

## 評估葉綠素螢光作為荔枝對高溫逆境 忍受性指標之研究

蔡宜君<sup>1)</sup> 謝慶昌<sup>2)</sup>

關鍵字：荔枝、高溫逆境、葉綠素螢光

**摘要：**近年來全球氣候異常且極端氣象發生的頻率與強度也有增加的現象，對於農業生產與作物栽培產生了莫大的衝擊與影響，為因應這些異常的氣候，選育出具有耐熱潛力的作物基因型是相當重要的，而在果樹育種的過程中，如可建立一快速且簡單的篩選方法，對於育種工作將會有很大的幫助。葉綠素螢光測定的方法簡單、快速、靈敏、機動性高且為非破壞性，故本試驗便以葉綠素螢光做為一篩選指標，針對荔枝包含'台農1號'、'台農3號'、'台農5號'、'台農7號'、'玉荷芭'、'糯米糍(73-S-20)'、'桂味'、'黑葉'及'三月紅'共9個荔枝品種成熟離體葉片，進行高溫50°C處理，初步篩選出較耐熱品種'糯米糍'及較不耐熱品種'台農1號'，進行後續的試驗。高溫處理的結果顯示荔枝葉片電解質滲漏率大多呈現不規則的變化，推測可能與葉片質地有關，但若與未處理葉片相比計算電解質滲漏指數，則皆以耐熱品種低於不耐熱品種，說明高溫逆境對於不耐熱品種仍會造成其電解質滲漏的現象加劇。乙烯生成會受到高溫抑制，且耐熱品種乙烯生成速率下降較不耐熱品種來得慢；在丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的部分，不耐熱品種其含量會隨處理時間顯著下降，耐熱品種則會先升後降。綜合各生理指標的表現，與葉綠素螢光的篩選結果大致相符，因此葉綠素螢光確實可做為荔枝在高溫逆境下的生理指標。

---

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副教授，通訊作者。

## 前 言

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)屬於無患子科之亞熱帶常綠果樹(鄧等, 2005), 原產於中國華南, 主要產區分布於南北緯 20-30 度之間, 約有 95% 的主要商業栽培集中於東南亞及亞洲地區, 在台灣荔枝的栽培早在 300 年前就開始發展(鄧等, 2005), 至今荔枝已成為台灣重要的經濟果樹之一。但根據近藤和盧(2009)指出, 台灣過去百年來氣溫上升的速率遠大於全球平均值, 顯示台灣長期以來暖化的趨勢較全球平均值來得高, 更需重視暖化以及氣候異常的問題。作物感受到逆境傷害時, 會啟動相對應的生理機制以抵抗逆境, 栽培者或育種家若能查知此變化, 以提早做出因應或是品種的篩選, 相信將有助於作物品種的改良與栽培。葉綠素螢光可有效的偵測植物光合作用性能(Maxwell and Johnson, 2000), 使用簡單、快速且為非破壞性, 無論是於實驗室或是田間都可使用, 具相當高的方便性(Baker and Rosenqvist, 2004; Ogaya et al., 2011), 本試驗便以葉綠素螢光評估高溫逆境對荔枝葉片的影響, 藉此尋求一理想的評估逆境傷害程度的方法, 以期將此技術應用在生理與植物育種上, 加速荔枝耐高溫逆境品種之選育。

## 材 料 與 方 法

### 一、試驗材料

本試驗材料係採自嘉義農業試驗所所栽培之荔枝離體成熟葉片共 9 種品種, 分別為 '台農 1 號'、'台農 3 號'、'台農 5 號'、'台農 7 號'、'玉荷苞'、'糯米糍'、'桂味'、'黑葉' 及 '三月紅'。

### 二、試驗方法

先用自來水清洗殘留於葉片上之髒汙或蟲卵後, 以純水再漂洗一次。隨後以紙巾輕拭葉片表面上的水分, 剪去葉尖與葉基, 留下面積約 5×5 cm<sup>2</sup> 的大小, 將裁剪後的葉片放置鋪有兩張紙巾且加入 3 ml 純水的塑膠培養皿中, 以 50°C 做為篩選溫度進行高溫處理。

### 三、調查項目及方法

#### (一) 葉綠素螢光之測定

以麥克筆於葉脈兩側畫上直徑約 1.5 cm 的圓形, 做為後續測定葉綠素螢光之部位。待葉片皆清洗與裁剪置於培養皿後, 以黑色絨布完全覆蓋, 進行暗適應(dark-adapted) 30 分鐘後, 使用攜帶式葉綠素螢光分析儀(portable chlorophyll fluorometer, MiNi-PAM, Walz, Germany)於事前標記之葉片表面進行葉綠素螢光值之測定。其探針可藉由特殊光纖(special fiberoptic 2010-F)提供測定光及飽和脈衝光, 並計算光系統 II 之活性, 以 Fv/Fm 表示之。

#### (二) 電解質滲漏率之測定

高溫處理過程中每 1 小時取出適量葉片以直徑 1 cm 之打孔器取 5 片葉圓片置入 EC

瓶中，加入 5 ml 純水後將 5 片葉圓片調整為相疊狀態，以玻璃棒壓住使葉圓片沉於瓶底，置入真空抽氣裝置(aspirator, A-3S. Tokyo Rikakikai Co., LTD. Japan)抽氣 30 秒後，以 100 rpm 震盪 3 小時，隨後以電導度計(electrical conductivity meter, SUNTEX, Taiwan)測定初始電導度(initial electrical conductivity, EC0)，再將 EC 瓶冰存於-20℃至少 1 天，目的是為了以冰晶破壞其膜體系統。取出直接震盪 3 小時同時進行解凍動作，再度測定其最大電導度(maximum electrical conductivity, EC1)。計算公式：Electrolyte leakage (%) = (EC0/EC1)×100%。另以處理前之電解質滲漏率為分母，每次調查之電解質滲漏率為分子，計算處理後荔枝離體葉片電解質滲漏率與未處理葉片之差異，稱為電解質滲漏率指數(Index of electrolyte leakage)，以% of control 為單位。

### (三) 乙烯釋放率之測定

高溫處理過程中每 1 小時取出適量葉片以直徑 1 cm 之打孔器取 5 片葉圓片，秤重後置於體積已知的 25 ml 三角瓶中，於常溫環境下以血清塞密閉 2 小時後，抽取 1 ml 瓶內氣體，以氣相層析儀(gas chromatograph, Shimadzu. Model GC-8A-FID)測定其乙烯濃度，計算乙烯釋放率。公式為： $\{[(\text{樣品 peak 長度} \times \text{衰減倍率}) - (\text{空氣 peak 長度} \times \text{衰減倍率})] \div \text{標準品長度} \times \text{衰減倍率}\} \times \text{標準品濃度}(\text{ppm}) \times 10 \div \text{三角瓶體積}(\text{L}) \div \text{葉圓片總重}(\text{g}) \div \text{密封時間}(\text{hr})$ 。單位以  $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$  表示之。

### (四) 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量之測定

高溫處理過程中每 2 小時取出適量葉片剪取 0.2 g 之葉片，以液態氮立即固定樣品，貯放於-20℃之環境下以備後續測定所需。根據 Heath 和 Packer(1968)的方法做些微的調整，高溫處理後的葉片取 0.2 g，加入 5 ml 5% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)溶液於冰浴下研磨，於 4℃下 12000 g 離心 10 分鐘。取 1 ml 上清液加入 4 ml 0.5% (w/v) thiobarbituric acid (TBA)溶液(將 0.5% thiobarbituric acid 溶於 20% (w/v)之 TCA 溶液中)，於 100℃沸水中水浴 15 分鐘後，立即移入冰水中冷卻以終止反應，隨後以分光光度計(HITACHI U-2000)測定在波長 532 和 600 nm 下之吸收值，單位以  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW})$ 表示之，每品種 3 重複。另以處理前之丙二醛含量為分母，每次調查之丙二醛含量為分子，計算處理後荔枝離體葉片丙二醛含量與未處理葉片之差異，稱為丙二醛指數(index of MDA)，以% of control 為單位。

### (五) 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

'台農1號'、'台農3號'、'台農5號'、'台農7號'、'玉荷苞'、'糯米糍'、'桂味'、'黑葉'及'三月紅'共9個荔枝品種成熟離體葉片之耐熱性，未處理之葉片葉綠素螢光值(Fv/Fm)皆在0.7-0.8之間。從圖1可知'台農1號'為高溫處理後葉綠素螢光值下降程度最嚴重的品種，在高溫處理1小時後約減少70%；而'糯米糍'為最高，在高溫處理2小時時，'糯米糍'仍維持在0.6左右；故推測'糯米糍'為較耐熱品種，而'台農1號'為較不耐熱品種，而後對這兩品種進行其他試驗，藉以了解高溫對'糯米糍'與'台農1號'荔枝離體葉片的影響。'糯米糍'與'台農1號'在50°C處理下電解質滲漏率呈現一不規則的變化(圖2)。若與未處理的葉片進行比較，以未處理的葉片電解質滲漏率為分母，計算電解質滲漏率指數，則可發現在各個高溫處理時間下，幾乎都是以'台農1號'的電解質滲漏率變化率高於'糯米糍'，或者為兩者相似的情況(圖3)。表1顯示在高溫處理的情況下'糯米糍'與'台農1號'兩品種之荔枝離體葉片其乙烯釋放率皆會受到抑制，50°C高溫處理第1個小時即分別下降至0.43與0.19 $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ ，而'台農1號'隨後無偵測到乙烯的生合成，'糯米糍'則至處理第3個小時起無偵測到乙烯的生合成。在丙二醛含量的部分未處理高溫的情況下'糯米糍'與'台農1號'分別為1.00及0.301 $\mu\text{mol/g}$ 。'糯米糍'的丙二醛含量呈現一先升後降的趨勢；'台農1號'的丙二醛含量則完全呈現下降的趨勢，至高溫處理第6小時，含量已下降到0.18 $\mu\text{mol/g}$ (圖4)。若將每次調查之丙二醛含量與未處理的葉片進行比較，以未處理的葉片丙二醛含量為分母，計算丙二醛指數，則顯示'糯米糍'的丙二醛含量在高溫處理第2小時增加了63%，隨後持續下降，至第6小時丙二醛含量下降了51%之多；而在'台農1號'其丙二醛指數持續減少，在高溫處理第6小時丙二醛含量下降了42%(表2)。

## 討 論

圖1為利用葉綠素螢光參數Fv/Fm篩選9個荔枝品種成熟葉片之耐熱性，9個荔枝品種成熟葉片的Fv/Fm皆會隨著高溫處理的時間增加而下降，與Molina-Bravo等人(2011)將懸鉤子屬不同品種之覆盆子成熟葉片以45°C處理，其Fv/Fm也會隨著處理時間的增加而下降的結果一致，而其他果樹作物如番荔枝、龍眼與芒果也有相同的結果(Yamada et al., 1996)。'糯米糍'葉綠素螢光值下降的速度顯著比'台農1號'來得慢，初步認定'糯米糍'為較耐熱品種，'台農1號'為較不耐熱品種。而根據Du等人(2013)針對禾本科牧草及草坪作物——肯塔基藍草耐熱品種'Midnight'及不耐熱品種'Brilliant'進行葉綠素螢光的測定顯示，以不耐熱品種'Brilliant'葉綠素螢光值下降速率較快，與本試驗結果相符。

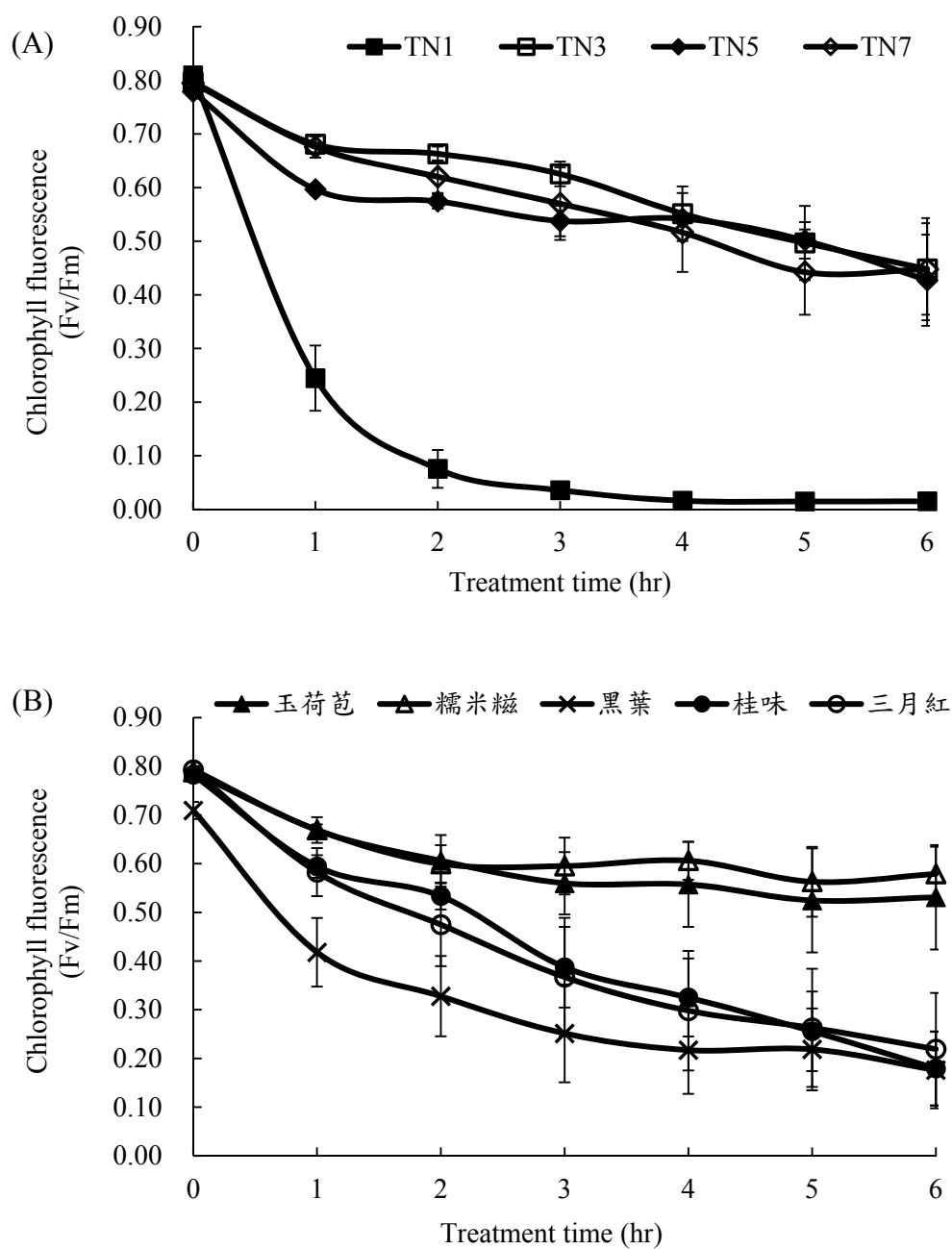


圖 1. 不同品種之荔枝離體葉片在 50°C 下葉綠素螢光的變化。(A)和(B)為試驗中 9 種荔枝品種。

Fig. 1. Change in chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) of litchi detached leaves excised from different cultivars during incubated at 50°C. (A) and (B) are the cultivars of this experiment.

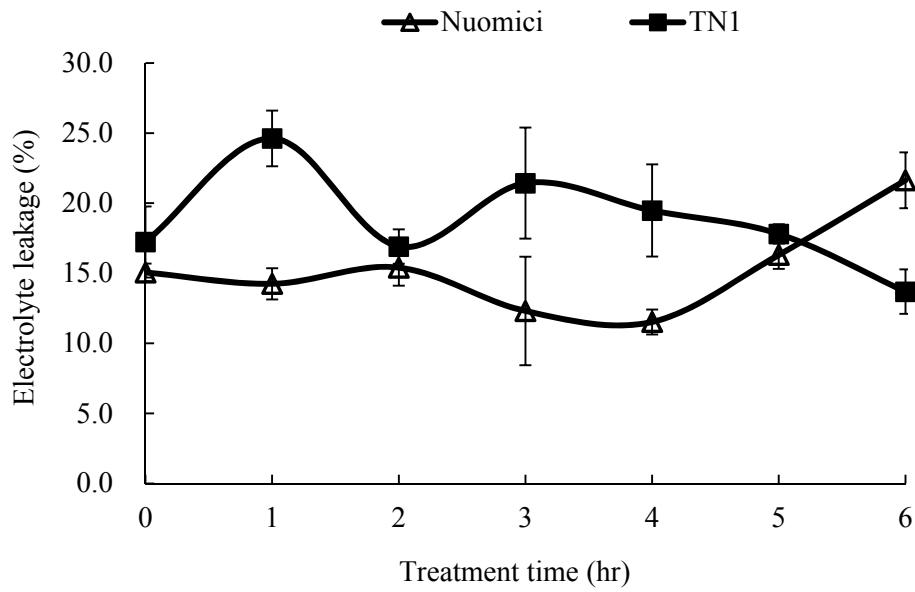


圖 2. 'TN1' 和 '糯米糍' 荔枝離體葉片在 50°C 下電解質滲漏的變化。

Fig. 2. Change in electrolyte leakage of litchi detached leaves excised from 'TN1' and 'Nuomici' during incubated at 50°C.

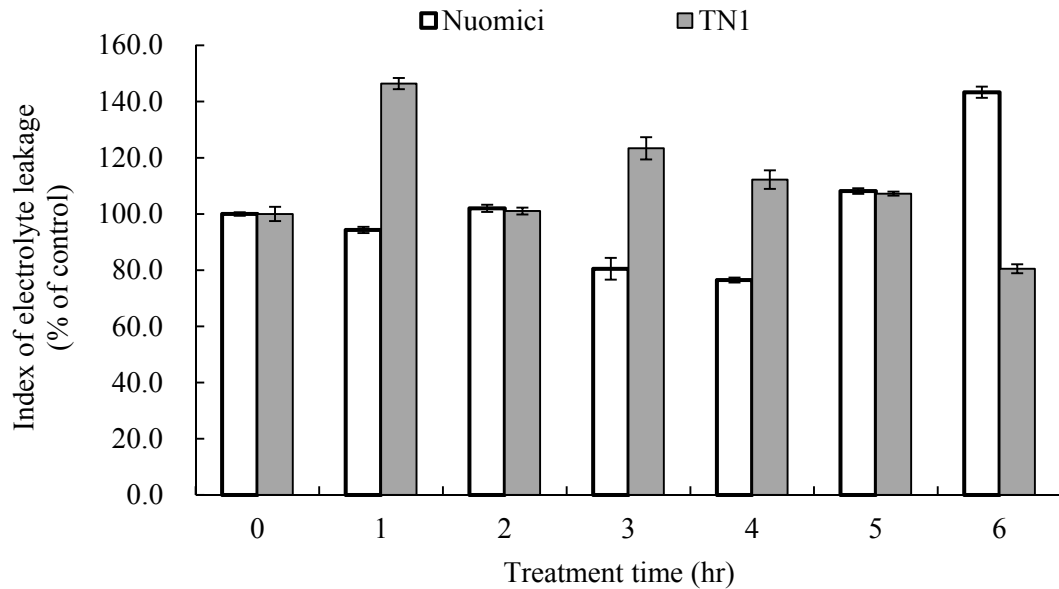


圖 3. 'TN1' 和 '糯米糍' 荔枝離體葉片在 50°C 下其電解質滲漏率指數的比較。

Fig. 3. Change in the index of electrolyte leakage (% of control) of litchi detached leaves excised from 'TN1' and 'Nuomici' during incubated at 50°C.

表 1. 'TN1' 和 '糯米糍' 荔枝離體葉片在 50°C 下其乙烯釋放率的比較。

Table 1. The ethylene production rate of litchi detached leaves excised from 'TN1' and 'Nuomici' during incubated at 50°C.

Treatment time (hr)	Ethylene production rate ( $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ )	
	TN1	Nuomici
0	17.32 bA <sup>x</sup>	50.06 aA
1	0.19 aB	0.43 aB
2	0.00 aB	0.07 aB
3	0.00 aB	0.00 aB
4	0.00 aB	0.00 aB
5	0.00 aB	0.00 aB
6	0.00 aB	0.00 aB

<sup>x</sup> Mean separation within columns (small letter) and within rows (capital letter) was by Duncan's multiple range test at 5% level.

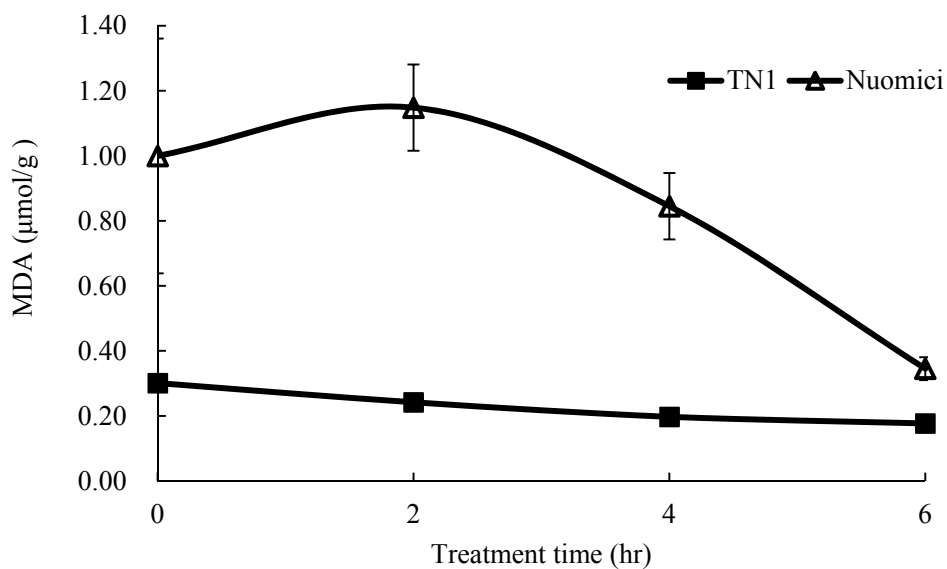


圖 4. 'TN1' 和 '糯米糍' 荔枝離體葉片在 50°C 下丙二醛含量之變化。

Fig. 4. Change in MDA content of litchi detached leaves excised from 'TN1' and 'Nuomici' during incubated at 50°C..

表 2. 'TN1' 和 '糯米糍' 荔枝離體葉片在 50°C 下其丙二醛指數的比較。

Table 2. The index of MDA of litchi detached leaves excised from 'TN1' and 'Nuomici' during incubated at 50°C.

Treatment time (hr)	Index of MDA <sup>x</sup> (% of control)	
	TN1	Nuomici
0	100.00 aA <sup>y</sup>	100.00 abA
2	80.86 bB	163.21 aA
4	65.79 cB	96.85 abA
6	58.68 cA	49.24 cA

<sup>x</sup> Mean separation within columns (small letter) and within rows (capital letter) was by Duncan's multiple range test at 5% level.

圖 2 為 '糯米糍' 與 '台農 1 號' 在 50°C 高溫處理下電解質滲漏率的變化，兩品種皆無一定的變化趨勢，推測可能是因荔枝葉片本身略呈革質化(coriaceous)，使得冰存於 -20°C 以冰晶破壞其膜體系統再解凍時，對其內容物的流出產生阻礙，故無法測得準確的最大電導度(maximum electrical conductivity; EC1)，導致電解質滲漏率並未隨處理時間增加而上升。但若計算電解質滲漏率指數，則可發現在各個高溫處理時間下，幾乎都是以較不耐熱品種 '台農 1 號' 的電解質滲漏指數高於較耐熱品種 '糯米糍'，代表較不耐熱品種其電解質滲漏的情形整體而言還是比較耐熱品種來得嚴重，推測在高溫處理後其膜體完整性應劣於較耐熱品種。

乙烯為植物賀爾蒙的一種，被認為與植物老化生理有一定的關係，而當植物遭遇逆境時會加快其老化生理的進程，如溫度、水分或重金屬毒害等逆境，因此乙烯也可做為判定植物遭受逆境所產生的受傷程度之指標(Hamber and Fuchigami, 2000)。高溫對於乙烯的合成不利，推測可能是因乙烯生合成途徑中的 ACO 活性會受到高溫抑制所致(Arteca and Arteca, 2007)，若以 43°C 處理阿拉伯芥 15、30 及 60 分鐘，則隨著熱處理時間的增加，植株的乙烯生成量有減少的趨勢，在番茄果實中也有相同結果(Biggs et al., 1988)。表 3 為 '糯米糍' 與 '台農 1 號' 在 50°C 高溫處理下乙烯釋放率的變化，高溫處理顯著的抑制乙烯的產生，在木瓜葉片上也有相同的結果(李, 2012)，與前人研究相符。

試驗中 '糯米糍' 與 '台農 1 號' 在 50°C 處理下，較不耐熱品種 '台農 1 號' 的丙二醛含量隨處理時間增加而持續下降；較耐熱品種 '糯米糍' 則先升後降(圖 6)，推測 50°C 對於 '台農 1 號' 會造成其酵素活性失活，故來不及表現出脂質過氧化反應就呈下降的趨勢；而較耐熱品種 '糯米糍' 在高溫處理第 2 小時 MDA 含量便增為原來的 1.6 倍(表 2)，充分表現出植體在遭受溫度逆境時所導致 MDA 累積的生理現象，推測可忍受高溫直到處理第 4



小時開始，才失去生理活性而使含量下降。

結果顯示在這四種逆境指標中，以葉綠素螢光測定方法最為快速方便且為非破壞性，其餘四種指標皆為破壞性，且其表現可能受到作物本身的特性影響而不一致。

## 參 考 文 獻

- 李芸媽。2012。葉綠素螢光作為評估番木瓜溫度逆境之指標。國立中興大學園藝學系碩士論文。台中。pp. 69。
- 鄧永興、張哲璋、王怡玗。2005。荔枝。p. 39-52。黃美華等編著。台灣農家要覽增訂(三版)——農作二。行政院農業委員會。台北。
- 近藤始彦、盧虎生。2009。台湾の稲作における気象変動の影響と研究の現状。農業および園芸 84: 36-41。
- Arteca, R. N. and J. M. Arteca. 2007. Heavy-metal-induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 164(11): 1480-1488.
- Baker, N. R. and E. Rosenqvist. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55: 1607-1621.
- Biggs, M., W. R. Woodson, and A. K. Handa. 1988. Biochemical basis of high- temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruits. *Physiol. Plant.* 72(3): 572-578.
- Du, H. M., P. Zhou, B. G. Huang. 2013. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in a cool-season perennial grass species. *Environ. Expt. Bot.* 87: 159-166.
- Hamber, R. M. and L. H. Fuchigami. 2000. Ethylene-induced stress resistance. pp. 81-89. In: H. L. Paul (ed.). *Low temperature stress physiology in crop*. CRC Press Inc., Florida.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 345: 659-668.
- Molina-Bravo, R., C. Arellano, B. R. Sosinski, and G. E. Fernandez. 2011. A protocol to assess heat tolerance in a segregating population of raspberry using chlorophyll fluorescence. *Scientia Hort.* 130: 524-530.
- Ogaya, R., J. Penuelas, D. Asensio, and J. Llusià. 2011. Chlorophyll fluorescence responses to temperature and water availability in two co-dominant Mediterranean shrub and tree species in a long-term field experiment simulating climate change. *Environ. Expt. Bot.* 73: 89-93.
- Yamada, M., T. Hidaka, and H. Fukamachi. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Scientia Hort.* 67: 39-48.

## Studies of Chlorophyll Fluorescence as an Indicator to Evaluate the Tolerance to Heat Stress of Litchi (*Litchi chinensis*)

Yi-Chung Tsai <sup>1)</sup> Ching-Chang Shiesh <sup>2)</sup>

Key words: Litchi, heat stress, Chlorophyll fluorescence

### Summery

In recently years global weather conditions are becoming abnormal. The frequency and intensity of extreme weathers also increase, impacting on agricultural productivity and crop cultivation. For adapting to unusual weathers, it is important to breed crops with heat tolerance genotypes. In the breeding process of fruit trees, if we can establish a quick and simple way to screen, that will be helpful for breeding work. Chlorophyll fluorescence determination method is simple, rapid, sensitive, high-mobility and non-destructive. In this experiment, we used chlorophyll fluorescence as a screening indicator to test several mature leaves of litchi cultivars: 'Tai-Nong No.1', 'Tai-Nong No.3', 'Tai-Nong No.5', 'Tai-Nong No.7', 'Yuh-Her-Bau', 'No-Mai-Tsz(73-S-20)', 'Gui-Wei', 'Hei-Yeh', and 'San-Yueh-Hnug' with heat (50°C) treatment. Using the chlorophyll fluorescence method, we selected 2 cultivars for further screening: the more heat-tolerant cultivar 'Nuomici' and the more heat-sensitive cultivar 'Tai-Nong No.1'. The results indicated that when litchi leaves underwent heat stress, electrolyte leakage varied irregularly. It might be the influence of leaf texture. Comparing with untreatment leaves and calculating the index of electrolyte leakage, the value of sensitive cultivars were higher than tolerance cultivars. Heat stress increases electrolyte leakage of sensitive cultivars. Ethylene production was inhibited by high temperature. Ethylene production rate of heat tolerance cultivar decreased slower than heat sensitive cultivar. Malondialdehyde (MDA) content declined with heat treatment in heat sensitive cultivar while in heat tolerance cultivar, the content increased followed by descent. To sum up the manifestation of physiologies above, they conformed to the result of chlorophyll fluorescence mostly. Chlorophyll fluorescence could be a screening indicator.

- 
- 1) Graduated student in MS program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Corresponding author.