

✱ ✱

※ The study of grain development in rice: ※
 ※ effects of temperature on the expression ※
 ※ of storage proteins during grain filling ※
 ※ stage. ※

[illegible]

第二年:89年8月1日至90年7月31日

☐赴國外出差或研習心得報告一份

☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 90 年 10 月 30 日

主持人：盧虎生 執行機構及單位名稱：國立台灣大學農藝學系
共同主持人： 執行機構及單位名稱：國立台灣大學農藝學系
計畫參與人員：林韶凱 執行機構及單位名稱：國立台灣大學農藝學系

一、中文摘要

穀粒蛋白質對米粒的理化性質、營養價值級外觀性狀有決定性的影響，因此研究穀粒蛋白質合成過程及其與環境的關係有助於稻米品質的改進。稻米蛋白質的合成與累積可直接受到溫度的影響。本試驗主要目的為利用 proteomics 的觀念探討溫度對水稻穀粒蛋白質表現與貯藏性蛋白質合成與累積的影響。

本試驗以台灣常見之日本型水稻品種台農 67 號及印度型水稻品種台中在來 1 號為試驗材料，以盆栽種植於人工氣候控制之溫室中，栽培方式與一般水稻栽培制度相同，開花後分別以高溫(日夜溫 35/30°C)、常溫(日夜溫 30/25°C)及低溫(20/15°C)處理，並於開花後 6 天、9 天、12 天及 15 天取穎果之胚乳測定乾鮮重、水份含量、胚乳細胞數、蛋白質含量以及 prolamins 與 glutelins 含量，並進行蛋白質雙向電泳分析。建立兩品種在不同溫度環境及不同生育期，蛋白質在各處理條件下的表現差異，及此差異與穀粒充實期間生理性狀之關係。

在生理的測定上，水稻乾鮮重、細胞數目、蛋白質含量等因素皆會受到低溫環境的抑制，由此推論低溫會延遲水稻穀粒的發育。在正常條件下，台中在來 1 號在開花後第 15 天的細胞數高於台農 67 號。兩品種的 Prolamins 累積在時序上皆較 glutelins 晚，品種本身的條件以及對溫度的感受性差異很大，台中在來 1 號對低溫的耐受性比台農 67 號低。

目前完成的電泳圖譜顯示，台農 67 號在高溫環境(日夜溫 35/30 °C)下蛋白質的圖譜受到較大的影響，在生理分析上，蛋白質的總量並沒有明顯的差異，可能是由於溫度影響了貯藏性蛋白質累積的種類或生

合成途徑。台中在來 1 號則在低溫(日夜溫 20/15 °C)下的蛋白質圖譜差異較大。此結果與印度型水稻品種對低溫的耐受性較低之情形相符。台中在來 1 號在高溫環境的電泳圖譜上，貯藏性蛋白質的累積速率較高，此結果與 prolamins 與 glutelins 含量測定之結果一致。台農 67 號可判別出有 16 個表現量較大的 spots 隨發育期的增加而增加，7 個隨之減少。台中在來 1 號則有 14 個隨之增加，6 個隨之減少，此與該蛋白質在穀粒發育期間所扮演的角色有關。

本試驗結果將各處理之間的蛋白質表現圖譜與生理背景進行初步的歸類，兩品種的各主要蛋白質墨點在不同溫度環境與不同發育期的表現狀態進行分析，並將具有差異的蛋白質進行胺基酸序列判讀與功能比對。

關鍵詞：水稻、貯藏性蛋白質、溫度、稻米品質。

ABSTRACT

The rice grain proteins have a decisive influence in the chemical and physical properties, nutritive value, and appearance of rice grains. Accumulation of rice proteins is affected directly by temperature. Therefore, study of the biosynthetic process of rice proteins and their responses to environment would benefit the knowledge for improving the quality of rice. Although molecular mechanisms of the biosynthesis for storage proteins have been studied to a certain extent in rice, how the environment affects on endosperm proteins are still unclear.

The main objectives of this study

were to study the temperature effects on the expressions of rice grain proteins using a concept of "proteomics". A japonica cultivar (Tainung 67, TNG 67) and an indica cultivar (Taichung Native, TC(N)1) were grown in pots at a phytotron under 30/25 °C (day/night). At flowering the plants were moved to 35/30 °C, 30/25 °C, and 20/15 °C for temperature treatments. Grains were sampled at 6, 9, 12, and 15 days after flowering, and endosperm were dissected for analysis. Fresh weight, level of dry weight, water content, nuclei number, soluble protein, prolamins, and glutelins were measured. To determine the expression pattern of endosperm proteins, a high resolution two-dimension gel electrophoresis system was used.

The results showed that, in general, plant growth and all physiological processes were slowed down under low temperature. Cultivar TC(N)1 was more sensitive to low temperature than TNG 67. Under high temperature, however, TC(N)1 had higher rate in the increase of fresh weight and endosperm cell number and soluble proteins than did the TNG 67. Glutelins level was significantly higher than prolamins for both cultivar. And the accumulation/expression of glutelins was also earlier than that of prolamins.

A total of 300 to 400 protein polypeptides could be resolved by 2-D gel. The expressions of polypeptides were further quantified and characterized by their coordinate molecular mass, pI, and expression time course. The expression patterns of protein polypeptides in TNG67 were significantly affected by high temperature. But in TC(N)1 the expression patterns were sensitive to low temperature. Expression of near 33 polypeptides in TNG67 and near 32 polypeptides in TC(N)1 could be regulated by temperature. During endosperm development the amounts of

16 polypeptides in TNG67 and 14 in TC(N)1 were increased. And the level of 7 polypeptides in TNG67 and 6 in TC(N)1 were decreased during endosperm development. We selected some spots which had significant difference between each treatment. The sequences and functions of these endosperm proteins were identified.

Keywords: rice; storage protein; temperature; rice grain quality.

二、計畫緣由與目的

台灣稻米的生產，隨著生活及消費水準的提昇，漸漸的將生產和消費習性由量轉變為質，因此現今稻作生產強調良質米的推廣及栽培。良質米除了需要有優良的品種外，有需要適當的環境條件配合，方能生產高品質的米。

在環境因素中，穀粒充實期不適當的溫度常導致水稻低產，且更降低了米粒的品質，就以往的研究報告指出，水稻穀粒充實期間的溫度對穀粒產量及米質關係最為密切(稻津 1979、1990; Tamaki *et al.* 1989a、b、c)。台灣的一、二期稻作生育溫度截然不同，稻米品質也有差異，兩期稻作分別處於高溫(南部一期作)與低溫(中北部二期作)環境。因此，溫度對水稻穀粒充實期的影響，實為重要的研究課題。

米粒中的主要成分如澱粉、蛋白質以及游離脂肪酸等皆易受到環境影響，其成分的改變將影響米粒外觀及食味品質(Tamaki *et al.* 1989a、b、c)。以本省的栽培管理而言，水稻生育溫度隨著地點以及時間的不同，致使一、二期稻作在不同的栽培地穀粒充實期所處的溫度環境差異甚大(盧等 1999)。

水稻穀粒中的蛋白質是主要的組成成分之一，且受到溫度環境的影響相當大，早期水稻穀粒蛋白質的研究多集中於粗蛋白質含量的變化，並指出蛋白質含量與米質呈負相關。但不同種類的貯藏性蛋白質分子與稻米食用、營養及消化品質有不同

的相關性(Jilano 1985; Masumura et al. 1991a、b; Souza et al. 1993; Chrsatil 1992)。

蛋白質是基因表現後的產物，環境因素會影響基因表現。因此，從蛋白質的表現層面上可探討不同環境條件上以及不同的穀粒發育充實期的狀態，若配合上生理上乾鮮重變化、蛋白質含量以及細胞數目的變化的研究分析，可建立環境因素與生理反應在蛋白質表現層面上的關聯性。然而，充實期溫度如何影響穀粒蛋白質表現這一方面的研究報告並不充分，因此溫度與米質關係的研究，需要進行更深入的探討。本論文目的乃針對台灣兩個期作之私稻品種台中在來 1 號及梗稻品種台農 67 號，並運用目前蛋白質分析技術中具高解析度的蛋白質雙向電泳膠體分析(2-dimantion gel)以及最新的 proteomics 技術，配合上穀粒充實期的基礎生理分析，探討不同溫度環境以及各充實生育期間蛋白質表現的差異，建立環境因素與穀粒發育期生理反應在蛋白質表現層面上的關聯。

三、結果與討論

隨著處理溫度愈高，發育期間鮮重的累積愈快，低溫環境下穀粒鮮重的累積速率明顯受到影響。乾重的累積速率與鮮重的變化趨勢相似(圖 1)。水份含量的變化在各溫度處理中，一般皆為發育最早期含量最高，而後逐漸下降。在高溫處理與對照組，期水份含量的變化趨勢相似，但低溫處理的水份含量變化在下降的時序上，有較對照組延遲的現象，為低溫環境會延遲穀粒發育的證據之一。台農 67 號在穀粒發育初期的細胞數目的增加隨著溫度的增高而提高，低溫處理下穀粒的細胞數目增加的速度相當慢，高溫與對照溫度處理的細胞數至發育第 15 天則趨於相同。台中在來 1 號在低溫下細胞數目的增加較慢，且受影響的程度比台農 67 號大，但在高溫處理下細胞數目增加的速率比對照組快，至發育第 15 天細胞數目略高於對照組(圖 2)。

全蛋白質分析的結果顯示，兩品種發育初期隨著發育期的增加，蛋白質逐漸累

積。台中在來 1 號在高溫處理下蛋白質的累積速率加快，低溫處理則蛋白質的累積速率明顯減緩。

本研究將上述兩品種之水稻穀粒發育期在不同溫度環境下的生理反應與各處理之蛋白質電泳圖譜(圖 3)進行分析比對，並依各參試條件具有不同表現量的蛋白質分子依序進行胺基酸序列分析，以判定該蛋白質的功能及其扮演的角色，在水稻穀粒中表現量較大的 39 個蛋白質中，目前已應用 proteomics 的關鍵技術成功的分析了 8 個在各參試條件下具有差異的蛋白質(表 1)。在比對出的 8 個蛋白質中，發現兩群與 amylose 含量有關的 Waxy proteins，其中分子量較大的四個 spots 含量與 anylose 含量呈正相關(圖 4)。由分析結果得知，與直鏈澱粉合成有關的酵素在台中在來 1 號中表現量較台農 67 號高，且會受溫度環境影響。合成 Glutelins 的前驅物亦會在低溫環境中延遲累積。台中在來 1 號開花後第 15 天於高溫環境中有大量的熱休克蛋白質累積，此結果顯示各種不同功能的蛋白質分子在各發育時期與各溫度環境下，其累積量與累積的時序上會有不同程度的差異。

四、計畫成果自評

本研究內容與原定計畫目標一致，本試驗為兩年期的研究計劃，目前已掌握關鍵的 proteomics 技術，順利應用於水稻穀粒在不同溫度環境因子下之蛋白質雙向電泳圖譜的差異分析。初步以完成六個具有表現差異的蛋白質分子之序列分析與比對，並得知各分子在水稻基因組中的位置及其可能的功能。

目前已知在日本型與印度型品種，在各穀粒發育期於不同溫度環境下的蛋白質差異表現，藉由 proteomics 的技術將各具差異表現的蛋白質一一進行功能分析，提供水稻基礎的蛋白質圖譜分析研究，判定各蛋白質在水稻穀粒發育中所扮演的角色，以供作將來育種與分子操作上的重要參考指標。

本研究室目前正針對上述結果進行整理，並繼續分析未分析的蛋白質，預期將發表在相關期刊上，水稻穀粒proteomics的分析，除可供本研究室進一步研究其與溫度環境間的關係，也可提供給相關研究人員做進一步與稻米品質相關的探討。

五、參考文獻

1. 稻津 脩。1990。米品質作物學。良質味品種特性栽培。日作紀 59：611-615。標準計測方法。1988。日本食糧廳。東京，日本。
2. 盧虎生。1999。溫度對水稻穀粒充實發育及稻米品質的影響。環境與稻作生產 p.106-118。台灣省農業試驗所中華農業氣象學會。
3. Chrastil, J. 1992. Correlations between the physicochemical and functional properties of rice. J. Agric. Food Chem.40:1683-1686.
4. Juliano, B.O. 1985. Biochemical properties of rice. In B.O. Juliano, ed, Rice : Chemistry and Technology. American Assoc. of Cereal Chemists. USA, pp.175-197.
5. Masumura, T., N. Mitsukawa, K. Tanaka, and S. Fujii. 1991. Rice storage proteins : Genetic analysis of accumulation process. In Biotechnology in Agriculture and Forestry (ed by Y. P. S.Bajaj) Vol 14, pp.495-507.
6. Souza, S.R., E.M.L.M. Stark, and M.S. Fernandes. 1993. Effects of supplemental-nitrogen on the quality of rice proteins. J. Plant Nutr. 16:1739-1751.
7. Tamaki, M., M. Ebata, T. Tashiro, and M. Ishikawa. 1989. Physocoecological studies on quality formation of rice kernel. II. Changes in quality of rice kernel during grain development. Jpn. J. Crop Sci. 58:659-663.

六、圖表

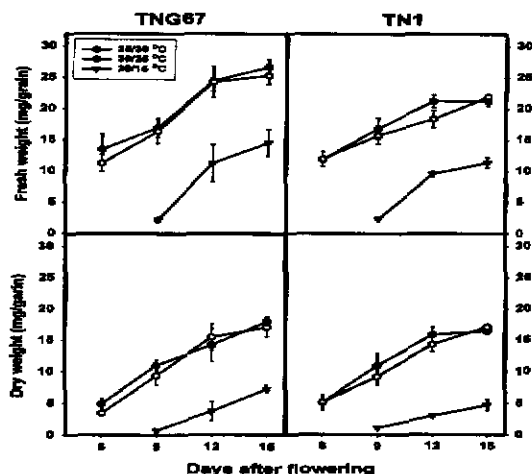


圖 1. 台農 67 號與台中在來 1 號於水稻開花後第六、九、十二、十五天，於不同溫度處理下穀粒鮮重與乾重的變化。

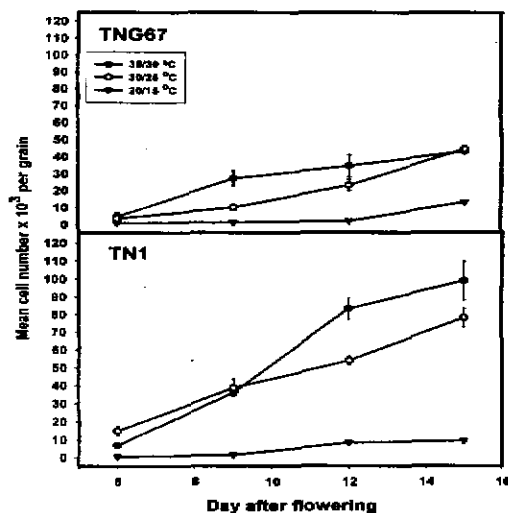


圖 2. 台農 67 號與台中在來 1 號於水稻開花後第六、九、十二、十五天，不同溫度處理下穀粒細胞數目的變化。



圖 3. 台農 67 號與台中在來 1 號於水稻穎果開花後第 12 天之電泳圖譜，箭號表示已定序的蛋白質依其分子量由大到小排列為 1 至 6 號。

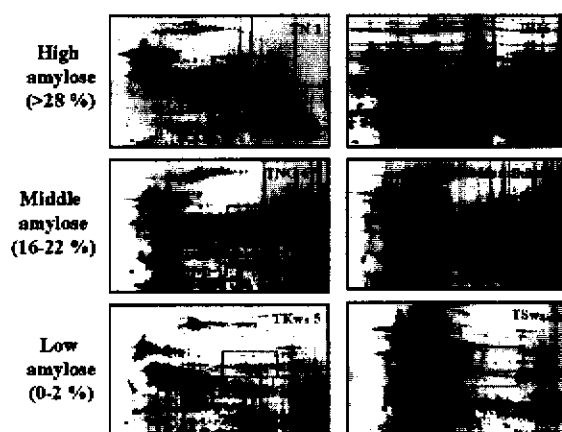


圖 4. 高 amylose 品種:台中在來 1 號 (TN1)、IR 36。中 amylose 品種:台農 67 號 (TNG 67)、越光(Koshihikari)。低 amylose 品種:台梗糯 5 號 (TKwx 5)、台秈糯 2 號(TSWx 2)之 Waxy proteins 2D 分布。

表 1：雙向電泳分析水稻穀粒之 8 個在各參試條件下具有顯著表現差異的蛋白質分子。
表中顯示蛋白質編號、分子量與等電點，蛋白質種類與符合之片段比例。

Spot Number	pI	Kd/Mr	Protein identified	Accession number (NCBI)	% of sequence covered by amino acid count
5	5.3	57.4/48.0	Enolase	Q42971	36.8%
6	5.8	62.6/66.5	Rexmont GBSS (Waxy) protein	AAF72561	47.0%
7	5.4	51.5/66.5	Rexmont GBSS (Waxy) protein	AAF72561	24.1%
8	5.4	58.7/51.7	UDPGase	AAF62555	8.6%
2	5.1	74.7/73.5	dnaK-type molecular chaperone BiP	T03581	47.5%
3	4.9	62.6/33.4	Pdi mRNA for protein disulfide isomerase	BAA92322	61.1%
1	4.8	78.1/EST	Gerrn shoot cDNA clone S11020_8A	AU070324	1.8%
4	5	64.0/64.1	CDNA clone E60817_3A	C74910	8.7%