

Cytokinin 延遲水稻葉片黃化效應之研究

袁 藝 宇¹ 李 成 章²

摘 要

本試驗主要探討 Cytokinin 對水稻葉片黃化之影響。就具有環狀側鏈之 Cytokinin 種類而言，其延緩葉片黃化效果依序為 BZI > K > BA。在二期作水稻各生育期之葉綠素含量，均在抽穗期前隨生育日數增加而增加，至抽穗後 10 天達最高點，然後開始下降。於一定濃度之 BZI 處理葉圓片，對葉綠素含量降低有延緩效果，對 α -氨基態氮含量之增加則有抑制效果，同時兩者之間呈顯著負相關。至於 BZI 處理葉圓片 (in vitro) 及生長植株 (in vivo) 對延緩葉綠素含量之比較可知，不論是 in vitro 或 in vivo，在一定濃度下之 BZI 對延緩葉綠素含量有效果；不同品種間經多種濃度之 BZI 處理後，in vitro 與 in vivo 所呈現最佳延緩效果之倍數關係不同；且就植株整體而言，老化速率較分離葉片為慢。

關鍵字：水稻 光合作用、老化

Cytokinin

前 言

“如何使作物增產”一直是作物育種家及從事農作物栽培研究的技術人員努力追求的目標；但依現行的栽培方式顯示，農作物增產依然受邊際效應瓶頸的限制，即使有所增加也是緩慢的，但是根據生理及遺傳理論研究顯示，農作物生產潛力極高，且未能充分發揮。而其中最主要的限制因子則為光合作用。就水稻而言，形成澱粉之碳水化合物有 25% 係來自營養器官中所貯存者，75% 則來自穀粒充實期間之光合作用(4)，但目前一般作物的光合作用效率極低，許多作物對太陽能的利用效率不及 1%。因此如何提高光合作用，應為達到豐產的有效途徑。

水稻光合作用效率及光合作用能力受溫度、日照、葉面積指數及葉綠素含量的影響，而葉綠素 (Chlorophyll) 係影響光合作用主要因子之一，葉綠素含量不僅與光合作用呈正相關，且亦可做為判斷葉片老化的指標。

當葉片老化時，葉之結構及代謝發生顯著變化，首先是葉片自尖端逐次黃化，失去葉綠素，最後導致枯死，同時葉片內蛋白質、核酸 (DNA RNA) 含量降低，結果造成氨基酸、醣類、礦物元素聚積增加或轉移至其它部位(2)。此外生理功能如光合作用、呼

1. 台東區農業改良場助理研究員 2. 中興大學教授

吸作用與葉部細微構造亦發生改變。

植物老化並不是一個單純的破壞過程，其破壞過程不僅受酵素控制，同時受植物荷爾蒙調節，故整個過程是由許多因子相互配合調節，但最主要的影響則為葉片中葉綠素、蛋白質和核酸含量及其代謝(2)；另一方面荷爾蒙中的 **Cytokinin** 被發現具有控制老化系統的能力則引起廣泛的注意。因此本試驗最主要的目的即為探討 **Cytokinin** 對水稻葉片老化的延續問題，包括不同種類不同濃度的 **Cytokinin** 延續葉綠素之效應，葉圓片老化時組成分的變化及水稻生育各時期之葉綠素變化，俾便對葉片老化有進一步的認識。

材 料 與 方 法

(一)供試材料：

1. 供試品種：選用不同葉綠素含量之水稻品種，台農67號、**Krishina**、**TN1**、農林8號(誘變系1264號)、**LT-8**號等參試。
2. 供試荷爾蒙種類：選用環狀側鏈之 **Cytokinin** (**Adenine** 環上之 N^6 側鏈為環狀者)，**Kinetin**(**K**)、**Benzyladenine**(**BA**)、**Benzimidazole**(**BZI**)。

(二)試驗設計：

1. **Cytokinin** 種類對葉圓片老化影響之試驗：採裂區設計，以三種 **Cytokinin**: **Kinetin**、**Benzyladenine** (以下簡稱 **BA**)。 **Benzimidazole** (以下簡稱 **BZI**) 為主區五種不同濃度：10、1、0.1 . PPM. 蒸餾水 (**ck₁**)，蒸餾水加展著劑 (**ck₂**) 為副區，三重複，施用之葉圓片係採用抽穗期之台農67號主莖第二葉，施用後隔三天測定葉綠素總量。
2. 水稻生育期之葉綠素變化比較試驗：採裂區設計，以台農67號、**Krishina**、農林8號、**LT-8** 品種為材料，每品種種植 200 株，行株距 25 × 25 cm，兩重複，於民國71年2期作進行。於分蘗期，最高分蘗期、孕穗期、抽穗期及抽穗後 10天、20天、30天分別測定主莖葉片之葉綠素含量。
3. 葉圓片老化時組成分變化試驗：採台農67號、**TN1**、**Krishina** 三品種為試驗材料，施用 **BZI** 七種濃度：10、5、1、0.5、0.1、0.01、0 ppm 處理台農67號葉圓片係採自抽穗期主莖第一葉，處理後隔 24、48、72小時各觀測一次葉綠素 (**chlorophyll**) 及 α -氨基態氮 (α -**Amino Nitrogen**) 含量。
4. 不同濃度之 **BZI** 處理葉圓片和生長植株對延緩葉綠素效應之比較試驗：採台農67號、**TN1**、**Krishina** 三品種為材料，葉圓片試驗 (**in vitro**) 部份之 **BZI** 濃度分為 10、5、1、0.1、0.01、0 ppm 六種處理，同時隔 24、48、72 小時測定葉綠素變化；生長植株試驗 (**in vivo**) 部份之 **BZI** 濃度則為 10^4 、 10^3 、 5×10^2 、 10^2 、10、0 ppm 六種處理，同時隔 3、6、9 天測定葉綠素變化，處理時期在抽穗期進行。

(三)取材及處理方法：

葉圓片試驗部份：於抽穗期至田間逢機採摘參試材料主莖的第二葉位，頭尾去除剪下 0.1 g 的葉圓片，分別放入不同 Cytokinin 或不同濃度處理之蒸發皿中，放入 30 °C 黑暗恆溫箱中（在黑暗及稍高的溫度中，會加速葉綠素含量的變化，可以在較短時間看出效果），然後再隔 24 小時取出觀察其顏色變化及測定葉綠素及 α -氨基態氮的含量。

生長植株試驗部份：荷爾蒙處理係於抽穗期噴灑田間各參試材料後，每隔 3 天取主莖第二葉置入冰桶携回剪下 0.1g 葉片，測葉綠素含量。不同時期之取樣於分蘗期，最高分蘗期、孕穗期，係採取主莖最上方已伸展之葉片，抽穗期及其後期之採樣，係採取主莖劍葉下一葉（第二葉）測試，每品種每次取樣 20 株。

四葉綠素及 α -氨基態氮含量之測定：

1. 葉綠素含量測定：將新鮮葉片 0.1 g 放入研鉢中加入海砂磨碎，再以 50 ml 之 80% 丙酮萃取，靜置約 2 小時，俟沉澱物變白，萃取完全後，利用光電比色計（Spectrophotometer）測其在 645 $m\mu$ 、663 $m\mu$ 、652 $m\mu$ 三種波長下之吸光度，並依下列公式將所測之吸光度換算為葉綠素 a、b 及總含量（3，5）：

$$\text{葉綠素 a (mg / g FW)} = \frac{(12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{葉綠素 b (mg / g FW)} = \frac{(22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{葉綠素總量 (mg / g FW)} = \frac{(20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{或} = \frac{(D_{652} \times 1000 / 345) \times V}{1000 \times W}$$

【V = 溶液體積 (ml)，W = 鮮葉重 (g)】

2. α -氨基態氮含量之測定：

分別吸取已間隔 24、48、72 小時，內置有葉圓片之 BZI 溶液 5ml，用 UV-300 測其在 520 $m\mu$ 波長之吸光度再與 Blank 相除，得出所需之比值。

五試驗年期：

民國 71 年 2 期作及民國 72 年 1 期作。

結果與討論

(一) Aytokinin 種類對葉圓老化之影響：

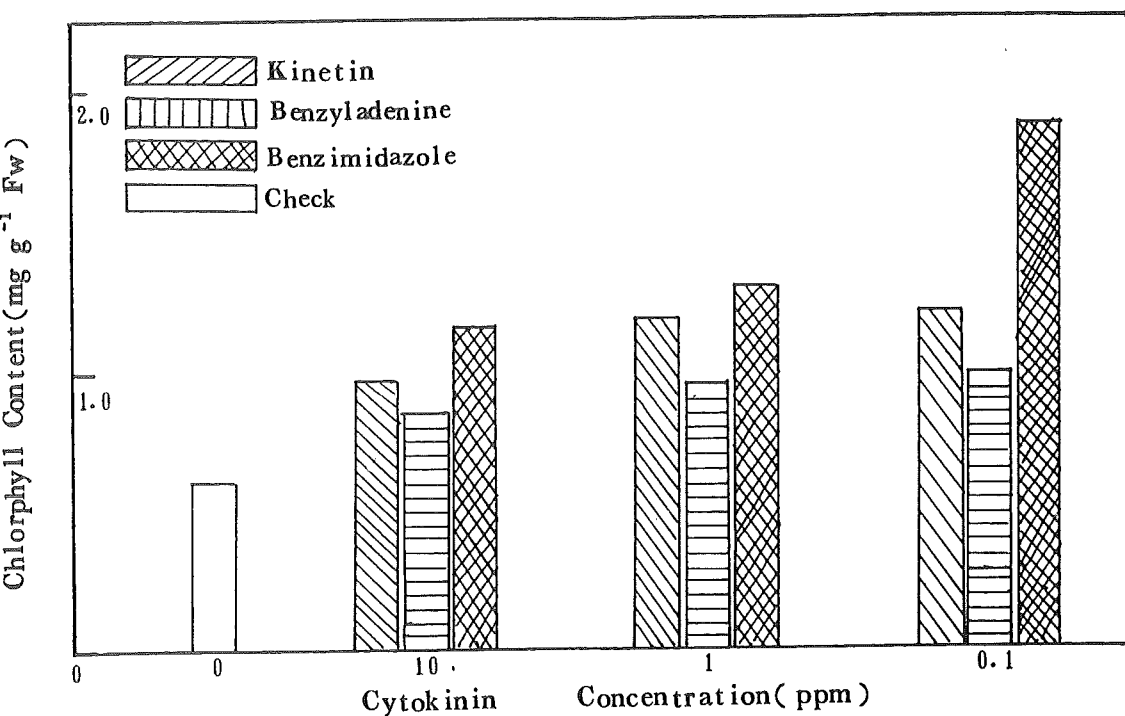
Cytokinin 延遲葉綠素消失，被認為主要是抑制蛋白質分解酵素形成及 RNase

活性，減少蛋白質及RNA分解，因此延遲了葉綠體蛋白結構之被破壞且保持 Photosystem 中電子傳遞系統的完整性(6)。

由圖一顯示，各種 Cytokinin 確有延緩葉綠素消失之效果，不論是 K, BA 或 BZI 處理之葉綠素含量均高於對照40%以上，若再以葉綠素含量為指標，其延緩水稻葉片老化效果依序為 BZI > Kinetin > BA，施用濃度則以 0.1 ppm 較 10 及 1 ppm 為佳。此與 Mishra 與 Pradhan (1973) 發現 BZI 延緩水稻切離葉圓片老化之效果大於 K 之結果一致，但依 Yu 和 Kao (1981) 之報告，具有鏈狀側鏈之 Cytokinin 對大豆之延緩效果則為 BA > K，而 BZI 則需高濃度始有稍許延緩效果。由以上討論可知 Cytokinin 延緩老化之效果隨作物品種不同以及濃度不同而不同。

(二) 水稻生育期之葉綠素變化比較：

圖二、三、四為四個水稻品種在民國71年2期作之各生育時期，葉片葉綠素含量平均值變化情形。葉綠素 a 含量如圖一顯示，不同水稻品種均於抽穗期前隨生育日數增加而逐次提昇，至抽穗後10天達到最高點，然後開始下降至成熟期最低，且均達顯著性差異(表一)。另比較各生育期不同品種葉綠素 a 含量之差異，得知以 Krishna



圖一 不同種類之 Cytokinin 處理水稻葉圓片對總葉綠素含量之影響

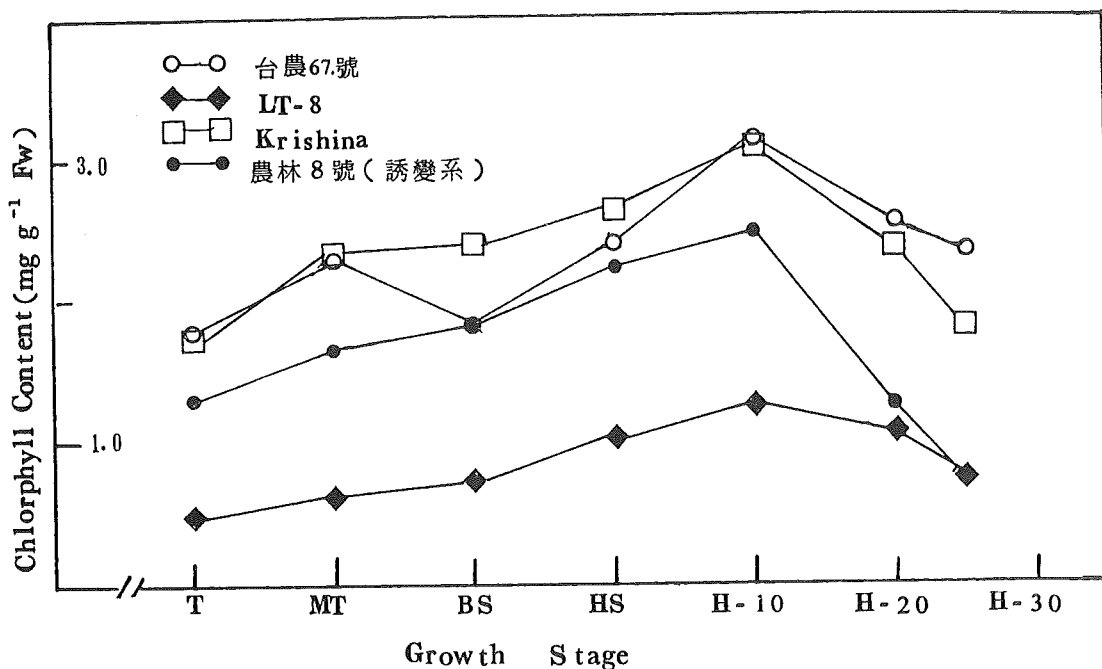
及台農67號最高，農林8號(誘變系)次之，LT-8最低，彼此間亦達顯著差異(表二)。

在不同生育時期葉綠素 b 含量之變化(圖三)與葉綠素 a 稍有不同，除 LT-8 外

，各品種均於孕穗期即達最高峰，且一直持續至抽穗後10天，然後才開始下降，在全生育期間表現較為穩定。品種間葉綠素 b 含量則均呈顯著差異（表二）。

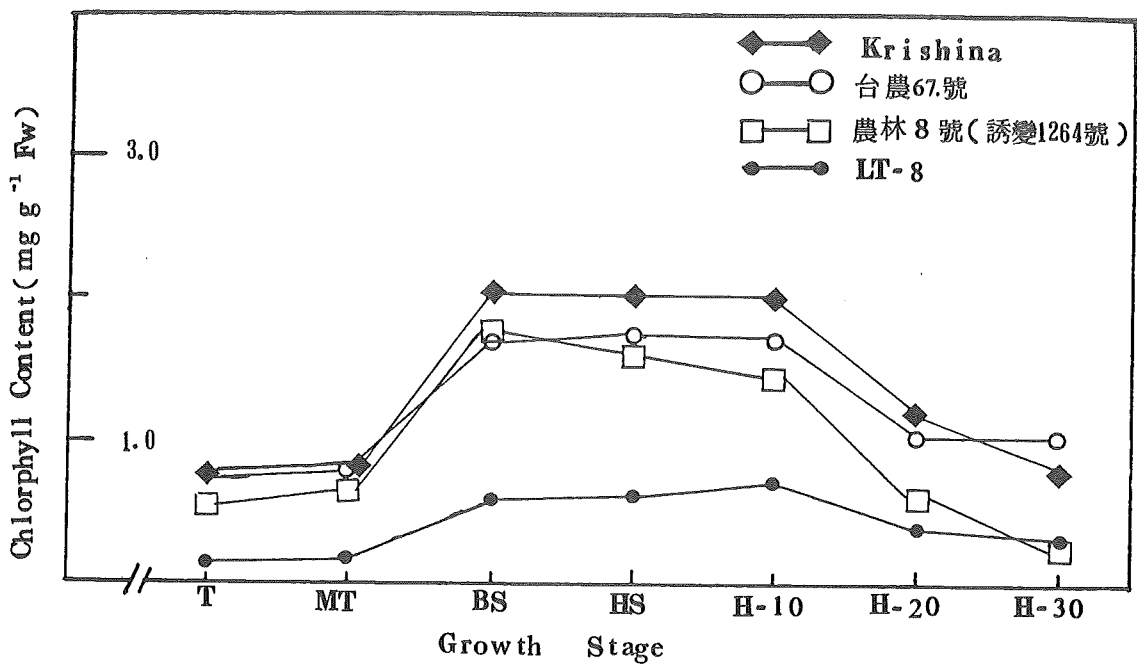
總葉綠素含量在各生育期之變化（圖四），除 LT-8 於孕穗期達到最高峰且持續至抽穗後10天外，其餘品種之趨勢均與葉綠素 a 含量相同，至抽穗後10天達最高峰後，才急速下降，且達顯著差異（表一），至於品種間之差異亦與葉綠素 a 相同。

由此可知，在二期作水稻全生育期中，葉綠素含量最高點均出現在抽穗期前後，此種性質對碳水化合物的形成及蓄積有特別的意義，因為穀粒充實期間之澱粉，有 75 % 左右來自抽穗後之光合作用(1)，故在此期間含有較高之葉綠素，顯示二期作水稻在抽穗前後有較高的光合能力，有助於穀粒的稔實。

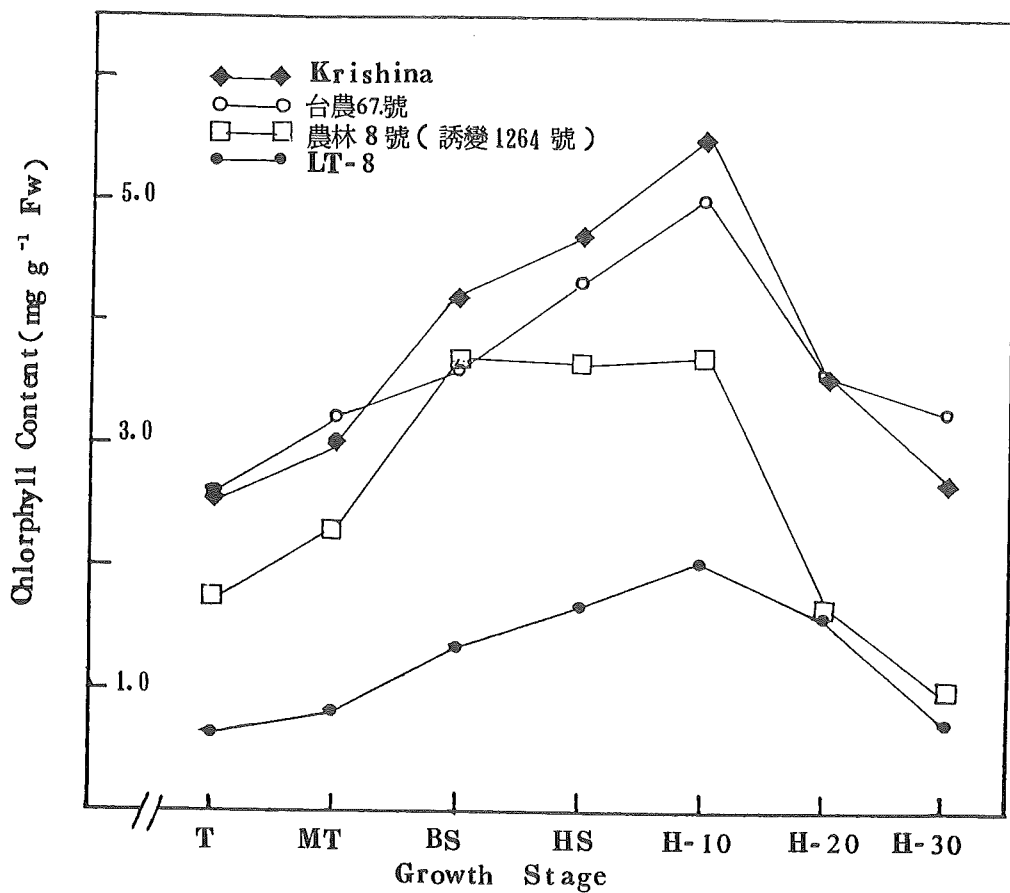


圖二 不同生育期之水稻葉綠素 a 含量變化（71年2期作）

- 註： T：分蘗期（Tiller stage）
 MT：最高分蘗期（Max tiller stage）
 BS：孕穗期（Booting stage）
 HS：抽穗期（Heading stage）
 H-10：抽穗後10天（10 days after heading）
 H-20：抽穗後20天（20 days after heading）
 H-30：抽穗後30天（30 days after heading）



圖三 不同生育時期之水稻葉綠素 b 含量變化 (71.年 2.期作)



圖四 不同生育時期之水稻葉綠素含量變化(71年2期作)

表一 水稻葉綠素含量在各生育時期間之鄧肯氏多變域測驗

水稻生育 時 期	葉綠素含量 (mg g ⁻¹ FW)		
	(a+b)	a	b
分蘖期	1.9 e	1.3 e	0.6 c
最高分蘖期	2.4 d	1.7 c	0.7 bc
孕穗期	3.2 c	1.6 cd	1.5 a
抽穗期	3.6 b	2.1 b	1.6 a
抽穗後10天	4.1 a	2.5 a	1.6 a
抽穗後20天	2.6 d	1.8 c	0.8 b
抽穗後30天	1.9 e	1.4 de	0.6 c

註：不同英文字母表示 5 % 顯著差異

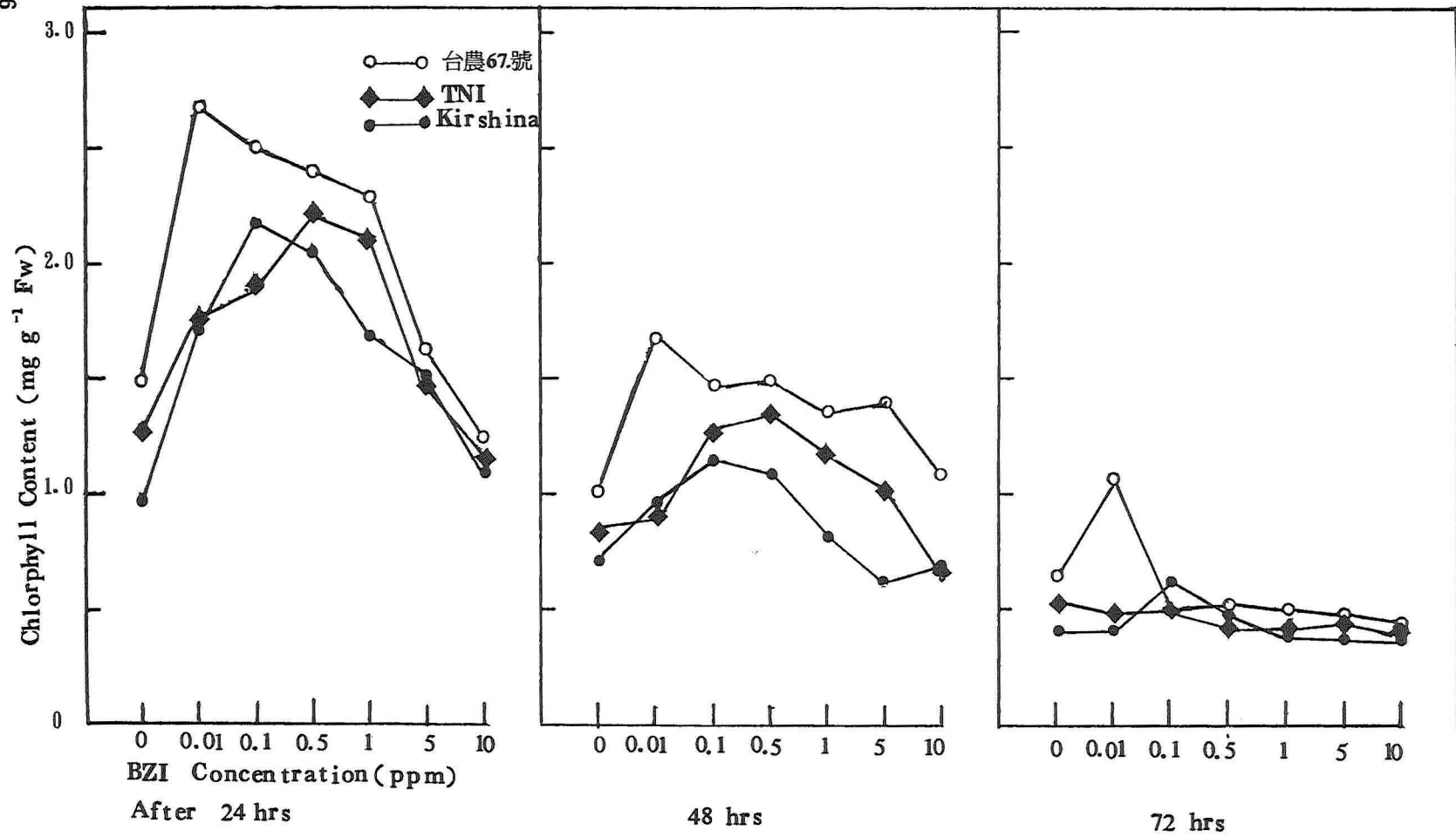
表二 水稻葉綠素含量在各品種間之鄧肯氏多變域測驗

品 種 別	葉綠素含量 (mg g ⁻¹ FW)		
	(a+b)	a	b
Krishina	3.8 a	2.4 a	1.5 a
台農67號	3.7 a	2.2 a	1.3 b
農林8號(誘變系)	2.5 b	1.6 b	1.0 c
LT-8	1.3 c	0.9 c	0.4 d

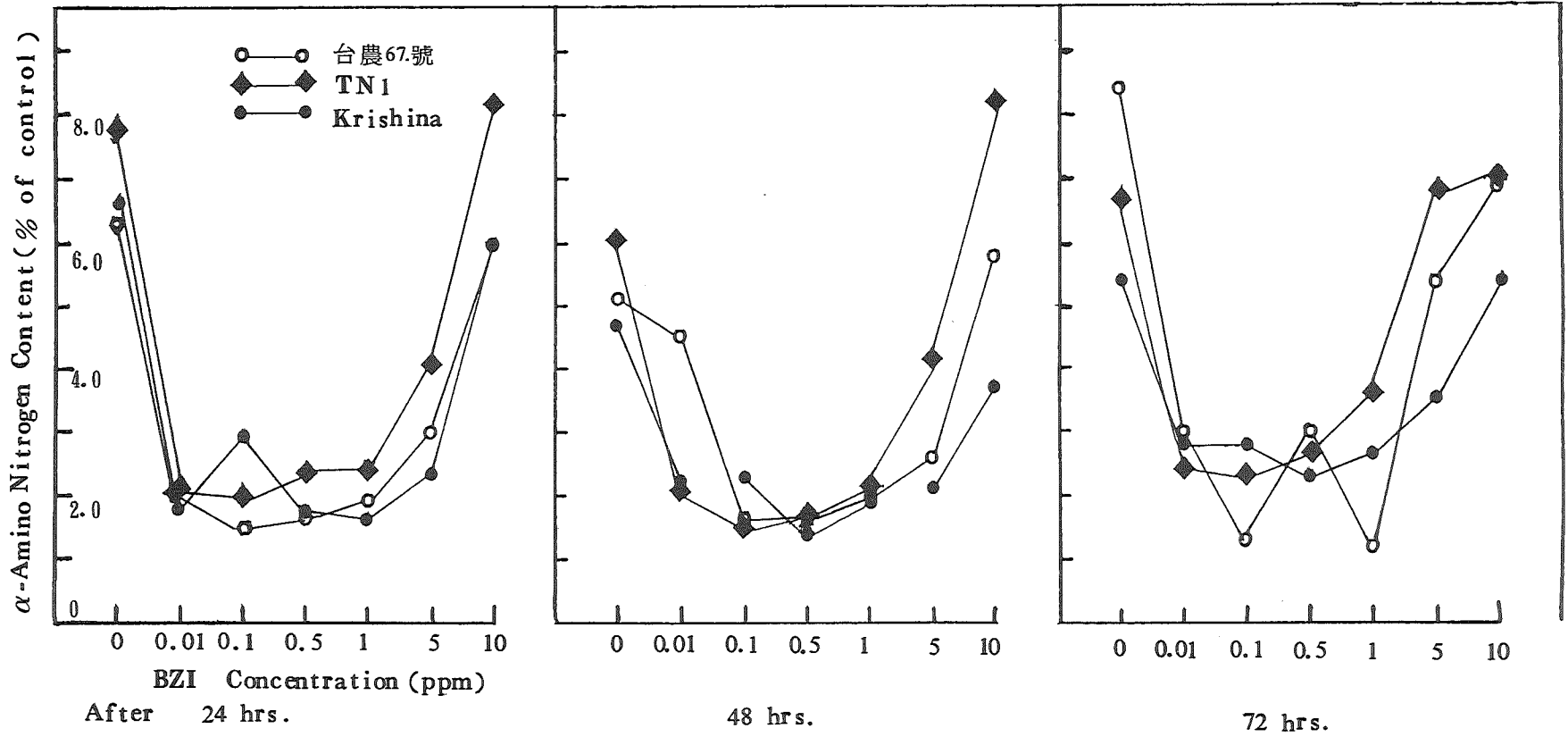
註：不同英文字母表示 5 % 顯著差異

(三)葉圓片老化時組成之變化：

不同品種水稻在抽穗期採摘之葉圓片，以BZI不同濃度處理，其葉綠素及 α -氨基態氮含量有顯著改變(圖五、六)。由圖五顯示，經BZI處理隔24小時後，台農67號、Krishina、TN1分別經BZI、0.01、0.1、0.5 ppm浸潤時，其葉綠素含量達到最高的延續效果，如濃度再高時，則葉綠素含量不升反降。同時隔48、72小時後，延遲葉綠素含量的趨勢與間隔24小時者相同，惟須注意的是經過的時間愈長，葉綠素含量顯著降低，例如台農67號於三個間隔時間中，由2.67降為1.68再降至1.06mgg⁻¹ FW



圖五 不同 BZI 濃度處理水稻葉圓片時總葉綠素含量之影響 (71年2期作)



圖六 不同BZI 濃度處理水稻葉圓片時 α -氨基態氮含量之影響 (71年2期作)

。由以上可知三點事實：1. 各不同水稻品種對BZI反應的敏感度不同。2. 於一定濃度下，BZI可延緩水稻葉圓片之黃化，如濃度再高則有反效果存在。3. 不論是何種濃度之BZI處理葉圓片，經過的時間愈久愈無法阻止或延緩葉片之黃化。

葉片老化另一顯著變化為葉片蛋白質含量減少，蛋白質發生分解，相對的氨基態氮含量顯著增加。由圖六可知，經BZI處理間隔24小時後，台農67號、Krishina、TN1葉圓片飄置液之 α -氨基態氮含量，分別以0.1、1、0.01 ppm為最低，最具抑制效果，濃度過高則氨基態氮含量急劇上升。葉片老化時 α -氨基態氮顯著增加的原因為組織膜完整性受破壞後(8)， α -氨基態氮從老化葉片破損組織中滲漏出，而累積在葉圓片懸浮液中之緣故。

另外綜合圖五及圖六，可以得到另二種現象：1) 經BZI不同濃度處理，間隔48-72小時之後， α -氨基態氮含量之趨勢與隔24小時者相同，且幾無任何變化，而葉綠素含量則隨時間延長而顯著下降。2) 某種濃度之BZI對延緩葉綠素含量之最高效果，並不一定對 α -氨基態氮含量造成最低滲漏之效果。這種葉綠素與 α -氨基態氮含量變化的時間及濃度差異，暗示著BZI對葉圓片老化之影響並不包括組織膜的完整性，意即BZI處理葉綠素含量時並未能維護葉圓片完好的組織狀況。Poovaiyah和Leopld(1973)則認為 Ca^{++} 可維持細胞膜的完整性，却不能影響葉圓片老化時的葉綠素含量，如果將 Ca^{++} 和Cytokinin或GA共同處理，則防止老化的效果將更為顯著。

同時探討 α -氨基態氮與葉綠素a、b及總含量之關係，發現於間隔24小時後，分別呈顯著的負相關($\gamma = -0.81 \uparrow\uparrow$ 、 $-0.79 \uparrow\uparrow$ 、 $-0.56 \uparrow$) (表三)，至於間隔48、72小時後無顯著關係之原因，則為分離葉圓片於24小時後分解已極為明顯，往後不再有任何變化；而葉綠素含量則隨時間延長而消滅，導致間隔48小時後無顯著相關。

表三 不同BZI濃度處理水稻葉圓片後， α -氨基態氮與葉綠素含量相關表

間 隔 (小時)	葉 綠 素 種 類		
	a	b	(a + b)
24	- 0.81 $\uparrow\uparrow$	- 0.79 $\uparrow\uparrow$	- 0.56 \uparrow
48	- 0.29 NS	- 0.41 NS	- 0.21 NS
72	- 0.06 NS	- 0.37 NS	- 0.05 NS

註： \uparrow 與 $\uparrow\uparrow$ 分別表示5%與1%顯著水準

四 不同濃度之BZI處理葉圓片和生長植株對延緩葉綠素效應之比較：

進行老化試驗時，不僅以分離葉片為材料，必要時也採用生長植株為材料來印證其異同。雖然研究生長植株葉片之老化易受其它器官影響，用間控制一致不易，與切離葉片生理表現不盡相同，但其中基本變化亦可做為參考。

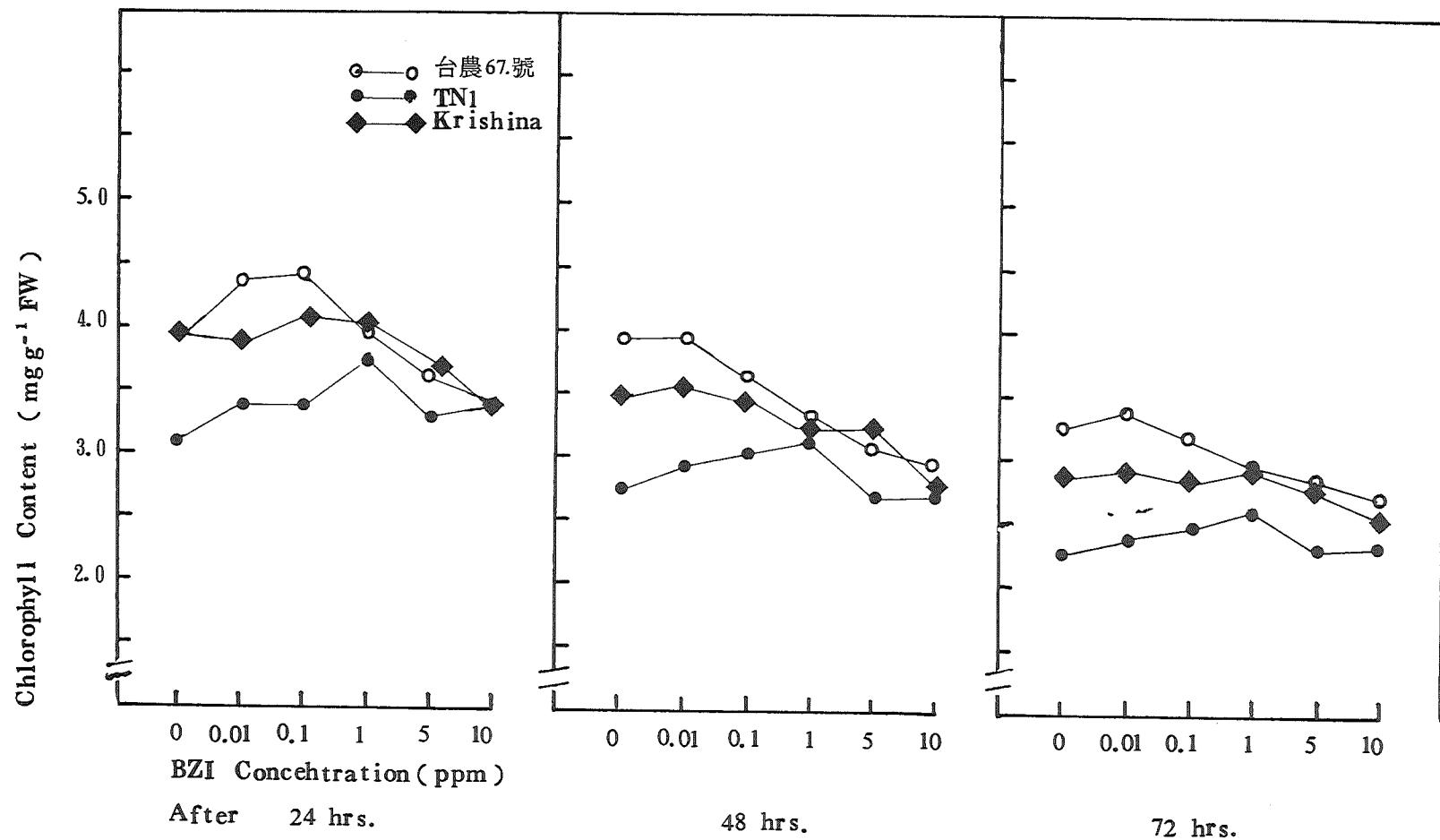
綜合圖六與圖七表現之比較可看出：

(1)不論是以生長植株或葉圓片為材料，均以台農67號及Krishina 之葉綠素含量高於TN1。至於前二個品種之間則差異不大，且在不同濃度下，葉綠素含量互有起伏。
 (2)台農67號、Krishina、TN1 在不同濃度BZI 處理下，於葉圓片(in Vitro)試驗中分別以 0.01、0.1、1 ppm 延緩效果較佳，於生長植株(in Vivo)試驗中則均以 100 ppm 為佳，如BZI 施用濃度過高(大於 500 ppm) 以上，則反而抑制稻株生長，葉綠素含量急劇下降，整個葉片變黃。(3)不同品種間經BZI 各種濃度處理後，in Vitro 與 in vivo 呈現最佳延緩效果之倍數關係不同，例如台農67號 in vitro 之最佳延緩效果為 0.01 ppm，in vivo 為 100 ppm，相差為一萬倍，而Krishina 則相差為一千倍，但大體而言，於 in vitro 及 in vivo 之 BZI 處理，葉綠素含量均維持在相同趨勢之曲線，意即在一定濃度下之BZI 對延緩水稻葉綠素均有效果。(4) BZI 對生長植株之葉綠素延緩時間維持效久，間隔 6 天、9 天後仍保持原有葉綠素含量(圖七)，而葉圓片試驗則於48及72小時後不斷下降(圖六)，因此就植株整個個體而言，老化速率較分離葉片為慢。(5)一定濃度之BZI 量與葉綠素含量間有正相關關係，如圖六之 TN1，以 BZI 0-1ppm 處理下，間隔 48小時及72小時均與葉綠素含量呈一直線關係，此種特性似亦可用來定量BZI 含量之多寡。

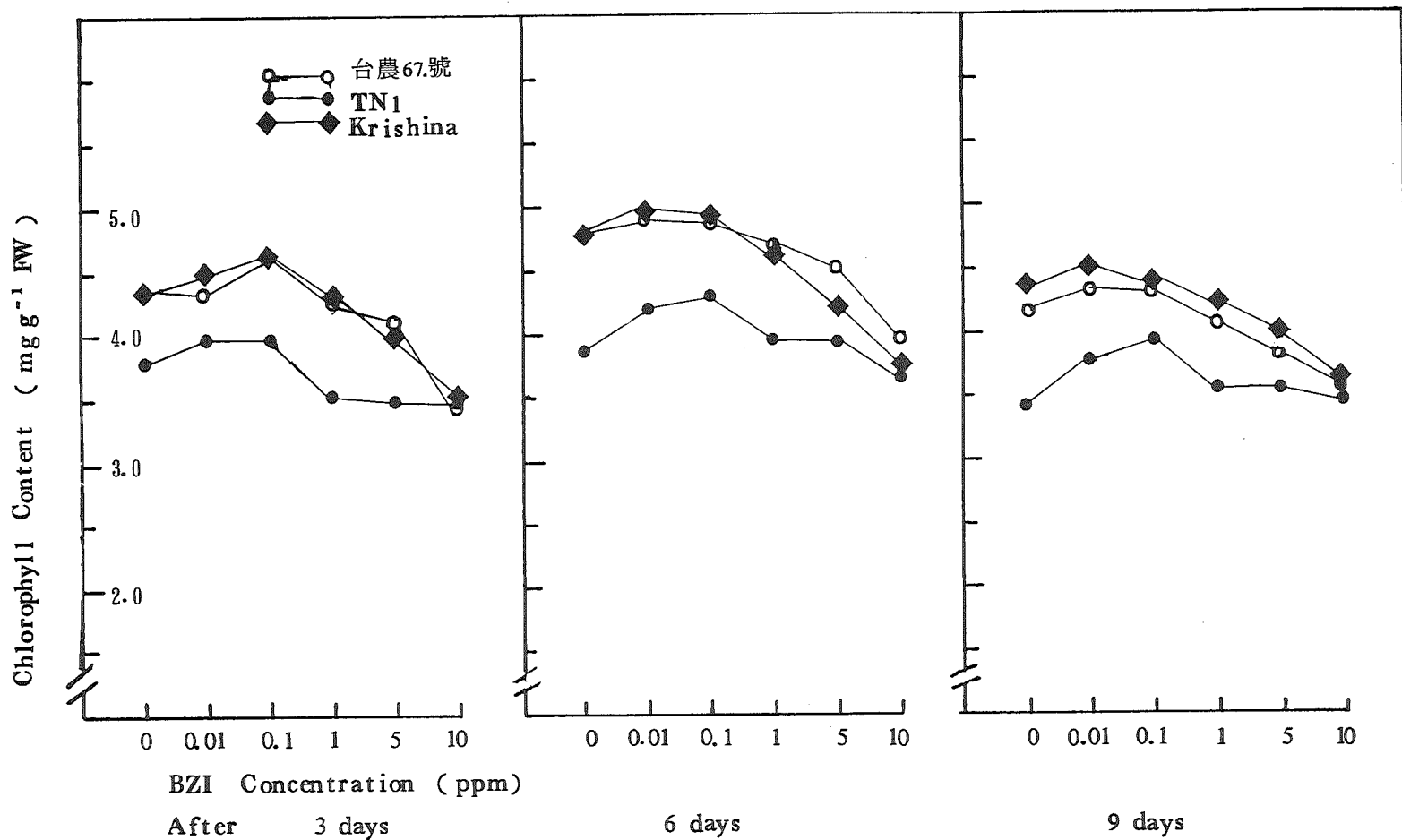
同時不論為 in vitro 或 in vivo 試驗，葉綠素 a、b 及總含量間之相關係數均為顯著(表四)，此表示葉綠素 a 及 b 同為構成葉綠素之主成分，共同影響光合作用。

表四 不同BZI 濃度處理水稻葉片後，葉綠素 a、b 及總含量(T)間之相關
 (72 年 1 期作)

葉綠素種類之相關	葉圓片處理(間隔小時)			生長植株處理(間隔天數)		
	24	48	72	3	6	9
$\gamma_{a,b}$	0.90 +	0.95 ++	0.98 ++	0.99 ++	0.84 +	0.88 +
$\gamma_{a,T}$	0.93 ++	0.97 ++	0.99 ++	0.98 ++	0.94 ++	0.91 +
$\gamma_{b,T}$	0.97 ++	0.99 ++	0.99 ++	0.99 ++	0.99 ++	0.99 ++



圖七 不同BZI 濃度處理水稻葉圓片對總葉綠素含量之影響 (72年 1.期作)



圖八 不同BZI濃度處理水稻葉圓片對總葉綠素含量之影響(72年1期作)

参 考 文 献

1. 星川、北條 1976 作物—その形態と機能
農業技術協會會刊 p. 202.
2. 陳秀瑜、朱德民 1977 葉片老化
科學農業 25(5-6)=170-176。
3. Arnon, D.I. 1959 Copper enzyme in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant physiol.* 24:1-15.
4. Cock, J. and S. Yoshida. 1972 Accumulation of ¹⁴C-labelled carbohydrate before flowering and its Subsequent redistribution and respiration in the rice plant. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan.* 41:226-234.
5. Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140:315 - 332.
6. Martin, C. and K.V. Thimann 1972 The role of Protein Synthesis in the Senescence of leaves. II The influence of amine acids on senescence. *Plant physiol.* 50:432 - 437.
7. Mishra, D. and P. Pradhan. 1973. Regulation of Senescence in detached rice leaves by light, benzimidazole and Kinetin. *Exp. Geront.* 8: 153 - 155.
8. Poovaiah, B. W. and A. C. Ceopold. 1973. Deferral of leaf senescence with calcium. *Plant Physiol.* 52:236 - 239.
9. Yu, S.M. and C.H. Kao 1981 A comparison of activities of Various cytokinins on the senescence of soybean leaf discs. *Bot. Ball. Academia Sinica.* 22:49 - 56.

Effect of Cytokinin on Rice Leaves Yellowing

Yih-Yen Yuan¹, Cheng - Chang Lee²

SUMMARY

Study about Cytokinin effects on Rice leaves yellowing was the principal goal of this experiment. Depending on their effective degree, all Cytokinins which had circular branch chains were arranged in order as BZI > K > BA. In second crop, the chlorophyll contents of Rice leaves were gradually increasing when growing-days increased and reach to top level at 10 days after tilling, then they started to descend. With the treatment of some suitable concentration of BZI, the descending speed of chlorophyll contents could be delayed. On the contrary, the ascending speed of α -amino nitrogen contents would be limited. Both of them showed negative relation. According to comparison of BZI treatment for cutten leaves (in vitro) and live plants (in vivo), the suitable concentration of BZI was effective not only in vitro but also in vivo for delaying descending speed of chlorophyll contents. Different varieties under treatment of various BZI concentrations showed different multiple relation of best delaying effects either in vitro or in vivo. As for whole live plant, their yellowing speed were slower than cutten leaves.

1. Asistant agronomist of Taitung District Agricultural Improvement Station.

2. Proffessor of Chung Hsing University.