

乙烯誘導芥藍葉片老化過程中之抗氧化反應¹

Antioxidant Responses in Ethylene-induced Leaf Senescence of Chinese Kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group)¹

張嘉滿² 高景輝² 王自存²

by

Chia-Man Chang², Ching-Hui Kao², and Tsu-Tsuen Wang²

關鍵字：抗氧化系統、乙烯、老化、活性氧族

Key words: antioxidant system, ethylene, senescence, active oxygen species

摘要：本試驗以對乙烯敏感的‘蕙津’芥藍(*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group cv. ‘Veg Gin’) 3 週苗齡的第二片本葉之切離葉片為試驗材料，研究乙烯促進切離葉片老化時抗氧化酶的反應，以及乙烯所促進的葉片老化是否與氧化逆境有關。芥藍幼苗第二片本葉切離後在 25°C 黑暗中以 1 ppm 乙烯處理 4 天，明顯加速葉片黃化。乙烯處理第 3 天葉片中之葉綠素與蛋白質含量顯著低於對照(空氣)組。過氧化氫(H₂O₂) 與丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量在乙烯處理第 1、2 天開始增加，並高於對照組。葉片的抗氧化防禦系統中的 ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR) 與 peroxidase (POX) 等抗氧化酵素的比活性在乙烯處理 2 天後顯著增加，但 superoxide dismutase (SOD) 與 catalase (CAT) 則無顯著變化。此結果表示，乙烯連續處理誘導芥藍切離葉片開始老化，是由於乙烯促使內生 H₂O₂ 含量的增加，造成脂質過氧化作用程度加劇，導致 MDA 含量的累積；在引起葉片氧化逆境增加時，APX、GR 與 POX 等抗氧化酵素也被誘導增加。

前 言

乙烯是一種植物賀爾蒙，它在植物的生長發育過程中擔任重要的調節任務，主要功能包括誘發更年型果實後熟、促進葉片老化、器官脫落、誘使白化幼苗的三相反應(triple responses)等(Abeles et al., 1992)。對大多數葉片而言，乙烯具有促進其老化變黃之作用(Abeles et al., 1992; Buchanan et al., 2000)；外加乙烯處理可使葉片之黃化速率加快一倍以上(唐, 1997; 紀, 2003)。

1. 本文為第一作者碩士論文之一部份，本研究承行政院農業委員會補助研究計畫經費[93 農科-1.1.2-糧-Z2(6)]，特申謝忱。This paper is a portion of the MS thesis submitted by the first author, The authors appreciated the support by a grant from the Council of Agriculture [93FS-1.1.2-FD-Z2(6)].

2. 國立台灣大學園藝學系前研究生、國立台灣大學農藝學系教授、國立台灣大學園藝學系副教授(通訊作者)；Former graduate student, Department of Horticulture; Professor, Department of Agronomy; and Associate Professor, Corresponding author. E-mail: tsutsuen@ntu.edu.tw, Department of Horticulture; National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

3. 本文於民國九十五年三月八日收到。Date received for publication: Mar. 08, 2006.



葉片老化是葉片發育後期細胞緩慢死亡的階段，係由遺傳控制之細胞自行崩解過程，也是一種細胞程序性死亡(programmed cell death, PCD) (Buchanan et al, 2000)。葉片老化階段會伴隨著一連串生理變化，如可溶性蛋白質分解、葉綠素含量減少、光合作用效率降低、細胞膜系滲漏增加、胞器構造瓦解、DNA 與 RNA 等遺傳分子發生損傷突變、最後導致細胞死亡(Taiz and Zeiger, 1998)。目前認為引起葉片老化的直接作用是與自由基(free radicals)所誘發的氧化逆境(oxidative stress)有關(Leshem, 1988)。

氧化逆境是指細胞內活性氧族(active oxygen species, AOS)對細胞內組成份，尤其是構成細胞膜的脂質所造成的傷害。由於氧原子(O₂)本身的分子特性，它在被還原成水分子(H₂O)的過程，需經由 4 個單電子的還原步驟，這些步驟的中間生成物，包括了超氧自由基(superoxide radical, O₂^{-•})、過氧化氫(hydrogen peroxide, H₂O₂)以及羥基自由基(hydroxyl radical, HO•)，都是具有高活性的活性氧(AOS)分子；雖然整個還原過程進行得很快，但是比起分子間碰撞所需的反應時間而言，還是很慢的，所以這些 AOS 很有可能與細胞內其他組成物進行反應，造成細胞的受傷(Hodges, 2003)。植物體在正常代謝過程中可能會生成 AOS，例如葉綠體內超氧陰離子(superoxide anion radical, O₂^{-•})的產生是由於氧分子接收光系統 I (photosystem I, PS I)的電子所致；而粒線體內的 O₂^{-•} 則是由於 ubiquinone 的氧化還原失序所致(Buchanan et al., 2000)。為因應 AOS 產生後對植物細胞之傷害，植物體內有一套很有效率的抗氧化反應機制來消除 AOS 在細胞內之累積；但是當細胞內 AOS 的產生與移除失去其穩定狀態時，會導致 AOS 的累積，而引起氧化逆境(oxidative stress) (Buchanan et al., 2000)。植物細胞在正常生長情況只有少量 AOS 存在，但在遭遇到許多生物性(biotic)或非生物性(abiotic)逆境如乾旱、淹水、臭氧、鹽分、重金屬、高光強度、創傷、病蟲害等時，細胞內的 AOS 含量會大量增加(Polle, 2001; Hodges and Forney, 2000)，同時會導致葉片加速老化(Bartoli., 1996; Philosoph-Hadas et al., 1991)，因此 AOS 被認為與葉片老化的發生有關(Dhindsa et al., 1981; Philosoph-Hadas et al., 1994)。

植物體內因應 AOS 生成的抗氧化反應機制，主要由一群抗氧化物及一些抗氧化酵素所組成。抗氧化物為具抗氧化力的水溶性與脂溶性的分子，包括抗壞血酸(ascorbic acid, AA)、還原態的穀胱甘肽(glutathione, GSH)、 α -生育酚(α -tocopherol)、及類胡蘿蔔素(carotenoids)等。抗氧化酵素為各種能以催化反應將 AOS 除去之酵素，主要有：抗壞血酸過氧化酶(Ascorbate peroxidase, APX)、過氧化氫酶(Catalase, CAT)、穀胱甘肽還原酶(Glutathione reductase, GR)、過氧化酶(Peroxidase, POX)及超氧歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)等(Buchanan et al, 2000)。SOD 負責將 2 分子的 O₂^{-•} 歧化成為 O₂ 與 H₂O₂；再由 CAT (分佈於過氧化體和 glyoxysome)、POX 與 APX (分佈於細胞質與葉綠體)等酵素負責清除 H₂O₂ 之工作，將之代謝為 H₂O。其中 APX 與 GR 參與清除 H₂O₂ 的反應，亦即所謂的 Halliwell-Asada 循環，或直接稱之為 ascorbate-glutathione 循環(Asada, 1992)。APX 利用 AA 為反應受質，將 H₂O₂ 還原為水，而 AA 則轉變為 dehydroascorbate (DHA)或 monodehydroascorbate (MDHA)。MDHA 可以經由自發反應或藉由 MDHA reductase (MDHAR)催化再生為 ascorbate；DHA 則可經由自發反應或藉由 DHA reductase (DHAR)催化再生為 ascorbate。DHAR 之催化反應需要 GSH 作為反應受質以提供還原力，GSH 在反應後成為氧化態的 GSSG。GSSG 再經由 glutathione reductase (GR)的催化反應，同時消耗 NADPH，再生為 GSH。抗氧化酵素的的存在除了負責清除 AOS，同時幫助植物細胞內 ascorbate (AA/DHA)與 glutathione (GSH/GSSG)維持在很高的還原狀態(Buchanan et al, 2000)。

不同植物葉片在正常老化或逆境誘導老化過程中，抗氧化系統中酵素的活性表現不一。老化速度較快的菠菜品種'Spokane F1'，其 APX 活性比老化較慢的'BJ412 Sponsor'品種低；但前者的 CAT 與 SOD 活性較高(Hodges and Forney, 2001)。玉米晚生品種 Deccan 103 與早生品種 X 3342 之抗氧化酵素在葉片老化過程中均有增加，Deccan 103 的 Mn-SOD (SOD isozyme)則一直維持較高活性(Prochazkova et al, 2001)。缺水處理會加速水稻葉片老化，降低與 H₂O₂ 代謝相關酵素(POX、CAT、APX、SOD)的活性(林，



1996)。菸草葉片以淹水做前處理，在復氧環境中會產生氧化逆境，因為 CAT 與 SOD 活性較對照組低，造成菸草葉片的氧化傷害(Hung and Kao, 1994)。三種可食性藥草的葉綠素降解速率由小到大依序為 watercress > parsley > sage，其中 parsley 的 CAT、POX 活性最高，而總還原能力居中，這似乎說明每一種藥草有其專屬的抗氧化防禦機制(Philosoph-Hadas et al, 1994)。

十字花科蕓苔屬蔬菜為國人日常食用之主要葉菜，常見的種類包括了小白菜、青江菜、大白菜、甘藍、芥藍、油菜、芥菜等。這些蔬菜中以芥藍與小白菜對乙烯之敏感度較高，在乙烯中之老化速率最快，因此最不耐貯藏(唐, 1997)。本研究室曾就芥藍對乙烯之反應進行觀察，發現不同品種芥藍對乙烯的敏感度差異頗大(王, 2000)；此表示由乙烯所導致之葉片老化反應部份是由遺傳因子所控制，因此應可以透過育種途徑來改善芥藍對乙烯的敏感性。為求明瞭乙烯誘導葉片老化的進一步機制，本試驗以對乙烯敏感的芥藍幼苗葉片為材料，探討乙烯所誘導之葉片老化與氧化逆境所造成傷害間的關係，以及芥藍葉片在受到乙烯影響而加速老化的過程中，其抗氧化酵素系統的反應。預期此一試驗之結果將可作為未來選育抗老化且耐貯藏之芥藍品種時之參考。

材料與方法

一、植物材料

本試驗以農友‘蕙津’芥藍(*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group cv. ‘Veg Gin’)為試驗材料。芥藍種子之播種、培育及採取幼苗第二片本葉作為試驗材料之過程，均修正自紀(2003)之方法，播種前以種子與水 1:100 (w/v)的比例，在 20°C 恆溫庫內通氣浸種 24 小時；將浸種後的種子以每格三粒的數量，播入已填好育苗介質的 128 格穴盤內，在 25°C、70%相對濕度光強度 5000 lux，每日照光 18 小時的恆溫庫中育苗，為取得生長速率一致的葉片，從種子發芽到第二片本葉生長期間進行兩次除苗。第一次為播種後第 4 天，除去子葉未展開的幼苗；第二次為播種後第 12 天，除去第 2 片本葉尚未長出的幼苗；最後，每格僅留一株幼苗。播種後第 7 天使用稀釋 3,000 倍之 Peter's No.1 (20-20-20)營養液，把育苗介質完全澆濕，然後用水輕輕洗去葉片上之營養液，避免發生鹽害。當芥藍苗第一片本葉長出時(約第 10 天)，施用稀釋 2,000 倍之 Peter's No.1 (20-20-20)營養液一次。之後每隔四天施用一次 1,000 倍之同種營養液。當芥藍苗生長到 21 天時，將第二片本葉以鋒利的刀片自葉柄切下，以四片葉片互不堆疊的方式插於裝有去離子水的 25 mL 三角瓶後，進行後續試驗。

二、乙烯處理

將裝有切離葉片的三角瓶分別放入置於 25°C 恆溫庫內的四個容積為 16 L，外覆鋁箔紙的呼吸缸中。將含 0、0.1、1、10 ppm 乙烯的空氣，以每小時 8 L 的流速，分別通入前述四個呼吸缸中，連續 8 天。每日測量各處理切離葉片之葉綠素讀值一次，量測時中斷乙烯處理，量測後再恢復流通乙烯，中斷時間在半小時以內。另以含 1 ppm 乙烯之空氣依相同方式各處理一批葉片，處理開始後第 1、2、3、4 天讀取固定 20 片葉片之葉綠素讀值；另各取 10 片葉片，經秤重後裝入封口袋，以液態氮固定後置於 -80°C 凍箱存放，留做之後測定蛋白質、MDA 與 H₂O₂ 含量與抗氧化酵素活性之用。測定時以 2 片為一樣品作 1 重複，無乙烯與有乙烯處理各 5 重複，亦即每處理均取樣 5 天。

三、測定項目

(一)葉綠素讀值測定

依據紀(2003)之研究結果，芥藍葉片以葉綠素計(Minolta SPAD 502 chlorophyll meter)量測之讀值與化學萃取測定之葉綠素含量間有良好之線性關係，因此以非破壞性之葉綠素計每日測量切離葉片的 SPAD 值。測定時取每片葉子前端葉脈兩側兩點後求平均值，每片葉的 SPAD 平均值代表一個重複之



結果。求得之 SPAD 值以下列公式換算葉片之黃化指數(Leaf yellowing index) (王, 2000)：葉片第 X 天之黃化指數=[(葉片第 0 天之 SPAD 值)-(葉片第 X 天之 SPAD 值)]÷該葉片第 0 天之 SPAD 值×100%。

(二)蛋白質含量測定

葉片以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨成均質後，在 4°C 下以 17,600 x g 離心 20 分鐘，取上清液依 Bradford (1976) 方法進行蛋白質測定。以小牛血清蛋白(BSA, bovine serum albumin) 作出的標準曲線，求得樣品中蛋白質含量。

(三)Malondialdehyde (MDA)含量之測定

MDA 含量之測定，採用 Heath and Packer (1968) 之方法。芥藍葉片以 5% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 研磨成均質後，在 20°C 下以 10,000 x g 離心 5 分鐘，取上清液加入 4 mL 溶劑為 20% (w/v) TCA 之 5% (w/v) TBA (thiobarbituric acid) 混合均勻。將試管置於 95°C 熱水浴 30 分鐘後，移入冰浴，在室溫下以 5,000 x g 離心 10 分鐘，取上清液以光電比色計測定 532 nm 及 600 nm 波長之吸光值。

(四) H₂O₂ 含量之測定

H₂O₂ 含量之測定參考 Jana and Choudhuri (1981) 方法。芥藍葉片以 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨成均質後，在 4°C 下以 6,000 g 離心 20 分鐘，取上清液加入 TiCl₄ 混合均勻，於室溫下以 5,000 x rpm 離心 15 分鐘，取上清液以光電比色計測定 410 nm 之吸光值。

(五) 抗氧化酵素活性分析

1. Ascorbate peroxidase (APX, EC.1.11.1.11) 之抽取及活性分析

APX 之活性測定參考 Nakano and Asada (1981) 方法。取 2 片芥藍葉片於預冷之研鉢中，以 4 mL 之 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 於冰浴下，將材料研磨成均質，在 4°C 以 12,000 x g 離心 20 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 A。取 0.1 mL 酵素萃取液 A，加入 potassium phosphate buffer 150 mM pH 7.0, 1 mL, 1.5 mM ascorbate 1 mL, 0.75 mM EDTA 0.4 mL 及 6 mM H₂O₂ 0.5 mL 於石英管混合均勻後，以光電比色計測定波長 290 nm 之吸光值(ΔA₂₉₀)反應 1 分鐘，空白試驗以 0.1 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。酵素活性單位(unit)為每分鐘消耗 1 μmol 之 ascorbate。

2. Catalase (CAT, EC.1.11.1.6) 之抽取及活性分析

CAT 之活性測定主要是參考 Kato and Shimizu (1985) 方法。取 0.2 mL 酵素萃取液 A，加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0) 及 0.1 mL H₂O₂ (1 M) 於石英管混合均勻後，立即以光電比色計測定 240 nm 之吸光值(ΔA₂₄₀)，偵測時間為 1 分鐘，空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。酵素活性單位(unit)為每分鐘消耗 1 μmol 之 H₂O₂。

3. Glutathione reductase (GR, EC.1.6.4.2) 之抽取及活性分析

GR 之活性測定主要參考 Foster and Hess (1980) 方法。取 0.2 mL 酵素萃取液 A，加入 1 mL TRIS-HCl buffer (150 mM, pH 7.5), 0.3 mL MgCl₂ (30 mM), 0.5 mL oxidized form glutathione (GSSG, 3 mM) 及 1 mL reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, 0.45 mM) 於石英管內混合均勻後，立即以光電比色計測定 340 nm 之吸光值(ΔA₃₄₀)，偵測時間為 1 分鐘，以 NADPH 被酵素氧化後其吸光值減少的量代表酵素活性。空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。酵素活性單位(unit)為每分鐘消耗 1 μmol 之 H₂O₂。

4. Peroxidase (POX, EC.1.11.1.7) 之抽取及活性分析

Peroxidase 之活性測定是參考 MacAdam et al. (1992) 方法。取 2 片芥藍葉片於預冷之研鉢中，將葉片放於預冷過的研鉢中，以 4 mL 之 potassium phosphate buffer (50 mM, pH 5.8) 於冰浴下，將材料研磨成均質，在 4°C 以 12,000 x g 離心 20 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 B。取 0.1 mL 酵素萃取液 B，加入 1 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 5.8)、1 mL guaiacol (21.6 mM) 及 0.9 mL H₂O₂ (39



mM)，於石英管混合均勻後，以光電比色計測定 470 nm 之吸光值(ΔA_{470})，偵測時間為 1 分鐘，空白試驗以 0.1 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。每一單位酵素活性(unit)以每分鐘形成 1 μmol 之 tetraguaiacol 表示。

5. Superoxide dismutase (SOD, EC.1.15.1.1)之抽取及活性分析

SOD 之活性測定是參考 Paoletti et al. (1986)方法。取 2 片芥藍葉片於預冷之研鉢中，以 3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4)將材料研磨成均質，在 4°C 以 15,000 g 離心 30 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 C。取 0.2 mL 酵素萃取液 C，加入 1.6 mL Tea-Dea buffer (triethanolamine-diethanolamine, 100 mM, pH7.4)、0.08 mL NADH (7.5 mM)、0.05 mL EDTA/MnCl₂ (100 mM / 50 mM, pH 7.0)及 1 mL β -mercaptoethanol (10 mM) 於石英管混合均勻後，立即以光電比色計測定 340 nm 之吸光值(ΔA_{340})，偵測時間為 10 分鐘；空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。酵素活性(unit)是以每 10 分鐘 SOD 抑制 NADH 氧化 50%的吸光值變化量(ΔOD)。

所有分析用試藥均購自 Sigma-Aldrich Corporation, USA.

結果

一、乙烯對芥藍切離葉片老化之影響

分別以 0、0.1、1、10 ppm 乙烯處理芥藍切離葉片，觀察葉片在 25°C 黑暗環境下之黃化變化。切離葉片經不同濃度的乙烯處理 1 天後，各處理間的 SPAD 值無顯著差異，葉片外觀尚未發生黃化。乙烯處理 3 天後，乙烯處理組切離葉片的 SPAD 值平均值顯著低於對照組(圖 1)，亦即黃化程度開始增加，此時葉片外觀開始黃化。隨著乙烯濃度提高，SPAD 平均值下降幅度更是顯著，說明乙烯處理確實可以加速芥藍切離葉片之老化。由於經 1 ppm 乙烯處理 3 天後，切離葉片的外觀表現較為一致，且葉片外觀已出現黃化，因此後續的試驗均採用以 1 ppm 乙烯進行 4 天時程的處理及分析。

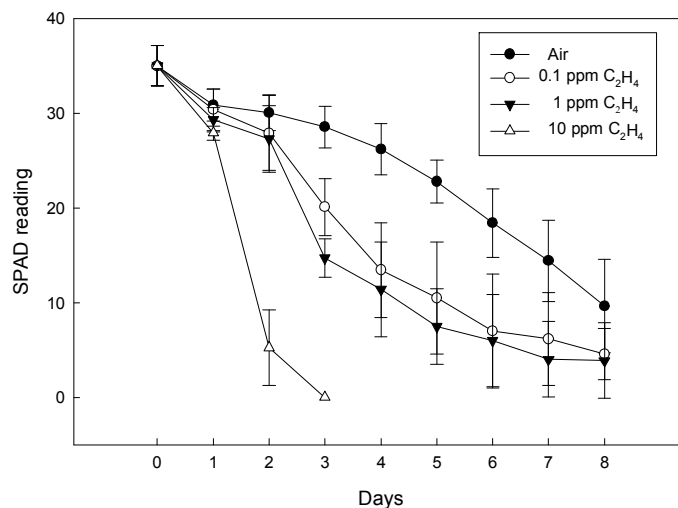


圖 1. '蕙津'芥藍苗切離葉片在 25°C 下以乙烯處理之葉綠素計 SPAD 讀值變化

Fig. 1 Changes in readings of SPAD chlorophyll meter of detached leaves of 'Veg Gin' Chinese kale seedlings treated with C₂H₄ at 25°C. Data represent mean \pm S.E. of 10 replications.



以純空氣(對照)或 1 ppm 乙烯連續處理芥藍苗切離葉片的 4 天中，前 2 天 SPAD 值無顯著差異(圖 2A)，葉片外觀尚未發生黃化。第 3 天開始，乙烯處理組葉片的 SPAD 平均值明顯低於對照組(圖 2A)，黃化指數已經達到 50% (圖 2B)，葉片外觀也開始黃化。對照組第 3、4 天的 SPAD 值仍維持恆定，葉片外觀變化也不顯著；但乙烯處理組的 SPAD 值持續下降，到第 4 天時葉片幾乎完全黃化，並有部分乾枯的現象，此時黃化指數達到 100% (圖 2B)。

葉片老化中，蛋白質含量改變也是重要的生理變化之一。由圖 3 結果得知，不論有無乙烯處理，蛋白質含量在處理的前 2 天均逐漸下降，而第 3 天開始，乙烯處理組的葉片蛋白質含量明顯低於對照組。根據葉綠素與蛋白質含量這兩種葉片老化指標的變化，顯示 1ppm 乙烯連續處理 3 天後，芥藍苗切離葉片已開始老化。

二、脂質過氧化作用、 H_2O_2 含量與切離葉片老化之關係

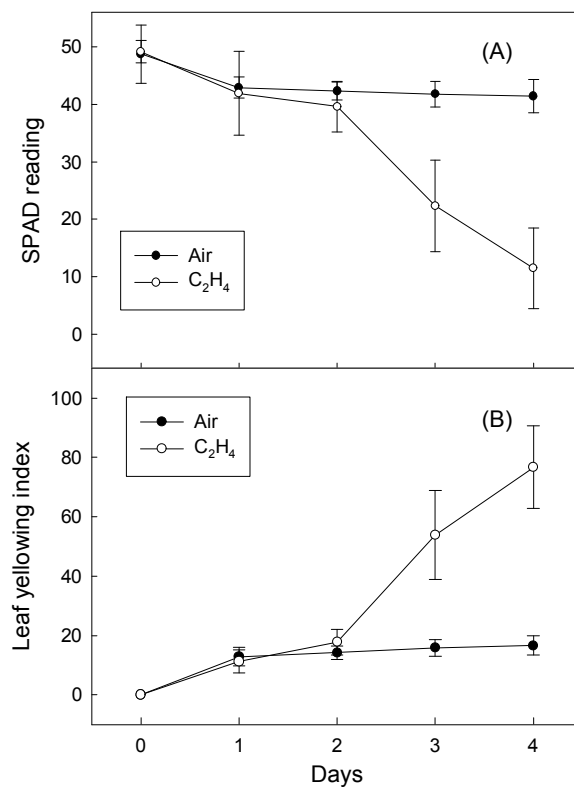


圖 2. '蕙津'芥藍苗切離葉片在 25°C 下以空氣與乙烯(1 ppm)處理之葉綠素計 SPAD 讀值(A)，及黃化指數(B)變化。圖(B)中第 0 天為葉片剛切離時的黃化指數

Fig. 2 Changes in readings of SPAD chlorophyll meter (A) and yellowing index (B) of detached leaves of 'Veg Gin' Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean \pm S.E. of 10 replications.

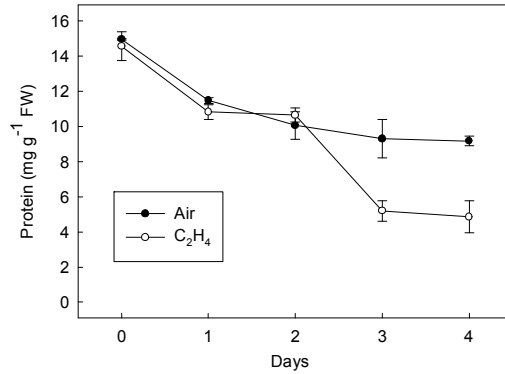


圖 3. ‘蕙津’芥藍苗切離葉片在 25°C 下以空氣與乙烯(1 ppm)處理之蛋白質含量變化
 Fig. 3 Changes in protein content of detached leaves of ‘Veg Gin’ Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean ± S.E. of 5 replications.

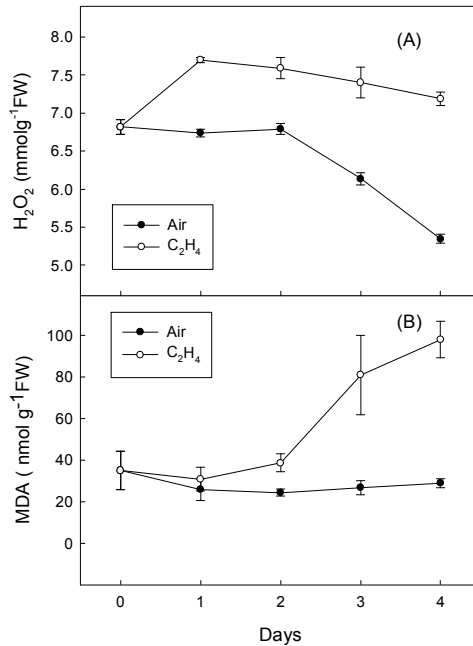


圖 4. ‘蕙津’芥藍苗切離葉片在 25°C 下以空氣與乙烯(1 ppm)處理之 H₂O₂ (A)與 malondialdehyde [MDA] (B)變化
 Fig. 4 Changes in H₂O₂ (A) and malondialdehyde [MDA] (B) level of detached leaves of ‘Veg Gin’ Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean ± S.E. of 5 replications.

許多學者認為葉片之所以會老化，主要是由於葉片遭受氧化逆境而引起老化(Dhindsa et al., 1981; Leshem, 1988; Philosoph-Hadas et al., 1994)。一般常以 MDA 與 H₂O₂ 含量變化來當作有無氧化逆境的指標；當葉片遭受氧化逆境時，兩者的含量通常會增加。以純空氣或 1 ppm 乙烯連續處理芥藍苗切離葉片的 4 天中，乙烯處理組的 H₂O₂ 含量在處理 1 天後即開始明顯高於對照組(圖 4A)，隨著處理天數增加，H₂O₂ 含量僅有些微下降；對照組的 H₂O₂ 含量在處理 2 天內並無顯著變化，之後明顯下降。



對照組與乙烯處理組切離葉片的 MDA 含量，在處理 1 天後均略有下降(圖 4B)。對照組葉片的 MDA 含量在其後的老化過程中並無顯著變化；但乙烯處理組的 MDA 含量則自處理第 2 天開始增加，高於對照組，且隨著處理天數增加，葉片漸漸老化，MDA 含量亦逐日增加。此結果說明乙烯處理芥藍苗切離葉片，會促使 AOS 含量增加，並加速脂質過氧化作用的發生，也表示切離葉片遭受到由乙烯誘導所產生的氧化逆境的傷害。以 1 ppm 乙烯誘導芥藍切離葉片老化的發生，究竟是先促使葉綠素降解，還是 MDA 含量先增加？此可以由比較圖 1(A)及圖 4(A、B)的結果得知，葉片的葉綠素含量(即 SPAD 值)在處理 3 天後開始低於對照組，而 H_2O_2 與 MDA 含量，則早在乙烯處理 1、2 天後就比對照組略高，表示芥藍切離葉片經乙烯處理後，是先遭受氧化逆境，然後葉片老化(SPAD 值下降)才開始顯現。

三、抗氧化酵素與切離葉片老化之關係

當植物遭受到氧化逆境時，其本身通常會誘導抵抗氧化逆境的反應機制來因應。以純空氣或 1 ppm 乙烯連續處理芥藍苗切離葉片 4 天，觀察切離葉片內 SOD、APX、GR、CAT 與 POX 等酵素的比活性變化。由結果得知，對照組與乙烯處理組的抗氧化酵素中，SOD 比活性在最初 3 天皆增加，但是到第 4 天時乙烯處理組繼續增加，而對照組卻下降(圖 5A)；兩處理之 SOD 比活性開始出現變化的時間

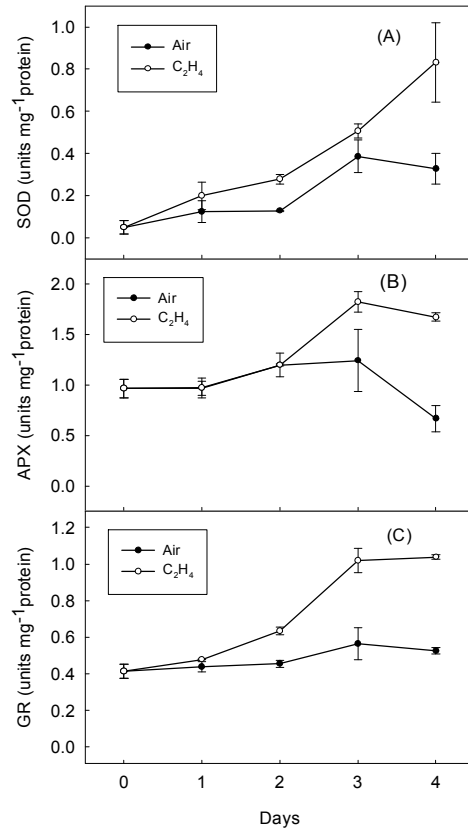


圖 5. '蕙津'芥藍苗切離葉片在 25°C 下以空氣與乙烯 (1 ppm) 處理之 superoxide dismutase [SOD] (A)、ascorbate peroxidase [APX] (B) 與 glutathione reductase [GR] (C) 比活性變化

Fig. 5 Changes in the specific activities of superoxide dismutase (A), ascorbate peroxidase (B) and glutathione reductase (C) of detached leaves of 'Veg Gin' Chinese kale seedlings treated with fresh air and C_2H_4 (1 ppm) at 25°C. Data represent mean \pm S.E. of 5 replications.

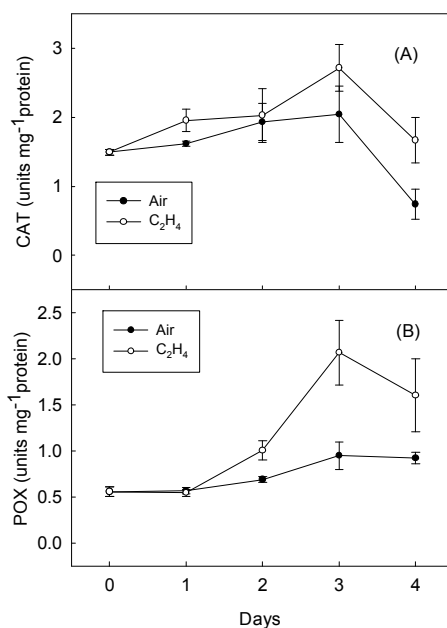


圖 6. ‘蕙津’芥藍苗切離葉片在 25°C 下以空氣與乙烯(1 ppm)處理之 catalase [CAT] (A)與 peroxidase [POD] (B) 比活性變化

Fig. 6. Changes in the specific activities of catalase (A) and peroxidase (B) of detached leaves of ‘Veg Gin’ Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean ± S.E. of 5 replications.

較晚，且變化差異不大。對照組與乙烯處理組的 APX 比活性在最初 2 天無大變化，但乙烯處理組在第 3、4 天開始高於對照組(圖 5B)，變化亦不大。對照組葉片的 GR 比活性在 4 天內變化很少，但乙烯處理組自第 2 天開始增高，顯著高於對照組(圖 5C)。CAT 與 POX 兩種清除過氧化氫的酵素中，CAT 比活性在對照組與乙烯處理組間無差異，比活性均自第 1 天開始略有增高，至第 4 天開始下降(圖 6A)，而乙烯處理組之 POX 比活性自第 2 天開始上升，且顯著高於對照組(圖 6B)。由此得知，切離葉片經乙烯處理後，APX、GR 與 POX 的比活性會因乙烯所誘發的氧化逆境而增加，SOD 與 CAT 則並不會受到氧化逆境程度的影響而改變其比活性。

討論

一、乙烯對切離葉片老化之影響

早有報告指出乙烯在切離葉片的老化過程中扮演重要角色；即外加乙烯處理可以加速葉片黃化與葉綠素降解(Aharoni and Lieberman, 1979a; Abeles et al., 1992; Buchanan et al., 2000; Kao and Yang, 1983)。根據 Yamauchi and Watada (1991; 1993)的報告指出，乙烯促進黃化的途徑與自然的老化並無不同，葉綠素的代謝途徑並不會受到乙烯處理的干擾，只是加速其分解速率，原因是兩者之葉綠素代謝產物並無不同，所以乙烯處理只是加速葉片老化的表現。

不同植物材料與不同乙烯處理條件所引起的黃化反應速率也不盡相同(高, 1987; 高, 1994)。唐(1997)以數種葉菜類作物之葉片在有乙烯存在的環境下，觀察到小白菜、蕹菜和芥藍等作物葉片的黃

化速率會加快，因而認定這些葉菜類屬於對乙烯敏感的作物。芥藍切離葉片對於乙烯處理引起的反應與處理的濃度、時間有很大的關聯，乙烯處理時間越長、濃度越高，對芥藍切離葉片的促進黃化效果越顯著。圖 1、2 說明葉綠素降解速率與乙烯濃度確有正相關，與之前的研究結果相符合(紀, 2003)。

二、 H_2O_2 含量、脂質過氧化作用與切離葉片老化之關係

葉片老化是需氧的過程(Sarkar and Choudhuri, 1981; Tetley and Thimann, 1974)。植物細胞中產生的 AOS 在低濃度時，可以誘導防禦基因的表現以抵抗病原菌與非生物性逆境，高濃度則會誘發細胞程序性死亡，因此 AOS 在細胞內的濃度需受到嚴密的調控(Vranova et al., 2002)。

AOS 中的 H_2O_2 是一種具有氧化力的細胞代謝產物，對細胞不具有很高的毒性，在生物或非生物逆境中可作為訊息傳導分子，引起植物反應；但細胞中有鐵離子或銅離子存在時， H_2O_2 會與 O_2^- 經由 Haber-Weiss 反應，產生毒性較強的羥基自由基(hydroxyl radical, $OH\cdot$)，能對細胞造成嚴重傷害。因此 H_2O_2 的濃度增加可能會導致植物抗氧化系統中的其他 AOS 分子濃度之增加 (Hodges and Forney, 2000; Salin, 1988)。

葉片老化亦會造成內生 H_2O_2 含量的累積 (Mondal and Choudhuri, 1982)。在芥藍切離葉片黃化過程中，乙烯處理組之 H_2O_2 含量在處理 1 天後即開始高於對照組，而對照組在處理 2 天後下降。本試驗結果說明乙烯處理可以增加芥藍切離葉片在處理期間 H_2O_2 含量，但對照組之內生 H_2O_2 的含量不僅未增加或維持一穩定狀態，反而開始降低，可能是切離葉片在自然老化過程的初期，細胞仍具有調控內生活性氧族含量的能力；由於乙烯處理可加速老化現象的發生，因此在葉片正常老化後期， H_2O_2 含量也可能會有增加的趨勢。

脂質過氧化作用是植物細胞老化的重要生理特性之一，在葉片老化中扮演重要的角色(Leshem, 1988)。外加乙烯可以加速細胞膜上脂質降解速率和老化的發生(Hodges and Forney, 2000; Kim and Wills, 1995)。葉片老化也被認為與自由基引起的脂質過氧化作用(lipid peroxidation)有關；脂質過氧化作用會使膜系(membrane system)降解、滲漏增加及失去完整性(Dhindsa et al., 1981)。許多研究指出脂質過氧化作用在葉片老化過程中會不斷發生(Dhindsa et al., 1981; Hurng and Kao, 1994)，因此脂質過氧化作用產物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量可用來當作切離葉片脂質過氧化作用程度的指標(Heath and Packer, 1968; Hodges et al., 1999)，並代表遭受氧化逆境的程度(Hodges et al., 1999)。MDA 含量也被認為與葉片老化的進行有正相關的關係(Dhindsa et al., 1981; Hodges et al., 1999; Hodges and Forney, 2000; Hurng and Kao, 1994; Kunert and Ederer, 1982)。

本研究中對照組與乙烯處理組切離葉片在處理 1 天後 MDA 均有下降現象，應是由於黑暗處理使葉片光氧化現象停止所致。乙烯處理使 MDA 含量自第 2 天開始高於對照組，且在第 3、4 天持續增加(圖 4B)，顯示乙烯所促進的切離葉片老化也同樣與脂質過氧化作用有關。對照組與乙烯處理組之 SPAD 讀值到第 3 天後才見明顯差異，而 H_2O_2 、MDA 含量表現之差異出現在第 1 天與第 2 天(圖 2)，此說明葉片先表現出遭到氧化逆境的變化而後葉片才出現老化。由於葉片老化與自由基引起的脂質過氧化作用有關(Dhindsa et al., 1981; Hodges and Forney, 2000; Leshem, 1988)，因此 H_2O_2 與 MDA 含量開始增加的時間可以做為芥藍切離葉片老化程度的指標。

三、抗氧化酵素與切離葉片老化之關係

植物老化過程中會伴隨自由基的增加，當植物體受到氧化逆境引起的傷害時，會誘導或增強自身防禦機制中的抗氧化酵素活性來負責清除自由基的工作(Leshem, 1988)，此一系統包含了 superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、peroxidase (POX)、ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR) 等抗氧化酵素。SOD 為植物抗氧化系統的第一道防線，SOD 能將具有毒性的 O_2^- 轉換成 H_2O_2 後再經由其他具有清除植物體內過氧化氫的反應機制的抗氧化酵素(APX、CAT 與 POX)來清除之。



本試驗中對照與乙烯處理組抗氧化酵素 SOD 的比活性差異並不顯著(圖 5A)，且兩處理的 SOD 比活性開始出現變化的時間均較晚；可能是由於乙烯處理誘導芥藍切離葉片老化過程中， $O_2^- \cdot$ 不是大量累積的 AOS，因此負責其清除工作的 SOD 不會隨著氧化逆境程度增加而被誘導表現。POX 與 CAT 是負責催化 H_2O_2 分解的酵素，所催化的反應是將細胞中累積的 H_2O_2 轉變為 O_2 與 H_2O ，以避免 H_2O_2 累積對細胞造成毒害。本試驗的結果顯示，乙烯處理誘導葉片老化的過程中，CAT 的比活性並沒有顯著的差異(圖 12A)，而 POX 的比活性最早增加(圖 11B)；因此在芥藍切離葉片中，清除 H_2O_2 的主要酵素應是 POX 而非 CAT。本結果似乎指出芥藍切離葉片中 CAT 活性的高低與老化程度無明顯關係，此與其他葉片老化時 CAT 活性會降低的結果不同(林, 1996; Dhindsa et al., 1981; Hodges and Forney, 2000)。

在 Ascorbate-glutathione 循環之酵素系統中，GR 之比活性在乙烯處理後第二天開始增加(圖 5C)；因此可推測芥藍切離葉片在遭受氧化逆境時，還原態的 glutathione 最先用於清除 $O_2^- \cdot$ 與 H_2O_2 等 AOS，因此需要 GR 將氧化態之 Glutathione (GSSG) 還原為 GSH。由於 APX 的比活性在第 3、4 天增加(圖 10B)，表示此時 ascorbate 開始參與清除 AOS 的反應，將 H_2O_2 還原為 H_2O 。在本試驗中，芥藍切離葉片老化過程中，未測定 ascorbate 與 glutathione 二種抗氧化物的含量變化，因此其參與清除 AOS 的角色與維持氧化還原狀態平衡的能力，尚待後續的研究證明。

葉綠素的降解(degradation)或褪色(bleaching)被認為與脂質過氧化作用與活性氧有關(Heath and Packer, 1968; Hodges et al., 1996; Imamura and Shimizu, 1974; Orthofer and Dugan, 1973; Zhuang et al., 1995)。植物組織內的抗氧化酵素系統活性減少，會導致其喪失自身調節活性氧含量的能力，因此很容易出現黃化徵狀(Toivonen and Sweeney, 1998)。乙烯處理導致芥藍切離葉片老化的試驗中，葉綠素含量減少的原因，可能是乙烯促進脂質過氧化作用的結果，產生了具有破壞葉綠體膜完整性的能力的過氧化物(hydroperoxides)，造成葉綠素降解；同時 APX、GR、POX 等抗氧化酵素活性雖有增加，但幅度並不足以克服活性氧攻擊植物光合作用系統所引起的傷害，因此葉片發生老化。

國人日常食用的葉菜大多為十字花科芸苔屬(*Brassica spp.*)之蔬菜，這一類蔬菜在採收後很容易受到乙烯的影響而變黃老化。本試驗以芥藍為代表性材料，探討受到乙烯作用後之老化反應與氧化逆境之關係，以及葉片中抗氧化酵素之反應；結果顯示乙烯誘導之葉片黃化可能與氧化逆境有關，而葉片在受到乙烯作用後，抗氧化系統中的 APX、GR 及 POX 等之活性會上升，可能是該葉片老化時參與清除 AOS 的主要酵素。未來可進一步利用對乙烯處理表現出不同黃化速率之芥藍品種，比較其抗氧化反應酵素之表現，其結果將可做為增進芸苔屬蔬菜之耐乙烯性狀選拔育種之參考。

參考文獻

1. 王自存. 2000. 耐貯藏性芥藍品種之選育與改良. 行政院農業委員會科技計畫研究報告. 89 科技-1-1-糧-67(01).
2. 林照能. 1996. 水稻老化葉片之研究. 台大農藝系碩士論文.
3. 高景輝. 1987. 植物生長與分化. p.451~454. 茂昌圖書有限公司. 台北.
4. 高景輝. 1994. 植物荷爾蒙生理. 華香園出版社. 台北.
5. 紀銘坤. 2003. 茉莉酸甲酯與乙烯對芥藍苗切離葉片黃化之影響. 台大園藝系碩士論文.
6. 唐志婷. 1997. 低氧及乙烯處理對綠色蔬菜採後黃化之影響. 台大園藝系碩士論文.



7. Abeles, F. B., P. W. Morgan, and M. E. Saltveit. 1992. Ethylene in plant biology. 2nd ed. Academic Press, San Diego. USA.
8. Aharoni, N. and M. Lieberman. 1979a. Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 64: 801-804.
9. Aharoni, N. and M. Lieberman. 1979b. Patterns of ethylene production in senescencing leaves. *Plant Physiol.* 64: 796-800.
10. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
11. Bartoli, C. G., M. Simontacchi, E. Montaldi, and S. Puntarulo. 1996. Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during aging of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *J. Exp. Bot.* 297: 595-601.
12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
13. Buchanan, B. B., W. Gruissem, and R. L. Jones. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. p.1044-1203. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Md. USA.
14. Dhindsa, R. S., P. L. Plumb-Dhindsa, and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.
15. Foster, J. S. and J. L. Hess. 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. *Plant Physiol.* 66: 482-487.
16. Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198.
17. Hodges, D. M. 2003. Chapter 1. Overview: oxidative stress and postharvest produce. p.1-12. In: D. M. Hodges ed. Postharvest oxidative stress in horticultural crops. Food Products Press, Binghamton, N.Y., USA.
18. Hodges, D. M., C. J. Andrews, D. A. Johnson, and R. I. Hamilton. 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.* 98: 685-692.
19. Hodges, D. M. and C. F. Forney. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 51: 645-655.
20. Hodges, D. M. and C. F. Forney. 2001. Antioxidant responses in harvested leaves of two cultivars of spinach differing in senescence rates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 611-617.
21. Humg, W. P. and C. H. Kao. 1994. Lipid peroxidation and antioxidative enzymes in senescing tobacco leaves during post-flooding. *Plant Sci.* 96: 41-44.
22. Imamura, M. and S. Shimizu. 1974. Metabolism of chlorophyll in higher plants. IV. Relationship between fatty acid oxidation and chlorophyll bleaching in plant extracts. *Plant Cell Physiol.* 15: 187-190.
23. Jana, S. and M. Choudhuri. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12: 345-354.
24. Kao, C. H. and S. F. Yang. 1983. Role of ethylene in the senescence of detached rice leaves. *Plant Physiol.* 73: 881-885.



25. Kato, M. and S. Shimizu. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plant. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can. J. Bot.* 65: 729-735.
26. Kim, G. H. and R. B. H. Wills. 1995. Effect on ethylene on storage life of lettuce. *J. Sci. Food Agric.* 69: 191-201.
27. Kunert, K. J. and M. Ederer. 1985. Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiol. Plant.* 65: 85-88.
28. Leshem, Y. Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 39-49.
29. MacAdam, J. W., C. J. Nelson, and R. E. Sharp. 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99: 872-878.
30. Mondal, R. and M. A. Choudhuri. 1982. Regulation of senescence of excised leaves of some C₃ and C₄ carbon pathways species by endogenous H₂O₂. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 177: 403-417
31. NaKano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
32. Orthoefer, F. T. and L. R. Dugan, Jr. 1973. The coupled oxidation of chlorophyll a with linoleic acid catalyzed by lipoxidase. *J. Sci. Food Agric.* 24: 357-365.
33. Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali, and A. Capparini. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154: 536-541.
34. Philosoph-Hadas, S., S. Meir, and N. Aharoni. 1991. Effect of wounding on ethylene biosynthesis and senescence of detached spinach leaves. *Physiol. Plant.* 83: 241-246.
35. Philosoph-Hadas, S., S. Meir, B. Akiri, and J. Kanner. 1994. Oxidative defense systems in leaves of three edible herb species in relation to their senescence rate. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2376-2381.
36. Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.
37. Prochazkova, D., R. K. Sairam, G. C. Srivastava, and D. V. Singh. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 161: 765-771.
38. Salin, M. L. 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant.* 72: 681-689.
39. Saltveit, M. E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15:279-292.
40. Sarkar, U. and M. A. Choudhuri. 1981. Effects of some oxidants and antioxidants on senescence of isolated leaves of sunflower with special reference to glycolate content, glycolate oxidase, and catalase activities. *Can. J. Bot.* 59: 392-396.
41. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. 2nd ed. p.476-478. Sinauer Association, Inc., Massachusetts. USA.
42. Tetley, R. M. and K. V. Thimann. 1974. The metabolism of oat leaves during senescence I. Respiration, carbohydrate metabolism, and the action of cytokinins. *Plant Physiol.* 54: 294-303.
43. Toivonen, P. M. A. and M. Sweeney. 1998. Differences in chlorophyll loss at 13°C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.* 46: 20-24.



44. Vranová, E., D. Inzé, and F. Van Breusegem. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
45. Yamauchi, N. and A. E. Watada. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 58~62.
46. Yamauchi, N. and A. E. Watada. 1993. Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled or ethylene containing atmosphere. *J. Food Sci.* 58: 616-637.
47. Zhuang, H., D. F. Hildebrand, and M. M. Barth. 1995. Senescence of broccoli buds is related to changes in lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2858-2591.

Abstract

The purpose of this research was to study the changes in enzyme activities of antioxidant system in excised leaves in response to ethylene, and to find out the relationship between oxidative stress and ethylene-induced leaf senescence. Plant material used in this study were the second fully developed leaf of 3-week old seedlings of the ethylene-sensitive 'Veg Gin' Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Alboglabra Group). Incubating the excised leaves of Chinese kale in dark at 25°C in the presence of 1 ppm ethylene for 4 days greatly accelerated the process of leaf yellowing. The ethylene treated leaves, in comparison with the air-treated control, had significantly lower chlorophyll and protein content on the third day. The hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) content started to increase on the 1st and 2nd day after ethylene treatment, and were much higher than the control. Specific activities of three antioxidant enzymes within the plant's antioxidant defense system: the ascorbate peroxidase (APX), the glutathione reductase (GR) and the peroxidase (POX), all showed significant increase after two days in the ethylene-treated leaves. On the other hand, the superoxide dismutase (SOD) and the catalase (CAT) changed very little in these leaves. The above results suggested that in excised leaves of Chinese kale, ethylene induced their rapid senescence first by an increase in H₂O₂, which caused an increase in the lipid peroxidation of the membrane systems and resulted in the accumulation of MDA. When the oxidative stress progressed, enzymes in the cellular antioxidant system including APX, GR and POX responded by increasing their specific activities.

