₄	12.4 g
B :	in 1 L	→ stock B
(500X)	Fe-citrate	7.5 g
	CaCl ₂	26.9 g
	HCl (1 N)	500 mL
C :	in 1 L	→ 再稀釋 10 倍為 stock C
(10,000X)	H ₃ BO ₃	1.55 g
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.34 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.58 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.13 g
	H ₂ MoO ₄	0.08 g

二、 外表性狀分析

(一) 地上部與地下部之長度與鮮乾重

取水稻地上部，量測地上部長度 (cm) 並測量鮮重 (FW, mg seedling⁻¹)，置於 65°C 烘箱烘乾 2 天後測量地上部乾重 (DW, mg seedling⁻¹)。水稻地下部量測根長 (cm)、根鮮重 (FW, mg seedling⁻¹)、根乾重 (DW, mg seedling⁻¹)。

三、 化學成份分析

(一) 葉綠素含量測定

葉綠素含量測定係根據 Wintermans and De Mots (1965) 之方法修定而成。取 10 片水稻葉片，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨成均質，從萃取液中取 40 μ L 於 1.5 mL 小離心管，並加入 960 μ L 乙醇 (100%) 混合均勻，放在 4°C 黑暗下靜置 30 分鐘後，於 4°C 下 1,000 g 離心 15 分鐘，取出上清液。將上清液利用分光光度計測定波長 665 nm 與 649 nm (A_{665} 、 A_{649}) 之吸光值。空白試驗以乙醇 (95%) 代替上清液。葉綠素濃度 (μ g Chl (40 μ L) $^{-1}$) 依公式 ($6.1 \times A_{665}$) + ($20.04 \times A_{649}$) 計算而來。每克鮮重之葉綠素含量 (mg g^{-1} FW) 為葉綠素濃度 $\times$ 50 (稀釋倍數) $\div$ 1000 $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之葉綠素含量 [$\text{mg (10 leaves)}^{-1}$] 為葉綠素濃度 $\times$ 50 (稀釋倍數) $\div$ 1000。

(二) 蛋白質含量測定

蛋白質含量測定係根據 Bradford (1976) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨成均質，將萃取液於 4°C 下 17,600 g 離心 20 分鐘，取出上清液。取 20 μ L 上清液加入 5 mL dye solution，震盪混合均勻後靜置 10 分鐘，以分光光度計測定波長 595 nm 之吸光值 (A_{595})。空白試驗以 20 μ L sodium phosphate buffer 代替上清液。每克鮮重之蛋白質含量 (mg g^{-1} FW) 為 $A_{595} \div 0.01$ (K, $\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\div$ 1000 $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之蛋白質含量 [$\text{mg (10 leaves)}^{-1}$] 為 $A_{595} \div 0.01$ (K, $\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\div$ 1000。標準曲線以 5~100 μ g 小牛血清蛋白依上述方法製作，得消光係數為 0.01 (K, $\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$)。

Dye solution 配製方法為秤取 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 加入 50 mL 乙醇 (95%, v/v) 且加少許二次蒸餾水攪拌至完全溶解，加入 100 mL phosphoric acid

(85%，v/v) 並用二次蒸餾水定量至 1 L，以 Whatman No.1 濾紙過濾之後存放於褐色瓶中冷藏備用。

(三) 硝酸鹽離子 (NO_3^-) 含量測定

NO_3^- 含量測定係根據 Catoldo et al. (1975) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 2 mL 二次蒸餾水研磨成均質，將萃取液於 4°C 下 17,600 g 離心 25 分鐘，取出上清液。取 0.1 mL 上清液加入 0.4 mL salicylic acid [5% (w/v)，溶於濃硫酸]，於室溫下反應 20 分鐘。緩慢加入 4.5 mL sodium hydroxide (NaOH, 4.2 N)，振盪混合均勻後於室溫靜置 30 分鐘待其完全冷卻，以分光光度計測定波長 410 nm 之吸光值 (A_{410})。空白試驗以 0.1 mL 二次蒸餾水代替上清液。每克鮮重之 NO_3^- 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 為 $A_{410} \div 1.229 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 20$ (稀釋倍數) $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 NO_3^- 含量 [$\mu\text{mol} (10 \text{ leaves})^{-1}$] 為 $A_{410} \div 1.229 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 20$ (稀釋倍數)。

(四) 過氧化氫含量測定

H_2O_2 含量測定係根據 Jana and Choudhuri (1981) 之方法。取 10 片水稻葉片或 5 株水稻根部，以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8，內含 1 mM hydroxylamine) 研磨成均質，將萃取液於 4°C 下 6,000 g 離心 25 分鐘，取出上清液。將 2 mL 上清液加入 1 mL titanium chloride [TiCl₄ (0.1%，v/v) 溶於 H₂SO₄ (20%，v/v)] 後振盪混合均勻，於室溫下以 1,000 g 離心 15 分鐘，以分光光度計測定波長 410 nm 之吸光值 (A_{410})。空白試驗以 2 mL sodium phosphate buffer 代替上清液。每克鮮重之 H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 為 $A_{410} \div 0.28 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1.5$ (稀釋倍數) $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 H_2O_2 含量 [$\mu\text{mol} (10 \text{ leaves})^{-1}$] 為 $A_{410} \div 0.28 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1.5$ (稀釋倍數)。每 5 株根部之 H_2O_2 含量 [$\mu\text{mol} (5 \text{ roots})^{-1}$] 為 $A_{410} \div 0.28 (K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1.5$ (稀釋倍數)。

(五) H_2O_2 組織化學檢測

H_2O_2 組織化學分析係根據 Orozco-Cárdenas and Ryan (1999) 之方法。切取 10 片水稻葉片，將切口朝下浸入 1 mL 3,3-diaminobenzidine-HCl (DAB, 1 mg mL^{-1}) 溶液，置於 27°C 光照生長箱下 24 小時。取出葉片放到含有 95% 酒精之玻璃試管內，用 80°C 水浴加熱 20 分鐘以除去葉綠素，等到回復室溫後更換新的 95% 酒精浸泡 24 小時，然後將處理過之葉片進行掃描分析。DAB 會與 H_2O_2 產生棕色之沉澱物，含有 H_2O_2 的部位會呈現棕色，顏色越深表示含量越高。

(六) GSH、GSSG 與 GSH + GSSG 含量測定

GSH 含量測定係根據 Smith (1985) 之方法。10 片水稻葉片以 1 mL sulfosalicylic acid (SSA, 5%, w/v) 研磨成均質，將萃取液以 $15,000 \text{ g}$ 離心 10 分鐘，取出上清液，分別進行 GSH + GSSG 分析與 GSSG 分析。

(1) GSH + GSSG 含量分析

取 10 μL 上清液注入 8×12 個樣本槽之 microplate，加入 15 μL SSA 稀釋後，每一樣品再依序加入 175 μL sodium phosphate [143 mM、pH 7.5, 6.3 mM EDTA, 0.3 mM NADPH (0.248 mg mL^{-1})]、20 μL 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) [DTNB、6 mM，溶於 sodium phosphate buffer (0.1 M、pH 7.2，含 0.1 mM EDTA)]，加入 20 μL GR (25 unit mL^{-1}) 後立刻將 microplate 放入 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) microplate reader 測定 600 秒內波長 412 nm 之吸光值變化 (ΔA_{412})。標準曲線以 10 μM GSH 加蒸餾水配製，再以標準曲線換算出 total glutathione 之實測含量。每克鮮重之 GSH + GSSG 含量 ($\text{nmol g}^{-1} \text{ FW}$) 為實測含量 $\times 250$ (稀釋倍數) $\div 1000 \div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 GSH + GSSG 含量 [$\text{nmol (10 leaves)}^{-1}$] 為實測含量 $\times 250$ (稀釋倍數) $\div 1000$ 。

(2) GSSG 含量分析

取 200 μL 上清液加 4 μL 2-vinylpyridine 及 6 μL 30 mM triethanolamine (Tea)，於室溫下至少反應一小時後，以 15,000 g 離心 20 分鐘，取 10 μL 上清液注入 8×12 個樣本槽之 microplate，後面步驟與 total glutathione 含量之測定相同。標準曲線以 10 μM GSSG 加蒸餾水配製，再以標準曲線比對出 GSSG 之實測含量。每克鮮重之 GSSG 含量 ($\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$) 為實測含量 $\times 250$ (稀釋倍數) $\div 1000 \div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 GSSG 含量 [$\text{nmol (10 leaves)}^{-1}$] 為實測含量 $\times 250$ (稀釋倍數) $\div 1000$ 。

(3) GSH 含量分析

樣品 GSH 含量 [$\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$ 、 $\text{nmol (10 leaves)}^{-1}$] 為 total glutathione 含量減掉 GSSG 含量。

(七) ASC、DHA 與 ASC + DHA 含量測定

ASC 含量測定係根據 Law et al. (1983) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 1 mL trichloroacetic acid (TCA, 5%, w/v) 冰浴研磨成均質，將萃取液以 15,000 g 離心 20 分鐘，取出上清液，分別進行 ASC + DHA 分析與 ASC 分析。

(1) ASC + DHA 含量分析

取 200 μL 上清液加入 200 μL sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.4)，室溫下混合均勻後，加入 100 μL dithiothreitol (DTT, 10 mM) 靜置 15 分鐘，再加入 100 μL *N*-ethylmaleimide (0.5%, w/v)，而後加入 400 μL TCA (10%, w/v)、400 μL phosphoric acid (44%) 振盪均勻。加 400 μL 2,2'-bipyridyl [4%, w/v, 先以 100% 乙醇溶解，再以蒸餾水定量使乙醇濃度達到 70%]，再加 200 μL FeCl_3 (3%, w/v)

後，置於 37°C 水浴搖晃 1 小時。以 10,000 *g* 離心 5 分鐘，取出上清液。上清液以分光光度計測定波長 525 nm 之吸光值 (A_{525})。空白試驗以 200 μ L TCA (5%, w/v) 代替上清液。每克鮮重之 ASC + DHA 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 為 $A_{525} \div 8.092$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 5$ (稀釋倍數) $\div$ 樣品鮮重 (*g*)。每 10 片葉片之 ASC + DHA 含量 [$\mu\text{mol (10 leaves)}^{-1}$] 為 $A_{525} \div 8.092$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 5$ (稀釋倍數)。

(2) ASC 含量分析

將上述 ASC + DHA 含量分析加入 100 μ L DTT 與 100 μ L *N*-ethylmaleimide 之步驟改為各加 100 μ L 二次蒸餾水，其餘步驟相同。每克鮮重之 ASC 含量 ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) 為 $A_{525} \div 8.092$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 5$ (稀釋倍數) $\div$ 樣品鮮重 (*g*)。每 10 片葉片之 ASC 含量 [$\mu\text{mol (10 leaves)}^{-1}$] 為 $A_{525} \div 8.092$ ($K, \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) $\times 5$ (稀釋倍數)。

(3) DHA 含量分析

樣品 DHA 含量 [$\mu\text{mol g}^{-1}$ FW、 $\mu\text{mol (10 leaves)}^{-1}$] 為 ASC + DHA 含量減掉 ASC 含量。

(八) 脫落酸含量測定

ABA 測定方法分為 ELISA 法與 *OsRab16A* 基因表現法。

(1) ELISA 法

ABA 含量測定係根據 Hurng *et al.* (1994) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 6 mL 甲醇 [80% (v/v)，含 2% 冰醋酸] 冰浴研磨成均質，將萃取液靜置於黑暗 4°C 下至少 24 小時 (可存放一週)。在室溫下以 2,000 *g* 離心 10 分鐘，取 1 mL 上清液真

空乾燥。待完全乾燥後，加入 0.5 mL 甲醇 (100%, v/v)、0.5 mL $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.2 M, pH 6.8)，振盪使其完成溶解。於 4°C 下靜置 10 分鐘，過 PVP column (以 waters vacuum manifold 抽氣)，再以 6 mL 蒸餾水流洗管柱，收集濾液後加 100 μL 冰醋酸，共得濾液 7.1 mL。

將濾液過 C18 column (以 waters vacuum manifold 抽氣，流量不超過 1.5 mL min^{-1})，加 4 mL 清洗液 [甲醇 (20%, v/v)、冰醋酸 (2%, v/v)] 流洗管柱後濾液丟棄。樣品於注入 4 mL 萃取液 [甲醇 (55%, v/v)、冰醋酸 (2%, v/v)] 後洗出，收集濾液進行真空乾燥 (可暫存於 4°C)。

加入 200 μL TBS buffer 溶解已乾燥之樣品。取 100 μL ABA 標準液或樣品加入 anti-ABA coated plate 之樣本槽中 (Agdia[®], Phytodetek[®] ABA kit)，於每一樣本槽加入 100 μL tracer solution，以膠紙密封後在 4°C 黑暗下靜置 3 小時。倒出樣本槽中之液體，以 200 μL wash solution 清洗樣本槽三次，每次 10 分鐘。每一樣本槽加入 200 μL reaction buffer 後立刻放入 ELISA reader 中，每 5 分鐘讀取一次波長 405 nm 之吸光值 (A_{405})，待標準 ABA 最低濃度之 A_{405} 達 1.2 以上停止。各種試劑配製方法見表 3。

將 ABA 標準濃度測定之吸光值換算成結合百分率 (Binding %)，以濃度與結合百分率建立標準曲線，樣品 ABA 也換算成結合百分率後由標準曲線求得 ABA 含量。結合百分率依下列公式估算而得：結合百分率 (Binding %) = $[(\text{標準 ABA 溶液或樣品之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405}) \div (\text{沒有 ABA 之 } A_{405} - 1000 \text{ pmol mL}^{-1} \text{ ABA 之 } A_{405})] \times 100\%$ binding。每克鮮重之 ABA 含量 ($\text{pmol g}^{-1} \text{ FW}$) 為 Binding % 換算之 ABA 含量 (pmol) $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 ABA 含量 [$\text{pmol (10 leaves)}^{-1}$] 為 Binding % 換算之 ABA 含量 (pmol)。

表 3. ELISA 法之試劑配製

試劑名	配製方法
TBS buffer	1000 mL 溶液含有 3.03 g trizma base、5.84 g NaCl、0.2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 g NaN_3 ，pH 7.5
Tracer solution	一瓶 tracer 加 1 mL 蒸餾水，5 分鐘後每瓶再加入 4 mL tracer diluent 備用，需新鮮配製
Wash solution	1000 mL 溶液含有 8 g NaCl、1.15 g sodium phosphate (dibasic, anhydrous)、0.2 g potassium phosphate (monobasic, anhydrous)、0.2 g KCl、0.5 g tween-20、0.2 g NaN_3 ，pH 7.4
Reaction buffer	一顆 <i>p</i> -nitrophenyl phosphate disodium (PNP) substrate tablet (5 mg PNP/tablet) 溶於 5 mL substrate diluent (1000 mL 溶液含 0.1 g MgCl_2 、0.2 g NaN_3 、97 g diethanolamine，pH 9.8)

(2) *OsRab16A* 基因表現法

OsRab16A 基因乃對 ABA 敏感之基因 (responsive to ABA) (Mundy and Chua, 1988)，因此水稻 ABA 含量亦可用 *OsRab16A* 基因表現來檢測。水稻葉片 RNA 之抽取與分析的步驟為：經正常與缺氮處理之三葉齡水稻幼苗，取 40 片水稻第二片葉片，加入 1.4 mL TRIzol[®] reagent (invitrogen[™]) 萃取 5 分鐘。於 4°C 以 13,220 *g* 離心 10 分鐘後，取上清液加入 0.2 mL chloroform，混合均勻後靜置 5 分鐘。再次於 4°C 以 13,220 *g* 離心 15 分鐘後，取出上清液並加入 0.5 mL isopropanol，混合均勻並於 -20°C 靜置 1 小時。於 4°C 以 13,220 *g* 離心 15 分鐘，去除上清液，分別以 75%、100% 酒精清洗沉澱物，將樣品風乾後取 60 μL 經 diethylpyrocarbonate (DEPC) 處理之蒸餾水溶解 RNA，樣品保存於 -70°C。

水稻 *OsRab16A* 基因的檢測：RNA 樣品經 DNase I 處理移除 genomic DNA 後，取 5 μg 已經 DNase I 處理後之 RNA 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR, SuperScript[™] III First-Strand

Synthesis System for RT-PCR, invitrogen™)。以水稻 *OsActin* 基因作為控制組。設計各個基因引子序列（表 4）和 PCR 反應條件（表 5）進行基因檢測。

PCR 產物以 2%瓊脂膠體進行電泳分離，利用 Gel-Pro® Analyzer 軟體將膠體中 DNA 條帶進行標定後，轉化濃度為數值，把 *OsRab16A* 數值除以 *OsActin* 數值進行標準化。試驗結果之呈現是將對照組的標準化數值作為 1，缺氮組的數值由對照組轉化而來，再根據量化的數值繪製成圖。

表 4. 基因引子序列

基因名	引子名	引子序列 (5' → 3')
<i>OsRab16A</i>	Rab16A-5'	CGACACACCACCACACCATG
	Rab16A-3'	TGTGTACATATGCACGATGA
<i>OsActin</i>	Actin-5'	ATGCTCTCCCCCATGCTATC
	Actin-3'	TCTTCCTTGCTCATCCTGTC

表 5. PCR 反應條件

基因名	溫度 (°C)	時間	循環次數
<i>OsRab16A</i>	94	5 分	1
	94	30 秒	} 27
	62	30 秒	
	72	30 秒	
	72	7 分	1
<i>OsActin</i>	94	5 分	1
	94	30 秒	} 24
	55	30 秒	
	72	30 秒	
	72	7 分	1

(九) 鎘含量測定

鎘含量測定係根據 Fuhrer (1982) 之方法。取 10 片水稻葉片、10 株地上部、或 10 株根部，置於 65°C 烘箱烘乾 2 天，並測乾重。將樣品剪碎，於 550°C 灰化爐中灰化 4 天（樣品需呈灰白色）。加入 100 μL 濃硝酸及 100 μL H_2O_2 (35%)，於 70°C 持續加熱至 HNO_3 及 H_2O_2 蒸乾。加入 2 mL 二次蒸餾水後，以原子吸收光譜儀 (atomic absorption spectrophotometer) 測定鎘含量。標準曲線以 1000 ppm CdCl_2 標準液配製。樣品鎘含量 ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) 為 $A_{228.8} (\mu\text{g mL}^{-1}) \times 2 (\text{樣品體積, mL}) \div \text{樣品乾重 (g)}$ 。

四、 酵素活性分析

(一) APX 活性分析

APX 之抽取與活性分析係根據 Nakano and Asada (1981) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 12,000 g 離心 20 分鐘後，所得上清液為酵素萃取液。取 0.1 mL 酵素萃取液依序加入 1 mL potassium phosphater buffer (150 mM, pH 7.0)、1 mL ASC (1.5 mM, 新鮮配製)、0.4 mL EDTA (0.75 mM)、0.5 mL H_2O_2 (6 mM, 新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立刻以分光光度計測定一分鐘內波長 290 nm 之吸光值變化 (ΔA_{290})。空白試驗以蒸餾水或酒精代替酵素萃取液。另取 20 μL 酵素萃取液利用 Bradford 方法測定蛋白質含量。每一單位酵素活性 (Unit) 定義為每分鐘消耗 1 μmol ASC。每克鮮重之 APX 活性 (Units g^{-1} FW) 為 $\Delta A_{290} \div 2.8 (\text{K, mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3 (\text{反應體積}) \times 40 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min}) \div \text{樣品鮮重 (g)}$ 。每 10 片葉片之 APX 活性 [$\text{Units (10 leaves)}^{-1}$] 為 $\Delta A_{290} \div 2.8 (\text{K, mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3 (\text{反應體積}) \times 40 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min})$ 。

(二) CAT 活性分析

CAT 之抽取與活性分析係根據 Kato and Shimizu (1987) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 12,000 g 離心 20 分鐘後，所得到上清液為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液依序加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0)、0.1 mL H₂O₂ (1 M, 新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立刻以分光光度計測定一分鐘內波長 240 nm 之吸光值變化 (ΔA_{240})。空白試驗以蒸餾水或酒精代替酵素萃取液。另取 20 μ L 酵素萃取液利用 Bradford 方法測定蛋白質含量。每一單位酵素活性 (Unit) 定義為每分鐘消耗 1 nmol H₂O₂。每克鮮重之 CAT 活性 (Units g⁻¹ FW) 為 $\Delta A_{240} \div 40 (K, \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3 (\text{反應體積}) \times 20 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min}) \div \text{樣品鮮重 (g)}$ 。每 10 片葉片之 CAT 活性 [Units (10 leaves)⁻¹] 為 $\Delta A_{240} \div 40 (K, \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3 (\text{反應體積}) \times 20 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min})$ 。

(三) GR 活性分析

GR 之抽取與活性分析係根據 Foster and Hess (1980) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 12,000 g 離心 20 分鐘後，所得到上清液為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液依序加入 1 mL Tris-HCl buffer (150 mM, pH 7.5)、0.3 mL MgCl₂ (30 mM)、0.5 mM GSSG (3 mM, 新鮮配製)、1 mL NADPH (0.45 mM, 新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立刻以分光光度計測定一分鐘內波長 340 nm 之吸光值變化 (ΔA_{340})。空白試驗以蒸餾水或酒精代替酵素萃取液。另取 20 μ L 酵素萃取液利用 Bradford 方法測定蛋白質含量。每一單位酵素活性 (Unit) 以每分鐘吸光值之變化為 1 表示。每克鮮重之 GR 活性 (Units g⁻¹ FW) 為 $\Delta A_{340} \times 20 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min}) \div \text{樣品鮮重 (g)}$ 。每 10 片葉片之 GR 活性 [Units (10 leaves)⁻¹] 為 $\Delta A_{340} \times 20 (\text{稀釋倍數}) \div 1 (\text{min})$ 。

釋倍數) $\div$ 1 (min)。

(四) SOD 活性分析

SOD 之抽取與活性分析係根據 Paoletti et al. (1981) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 15,000 *g* 離心 30 分鐘後，所得到上清液為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液依序加入 1.6 mL Tea-diethanolamine buffer (Tea-Dea, 100 mM, pH 7.4)、0.08 mL NADH (7.5 mM, 新鮮配製)、0.05 mM EDTA/MnCl₂ (100 mM/50 mM, pH 7.0)、1 mL 2-mercaptoethanol (10 mM, 新鮮配製)，於比色管內混合均勻後，立刻以分光光度計測定十分鐘內波長 340 nm 之吸光值變化 (ΔA_{340})。以空白石英管做歸零之動作，不含酵素萃取物之 ΔA_{340} 係以 0.2 mL sodium phosphate buffer 代替上清液。另取 20 μ L 酵素萃取液利用 Bradford 方法測定蛋白質含量。每一單位酵素活性 (Unit) 定義為每分鐘 SOD 抑制 50% NADH 氧化速率之吸光值變化量。每克鮮重之 SOD 活性 (Units g⁻¹ FW) 為 [(不含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340}) - (含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340})] $\div$ 1/2 (不含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340}) $\times$ 15 (稀釋倍數) $\div$ 10 (min) $\div$ 樣品鮮重 (g)。每 10 片葉片之 SOD 活性 [Units (10 leaves)⁻¹] 為 [(不含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340}) - (含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340})] $\div$ 1/2 (不含酵素萃取物所得到之 ΔA_{340}) $\times$ 15 (稀釋倍數) $\div$ 10 (min)。

(五) GS 活性分析

GS 之抽取與活性分析係根據 Oak et al. (1980) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 2 mL extraction buffer [Tris-HCl (10 mM, pH 7.6)、MgCl₂ (1 mM)、EDTA (1 mM)、2-mercaptoethanol (10 mM)] 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 15,000 *g* 離心 30 分鐘後，所得到上清液為酵素萃取液。取 0.2 mL 酵素萃取液加入 0.8 mL reaction buffer [Tris-HCl (100 mM, pH 8.0)、L-glutamate (50 mM, monopotassium type)、

ATP (10 mM)、MgSO₄ (30 mM)、NH₂OH · HCl (20 mM)]，置於 30°C 水浴中反應 30 分鐘，再加 2 mL 反應終止液〔2.5 g FeCl₃ 與 5.0 g TCA 溶於 HCl (100 mM，1.5 N)〕終止反應，在室溫下以 1,000 g 離心 20 分鐘後，取出上清液。將上清液利用分光光度計測定波長 540 nm (A_{540}) 之吸光值。每一處理均應做空白試驗，空白試驗依不同處理而個別取酵素萃取液配製，但在置入水浴前要先加入終止反應液。每一單位酵素活性 (Unit) 定義為每分鐘形成 1 μ mol L-glutamate γ -monohydroxamate。樣品 GS 活性 (Units g⁻¹ FW) 為 $A_{540} \div 0.3816$ (K, mM⁻¹ cm⁻¹) $\times 10$ (稀釋倍數) $\times 3$ (反應體積) $\div 30$ (min) $\div$ 樣品鮮重 (g)。

(六) Protease 活性分析

Protease 之抽取與活性分析係根據 Sheoran and Garg (1978) 之方法。取 10 片水稻葉片，以 2 mL Tris-HCl (10 mM，pH 7.4，含 10 mM 2-mercaptoethanol) 冰浴研磨成均質，萃取液於 4°C 下 15,000 g 離心 30 分鐘後，所得到上清液為酵素萃取液。取 1 mL 酵素萃取液加入 1 mL casein〔1%，w/v，casein 不易溶，先加數滴 NaOH，再加入 phosphate buffer (0.1 M，pH 6.0) 攪拌 20 分鐘後過濾〕以及 1 mL citrate buffer (0.2 M，pH 5.4)，混合均勻後置於 30°C 水浴中反應 1 小時，再加 1 mL TCA (20%，w/v)，於室溫下以 1,000 g 離心 20 分鐘，取出上清液。將上清液利用分光光度計測定波長 280 nm 之吸光值 (A_{280})。空白試驗以 1 mL Tris-HCl buffer (10 mM，pH 7.4) 代替酵素萃取液。另取 20 μ L 酵素萃取液利用 Bradford 方法測定蛋白質含量。每一單位酵素活性 (Unit) 定義為每小時吸光值之變化。樣品 protease 比活性 (Units mg⁻¹ protein) 為 $\Delta A_{280} \times 2$ (稀釋倍數) $\div 1$ (h) $\div$ 蛋白質含量 (mg)。

五、 統計分析

本論文每一試驗處理均有四個重覆，結果為其平均值加上標準機差（standard error，SE）表示。統計分析方法採用 statistical analysis system（SAS）軟體 9.1 版進行 Student's *t*-test 或 least significant difference（LSD）分析（ $P < 0.05$ ），比較各處理間平均值之差異。



結 果

一、 鎘對缺氮水稻幼苗毒害之影響

(一) 缺氮處理對水稻幼苗之生長與葉片葉綠素、蛋白質與硝酸鹽含量影響

水稻幼苗經缺氮處理，抑制地上部之生長並降低鮮乾重，但不影響根長與根之鮮乾重（圖 1）。圖 2A 可觀察到水稻幼苗缺氮處理使第二片葉片發生黃化現象。進一步分析第二片葉片之葉綠素含量，亦發現不論以鮮重或 10 片葉片為基準，缺氮會使葉綠素含量顯著地下降（圖 2B, C）。缺氮處理可使水稻幼苗第二片葉片之硝酸鹽與蛋白質含量降低（圖 3）。

(二) 缺氮處理對水稻幼苗抗氧化系統之影響

植物缺乏氮素可能造成氧化還原狀態之失衡，而誘導活化氧族生成(Tewari et al., 2004; Shin et al., 2005)。以組織呈色法檢測 H_2O_2 ，發現缺氮處理之水稻幼苗第二片葉片，其 H_2O_2 含量比對照組處理來得高（圖 4A）。以化學含量測定，也發現缺氮之水稻幼苗其第二片葉片 H_2O_2 含量高於對照處理之葉片（圖 4B, C），但是缺氮處理不影響根部之 H_2O_2 含量（圖 4D, E）。

在水稻幼苗可以發現缺氮處理不影響抗氧化物 GSH 含量（圖 5A, B）。缺氮處理降低葉片 ASC 與 ASC + DHA 含量，但增加氧化態 DHA 含量（圖 6）。將 $O_2^{\cdot-}$ 轉變為 H_2O_2 之抗氧化酵素 SOD 在缺氮處理下活性會有顯著的增加（圖 7A, B）；在植物之抗氧化系統中， H_2O_2 的清除工作可由 CAT 以及參與 ASC-GSH 循環之 GR、APX 來擔任(Mittler, 2002)，這些酵素的活性在缺氮處理下均比對照處理來得低（圖 7C~H）。

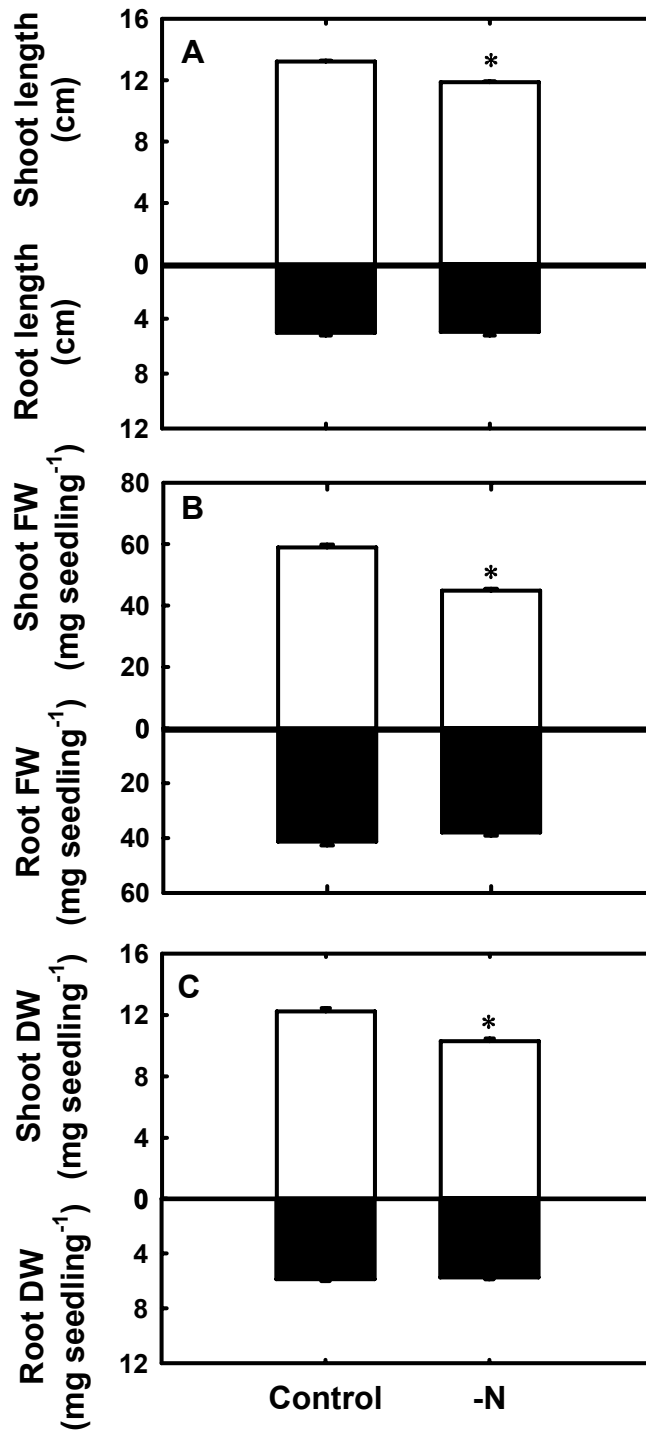


圖 1. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗地上部與根部長度(A)、鮮重(B)與乾重(C)之影響。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較-N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

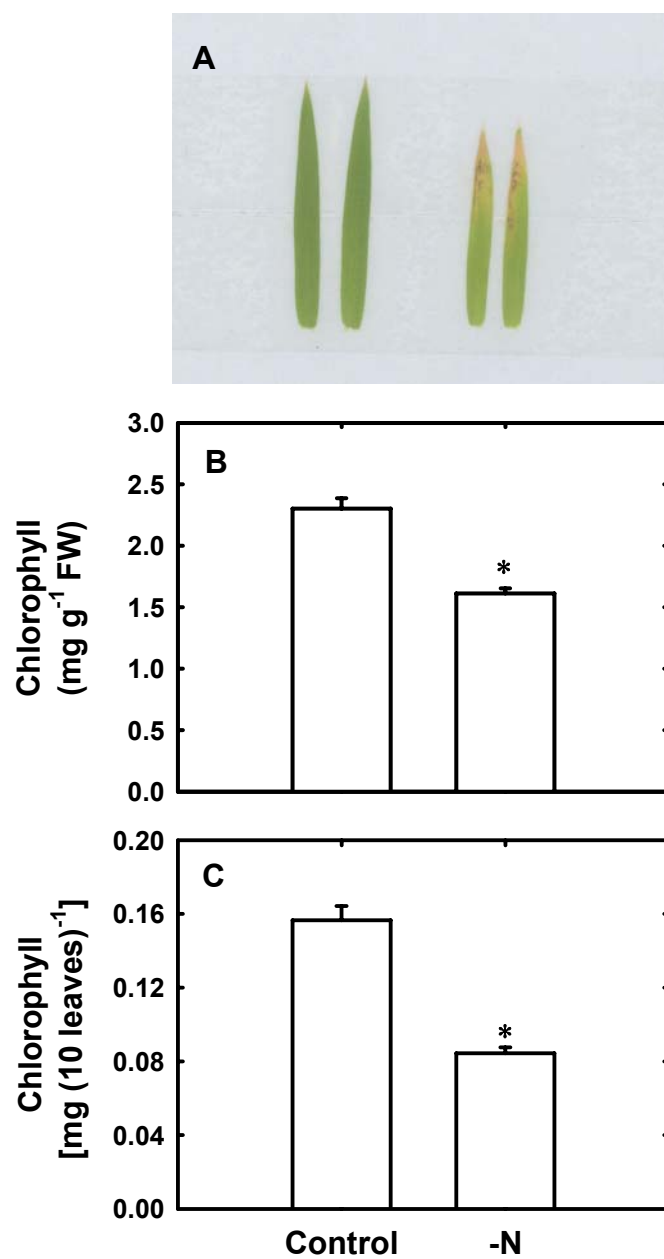


圖 2. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響。B, 以 FW 為基準；C, 以十片葉片為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

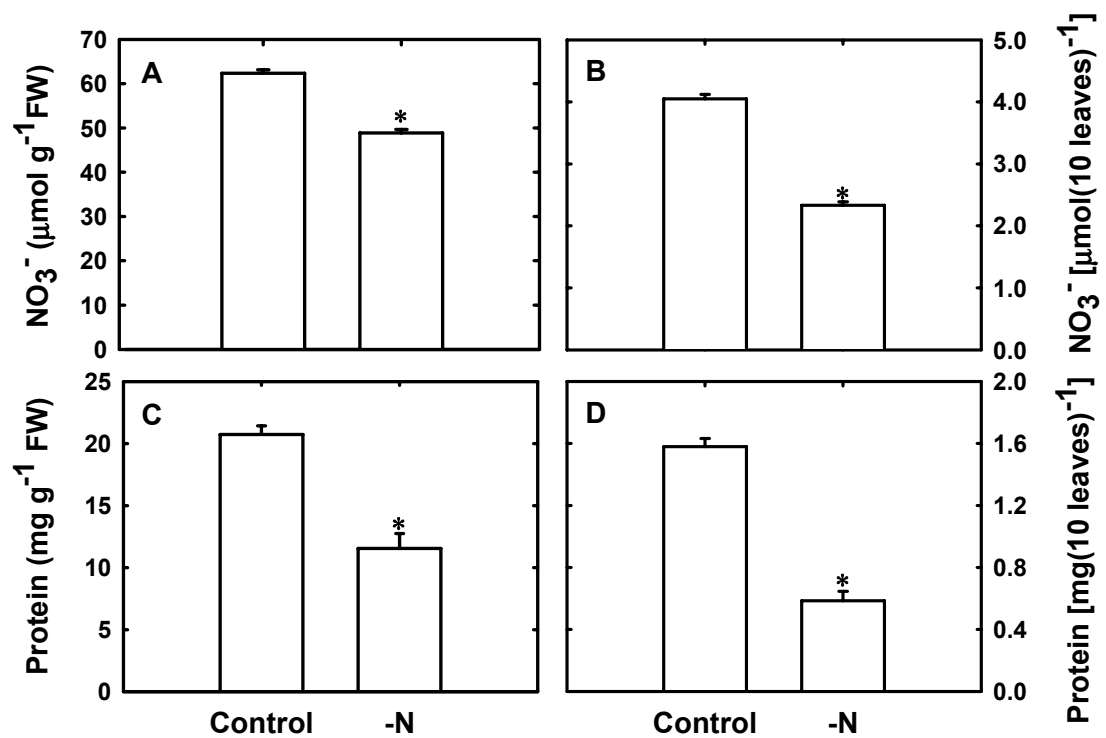


圖 3. 缺氮(-N)對水稻幼苗第二片葉片 NO_3^- (A, B)與蛋白質含量(C, D)之影響。A、C，以 FW 為基準；B、D，以十片葉片為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

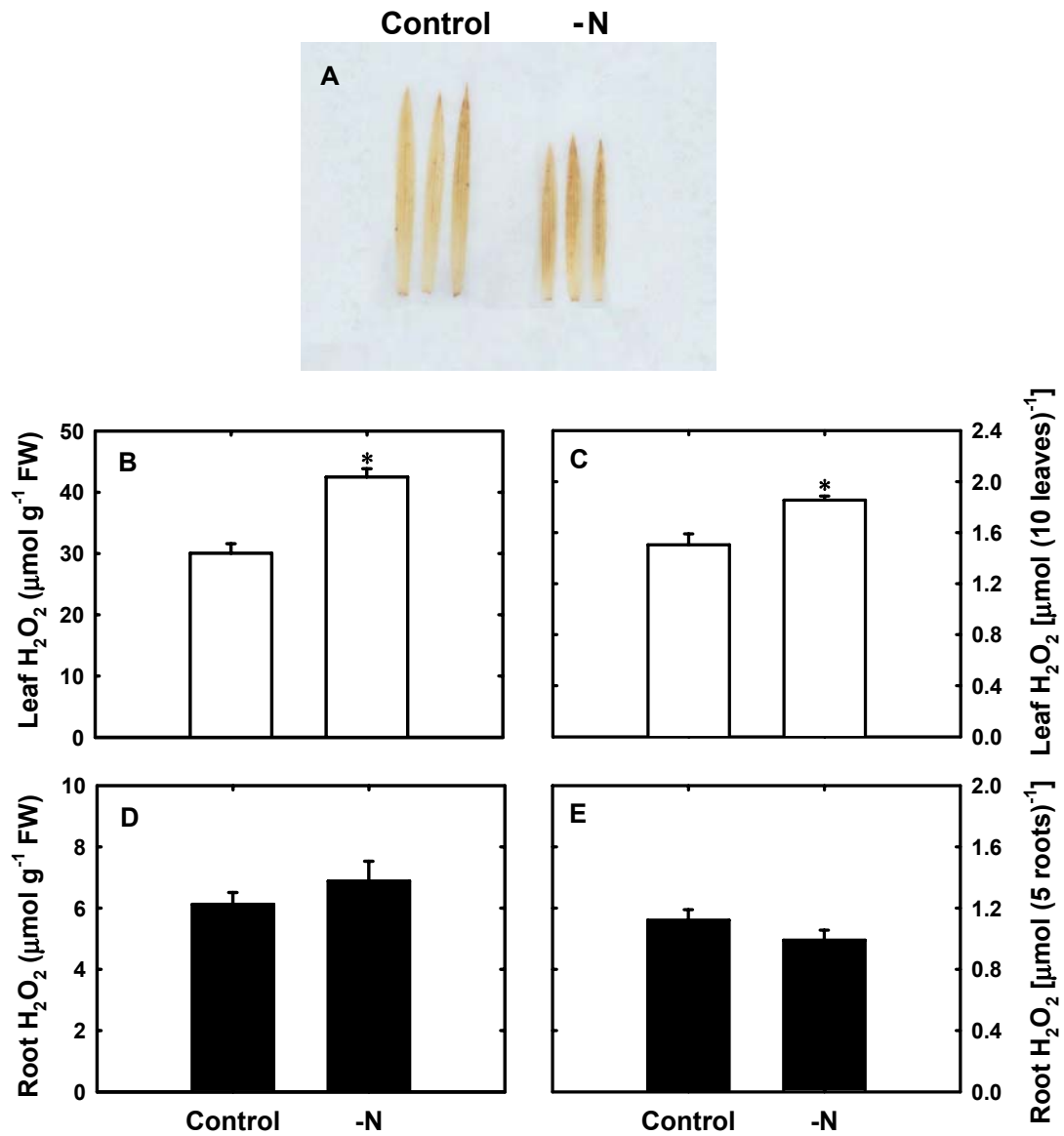


圖 4. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片(A, B, C)與根部(D, E) H_2O_2 含量之影響。A 為以組織化學方法檢測，DAB 染色後呈現棕色，顏色越深表示 H_2O_2 含量越高。B、D，以 FW 為基準；C，以十片葉片為基準；E，以 5 株根部為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。* 係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

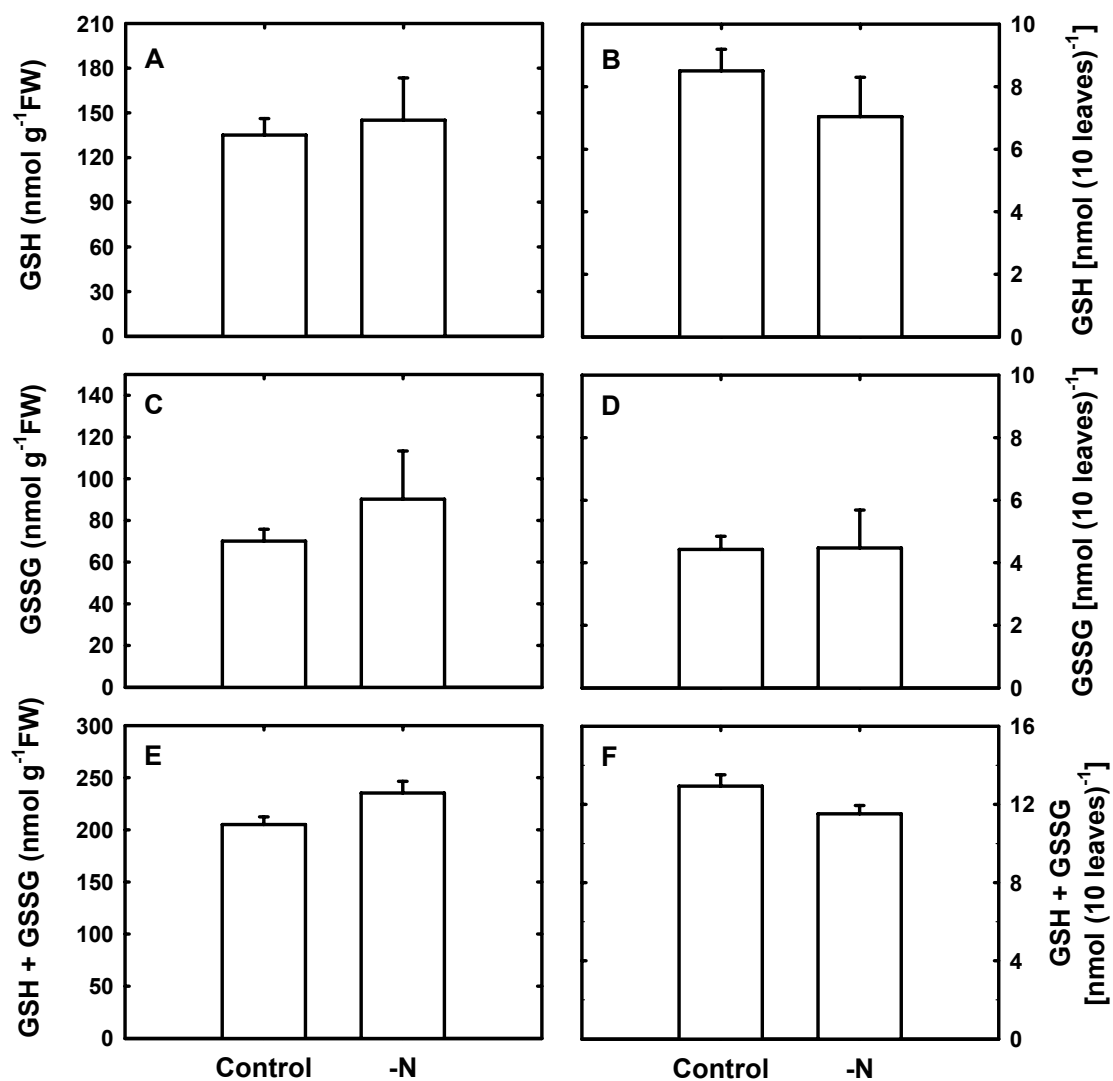


圖 5. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片 GSH (A, B)、GSSG (C, D) 與 GSH + GSSG (E, F) 含量之影響。A、C、E，以 FW 為基準；B、D、F，以十片葉片為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

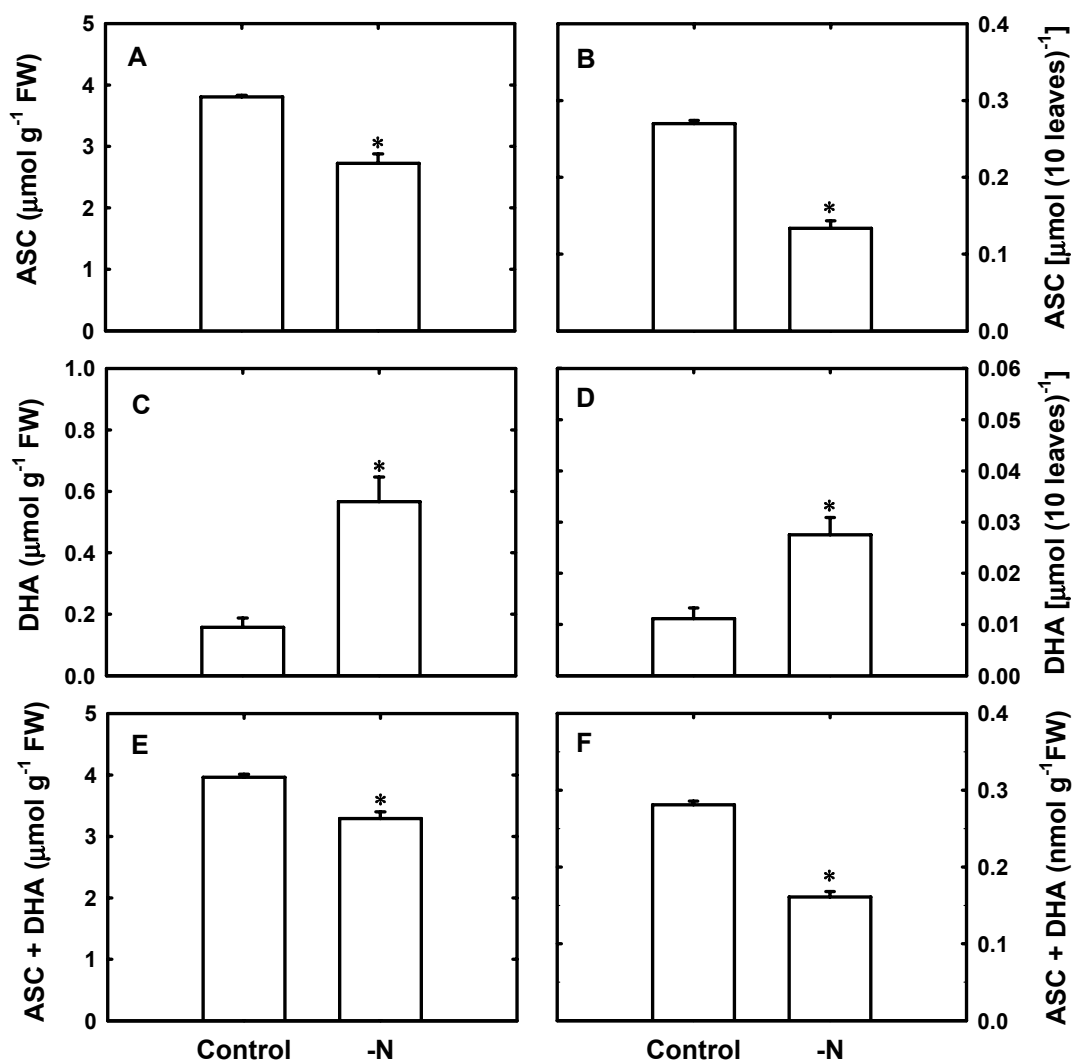


圖 6. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片 ASC (A, B)、DHA (C, D) 與 ASC + DHA (E, F) 含量之影響。A、C、E，以 FW 為基準；B、D、F，以十片葉片為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

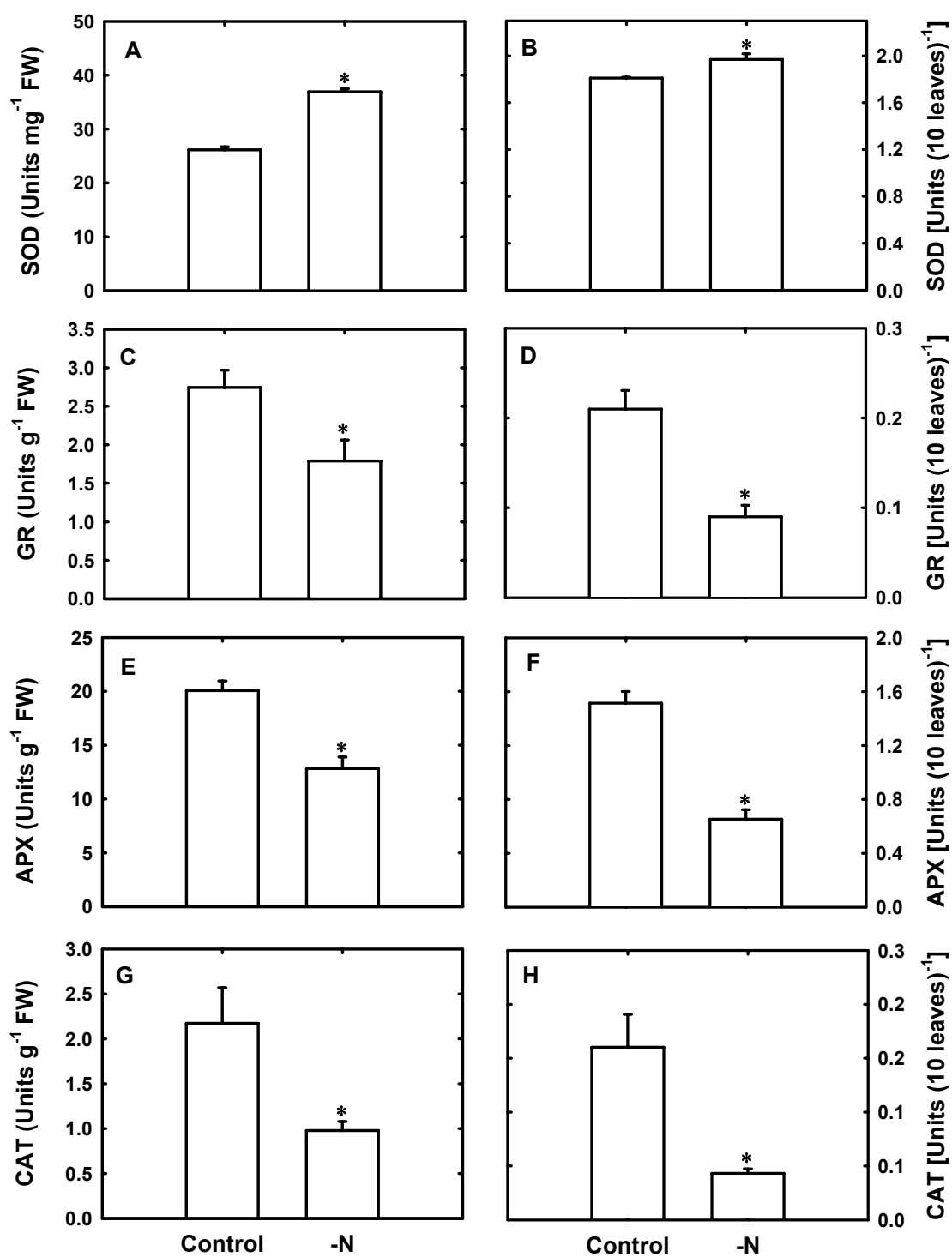


圖 7. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片抗氧化酵素 SOD (A, B)、GR (C, D)、APX (E, F)、CAT (G, H) 活性之影響。A、C、E、G，以 FW 為基準；B、D、F、H，以十片葉片為基準。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

(三) 缺氮處理對水稻幼苗葉片脫落酸含量之影響

ABA 為一種植物逆境荷爾蒙。以 RT-PCR 檢測對 ABA 敏感的 *OsRab16A* 基因，結果顯示經缺氮處理之水稻幼苗，其第二片葉片的 *OsRab16A* 基因表現量會顯著地增加（圖 8A）。以 ELISA 法測定結果亦發現缺氮葉片之 ABA 含量高於對照組（圖 8B）。

(四) 缺氮與鎘處理對水稻幼苗鎘毒害之影響

圖 9A 為低濃度氯化鎘（5 μM ）處理之水稻幼苗，發現不論是對照或缺氮處理，只要是鎘處理的第二片葉片皆有黃化現象，但是缺氮與氯化鎘同時處理比起單獨氯化鎘處理的黃化程度來得更嚴重。除了外觀上的變化外，實際測定水稻幼苗第二片葉片之每克鮮重葉綠素含量（圖 9B, C），結果顯示對照處理之葉片，經鎘處理後葉綠素含量（87%）較未經鎘處理（100%）降低 13%；而缺氮處理之葉片，經鎘處理後葉綠素含量（69%）較未經鎘處理（100%）降低 31%，此外每 10 片葉片之葉綠素含量也有類似結果。以上結果顯示缺氮水稻幼苗經短時間氯化鎘處理後，會使第二片葉片遭受鎘毒害之情形加劇。經氯化鎘長期處理 24 天後，發現缺氮水稻幼苗經鎘處理後之毒害較對照組經鎘處理更明顯（圖 10）。

(五) 缺氮處理對鎘含量之改變

鎘毒害之加劇有可能是由於鎘之吸收增加。因此缺氮處理水稻幼苗經氯化鎘處理後其體內之鎘含量，是否高於正常幼苗之氯化鎘處理為極欲瞭解之結果。圖 11A 試驗結果確實顯示缺氮幼苗經鎘處理之第二片葉片，鎘含量高於正常幼苗鎘處理。水稻幼苗之地上部和根部也有類似的情形，缺氮與鎘處理會增加對鎘的吸收量（圖 11B, C）。

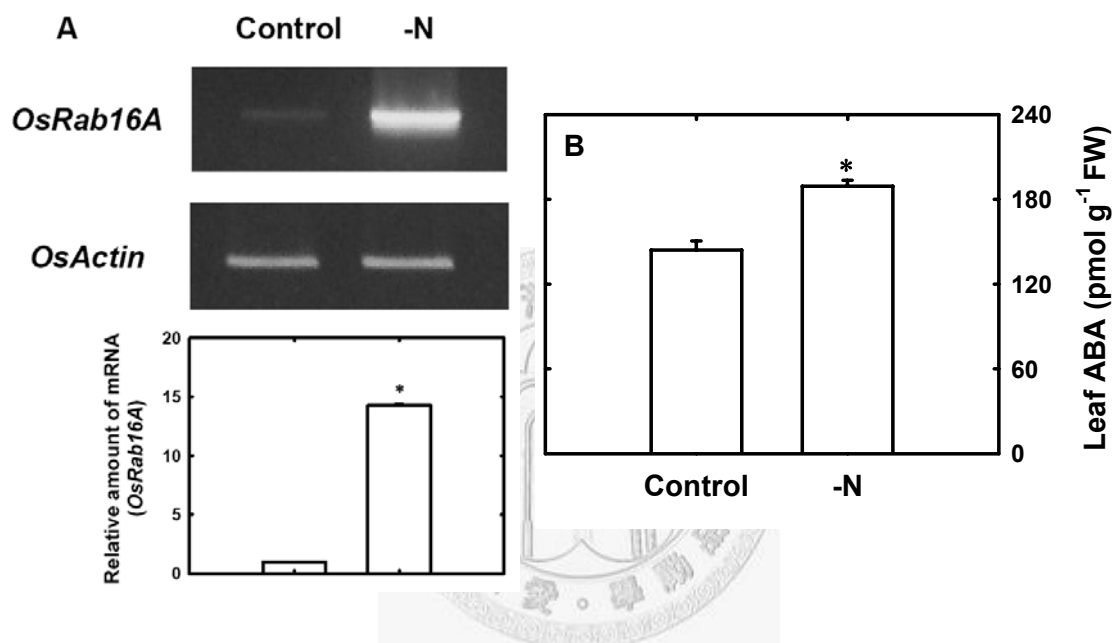


圖 8. 缺氮 (-N) 對水稻幼苗第二片葉片脫落酸含量之影響。以 RT-PCR 檢測 *OsRab16A* 基因表現(A)與 ELISA 法(B)測定脫落酸含量。於第三片葉片完全展開後進行所有測定。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較 -N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

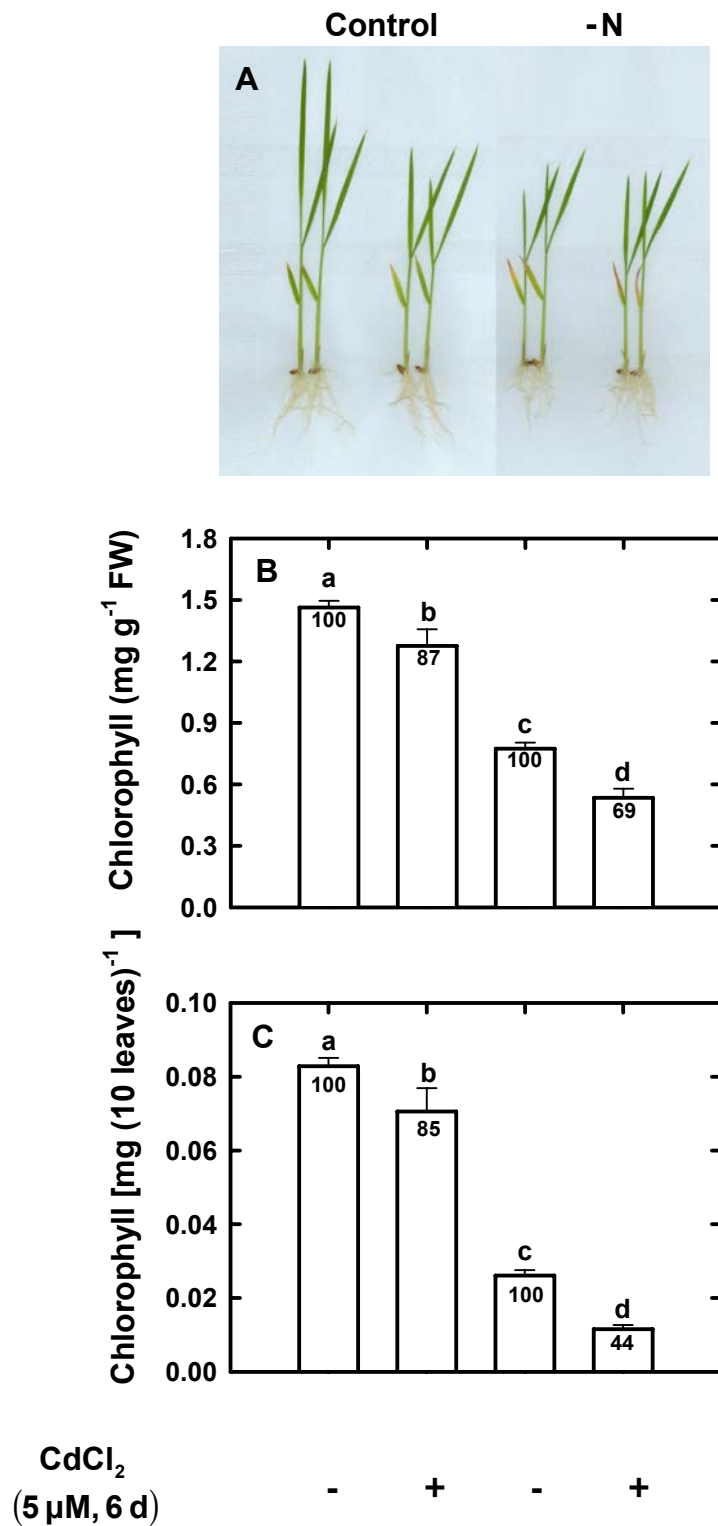


圖 9. 缺氮 (-N) 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響。B, 以 FW 為基準；C, 以十片葉片為基準。待對照與-N 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液，6 天後進行各項分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 (P<0.05)。柱內數字表示相對值。

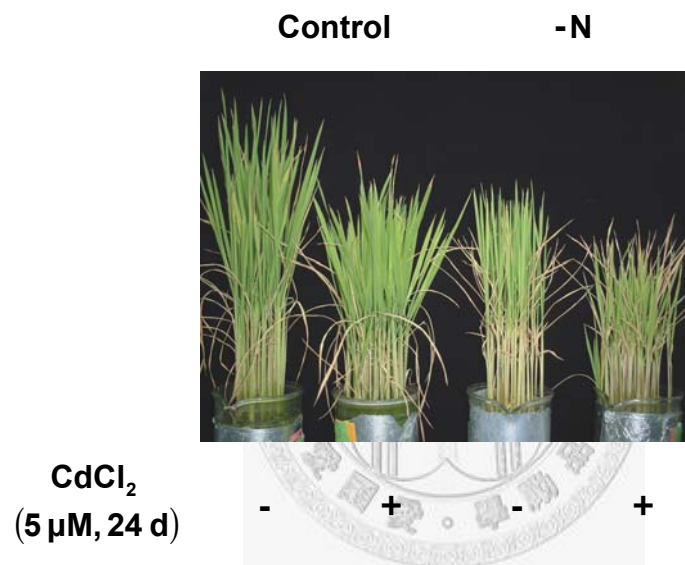


圖 10. 缺氮 (-N) 與氯化鎘長期處理 (24 天) 對水稻幼苗植株外觀之影響。待對照與-N 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液 24 天。每一處理重覆數為 4。

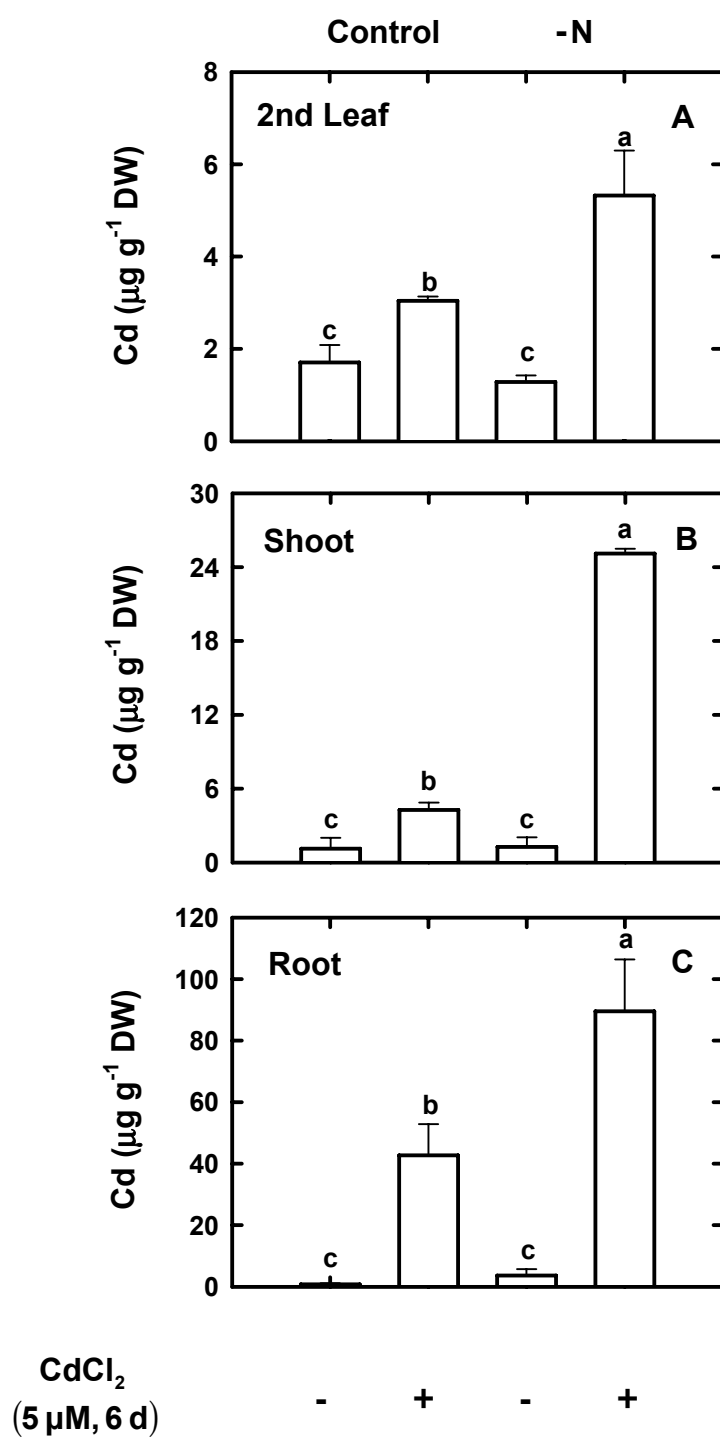


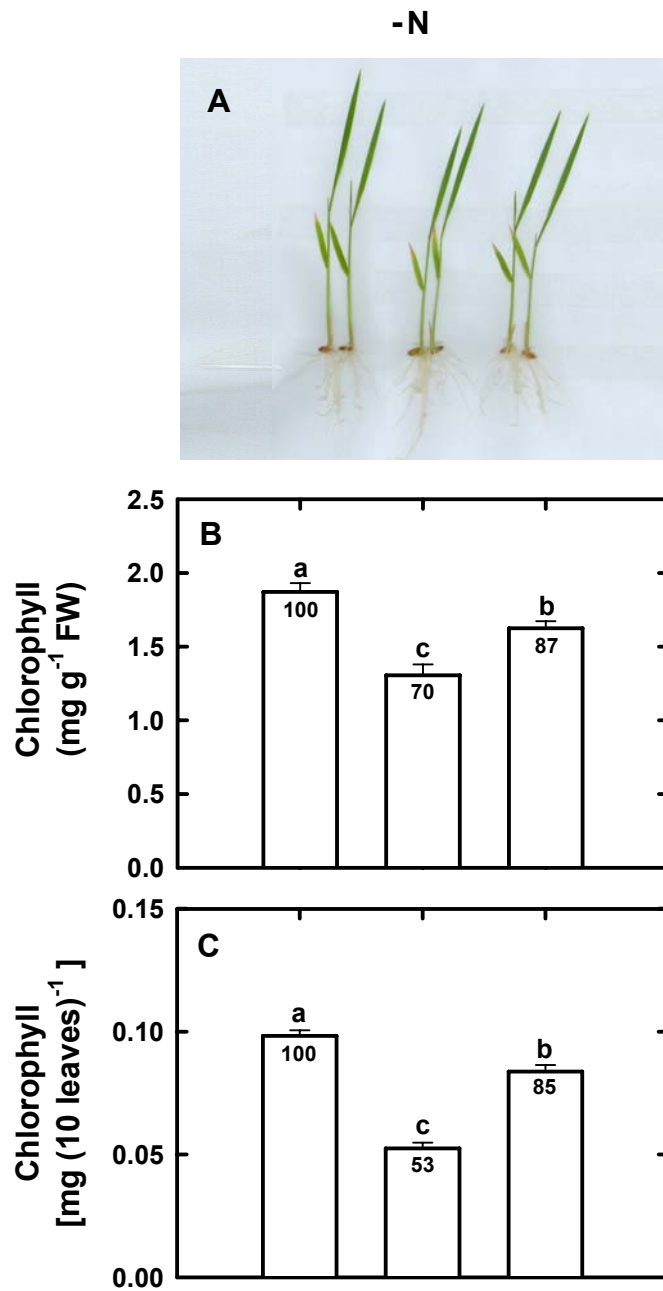
圖 11. 缺氮 (-N) 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片(A)、地上部(B)與根部(C)鎘含量之影響。待對照與-N 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液，6 天後進行各項分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

(六) 外加 ASC 減緩缺氮水稻幼苗之鎘毒害

ASC 為植物體內重要的抗氧化分子(Noctor and Foyer, 1998)。由於缺氮會造成水稻幼苗第二片葉片的 ASC 含量下降(圖 6A, B)，且缺氮幼苗經鎘處理之葉片的黃化現象與正常幼苗鎘處理相比之下是更為嚴重的(圖 9、10)，說明 ASC 在鎘耐性間可能扮演了重要的角色。因此，進一步地外加 ASC，是不是可以提高缺氮水稻幼苗對於鎘逆境之耐性呢？圖 12 之結果顯示 ASC 前處理確實能夠減少鎘對缺氮葉片造成之黃化現象。

ASC 前處理可以提供缺氮水稻幼苗於鎘逆境之保護，然而這樣的作用是否真的是藉由改變水稻體內的 ASC 含量而達到保護效果。實際地去分析缺氮葉片之 ASC 含量(圖 13)，發現缺氮葉片在 ASC 前處理 6 小時後，ASC 含量雖然沒有明顯的改變，但是可提高 ASC / DHA 比例。





Pretreatment

ASC (0.5 mM, 6 h)

-

-

+

Treatment

CdCl₂ (5 μM, 6 d)

-

+

+

圖 12. 缺氮 (-N) 後外加 ASC 前處理於後續 -N 與氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片黃化(A)與葉綠素含量(B, C)之影響。B, 以 FW 為基準; C, 以十片葉片為基準。待 -N 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後, 水耕液中添加 0.5 mM ASC, 6 小時後再移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液 6 天。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。柱內數字表示相對值。

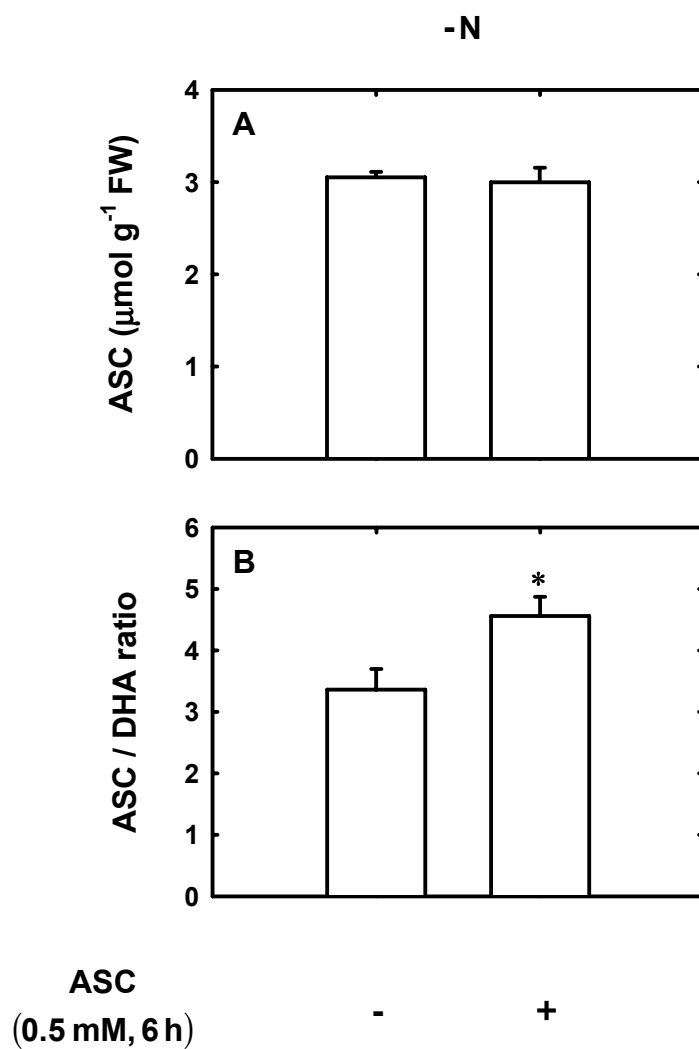


圖 13. 缺氮 (-N) 後外加 ASC 前處理對水稻幼苗第二片葉片 ASC 含量(A)與 ASC / DHA 比值(B)之影響。待-N 處理之幼苗生長至第三片葉片完全展開後，水耕液中添加 0.5 mM ASC，6 小時後取樣分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。*係以 Student's t-test 統計分析方法比較-N 與對照處理間平均值之差異，表示 $P < 0.05$ 。

二、 熱休克對水稻後續鎘逆境誘導 GS 與 protease 活性變化之影響

(一) 熱休克前處理對鎘誘導水稻幼苗葉片 GS 活性與 protease 比活性變化之影響

GS 為銨離子同化作用中的一員，將水稻幼苗分別給予或不給予氯化鎘處理 0、2、4、6 天，發現第二片葉片之 GS 活性會隨著時間有下降的趨勢，水稻幼苗在鎘逆境第 6 天 GS 活性明顯低於未經鎘處理（圖 14A）。隨著處理天數增加，水稻幼苗第二片葉片 protease 活性逐漸上升，到第 6 天時經鎘處理葉片之 protease 比活性明顯高於未經鎘處理之葉片（圖 14B）。圖 15 結果顯示水稻幼苗進行 HS 前處理能夠有效地抑制因鎘所誘導 GS 活性降低與 protease 比活性增加。

(二) 過氧化氫對鎘誘導水稻幼苗葉片 GS 活性與 protease 比活性變化之影響

Hsu and Kao (2007) 發現 HS 處理可導致 H_2O_2 增加。在 non-HS 狀態下以 H_2O_2 前處理水稻幼苗，發現 H_2O_2 可以抑制後續氯化鎘處理所引起的 GS 活性下降與 protease 比活性增加（圖 16）。

IMD 為 NADPH oxidase 之抑制劑(Auh and Murphy, 1995)。水稻幼苗給予 IMD 處理，會降低 HS 前處理所增加之 H_2O_2 (Hsu and Kao, 2007b)。本論文結果顯示 HS 前處理時添加 IMD，會抵消 HS 減緩後續鎘處理所引起 GS 活性與 protease 比活性變化（圖 17）。

(三) GSH 抑制鎘誘導水稻幼苗葉片 GS 活性與 protease 比活性變化之影響

GSH 在保護植物抵禦逆境方面扮演了重要的角色(Xiang and Oliver, 1998)，本研究室未發表資料認為 HS 可減緩水稻幼苗鎘毒害，係藉由誘導 GSH 累積所導致。在 non-HS 狀況下添加 GSH 可以抑制後續幼苗葉片所引起的 GS 活性下降與 protease 比活性增加（圖 18）。

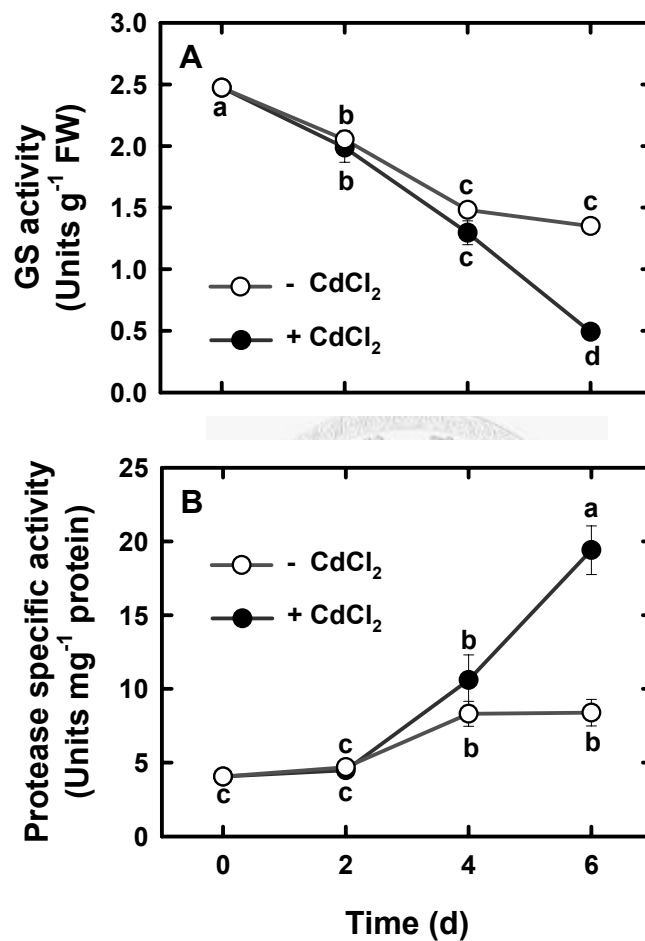


圖 14. 氯化鎘處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，移到含與不含氯化鎘 (5 μ M) 水耕液處理 0、2、4、6 天後進行各項分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

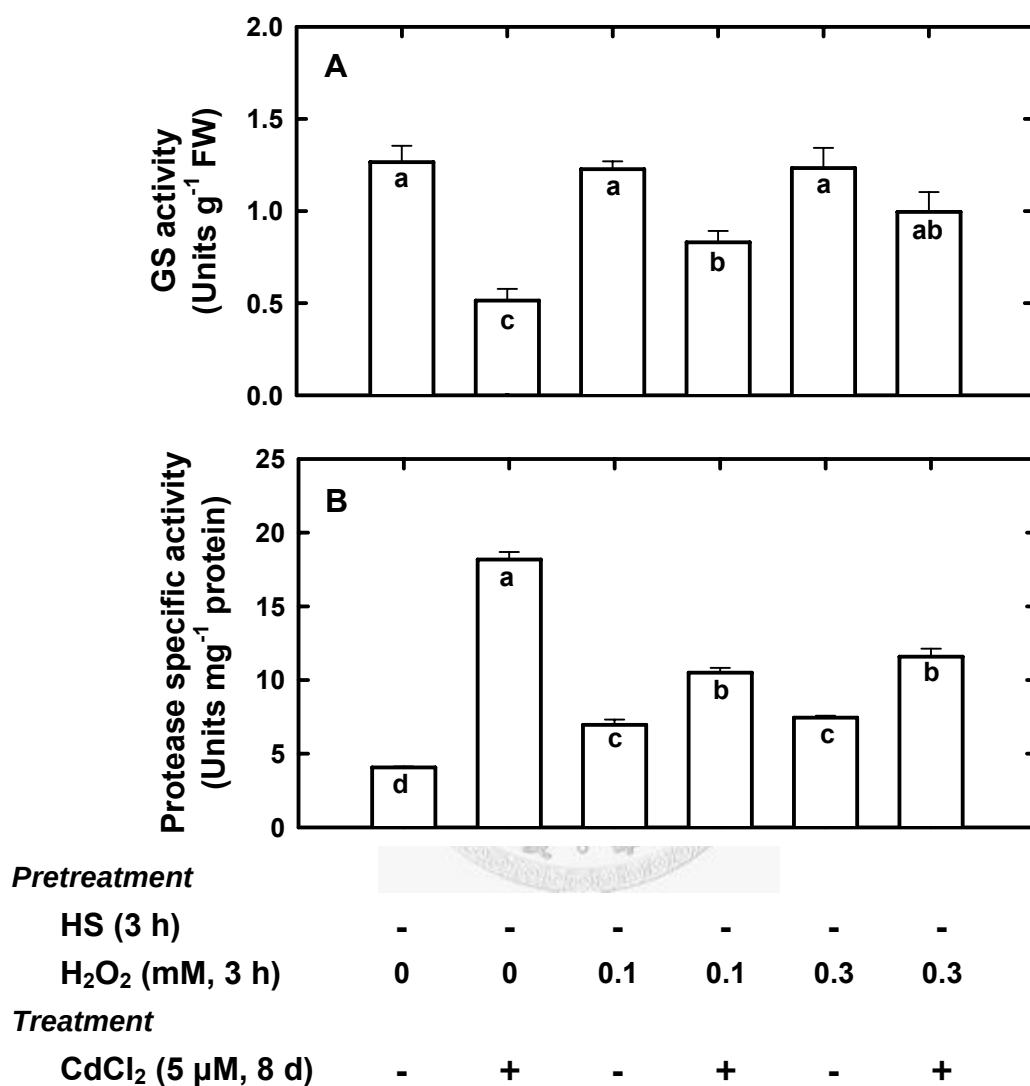
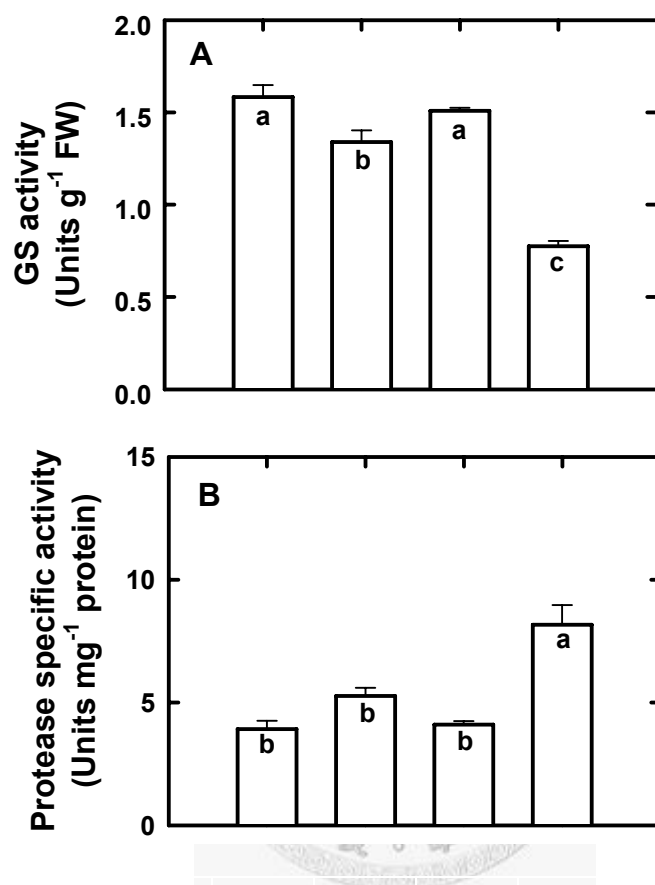


圖 16. non-HS 與 H₂O₂ 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性 (B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，在 non-HS (30°C) 下添加 0、0.1、0.3 mM H₂O₂ 3 小時，再移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液處理 8 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 (P<0.05)。



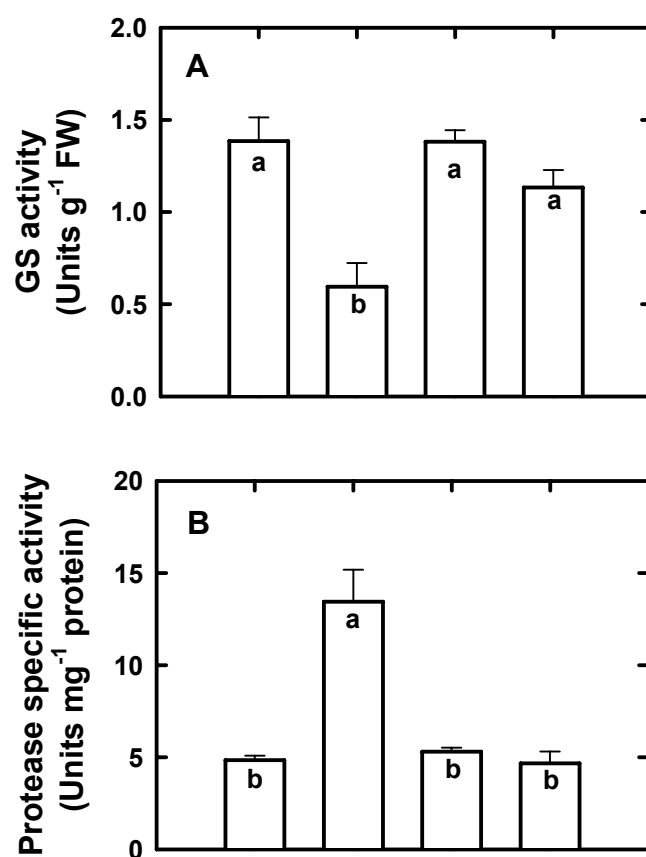
Pretreatment

HS (3 h)	+	+	+	+
IMD (0.1 mM)	-	-	+	+

Treatment

CdCl ₂ (5 μM, 9 d)	-	+	-	+
-------------------------------	---	---	---	---

圖 17. HS 與 IMD 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，在 HS (45°C) 下添加或不添加 0.1 mM IMD 3 小時，再移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液處理 9 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 (P<0.05)。



Pretreatment

HS (3 h)

- - - -

GSH (1 mM, 3 h)

- - + +

Treatment

CdCl₂ (5 μ M, 9 d)

- + - +

圖 18. non-HS 與 GSH 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，在 non-HS (30°C) 下添加或不添加 1 mM GSH 3 小時，再移到含與不含 5 μ M 氯化鎘水耕液處理 9 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 ($P < 0.05$)。

BSO 為 GSH 生合成抑制劑，會抑制催化合成 GSH 第一個步驟之 γ -EC (γ -glutamylcysteine) synthetase，降低細胞內 GSH 含量(Griffith, 1982)。研究室未發表之資料也顯示 HS 狀態下添加 BSO 可降低葉片內 GSH 含量。圖 19 指出在 HS 處理下，處理 BSO 會使得後續鎘誘導 GS 活性降低與 protease 比活性增加較不添加 BSO 處理之幼苗葉片為大。而 BSO 之效應可因 GSH 之添加而消失（圖 19）。

(四) GalL 和 ASC 對鎘誘導水稻幼苗葉片 GS 活性與 protease 比活性變化之影響

本研究室未發表之研究顯示，HS 前處理水稻幼苗可增加葉片內 ASC 含量。在植物中，GalL 可經 GalL dehydrogenase 作用轉變為 ASC (Valpuesta and Botella, 2004)。因此，本論文將水稻幼苗於 non-HS 前處理同時添加 GalL 或 ASC，觀察是否可以改變後續鎘逆境所造成 GS 活性降低與 protease 比活性增加。圖 20 結果顯示，在 non-HS 狀況下前處理 GalL 或 ASC，其第二片葉片受鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性變化，均少於單獨只有 non-HS 前處理之葉片。



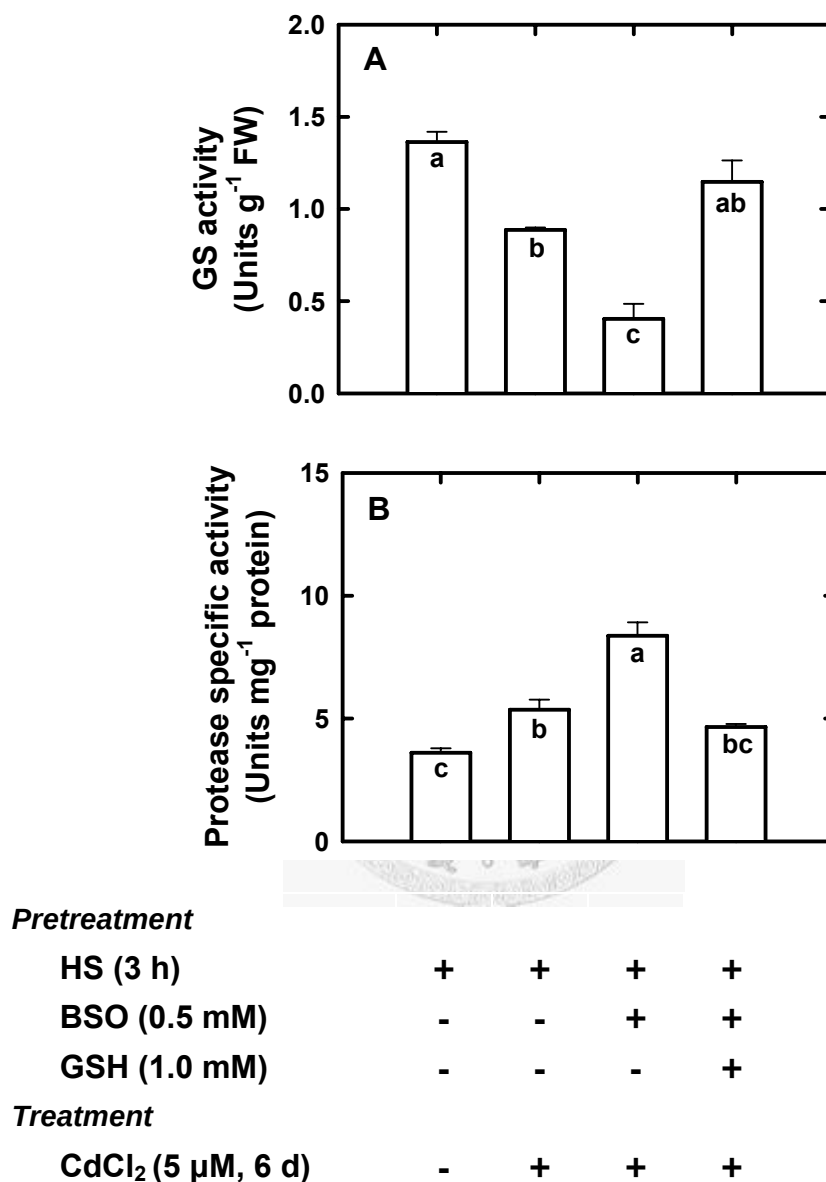
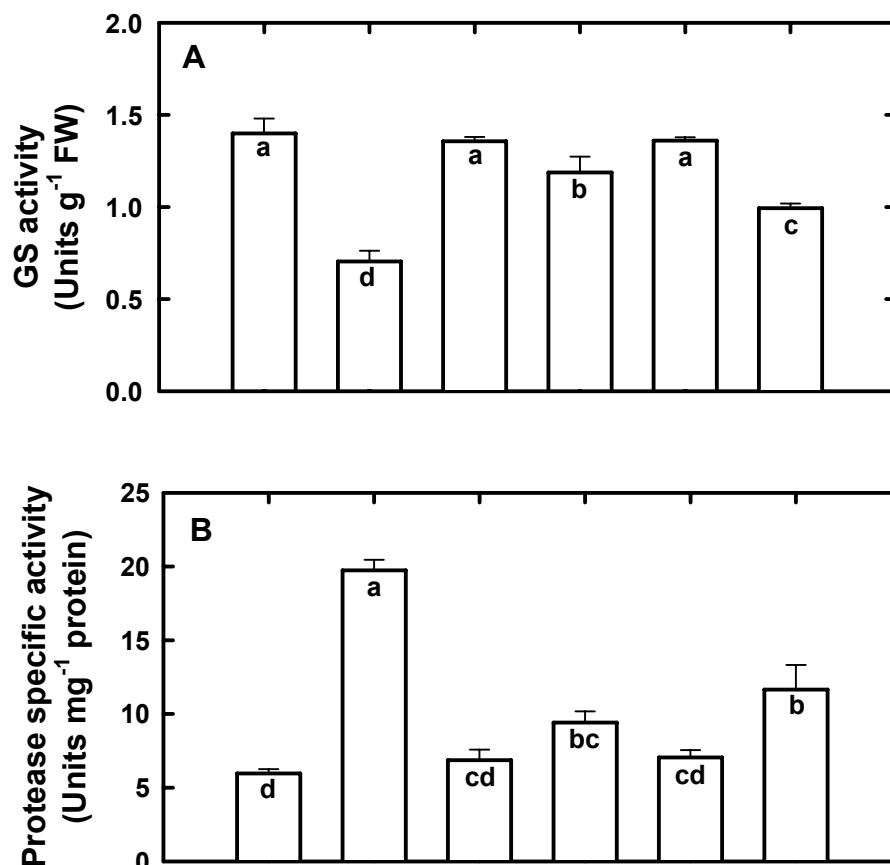


圖 19. HS 與 BSO 或 GSH 共同前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，在 HS (45℃) 下添加或不添加 0.5 mM BSO 或 1 mM GSH 3 小時，再移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液處理 6 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析方法進行顯著性測驗。相同字母表示無顯著差異 (P<0.05)。



Pretreatment

HS (3 h)	-	-	-	-	-	-
GalL (0.5 mM)	-	-	+	+	-	-
ASC (0.5 mM)	-	-	-	-	+	+

Treatment

CdCl ₂ (5 μM, 8 d)	-	+	-	+	-	+
-------------------------------	---	---	---	---	---	---

圖 20. non-HS 與 GalL 或 ASC 前處理對水稻幼苗第二片葉片 GS 活性(A)與 protease 比活性(B)變化之影響。待水稻幼苗生長至第三片葉片完全展開時，在 non-HS (30℃) 下添加或不添加 0.5 mM GalL 或 ASC 3 小時，再移到含與不含 5 μM 氯化鎘水耕液處理 8 天後進行分析。每一處理重覆數為 4。垂直線距表示標準機差。以 LSD 統計分析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、 鎘對缺氮水稻幼苗毒害之影響

許多文獻指出，缺氮會抑制植物地上部，影響根部生長(Darrall and Wareing, 1981; Finkemeier et al., 2003; Li et al., 2006; Erley et al., 2007; Tewari et al., 2007)。本論文亦於地上部有相同結果，但不影響根部（圖 1）。缺氮另一項重要特徵為老葉會先出現黃化(Mei and Thimann, 1984; Tewari et al., 2007)。本論結果顯示缺氮水稻三葉齡幼苗之第二片葉片確有此現象發生，且減少葉綠素含量（圖 2）。在水稻本身含氮量方面，缺氮水稻幼苗葉片會降低硝酸鹽含量，且由於氮素為構成蛋白質之主要元素，缺氮亦會造成蛋白質含量減少（圖 3）。其他研究報告亦有同樣的結果(Darrall and Wareing, 1981; Finkemeier et al., 2003; Huang et al., 2004; Kandlbinder et al., 2004; Li et al., 2006; Tewari et al., 2007)。上述結果皆顯示水稻幼苗在缺氮處理時，確實是處於缺氮狀態。

所有的抗氧化酵素和抗氧化物 GSH，結構上皆含有氮素。因此限制氮素來源，可能會降低植物抗氧化系統之表現。本論文結果發現缺氮水稻幼苗會降低抗氧化酵素 GR、APX、CAT 活性，以及減少抗氧化物 ASC 含量，不影響 GSH 含量（圖 5、6、7）。文獻中亦曾報導相同結果，缺氮促使阿拉伯芥 APX 與 CAT 活性下降、GSH 含量不變，以及大麥 GR 活性下降(Finkemeier et al., 2003; Kandlbinder et al., 2004)。而其他文獻則有不同情形，可能造成抗氧化酵素活性不變、比活性增加，抗氧化物 GSH 含量下降，增加 ASC 含量(Finkemeier et al., 2003; Huang et al., 2004; Tewari et al., 2004; Tewari et al., 2007)。

學者指出，植物於缺氮、缺磷、缺鉀、缺硫、缺鎂、缺鐵等營養元素時會誘導 H_2O_2 累積(Shin et al., 2005; Molassiotis et al., 2006; Tewari et al., 2006; Schachtman

and Shin, 2007)。本研究結果亦發現缺氮會造成葉片 H_2O_2 含量增加(圖 4A, B, C)。 H_2O_2 之生成與解毒與植物抗氧化酵素有關：SOD 可將毒性較強的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 轉變為 H_2O_2 ，CAT 與 ASC-GSH 循環之成員 APX、GR 則是負責 H_2O_2 之清除工作。缺氮處理會提高水稻幼苗葉片 SOD 活性，以及降低 GR、APX、CAT 活性(圖 7)，顯示缺氮水稻幼苗造成葉片 H_2O_2 之累積可能是因抗氧化酵素活性改變所致。

植物遭遇許多逆境時，會誘導逆境荷爾蒙 ABA 之大量累積，如遭受萎凋、病原菌、鹽害等(Steadman and Sequeira, 1970; Mizrahi et al., 1971)。本論文結果發現，缺氮會誘導 ABA 含量累積(圖 8)。文獻指出，ABA 會抑制植物地上部之生長(Watts et al., 1981; Biddington and Dearman, 1982)，因此缺氮造成水稻幼苗地上部矮化(圖 1A)可能與 ABA 之累積有關。其他植物於缺氮狀況下亦發現有 ABA 含量增加之情形(Mizrahi and Richmond, 1972; Goldbach et al., 1975; Daie et al., 1979; Radin and Boyer, 1982)。

當水稻幼苗缺氮與鎘逆境同時發生的時候，屬於雙重逆境研究之範疇。雙重逆境不只是單獨兩個不同逆境的反應加總起來，而是有一套特別的反應方式。研究指出雙重逆境對於植物之效果可能有正有反：植物曝露於 UV 光照或臭氧環境，可提高內生水楊酸與病程相關蛋白(pathogenesis-related proteins)含量，因而加強抵禦病原菌之能力(Yalpani et al., 1994; Sharma et al., 1996)。乾旱逆境降低植物氣孔導度，減少臭氧吸收量而減緩逆境傷害(Paakkonen et al., 1998)。但是當熱逆境與乾旱逆境同時發生，植物則不能打開氣孔散熱，使得傷害加劇(Rizhsky et al., 2004)。本論文發現，同時處以缺氮與鎘逆境之結果，會造成水稻幼苗鎘毒害更加嚴重(圖 9、10)。缺氮處理水稻幼苗會誘導 H_2O_2 之累積，抗氧化物 ASC 含量之減少，以及抗氧化酵素 GR、APX、CAT 活性之降低，SOD 活性之提高(圖 4、6、7)。顯示缺氮與鎘雙重逆境於水稻幼苗之負面效果，與缺氮處理造成抗氧化能力之下降有關。其他學者亦發現缺氮與鎘逆境同時發生會加重植物傷害(Finkemeier et al.,

2003)。

ASC 可清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ ，亦可配合 APX 作用清除 H_2O_2 ，為具有良好清除自由基能力之抗氧化物(Padh, 1990; Buettner and Jurkiewicz, 1996)。缺氮處理水稻幼苗會降低葉片 ASC 含量（圖 6）。因此若提高缺氮水稻幼苗體內 ASC 含量，理論上應可以增加對鎘逆境之耐性。本論文結果發現，於缺氮水稻幼苗前處理 ASC，葉片 ASC 含量雖然沒有明顯改變，但是可提高 ASC/DHA 比值，顯示外加 ASC 可提升缺氮水稻幼苗自身還原之狀態。且外加 ASC 確實能夠減少鎘逆境之毒害（圖 12、13）。此結果可進一步地佐證前段論點，缺氮水稻幼苗加劇鎘毒害之現象，是由於缺氮處理造成抗氧化能力低落，而對鎘逆境較不具耐受性。

缺氮之水稻幼苗經氯化鎘處理，會顯著於葉片、地上部與根部累積鎘（圖 11），顯示缺氮水稻幼苗加劇鎘毒害之機制亦可能與增加鎘之吸收有關。一般非植物生長必需元素，是透過較非專一性之陽離子轉運蛋白進入植物細胞。近年來，許多金屬轉運蛋白（metal transporter）陸續在植物中被發現(Maser et al., 2001)。通常鎘離子是以鋅、鐵、鈣的轉運蛋白運送到細胞內(Clemens, 2001)。然而缺氮時可誘導大麥鐵運送蛋白(Hv-Nramp)基因表現，但並不會增加鎘之吸收量(Finkemeier et al., 2003)。水稻幼苗在缺氮下是否能影響轉運蛋白目前並不瞭解，有待進一步之研究。

本部份論文結果顯示缺氮水稻幼苗加劇鎘毒害，可能機制與缺氮造成抗氧化能力下降及鎘之吸收增加有關（圖 21）。

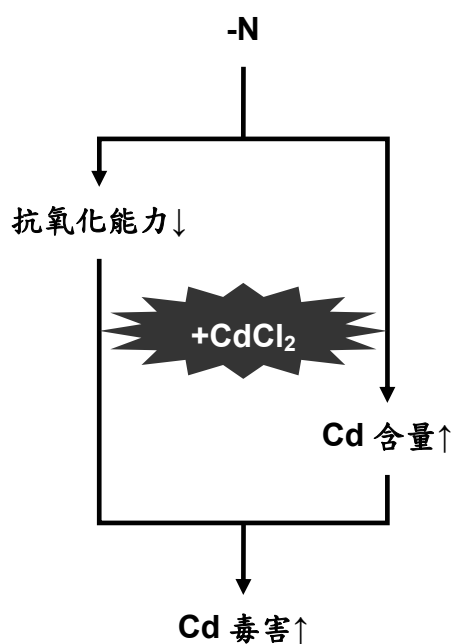


圖 21. 缺氮水稻幼苗鎘毒害加劇之可能機制

二、熱休克對水稻後續鎘逆境誘導 GS 與 protease 活性變化之影響

本研究室過去研究結果顯示水稻幼苗遭遇鎘逆境，可誘導氧化逆境發生而造成 GS 活性之降低(Chien and Kao, 2000)，亦可促使 protease 比活性之提高(Hsu and Kao, 2003b)。本論文亦有相同結果，水稻幼苗以氯化鎘（5 μM ）處理會誘導葉片 GS 活性下降與 protease 比活性上升（圖 14、15、16、18、20）。

HS 前處理可以增加植物對於後續逆境之耐受性，如鹽害、寒害、高溫、乾旱、重金屬、UV 光、病原菌等。本論文結果亦顯示經 HS 前處理之水稻幼苗，能夠有效抑制鎘逆境所誘導 GS 活性降低與 protease 比活性增加（圖 15、17、19）。

H_2O_2 為一種穩定且可擴散之活化氧族。前人研究指出低濃度之 H_2O_2 可作為訊息傳導分子，誘導抗氧化系統之表現(del Rio et al., 2006)。本研究室亦發現 HS 前處理可增加水稻幼苗於後續鎘逆境之耐受性，係藉由早期 H_2O_2 之累積，誘導抗氧

化物 GSH、ASC 含量，以及抗氧化酵素 APX、GR 活性之增加(Hsu and Kao, 2007b; 本研究室未發表資料)。H₂O₂ 之來源在植物體可能有許多不同產生方式，Hsu and Kao (2007)發現 HS 前處理誘導 H₂O₂ 之累積，為 NADPH oxidase 作用之結果。NADPH oxidase 為位於細胞膜上之酵素，以 NADPH 作為電子提供者還原氧分子，使生成 O₂^{·-}後再進一步經由自發性或 SOD 作用，形成 H₂O₂ (Apel and Hirt, 2004)。IMD 則為 NADPH oxidase 之抑制劑(Auh and Murphy, 1995)。水稻幼苗處理 IMD 會降低 HS 前處理誘導葉片 H₂O₂ 之累積(Hsu and Kao, 2007b)，同時抵消 HS 對鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性變化之效應（圖 17）。於 non-HS 狀態水稻幼苗添加 H₂O₂可增加葉片 H₂O₂ 含量(Hsu and Kao, 2007b)，同時亦可部份恢復因鎘誘導 GS 活性與 protease 比活性之改變（圖 16）。因此，HS 前處理可抑制鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性變化，H₂O₂ 係在過程中扮演了重要的角色。

GSH 為重要的抗氧化物，於幫助植物抵禦逆境提供了極大作用。GSH 合成步驟的第一個酵素 γ -EC synthetase，可受 BSO 藥劑所抑制。本研究室未發表資料指出 HS 前處理可誘導 GSH 累積，提供水稻幼苗於後續鎘逆境之耐性。在 non-HS 狀態下添加 GSH 可增加水稻幼苗葉片之 GSH 含量，HS 前處理時添加 BSO 會降低葉片內 GSH 含量(本研究室未發表資料)。本論文結果指出，HS 前處理水稻幼苗可抑制鎘所誘導 GS 活性之降低與 protease 比活性之上升，與 GSH 含量之增加有關。主要的證據為：(一) 在 non-HS 處理下外加 GSH，可恢復因鎘誘導所改變之 GS 活性或 protease 比活性（圖 18）；(二) BSO 處理會去除 HS 對鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性改變之效果（圖 19）；(三) BSO 之作用可因添加 GSH 所抵消（圖 19）。

抗氧化物 ASC 亦可能參與於 HS 前處理提供對後續鎘逆境耐性之作用。本研究室未發表資料顯示，HS 前處理水稻幼苗可增加葉片 ASC 之含量。因此在 non-HS 狀態下添加 ASC 或 GalL（ASC 合成之前趨物），理論上應可抑制鎘所誘導 GS 活

性之降低與 protease 比活性之上升。本論文之結果確實發現，添加 ASC 或 GalL 於 non-HS 水稻幼苗，可抑制鎘所誘導 GS 活性與 protease 比活性之變化（圖 20）。

鎘可誘導氧化逆境發生，造成活化氧族之累積。前人研究指出，活化氧族可對 GS 蛋白進行氧化修飾(Levine, 1983; Balestrasse et al., 2006)，並參與 GS 蛋白之降解(Rivett and Levine, 1990; Stieger and Feller, 1997; Ortega et al., 1999; Palatnik et al., 1999)，造成 GS 酵素活性之降低(Chien and Kao, 2000)。經活化氧族修飾之 GS，會變得較容易被 protease 降解。活化氧族亦可誘導 protease 之表現，增加蛋白質之分解速率(Stroeher et al., 1997; Yano et al., 1999; Subbaiah et al., 2000)。對水稻幼苗進行鎘處理，會誘導 GS 活性下降與 protease 比活性上升（圖 14），根據上述文獻之結果暗示鎘造成酵素活性改變可能與活化氧族有關。HS 前處理可促使 H_2O_2 少量地增加，作為訊息分子誘導抗氧化物與抗氧化酵素之表現，使提升水稻幼苗抵抗氧化逆境之能力。因此，HS 前處理可抑制鎘所誘導水稻幼苗葉片 GS 活性下降與 protease 比活性之上升，可能與抗氧化能力之提升有關。整體而言，HS 可改變鎘所誘導之 GS 與 protease 活性變化的可能機制為（圖 22）：

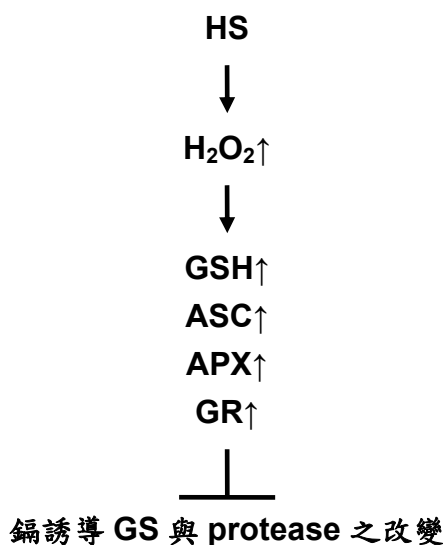


圖 22. HS 抑制鎘所誘導 GS 與 protease 活性變化之可能機制

三、 未來研究方向

本論文研究結果顯示，缺氮水稻幼苗於鎘逆境會有毒害加劇之效果，係由於抗氧化系統表現下降之因。關於氮素與水稻幼苗鎘逆境之關係，未來仍有可繼續探究之方向。缺乏氮素時，大麥與阿拉伯芥之抗氧化酵素基因表現有所改變 (Finkemeier et al., 2003; Kandlbinder et al., 2004)。缺氮之水稻幼苗會降低抗氧化酵素活性，此酵素活性是否與基因表現層次上之調控有關。在缺氮狀態下，水稻幼苗於鎘逆境會增加鎘之吸收量，是否經由影響轉運蛋白之表現。此外，若進一步給予水稻幼苗不同氮量或氮源，是否會改善水稻幼苗對鎘之耐性。這些問題皆值得未來進一步地深入探討。而熱休克對後續鎘逆境之影響，係以提高抗氧化能力增加對鎘之耐性。Volkov 等人(2006)指出熱休克可能經由 H_2O_2 誘導 APX 與熱休克蛋白基因表現。就熱休克處理增加對後續逆境耐性而言，促進熱休克蛋白之形成為其中一種作用機制。熱休克是否會改變水稻幼苗抗氧化酵素以及熱休克蛋白基因之表現，亦為未來極有趣之研究方向。

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。財團法人國家政策研究基金會
- Alcantara E, Romera FJ, Canete M, Delaguardia MD** (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1893-1898
- Allan AC, Maddumage R, Simons JL, Neill SO, Ferguson IB** (2006) Heat-induced oxidative activity protects suspension-cultured plant cells from low temperature damage. *Functional Plant Biology* **33**: 67-76
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639
- Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ et al. (eds) *Photoinhibition*. Elsevier, pp. 227-287.
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology* **107**: 1241-1247
- Backer TW, Hoppe M, Foch PH** (1986) Evidence for the participation of dissimilatory processes in maintaining high carbon fluxes through the photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles in water-stressed bean leaves. *Photosynthetica* **20**: 153-157
- Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML** (2003) Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Functional Plant Biology* **30**: 57-64
- Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML** (2004) Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant and Soil* **262**: 373-381
- Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML** (2006) Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant and Soil* **284**: 187-194
- Balestrasse KB, Gardey L, Gallego SM, Tomaro ML** (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 497-504
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G** (1987) Aspects of the structure, function, and

- applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22**: 111-180
- Barcelo J, Poschenrieder C** (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress - a review. *Journal of Plant Nutrition* **13**: 1-37
- Barcelo J, Poschenrieder C, Andreu I, Gunse B** (1986) Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Contender). I. Effects on water potential, relative water content and cell wall elasticity. *Journal of Plant Physiology* **125**: 17-25
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao CS** (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **44**: 399-415
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML** (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 21-34
- Biddington NL, Dearman AS** (1982) The effect of abscisic acid on root and shoot growth of cauliflower plants. *Plant Growth Regulation* **1**: 15-24
- Bingham FT, Page AL, Mahler RJ, Ganje TJ** (1976) Yield and cadmium accumulation of forage species in relation to cadmium content of sludge-amended soil. *Journal of Environmental Quality* **5**: 57-60
- Boussama N, Ouariti O, Ghorbal MH** (1999a) Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* **22**: 731-752
- Boussama N, Ouariti O, Suzuki A, Ghorbal MH** (1999b) Cd-stress on nitrogen assimilation. *Journal of Plant Physiology* **155**: 310-317
- Bowler C, Vanmontagu M, Inze D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 83-116
- Boyer JS** (1982) Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Brune A, Urbach W, Dietz KJ** (1995) Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation - a comparison of Cd-stress, Mo-stress, Ni-stress and Zn-stress. *New Phytologist* **129**: 403-409
- Buettner G, Jurkiewicz B** (1996) Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: Cadenas E and Packer L (eds) *Handbook of Antioxidants*. Dekker, New York, pp. 91-115.
- Carrier P, Baryl A, Havaux M** (2003) Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta* **216**: 939-950
- Casano LM, Gomez LD, Trippi VS** (1990) Oxygen-induced and light-induced

- proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **31**: 377-382
- Casano LM, Lascano HR, Trippi VS** (1994) Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light-induced and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **35**: 145-152
- Casano LM, Trippi VS** (1992) The effect of oxygen radicals on proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **33**: 329-332
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71-80
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, ElFerjani E** (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science* **127**: 139-147
- Chen LM, Kao CH** (1998) Relationship between ammonium accumulation and senescence of detached rice leaves caused by excess copper. *Plant and Soil* **200**: 169-173
- Chen SJ, Hung KT, Kao CH** (1997) Ammonium accumulation is associated with senescence of rice leaves. *Plant Growth Regulation* **21**: 195-201
- Chen SL, Kao CH** (1995a) Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **17**: 67-71
- Chen SL, Kao CH** (1995b) Glutathione reduces the inhibition of rice seedling root-growth caused by cadmium. *Plant Growth Regulation* **16**: 249-252
- Chen SL, Kao CH** (1995c) Prior temperature exposure affects subsequent Cd-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Science* **104**: 135-138
- Chien HF, Kao CH** (2000) Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium. *Plant Science* **156**: 111-115
- 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 damage. *Plant Growth Regulation* **36**: 41-47
- Chien HF, Wang JW, Lin CC, Kao CH** (2001) Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* **33**: 205-213
- Cho UH, Seo NH** (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**: 113-120
- Chugh LK, Gupta VK, Sawhney SK** (1992) Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* **31**: 395-400
- Clemens S** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Costa G, Morel JL** (1994) Water relations, gas exchange and amino acid content in

- Cd-treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**: 561-570
- Daie J, Seeley SD, Campbell WF** (1979) Nitrogen deficiency influence on abscisic acid in tomato. *Hortscience* **14**: 261-262
- Dalurzo HC, Sandalio LM, Gomez M, Del Rio LA** (1997) Cadmium infiltration of detached pea leaves: Effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton* **37**: 59-64
- Darrall NM, Wareing PF** (1981) The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula Pendula* Roth and *Acer Pseudoplatanus* L. *Journal of Experimental Botany* **32**: 369-379
- Das P, Samantaray S, Rout GR** (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* **98**: 29-36
- Dat JF, Foyer CH, Scott IM** (1998a) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology* **118**: 1455-1461
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM** (1998b) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* **116**: 1351-1357
- Davies KJA** (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **83**: 301-310
- Defilippis LE, Ziegler H** (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon-reduction cycle of *Euglena*. *Journal of Plant Physiology* **142**: 167-172
- del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330-335
- di Toppi LS, Gabbrielli R** (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105-130
- di Toppi LS, Lambardi M, Pazzagli L, Cappugi G, Durante M, Gabbrielli R** (1998) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Science* **137**: 119-129
- Dixit V, Pandey V, Shyam R** (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* **52**: 1101-1109
- Djebali W, Gallusci P, Polge C, Boulila L, Galtier N, Raymond P, Chaibi W, Brouquisse R** (2008) Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta* **227**: 625-639
- Eckardt NA, Pell EJ** (1995) Oxidative modification of rubisco from potato foliage in response to ozone. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**: 273-282

- Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM** (1990) Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine-synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 3459-3463
- Elstner EF, Frommeyer D** (1978) Production of hydrogen peroxide by photosystem II of spinach chloroplast lamellae. *FEBS Lett* **86**: 143-146
- Eriksson JE** (1990) Effects of nitrogen-containing fertilizers on solubility and plant uptake of cadmium. *Water Air and Soil Pollution* **49**: 355-368
- Erley GSA, Wijaya KA, Ulas A, Becker H, Wiesler F, Horst WJ** (2007) Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiologia Plantarum* **130**: 519-531
- Fassett DW** (1975) Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment. *Annual Review of Pharmacology* **15**: 425-435
- Finkemeier I, Kluge C, Metwally A, Georgi M, Grotjohann N, Dietz KJ** (2003) Alterations in Cd-induced gene expression under nitrogen deficiency in *Hordeum vulgare*. *Plant, Cell and Environment* **26**: 821-833
- Florijn PJ, Nelemans JA, Vanbeusichem ML** (1992) The influence of the form of nitrogen nutrition on uptake and distribution of cadmium in lettuce varieties. *Journal of Plant Nutrition* **15**: 2405-2416
- Fodor E, Szabonagy A, Erdei L** (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology* **147**: 87-92
- Fornazier RF, Ferreira RR, Vitoria AP, Molina SMG, Lea PJ, Azevedo RA** (2002) Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum* **45**: 91-97
- Foster JG, Hess JL** (1980) Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiology* **66**: 482-487
- Foyer C, Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- Foyer CH, Descourvieres P, and Kunert KJ** (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**: 507-523
- Fuhrer J** (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* **70**: 162-167
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML** (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**: 151-159

- Goldbach E, Goldbach H, Wagner H, Michael G** (1975) Influence of N-deficiency on abscisic acid content of sunflower plants. *Physiologia Plantarum* **34**: 138-140
- Gong M, Chen B, Li ZG, Guo LH** (2001) Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1125-1130
- Gouia H, Ghorbal MH, Meyer C** (2000) Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 629-638
- Griffith OW** (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **257**: 3704-3712
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP** (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science* **161**: 481-488
- Grune T, Reinheckel T, Davies KJA** (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB Journal* **11**: 526-534
- Gussarsson M, Asp H, Adalsteinsson S, Jensen P** (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO). *Journal of Experimental Botany* **47**: 211-215
- Halliwell B** (1982) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxy radicals in vivo. *Biochemical Journal* **205**: 461-463
- Hassan MJ, Shafi M, Zhang G, Zhu Z, Qaisar M** (2008) The growth and some physiological responses of rice to Cd toxicity as affected by nitrogen form. *Plant Growth Regulation* **54**: 125-132
- Heckathorn SA, Mueller JK, LaGuidice S, Zhu B, Barrett T, Blair B, Dong Y** (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* **91**: 1312-1318
- Hernandez LE, CarpenaRuiz R, Garate A** (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **19**: 1581-1598
- Hernandez LE, Garate A, CarpenaRuiz R** (1997) Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant and Soil* **189**: 97-106
- Hirel B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F, Verma DP** (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO Journal* **6**: 1167-1171
- Hou SM, Kao CH** (1993) Characteristics of the induction of the ethylene by cadmium in detached rice leaves. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **34**: 163-168

- Hsu YT, Kao CH** (2003a) Accumulation of ammonium ion in cadmium tolerant and sensitive cultivars of *Oryza sativa*. *Plant Growth Regulation* **39**: 271-276
- Hsu YT, Kao CH** (2003b) Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regulation* **40**: 147-155
- Hsu YT, Kao CH** (2003c) Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell and Environment* **26**: 867-874
- Hsu YT, Kao CH** (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation* **42**: 227-238
- Hsu YT, Kao CH** (2005) Absciscic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings. *Physiologia Plantarum* **124**: 71-80
- Hsu YT, Kao CH** (2007a) Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines. *Plant and Soil* **291**: 27-37
- Hsu YT, Kao CH** (2007b) Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant and Soil* **300**: 137-147
- Hsu YT, Kao CH** (2007c) Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant and Soil* **298**: 231-241
- Hsu YT, Kuo MC, Kao CH** (2006) Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant and Soil* **287**: 267-277
- Huang ZA, Jiang DA, Yang Y, Sun JW, Jin SH** (2004) Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* **42**: 357-364
- Huffaker RC** (1990) Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytologist* **116**: 199-231
- Huang WP, Lur HS, Liao CK, Kao CH** (1994) Role of abscisic acid, ethylene and polyamines in flooding-promoted senescence of tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology* **143**: 102-105
- Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A** (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 977-982
- IRRI** (2003) http://www.knowledgebank.irri.org/riceDoctor/Fact_Sheets/DeficienciesToxicities/Nitrogen_Deficiency.htm.
- Jana S, Choudhuri MA** (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms: Effect of heavy metals. *Aquatic Botany* **11**: 67-77
- Juszczuk IM, Tybura A, Rychter AM** (2008) Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.), mutant MSC16 and wild type. *Journal of Plant Physiology* **165**: 355-365

- Kandlbinder A, Finkemeier I, Wormuth D, Hanitzsch M, Dietz KJ** (2004) The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **120**: 63-73
- Kang HM, Saltveit ME** (2001) Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiologia Plantarum* **113**: 548-556
- Kato M, Shimizu S** (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* **65**: 729-735
- Kingston-Smith AH, Foyer CH** (2000) Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *Journal of Experimental Botany* **51**: 123-130
- Kochhar S, Kochhar VK** (2005) Expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in relation to combined stress of cadmium and heat in *Vigna mungo* seedlings. *Plant Science* **168**: 921-929
- Kocsy G, Szalai G, Sutka J, Paldi E, Galiba G** (2004) Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxymethylglutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. *Plant Science* **166**: 451-458
- Kovacik J, Klejdus B, Backor M, Repcak M** (2007) Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* **172**: 393-399
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2940-2945
- Kuo MC, Kao CH** (2004) Antioxidant enzyme activities are upregulated in response to cadmium in sensitive, but not in tolerant, rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 291-299
- Kuun KG, Okole B, Bornman L** (2001) Protection of phenylpropanoid metabolism by prior heat treatment in *Lycopersicon esculentum* exposed to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 871-880
- Kuznetsov VV, Rakitin VY, Borisova NN, Rotschupkin BV** (1993) Why does heat-shock increase salt resistance in cotton plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**: 181-188
- Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, Vangronsveld J** (1998) Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* **200**:

- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E** (2005) Heat stress phenotypes of arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* **138**: 882-897
- Lauriere C, Daussant J** (1983) Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate-dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the 1st leaf of wheat. *Physiologia Plantarum* **58**: 89-92
- Law MY, Charles SA, Halliwell B** (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal* **210**: 899-903
- Levine RL** (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase. 2. Characterization of the ascorbate model system. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 1828-1833
- Li BZ, Xin WJ, Sun SB, Shen QR, Xu GH** (2006) Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. *Plant and Soil* **287**: 145-159
- Li ZF, Liu HF, Xiong XX, Liu HS** (2005) Effect of cadmium on seed germination, seedling development and physiological and biochemical characteristics of wheat. *Journal of Agro-Environment Science* **24**: 17-20 (in Chinese)
- Lin JN, Kao CH** (1998) Water stress, ammonium, and leaf senescence in detached rice leaves. *Plant Growth Regulation* **25**: 165-169
- Liu W, Zheng L, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Sun TH** (2006) Effects of cadmium stress on DNA polymorphism of genome in barley seedlings. *Journal of Agro-Environment Science* **25**: 19-24 (in Chinese)
- Lurie S, Klein JD** (1991) Acquisition of low-temperature tolerance in tomatoes by exposure to high-temperature stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 1007-1012
- Maier NA, McLaughlin MJ, Heap M, Butt M, Smart MK** (2002) Effect of nitrogen source and calcitic lime on soil pH and potato yield, leaf chemical composition, and tuber cadmium concentrations. *Journal of Plant Nutrition* **25**: 523-544
- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology* **121**: 97-111
- Mattioni C, Gabbrielli R, Vangronsveld J, Clijsters H** (1997) Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in nitolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* pers. *Journal of Plant Physiology* **150**: 173-177
- Mei HS, Thimann KV** (1984) The relation between nitrogen deficiency and leaf senescence. *Physiologia Plantarum* **62**: 157-161

- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ** (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* **56**: 167-178
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19
- Mizrahi Y, Blumenfeld A, Bittner S, Richmond AE** (1971) Absciscic acid and cytokinin contents of leaves in relation to salinity and relative humidity. *Plant Physiology* **48**: 752-&
- Mizrahi Y, Richmond AE** (1972) Absciscic acid in relation to mineral deprivation. *Plant Physiology* **50**: 667-670
- Mo WH, Li MX** (1992) Effect of CdCl₂ on the growth and mitosis of root tip cells in *Vicia faba*. *Chinese Bulletin of Botany* **9**: 30-34 (in Chinese)
- Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G, Patakas A, Therios L** (2006) Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology* **163**: 176-185
- Moreno-Caselles J, Moral R, Perez-Espinosa A, Perez-Murcia MD** (2000) Cadmium accumulation and distribution in cucumber plant. *Journal of Plant Nutrition* **23**: 243-250
- Moreno JL, Hernandez T, Garcia C** (1999) Effects of cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biology and Fertility of Soils* **28**: 230-237
- Mundy J, Chua NH** (1988) Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO Journal* **7**: 2279-2286
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **22**: 867-880
- Neumann D, Lichtenberger O, Gunther D, Tschiersch K, Nover L** (1994) Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher-plants. *Planta* **194**: 360-367
- Nies DH** (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 730-750
- Nietosotelo J, Ho THD** (1986) Effect of heat-shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiology* **82**: 1031-1035
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**:

- Oaks A, Stulen I, Jones K, Winspear MJ, Misra S, Boesel IL** (1980) Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. *Planta* **148**: 477-484
- Obata H, Umebayashi M** (1997) Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *Journal of Plant Nutrition* **20**: 97-105
- Orozco-Cárdenas M, Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6553-6557
- Ortega JL, Roche D, Sengupta-Gopalan C** (1999) Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. *Plant Physiology* **119**: 1483-1495
- Orzech KA, Burke JJ** (1988) Heat-shock and the protection against metal toxicity in wheat leaves. *Plant, Cell and Environment* **11**: 711-714
- Paakkonen E, Vahala J, Pohjolai M, Holopainen T, Karenlampi L** (1998) Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress. *Plant, Cell and Environment* **21**: 671-684
- Padh H** (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology* **68**: 1166-1173
- Palatnik JF, Carrillo N, Valle EM** (1999) The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiology* **121**: 471-478
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Rio LA** (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 521-530
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A** (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **154**: 536-541
- Peeters KMU, Vanlaere AJ** (1992) Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum* **84**: 243-249
- Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML, Gallego SM** (2006) Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science* **171**: 531-537
- Pinto AP, Mota AM, de Varennes A, Pinto FC** (2004) Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the*

Total Environment **326**: 239-247

- Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J** (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology* **90**: 1365-1371
- Prasad TK** (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: Changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal* **10**: 1017-1026
- Radin JW, Boyer JS** (1982) Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants - role of hydraulic conductivity and turgor. *Plant Physiology* **69**: 771-775
- Ranieri A, Castagna A, Baldan B, Soldatini GF** (2001) Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **52**: 25-35
- Rausser WE** (1995) Phytochelatins and related peptides - structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* **109**: 1141-1149
- Rivett AJ, Levine RL** (1990) Metal-catalyzed oxidation of *Escherichia coli* glutamine synthetase: correlation of structural and functional changes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **278**: 26-34
- Rizhsky L, Liang HJ, Mittler R** (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143-1151
- Rizhsky L, Liang HJ, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**: 1683-1696
- Roche D, Temple SJ, Senguptagopalan C** (1993) Two classes of differentially regulated glutamine synthetase genes are expressed in the soybean nodule: a nodule-specific class and a constitutively expressed class. *Plant Molecular Biology* **22**: 971-983
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA** (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research* **31**: S25-S31
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM** (2002) Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 677-686
- Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1122-1134
- Salt DE, Rausser WE** (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the

- tonoplast of oat roots. *Plant Physiology* **107**: 1293-1301
- Saltveit ME** (1991) Prior temperature exposure affects subsequent chilling sensitivity. *Physiologia Plantarum* **82**: 529-536
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA** (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115-2126
- Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M** (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany* **52**: 145-151
- Schachtman DP, Shin R** (2007) Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 47-69
- Schutzendubel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A** (2002) Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 577-584
- Schutzendubel 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 Physiology* **127**: 887-898
- Shakirova FM, Bezrukova MV, Shayakhmetov IF** (1996) Effect of temperature shock on the dynamics of abscisic acid and wheat germ agglutinin accumulation in wheat cell culture. *Plant Growth Regulation* **19**: 85-87
- Sharma YK, Leon J, Raskin I, Davis KR** (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5099-5104
- Shaw BP** (1995) Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum* **37**: 587-596
- Sheoran IS, Garg OP** (1978) Effect of salinity on activities of RNase, DNase and protease during germination and early seedling growth of mung bean. *Physiologia Plantarum* **44**: 171-174
- Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K** (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **39**: 285-292
- Shin R, Berg RH, Schachtman DP** (2005) Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant & Cell Physiology* **46**: 1350-1357
- Shringarpure R, Grune T, Davies KJA** (2001) Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cellular and Molecular*

Life Sciences **58**: 1442-1450

- Siedlecka A, Krupa Z** (1999) Cd/Fe interaction in higher plants - its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* **36**: 321-331
- Smith IK** (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiology* **79**: 1044-1047
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A** (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell* **11**: 431-443
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* **85**: 85-89
- Song SQ, Lei YB, Tian XR** (2005) Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds. *Russian Journal of Plant Physiology* **52**: 793-800
- Stapel D, Kruse E, Kloppstech K** (1993) The protective effect of heat shock proteins against photoinhibition under heat shock in barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **21**: 211-218
- Steadman JR, Sequeira L** (1970) Absciscic acid in tobacco plants - tentative identification and its relation to stunting induced by *pseudomonas-solanacearum*. *Plant Physiology* **45**: 691-&
- Stieger PA, Feller U** (1997) Requirements for the light-stimulated degradation of stromal proteins in isolated pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1639-1645
- Stobart AK, Griffiths WT, Ameenbukhari I, Sherwood RP** (1985) The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum* **63**: 293-298
- Stohs SJ, Bagchi D** (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 321-336
- Stolt JP, Sneller FEC, Bryngelsson T, Lundborg T, Schat H** (2003) Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 21-28
- Streit L, Feller U** (1983) Changing activities and different resistance to proteolytic activity of 2 forms of glutamine synthetase in wheat leaves during senescence. *Physiologie Vegetale* **21**: 103-108
- Stroeher VL, Maclagan JL, Good AG** (1997) Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiologia Plantarum* **101**: 389-397
- Subbaiah CC, Kollipara KP, Sachs MM** (2000) A Ca²⁺-dependent cysteine protease is

- associated with anoxia-induced root tip death in maize. *Journal of Experimental Botany* **51**: 721-730
- Sukanya R, Li MG, Snustad DP** (1994) Root- and shoot-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant Molecular Biology* **26**: 1935-1946
- Talarico L** (2002) Fine structure and X-ray microanalysis of a red macrophyte cultured under cadmium stress. *Environmental Pollution* **120**: 813-821
- Tambussi EA, Bartoli CG, Beltrano J, Guamet JJ, Araus JL** (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* **108**: 398-404
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN** (2006) Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Scientia Horticulturae* **108**: 7-14
- Tewari RK, Kumar P, Sharma PN** (2007) Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 313-322
- Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN** (2004) Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses - influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science* **166**: 687-694
- Thomas H** (1978) Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* **142**: 161-169
- Valpuesta V, Botella MA** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **9**: 573-577
- Velikova V, Loreto F** (2005) On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment* **28**: 318-327
- Vierstra RD** (1996) Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* **32**: 275-302
- Vitoria AP, Lea PJ, Azevedo RA** (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* **57**: 701-710
- Vogelilange R, Wagner GJ** (1990) Subcellular localization of cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implications of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiology* **92**: 1086-1093
- Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schoffl F** (2006) Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **61**: 733-746
- Walker EL, Coruzzi GM** (1989) Developmentally regulated expression of the gene family for cytosolic glutamine synthetase in *Pisum sativum*. *Plant Physiology* **91**:

- Walter MH** (1989) The induction of phenylpropanoid biosynthetic enzymes by ultraviolet light or fungal elicitor in cultured parsley cells is overridden by a heat-shock treatment. *Planta* **177**: 1-8
- Watts S, Rodriguez JL, Evans SE, Davies WJ** (1981) Root and shoot growth of plants treated with abscisic acid. *Annals of Botany* **47**: 595-602
- Weast RC** (1984) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 64th edn. CRC Press, Boca Raton.
- Willaert G, Verloo M** (1992) Effects of various nitrogen fertilizers on the chemical and biological activity of major and trace elements in a cadmium contaminated soil. *Pedologie* **43**: 83-91
- Winterma JF, Demots A** (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica Et Biophysica Acta* **109**: 448-&
- Wu FB, Zhang GP, Dominy P** (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* **50**: 67-78
- Xiang CB, Oliver DJ** (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 1539-1550
- Xiong YH, Yang XE** (2006) Review of the toxic effects of cadmium on plants and their tolerant mechanism. *Journal of Agro-Environment Science* **34**: 2969-2971 (in Chinese)
- Yalpani N, Enyedi AJ, Leon J, Raskin I** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372-376
- Yano A, Suzuki K, Shinshi H** (1999) A signaling pathway, independent of the oxidative burst, that leads to hypersensitive cell death in cultured tobacco cells includes a serine protease. *The Plant Journal* **18**: 105-109
- Yeh CM, Hsiao LJ, Huang HJ** (2004) Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. *Plant & Cell Physiology* **45**: 1306-1312
- Zhao DY, Tian QY, Li LH, Zhang WH** (2007) Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Annals of Botany* **100**: 497-503