

葉綠素螢光作為番石榴低溫逆境指標之評估

何美慶¹⁾ 林慧玲²⁾

關鍵字：番石榴、低溫逆境、葉綠素螢光

摘要：面對全球氣候變遷日益嚴重，寒流等極端氣候出現頻率加劇，於育種或選種中快速有效的篩選出耐寒種原相當重要。利用光合作用對溫度逆境相當敏感的特性，本試驗監測16種番石榴品種遇低溫逆境後的葉片葉綠素螢光參數Fv/Fm值之變化，以1°C低溫48小時後回溫25°C中2小時的溫度篩選條件，選出耐低溫品種'榕葉'、'巴基斯坦'，與低溫敏感品種'世紀'，並進一步探討這些品種於低溫逆境中其他生理指標表現。經測定結果顯示，不耐低溫品種'世紀'於低溫處理回溫後其電解質滲漏率、呼吸率、丙二醛含量較耐低溫品種'巴基斯坦'高，而乙烯生成率顯著受到抑制，花粉於12°C及15°C低溫環境中培養萌芽率與花粉管長度亦顯著降低，'巴基斯坦'品種則在所有測定中變化較小，維持較穩定的狀態。所有生理指標變化趨勢皆與葉綠素螢光Fv/Fm值篩選結果相符，且其兼具高敏感性、非破壞性、簡便之特性，因此葉綠素螢光Fv/Fm可作為番石榴在低溫逆境下篩選之生理指標，加速育種選拔效率。

前 言

低溫逆境為主要影響作物生長、產量及分布範圍的非生物逆境因素之一(Thakur *et al.*, 2010)。隨著寒流等極端氣候變動日益嚴重，將對農業產生不小的衝擊(IPCC, 2007)，尤其對於熱帶與副熱帶低溫敏感作物影響甚巨，即使溫度只是略微下降，也將會造成50%以上的減產(Lukatkin *et al.*, 2012)。番石榴(*Psidium guajava* L.)屬桃金娘科(Myrtaceae)之常綠小喬木或灌木，原生於南美洲的秘魯、墨西哥一帶，現今主要分布於熱帶及亞熱帶地區(Castro-Vargas *et al.*, 2010)，為台灣重要經濟果樹(張和林, 1998)，其最適生長溫度介於23~28°C之間，若開花期間溫度低於23°C著果率會顯著下降，且亞熱帶地區於冬季高溫不

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

足的情況下，很難進行商業生產，從開花至果實成熟所需時間亦會延長(Paull and Duarte, 2011)，面對極端氣候的挑戰，未來可能將會需要藉由育種或引種篩選出適應低溫環境之品種，然傳統育種流程耗費時間長(Hakam *et al.*, 2000)。由於許多植物在經歷低溫後光合作用能力會大幅下降(Allen and Ort, 2001)，且因為葉綠素螢光測定操作簡便、快速、便宜、為非破壞性測定，目前已廣泛運用於評估植物光合作用能力(Gorbe and Calatayud, 2012)，因此本實驗以不同番石榴品種離體葉片進行低溫度逆境處理，監測葉綠素螢光參數Fv/Fm值及其他生理指標的變動、比對相關性，期能藉此評估葉綠素螢光作為番石榴耐低溫逆境篩選指標之可行性。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗材料取自台中市果園與國立中興大學園藝試驗場葡萄中心。番石榴品種包括：位於台中市果園的'榕葉'、'馬來'、'帝王世紀'、'斑葉'、'帝王'、'紅心西瓜'等品種，與來自國立中興大學園藝試驗場的'黃心土拔'、'紅心'、'巴基斯坦'、'黃拔'、'龍鳳'、'寶島蜜拔'、'世紀'、'無籽'、'竹葉'、'水晶'等品種。

二、試驗方法

(一)葉片

選取不同品種的剛完全展開成熟葉片，以蒸餾水略為清洗後，用紙巾輕拭葉片表面上的水分，剪取中段葉片約5公分長度，以黑色奇異筆於葉片中肋左右各畫1個約1cm大小之圓圈，作為之後測量螢光的固定點(葉綠素螢光篩選實驗)，或將葉片從中剪半(其他生理指標測定)。之後將葉片置於含有雙層紙巾與3ml純水的培養皿中，且以每個品種為單位將培養皿放入夾鏈袋中，置入1°C之生長箱。

(二)花粉

於晴天早上7~8點間採集當日盛開之番石榴花朵，將花粉均勻抖落至含有50ppm硼酸、20%蔗糖、8g/L Agar、pH 5.7之培養基的雙凹載玻片上，之後再將雙凹載玻片置於鋪有雙層紙巾，且加入3ml純水的培養皿中維持花粉生長的環境濕度，最後分別培養於12°C、15°C、25°C、30°C之生長箱。

三、調查項目及方法

(一)葉綠素螢光之測定

先以黑布覆蓋經過30分鐘之暗適應(dark-adapted)之後，以攜帶式葉綠素螢光分析儀(portable chlorophyll fluorometer, MiNi-PAM, Walz, Germany)進行葉片上兩標記點的葉綠素螢光測定，儀器藉由特殊光纖(Special Fiberoptic 2010-F)可給予葉片測定光及飽和脈衝光，測得螢光參數Fv/Fm，亦即光系統II在暗適應下的最高光效能(Maximum quantum yield)。

分別於置入 1°C 生長箱前，及葉片處理 1°C 48 小時後，再回溫於 25°C 0~6 小時的過程中，每小時測定 Fv/Fm 之變化。

(二) 電解質滲漏率之測定

將葉片處理低溫 1°C 144 小時後，在回溫於 25°C 期間的 0~3 天，每天以直徑 1.1 公分的打洞器打葉圓片，並迅速將葉圓片以純水沖洗，之後以紙巾擦乾後放入指形瓶中，加入 5ml 的純水，將葉圓片以玻棒壓於指形管底部固定，放入真空抽氣機(Aspirator A-3S, Tokyo Rikakikai Co., Japan)抽氣 3 分鐘，再於 110 rpm 震盪 3 小時後，以電導度計(electrical conductivity meter, SUNTEX, Taiwan)測定初始電導度(initial electrical conductivity, EC0)。之後將指形瓶加蓋，放入 100°C 沸水中煮沸 45 分鐘，最後回溫於 25°C 中冷卻至常溫，測定最大電導度(maximum electrical conductivity, EC1)，並算出電解質滲漏率(Electrolyte leakage, EC(%)) = $EC0/EC1 \times 100$ 及相對受傷率%(Relative injury%, = $\{1-[1-(TEC0/TEC1)]/[1-(CEC0/CEC1)]\} \times 100$ ，T 為 50°C 處理組，C 為 25°C 對照組)。

(三) 乙烯釋放率及呼吸率之測定

將葉片處理低溫 1°C 48 小時後，在回溫於 25°C 期間的 0、2、4、6 小時，以直徑 1.1 公分的打洞器打葉圓片，取 10 片葉圓片放入 25 ml 三角瓶，測量瓶內葉圓片總重量，之後以血清塞密封 6 小時，再使用塑膠針筒抽取 1 ml 瓶內氣體，以氣象層析儀(gas chromatograph, Shimadzu, Model GC-8A)測定，計算乙烯釋放率，單位為 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 。或以紅外線二氧化碳分析儀(IR-analyzer, Maihak, UNOR610)測量二氧化碳濃度，並計算呼吸率，單位為 $\text{ml CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{hr}^{-1}$ ；並進一步換算為呼吸上升指數，公式為：(呼吸率 C - 呼吸率 R) / 呼吸率 C $\times 100$ ，其中 R 與 C 分別代表為處理回溫組與 25°C 對照組。

(四) 丙二醛含量之測定

將葉片處理低溫 1°C 144 小時後，在回溫於 25°C 期間的 0~2 天中，每天秤取每包 0.25 g 的樣本以液態氮固定，冰於 -20°C 凍箱中備用，於後日取出與 3ml 0.1% (w/v) Trichloroacetic acid(TCA)於冰浴下研磨，再於 4°C 下 12,000 \times g 離心 10 分鐘。取 1 ml 上清液，加入 4 ml 的反應試劑(此試劑為含有 0.5% (w/v) Thiobarbituric acid 之 20% (w/v) TCA 溶液)，於 100°C 沸水中加熱 15 分鐘，再迅速移入冰水中冷卻終止呈色反應，待冷卻後以分光光度計(spectrophotometer, Hitachi U-2000)於波長 450 nm、532 nm 與 600 nm 測定每個樣品之吸光值，並計算酯質過氧化物含量，其公式為： $\text{MDA content} = 6.45 (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \text{OD}_{450}$ ，單位為 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ ；並換算為 MDA 相對上升指數公式為： $(\text{MDAC} - \text{MDAR}) / \text{MDAC} \times 100$ ，其中 R 為處理回溫組，C 為 25°C 對照組。

(五) 花粉萌芽率

各培養皿分別置於 25°C、30°C 之生長箱中培養 6 小時，或於 12°C、15°C 之生長箱中培養 24 小時，再以光學顯微鏡觀察花粉萌芽狀況，每個培養基取 5~10 個視野調查，至少調查兩百個花粉，花粉管伸長長度超過兩倍的花粉粒直徑則視為萌芽，最後將所得的花粉

萌芽率換算為花粉發芽下降指數，其公式為： $(\text{最高萌芽率}-\text{該處理溫度之萌芽率})/\text{最高萌芽率}\times 100$ 。

(六) 統計分析

將試驗結果以 SAS 套裝軟體(Statistical Analysis System, Institute Inc.)計算平均值，並利用 ANOVA 進行變方分析(analysis of variance)及最小顯著差異檢定(least significant difference test, LSD)，比較各品種間之差異顯著性。

結 果

以 16 種不同品種的番石榴離體葉片處理 1°C 低溫 48 小時後，測定其葉綠素螢光 Fv/Fm 值，評估耐低溫程度，可知健康的番石榴離體葉片在低溫處理前螢光值約為 0.84~0.79 之間，經過低溫處理後回溫 2 小時，各品種葉片的葉綠素螢光值會出現大幅度的下降狀況，其中'榕葉'及'巴基斯坦'的值最高，分別為 0.79、0.7，與處理前的值相比，下降率僅為 4.19% 與 15.70%，但'世紀'Fv/Fm 值則最低，僅為 0.33，下降率高達 59.24%，顯示經低溫逆境後'榕葉'及'巴基斯坦'的光合作用能力表現仍優於'世紀' (圖 1)，故推測'榕葉'及'巴基斯坦'為耐低溫品種，而'世紀'為低溫敏感品種，而後對後兩個品種進行其他試驗，藉以佐證葉綠素螢光之篩選結果。

'世紀'的電解質滲漏率在低溫 1°C 中 144 小時後升高為 5.36%，顯著高於對照組的 4.46%，但在後續回溫於 25°C 下 0~3 天卻發現'世紀'低溫處理組的電解質滲漏率開始下降，在回溫後第 2 天顯著降至 4.23%，顯著低於對照組，直到第 3 天才恢復至與對照組無顯著差異(表 1)。相反的，'巴基斯坦'低溫處理電解質滲漏率無論在低溫處理結束時或回溫後的狀態皆與對照組無顯著差異，以相對受傷率比較兩品種，'世紀'為 0.95%，顯著高於'巴基斯坦'的 0.15%(圖 2)。

在乙烯生成率部份，'世紀'品種葉片在處理 1°C 48 小時後顯著受抑制，僅剩 $0.07 \mu\text{l C}_2\text{H}_4.\text{kg}^{-1}.\text{hr}^{-1}$ ，為對照組含量的五分之一，'巴基斯坦'則與對照組無顯著差異(圖 3)。反之，'世紀'品種的呼吸率在處理低溫結束後上升至 $476.63 \text{ ml CO}_2.\text{kg}^{-1}.\text{hr}^{-1}$ ，顯著高於對照組，且於回溫 2~4 小時內仍維持高呼吸率狀態，直到回溫 6 小時才與對照組無顯著差異。然而，'巴基斯坦'品種僅在回溫 4 小時出現此狀況，並在 6 小時立即恢復(表 2)，若換算為相對上升指數，則可知回溫 0~6 小時之間'世紀'的上升指數皆高於'巴基斯坦'(圖 4)。

而在低溫處理 144 小時後測定葉片丙二醛含量的變動，'世紀'品種的丙二醛含量在處理一結束後增加至 $10.7 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ，比起對照組的 $6.09 \mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ，有顯著上升的情形，'巴基斯坦'品種與對照組並無顯著差異，兩品種在回溫於 25°C 1 天後葉片丙二醛含量反而下降，直到回溫第 2 天才又再度上升，恢復至與對照組無顯著差異(表 3)；若換算為丙二醛相對上升指數比較兩品種，則不論是低溫處理結束時或回溫 1~2 天的狀況下，'世紀'皆

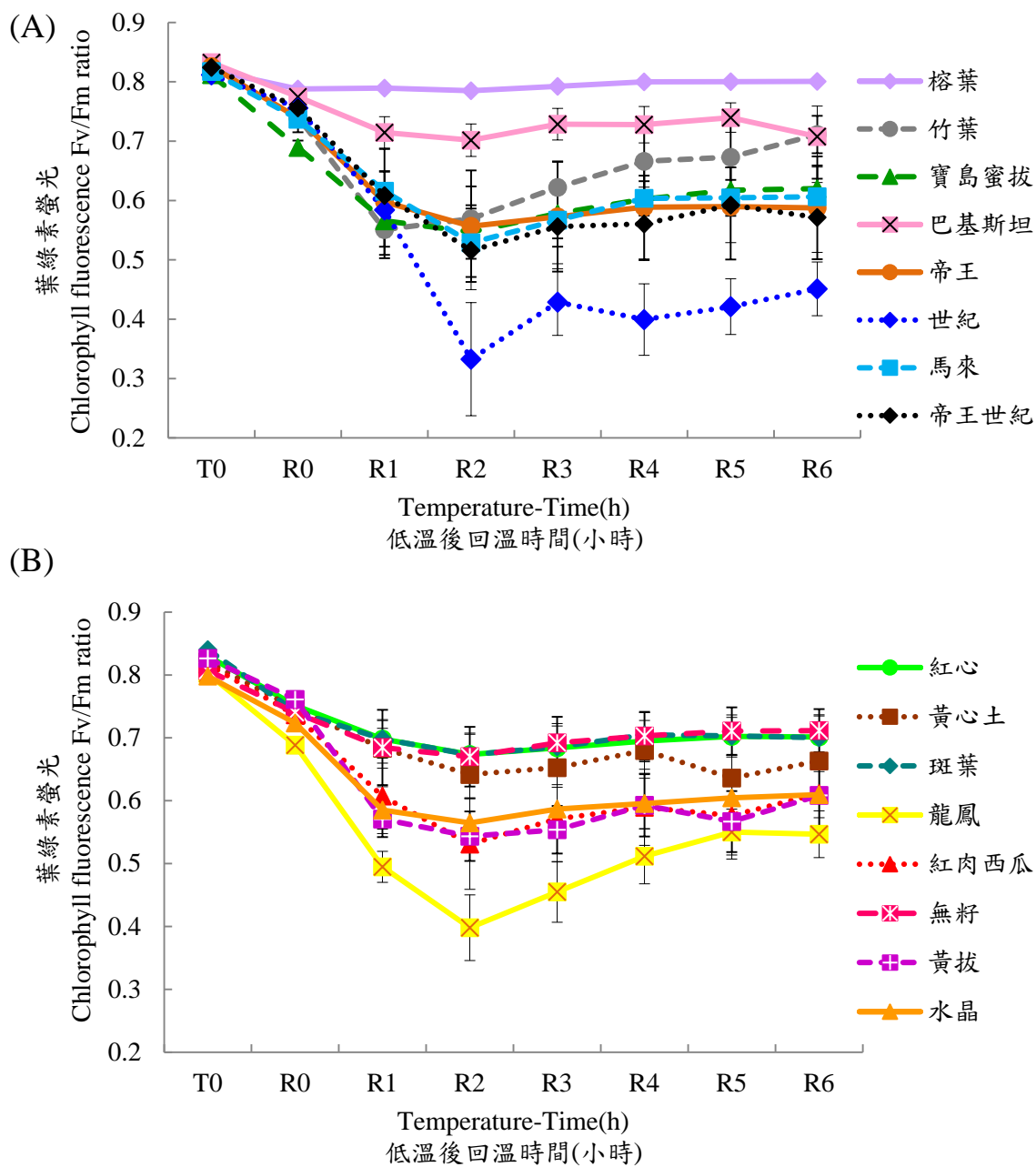


圖 1. 16 種不同品種番石榴離體成熟葉片在 1°C 下 48 小時後回溫 0~6 小時其葉綠素螢光之變化。(A)和(B)為試驗 16 個番石榴品種。T 為低溫 1°C 處理前；R 為 1°C 處理 48 小時後回溫於 25°C 中。

Fig. 1. Change in chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) of guava detached mature leaf during rewarming at 25°C following 1°C treatment for 24 hours .
T is before 1°C treatment, R is returned to 25°C.

多於'巴基斯坦'(圖 5)。

另採集'巴基斯坦'與'世紀'品種之花粉於不同適溫(25°C、30°C)或低溫(12°C、15°C)下培養，適溫下兩品種最高萌芽率依序分別為 82.35%、87.19%。在低溫 15°C 下，雖經過 24 小時的培養，仍會使'世紀'的萌芽率顯著下降至 74.96%，但不會對'巴基斯坦'品種的花粉造成花粉萌芽率的顯著下降，仍可維持在 83.13% 的高萌芽率狀態(表 4)。且當溫度降至 12°C，'巴基斯坦'也仍保有最好的萌芽率，高達 53.59%，約為'世紀'品種萌芽率(8.86%)的 6 倍。相對的，將萌芽率換算成下降指數時，'世紀'在 12°C 下下降指數高達 89.84%，'巴基斯坦'卻只有 34.92%，在 15°C 時'巴基斯坦'下降指數甚至為 0，而'世紀'為 14.03%，顯示低溫對於 '巴基斯坦' 花粉萌芽的影響顯著小於與'世紀'(表 4)。

表 1. '世紀'和'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片在1°C下6天後回溫於25°C下3天電解質滲漏率之變化。

Table 1. Effect of low temperature (1°C) treatment for 6 days then rewarm at 25°C for 3 days on electrolyte leakage in detached mature leaves of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

溫度及品種 Temperature and cultivar	電解質滲漏率 Electrolyte leakage(%)			
	R0	R1	R2	R3
世紀				
25°C	4.46 ± 0.11 bBC ^Z	4.73 ± 0.15 bcAB	4.96 ± 0.07 bA	4.4 ± 0.22 bBC
1°C	5.36 ± 0.07 aA	4.39 ± 0.06 cB	4.23 ± 0.07 cBC	4.53 ± 0.13 bB
巴基斯坦				
25°C	5.11 ± 0.14 aA	5.21 ± 0.14 abA	5.06 ± 0.1 abA	5.57 ± 0.35 aA
1°C	5.25 ± 0.06 aAB	5.68 ± 0.46 aAB	5.59 ± 0.31 aAB	6.08 ± 0.2 aA

R is returned to 25°C.

^ZMeans with same letters in the same column and with same capital letter in the same row are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

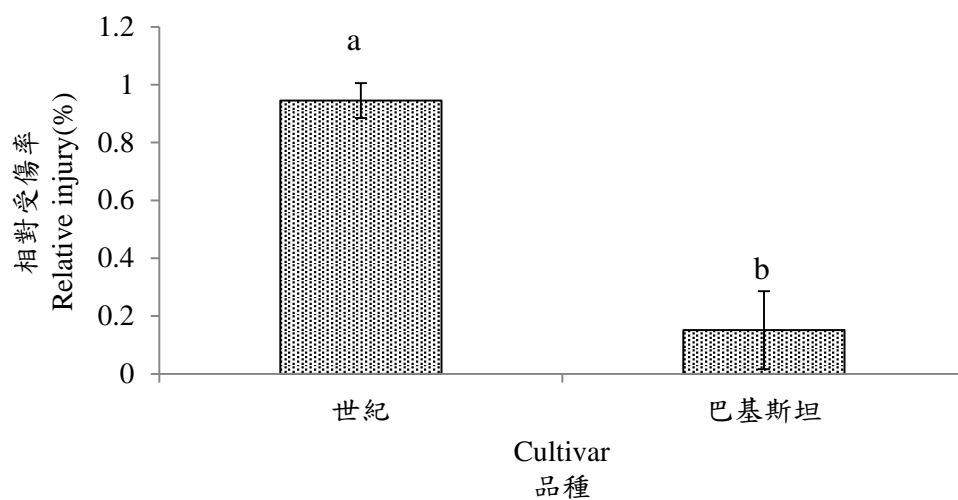


圖 2. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體葉片在1°C培養6天其葉圓片相對受傷率之變化。

Fig. 2. Effect of low temperature (1°C) treatment for 6 days on relative injury of detached mature leaves in 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava .

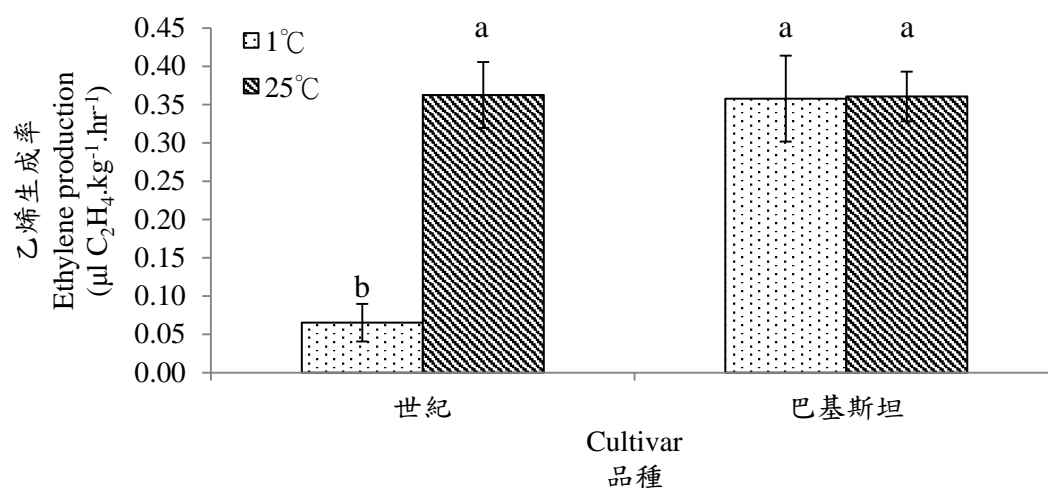


圖 3. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片以1°C處理48 小時後乙烯釋放率的變化。

Fig. 3. Effect of low temperature (1°C) treatment for 48 hours on ethylene production in detached mature leaves of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

表 2. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片在1°C下48 小時後回溫 6小時呼吸率的變化。

Table 2. Effect of low temperature (1°C) treatment for 48 hours then rewarm on respiration rate of detached mature leaves in 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

溫度及品種 Temperature and cultivar	呼吸率 Respiration rate(ml CO ₂ .kg ⁻¹ .hr ⁻¹)			
	R0	R2	R4	R6
世紀				
25°C	332.4 ± 16.3 bB ^Z	296.8 ± 6.3 bC	315.7 ± 9.1 bBC	371.2 ± 2.8 aA
1°C	476.6 ± 12.1 aA	417.3 ± 18.3 aB	463.3 ± 16.0 aA	423.7 ± 19.4 aB
巴基斯坦				
25°C	304.8 ± 15.1 aA	292.9 ± 9.4 aA	283.3 ± 9.5 bA	314.7 ± 19.2 aA
1°C	362.2 ± 27.4 aA	366.5 ± 27.8 aA	356.3 ± 18.2 aA	335.1 ± 8.7 aA

R is returned to 25°C.

^ZMeans with same small letters in the same column and with same capital letter in the same row are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

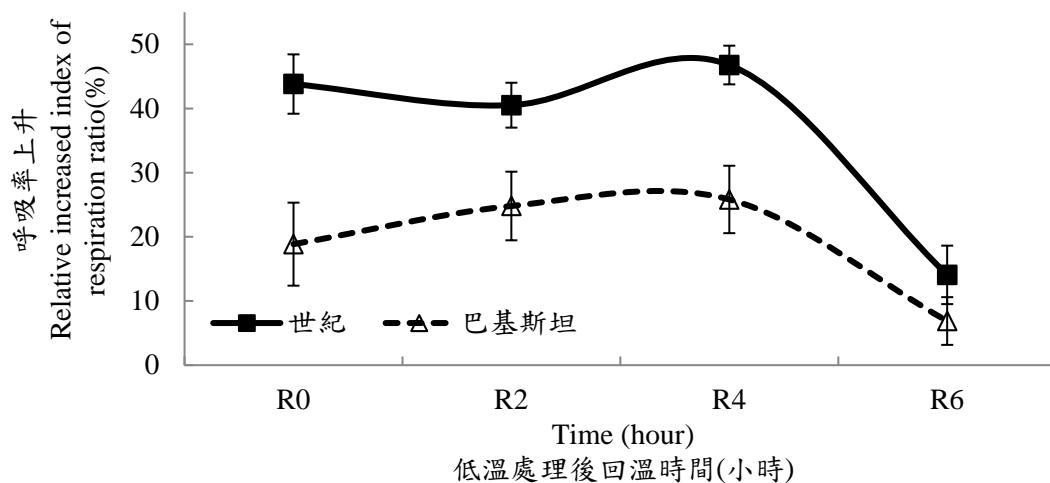


圖 4. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片在1°C下48 小時後回溫 6小時呼吸上升率的變化。

Fig. 4. Effect of low temperature (1°C) treatment for 48 hours then rewarm on relative increased index of respiration rate in detached mature leaves of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

表 3. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片在1°C下6天後回溫 2天丙二醛含量的變化。
Table 3. Effect of low temperature (1°C) treatment for 6 days then rewarm for two days on malondialdehyde in detached mature leaves of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

溫度及品種 Temperature and cultivar	丙二醛含量 Malondialdehyde ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)		
	R0	R1d	R2d
世紀			
25°C	6.09 \pm 1.05 bA	7.32 \pm 0.45 aA	6.2 \pm 0.62 aA
1°C	10.7 \pm 1.44 aA	5.78 \pm 0.53 bB	6.51 \pm 0.18 aB
巴基斯坦			
25°C	4.31 \pm 0.24 aA	4.61 \pm 0.12 aA	4.83 \pm 0.58 aA
1°C	4.47 \pm 0.21 aA	3.43 \pm 0.34 bA	4.25 \pm 0.12 aA

R is returned to 25°C and d is days.

²Means with same small letters in the same column and with same capital letter in the same row are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

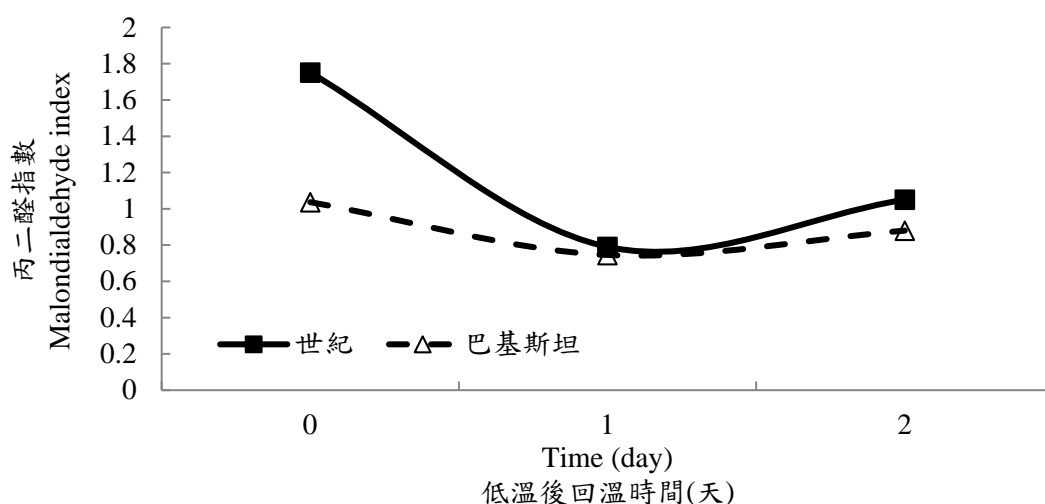


圖 5. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴離體成熟葉片在1°C下6天後回溫 2天丙二醛指數的變化。

Fig. 5. Effect of low temperature (1°C) treatment for 6 days then rewarm for two days on malondialdehyde index in detached mature leaves of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava.

表 4. '世紀'與'巴基斯坦'番石榴花粉於不同低溫下花粉發芽率及花粉發芽下降指數之變化。

Table 4. The pollen germination rate and decline index of pollen germination of 'Shy-ji' and 'Pakistani' guava at different low temperatures.

溫度 Temperature	12°C ^X	15°C ^X	25°C ^W	30°C ^W
品種 Cultivar	花粉萌芽率 pollen germination rate (%)			
世紀	8.86±0.70 cC ^Y	74.96±1.34 bcB	87.04±1.99 abA	87.19±1.39 bA
巴基斯坦	53.59±6.00 aB	83.13±1.17 aA	80.34±1.09 cA	82.35±0.94 cA
品種 Cultivar	花粉萌芽下降指數 decline index of pollen germination (%) ^Z			
世紀	89.84	14.03	0.17	-
巴基斯坦	34.92	0.00	2.44	-

^WIncubation for 6 hours.

^XIncubation for 24 hours.

^YMeans with same small letters in the same column and with same capital letter in the same row are not significantly different by Fisher's LSD test at 5% level.

^Z花粉發芽下降指數 = (最高萌芽率-該處理溫度之萌芽率) / 最高萌芽率×100。

討 論

一般而言，在低於 5~7°C 的溫度下，熱帶植物無法進行光合作用，而在 0°C 以下溫帶與寒帶植物光合作用速率亦甚低，這是由於低溫逆境下會造成葉綠素含量減少、光合產物移動受阻與類囊膜體結構發生改變(邱等, 2000)，其中於類囊膜體上包括: PS II、PS I、電子傳遞鏈(Allen and Ort, 2001)、卡爾文循環關鍵酵素(Lukatkin *et al.*, 2012) 皆受到抑制，因此，一般會以葉綠素螢光參數 Fv/Fm 來評估 PS II 於低溫逆境中受傷的狀態(Allen and Ort, 2001)。從本實驗結果中，各品種葉片於 1°C 低溫處理結束後，葉綠素螢光會顯著低於處理前的螢光值(圖 1)，與番茄(Jung and Steffen, 1997)、9 種阿拉伯芥植物(Mishra *et al.*, 2011) 於低溫下 Fv/Fm 會下降的趨勢相同。但較大幅度的螢光值(Fv/Fm)下降狀況發生於回溫之後的 2 小時左右，與青花菜儲藏於 18°C 3 天後回溫，Fv/Fm 顯著下降的狀況一致(De Eil and Toivonen, 1999)。由於稻米、大麥、黑麥(姚等, 2002)、阿拉伯芥植物(Mishra *et al.*, 2011) 的實驗中皆顯示不耐低溫品種經低溫處理後其 Fv/Fm 值會顯著下降，耐低溫品種則下降較少，或與處理前無顯著差異，因此本實驗於 16 個品種中選出葉綠素螢光 Fv/Fm 值下降率最小的'榕葉'與'巴基斯坦'為耐低溫品種，及下降率最大的'世紀'為低溫敏感品種(圖 1)。此結果與陳(1984)所提到'榕葉' (草莓番石榴)耐寒性表現較一般番石榴品種優的結果相

符。

低溫會降低細胞膜流動性，並由柔嫩的液態晶體(liquid crystalline)狀態變成固態膠體(solid-gel)狀態，降低膜對溶質通透性的選擇能力，通透性增加(邱等，2000)。因此'世紀'於 1°C 連續處理 6 天後電解質滲漏率顯著提高(表 1)表示膜體受低溫影響完整性降低，與小黃瓜(Wright and Simon, 1973)、馬鈴薯(Lindstrom and Carter, 1985)之葉片實驗結果相符。而在回溫後其電解質滲漏率之恢復則表示隨著回溫後膜體變回液態晶體，膜的完整性亦恢復，1°C 低溫處理條件還不至於造成不可逆的傷害。比較兩品種之間的差異，1°C 處理 6 天後'世紀'的相對受傷率顯著高於'巴基斯坦'(圖 2)，由於菜豆、番茄(Noble, 1974)、水稻(Huang and Guo, 2005)實驗中皆顯示，耐低溫品種比低溫敏感品種的電解質滲漏率上升較緩和或無顯著上升之現象，因此判定'巴基斯坦'為耐低溫品種，'世紀'為低溫敏感品種。

已知乙烯生合成途徑中，ACC 生合成及 ACC 合成酶活性在低溫下皆會受到抑制(Tanino and McKersie, 1985)，因此本實驗中，'世紀'品種離體葉片經處理 1°C 48 小時後，乙烯生成顯著受抑制，為對照組含量的五分之一(圖 3)，與菜豆(Field, 1981)、小麥(Tanino and McKersie, 1985)葉片結果相符，顯示其 ACC 生合成及 ACC 合成酶活性極可能會受到低溫的影響，且因'巴基斯坦'與對照組無顯著差異，可知'世紀'受影響較'巴基斯坦'顯著(圖 3)。

在低溫處理後回溫狀態下，許多作物會出現呼吸率大幅提高的狀況(Wang, 1990)，造成此狀況的原因為：(1) 一部分呼吸作用上升是因為植物體本身由低溫移到高溫中的正常反應表現(Lukatkin *et al.*, 2012)。(2) 由於先前的低溫傷害造成粒線體中氧化磷酸化發生不耦合，導致代謝功能呈現無法恢復的異常狀態，或者不完全氧化的中間代謝物大量累積(Lukatkin *et al.*, 2012)。當溫度回升後，細胞為了消耗中間產物因而加速代謝(Mencarelli *et al.*, 1983)。(3) 經低溫刺激後抗氰呼吸(cyanide-resistant respiration)啟動運作(Kiener and Bramlage, 1981)。本實驗中，'世紀'與'巴基斯坦'兩品種呼吸率分別在回溫後 0 小時及 4 小時顯著上升(表 2)，與青花菜(DeEll and Toivonen, 1999)、小黃瓜(Wright and Simon, 1973)葉片實驗結果一致。此狀況會持續維持直到回溫後 6 小時兩品種才會都下降至與對照組無顯著差異(表 2)，與小黃瓜實驗結果相同，顯示此程度的低溫處理並不會對細胞造成永久性的傷害(Wang, 1990)。比較兩個品種，顯示'世紀'於回溫後立即上升，呼吸率上升至恢復的時間長於'巴基斯坦'(表 2)，且過程中呼吸率相對上升指數亦高於'巴基斯坦'(圖 4)，顯示受低溫影響較大。由於根據 Yamori (2009)指出，耐低溫植物在溫度變動的情況下，其葉片的呼吸作用較低溫敏感作物能維持穩定的狀況，據此可知'巴基斯坦'為耐低溫品種，而'世紀'則為低溫敏感品種。

由於低溫會造成粒腺體膜結構改變(邱等，2000)，影響呼吸作用(Wang, 1990)，亦會造成類囊膜上的 PS I、PS II、電子傳遞鏈受抑制，光合作用失序(Lukatkin *et al.*, 2012)，因而產生 ROS，造成膜的酯質過氧化作用，產生丙二醛(林，2000)。「世紀」品種葉片以 1°C 低溫處理 144 小時後丙二醛含量會顯著高於對照組(表 3)，與葡萄(Zhang *et al.*, 2005)、咖

啡幼苗(Queiroz *et al.*, 1998)的趨勢一致。兩品種比較，'世紀'品種在低溫處理結束後顯著上升，'巴基斯坦'則無顯著差異(表 3)，且於回溫 0~2 天的期間'世紀'的丙二醛指數皆高於'巴基斯坦'(圖 5)，顯示膜體受到酯質過氧化的情形較為嚴重，為低溫敏感品種，而'巴基斯坦'則為耐低溫品種。此結果與不同耐低溫特性水稻品種的實驗結果相符(Huang and Guo, 2005)。而於後續回溫 1 天後，兩品種的丙二醛含量皆下降至顯著低於對照組的狀況(表 3)，可能是由於細胞生理或抗氧化酵素活性恢復後開始進行修復所致。

花粉活力與表現對於植物有性生殖的成功與否扮演重要角色，因植物需要使花粉與胚珠受精後才可得到種子(Distefano *et al.*, 2012)。本試驗中，兩品種的最高萌芽率(表 4)與 Ray (2002)與劉(2004)的番石榴花粉實驗結果相似。而在 15°C 下，'巴基斯坦'品種的花粉於培養 24 小時後與 25~30°C 萌芽率並無差異，表示 15°C 低溫並不會影響其萌芽率，在 12°C 下'巴基斯坦'萌芽率下降指數亦為最少(表 4)，顯示'巴基斯坦'為耐低溫品種。然而'世紀'花粉萌芽率於低溫 12°C 與 15°C 培養皆會顯著下降(表 4)，與柑橘(Distefano *et al.*, 2012)、番石榴(劉, 2004)、荔枝(Stern and Gazit, 1998)結果相似，在 12°C 中僅剩 8.86%，為 '巴基斯坦'品種的 1/6 倍(表 4)，受低溫影響大。

上述 5 種生理指標皆顯示'巴基斯坦'為耐低溫品種，'世紀'為低溫敏感品種，與離體葉片葉綠素螢光 Fv/Fm 篩選結果相符，因此葉綠素螢光可作為番石榴耐低溫逆境之良好指標。比較各種指標對低溫逆境的敏感性，以低溫 1°C 處理 48 小時後回溫 2 小時造成'世紀'品種葉綠素螢光值顯著下降，與幾乎無變動的'巴基斯坦'、'榕葉'兩品種相比有顯著差異(圖 1)。然而，電解質滲漏率(表 1)與丙二醛含量變動(表 3、圖 5)需進一步將低溫處理延長至 6 天才會造成'世紀'品種顯著提升。雖然'世紀'品種之乙烯生成率、呼吸率於回溫後分別立即產生抑制與提高的現象(圖 3~4、表 2)，可藉此與'巴基斯坦'品種區分出差異性，反應時間比葉綠素螢光早，而花粉萌芽率於 15°C 中培養 24 小時即會造成顯著的抑制(表 4)，區分出'巴基斯坦'之耐寒性，顯著高於'世紀'，但三種測定所需花費時間長且費工。因此整體而言，除了花粉萌芽率之外，葉綠素螢光為所有指標中最為敏感的指標，且其為非破壞性指標，可快速測定，具簡便、省時之特性，可在早期檢測出逆境並進行防範，其他指標皆為破壞性測定指標，因此可知葉綠素螢光測定為 6 種生理指標中最適合作為篩選番石榴耐低溫性狀的生理指標，可加速育種選拔效率，改善傳統育種耗時費工之缺點。

參 考 文 獻

- 邱麗慧、王玉麒、詹明才。2000。植物與溫度逆境的交感作用 I、植物低溫逆境的傷害。科學農業 48(9-10):254-258。
- 林傳琦、高景輝。2000。植物之過氧化性傷害與鹽分逆境。科學農業 48: 244-248。
- 姚銘輝、盧虎生、朱鈞。2002。葉綠素螢光與作物生理反應。科學農業 50(1-2):31-41。

- 陳敏祥。1984。臺灣番石榴之栽培管理與產期調節。果樹產期調節研討會專集。臺中區農業改良場。pp. 87-92。
- 張哲嘉、林宗賢。1998。台灣番石榴生產之現況與改進。中國園藝 44(2): 116-124。
- 劉玠吟。2004。無籽番石榴之倍體數、花粉活力及雜交稔實率。屏東科技大學農園生產系碩士論文。93pp。
- Allen, D. J. and D. R. Ort. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci.* 6(1):36-42.
- Castro-Vargas, H.I., L.I. Rodríguez-Varela, S.R.S. Ferreira, and F. Parada-Alfonso. 2010. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *J. Supercrit. Fluids* 51(3):319-324.
- DeEll, J.R. and P.M.A. Toivonen. 1999. Chlorophyll fluorescence as an indicator of physiological changes in cold-stored broccoli after transfer to room temperature. *J. Food Sci.* 64(3):501-503.
- Distefano, G., A. Hedhly, G.L. Casas, S.L. Malfa, M. Herrero, and A. Gentile. 2012. Male-female interaction and temperature variation affect pollen performance in Citrus. *Scientia Hort.* 140:1-7.
- Field, R.J. 1981. The effect of low temperature on ethylene production by leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 47:215-223.
- Gorbe, E., and A. Calatayud. 2012. Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: A review. *Scientia Hort.* 138:24-35.
- Hakam, N., S.Khanizadeh, J.R. DeEll, and C. Richer. 2000. Assessing chilling tolerance in roses using chlorophyll fluorescence. *HortScience* 35(2):184-186.
- Huang, M. and Z. Guo. 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biol. Plant.* 49(1):81-84.
- IPCC. 2007. *Climate change 2007, impacts, adaptation and Vulnerability*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 976pp.
- Jung, S., and K.L. Steffen. 1997. Influence of photosynthetic photon flux densities before and during long-term chilling on xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence quenching in leaves of tomato (*Lycopersiconhirsutum*). *Physiol. Plant.* 100: 958-966.
- Kiener, C.M. and W.J. Bramlage. 1981. Temperature effects on the activity of the alternative respiratory pathway in chill-sensitive *Cucumissativus*. *Plant Physiol.* 68:1474-1478.
- Lindstrom, O.M. and J.V. Carter. 1985. Injury to potato leaves exposed to subzero temperatures in the absence of freezing. *Planta* 164(4):512-516.
- Lukatkin, A.S., A. Brazaityte, C. Bobinas, and P. Duchovskis. 2012. Chilling injury in

- chilling-sensitive plants: A review. *Agriculture* 99(2):111-124.
- Mencarelli, F., W.J. Lipton, and S.J. Peterson. 1983. Responses of 'Zucchini' squash to storage in low-O₂ atmosphere at chilling and nonchilling temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 884-890.
- Mishra, A., K.B. Mishra, I.I. Höermiller, A.G. Heyer, and L. Nedbal. 2011. Chlorophyll fluorescence emission as a reporter on cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Signal Behav.* 6(2):301-310.
- Noble, P.S. 1974. Temperature dependence of the permeability of chloroplast from chilling-sensitive and chilling resistant plants. *Planta* 115(4):369-372.
- Paull, R.E. and O. Duarte. 2011. Guava. In: *Tropical fruits volume 2*, Paull and Duarte(eds.), CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp. 91-122.
- Queiroz, C.G.S., A. Alonso, M. Mares-Guia, and A.C. Magalhães. 1998. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biol. Plant.* 41(3):403-413.
- Ray, P.K. 2002. Guava. In: *Breeding tropical and subtropical fruits*, Ray (ed.), Narosa Publishing House, India, pp. 143-155.
- Stern, R.A., and S. Gazit. 1998. Pollen viability in lychee. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(1):41-46.
- Tanino, K.K. and B.D. McKersie. 1985. Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.* 63(3):432-436.
- Thakur, P., S. Kumar, J. A. Malik, J.D. Berger, and H. Nayyar. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 67:429-443.
- Wang, C.Y. 1990. *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 313pp.
- Wright, M. and E.W. Simon. 1973. Chilling injury in cucumber leaves. *J. Exp. Bot.* 24(2): 400-411.
- Yamori, W., K. Noguchi, K. Hikosaka, and I. Terashima. 2009. Cold-tolerant crop species have greater temperature homeostasis of leaf respiration and photosynthesis than cold-sensitive species *Plant Cell Physiol.* 50(2): 203-215.
- Zhang, J.H., W.D. Huang, Y.P. Liu, and Q.H. Pan. 2005. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under cross-temperature stresses. *J. Integr. Plant Biol.* 47(8):959-970.

Chlorophyll Fluorescence as an Indicator to Evaluate Low Temperature Stress of Guava (*Psidium guajava* L.)

Mei-Ching Ho ¹⁾ Huey-Ling Lin ²⁾

Key words: Guava, Low temperature stress, Chlorophyll fluorescence

Summary

With extreme weathers getting more severe and the frequency of low temperature stress increasing, screening for cold tolerance genotypes using rapid and effective methods is very important in the guava breeding and selection process. Because photosynthesis is very sensitive to temperature, it was used in these experiments to detect the changes in chlorophyll fluorescence parameters (Fv/Fm) of leaves of sixteen guava cultivars exposed to low temperature stresses. By treating the leaf with 1°C for 48 hours then rewarming at 25°C for 2 hours, we selected cold-tolerant cultivars 'Strawberry', 'Pakistani' and cold-sensitive cultivar 'Shy-ji' for further screening to investigate whether other physiological responses of these cultivars undergoing temperature stress have correlation with chlorophyll fluorescence or not. The results indicated that in low temperature stress experiments, the electrolyte leakage, respiration rate and malondialdehyde content of the cold-sensitive cultivar 'Shy-ji' were elevated significantly after rewarming at 25°C. In contrast, the ethylene production of 'Shy-ji' was inhibited much more than 'Pakistani'. Pollen germination and pollen tube length at 12°C and 15°C also decreased more than 'Pakistani'. Data showed that 'Pakistani' has greater temperature homeostasis in all physiological responses than 'Shy-ji'. The results indicated that guava leaves underwent cold stress experiments, physiological responses all showed good positive correlation with chlorophyll fluorescence (Fv/Fm). In addition, determination method of Chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) is high-sensitive, non-destructive, simple and rapid. Overall, the result indicated that chlorophyll fluorescence can be used as a physiological indicator in determining low temperature stress tolerance of guava, and can be applied to increase the efficiency of breeding selection.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Corresponding author.

