

葉綠素螢光在作物耐熱性篩選之應用

劉敏莉¹

摘要

光合作用(photosynthesis)是植物物質轉換與能量代謝的關鍵，對環境逆境具有敏銳且直接之反應。高溫逆境(heat stress)對於光合作用活性的影響尤其明顯，植物葉綠體類囊體膜對於高溫十分敏感易受傷害，其結果是降低光合作用的效率，其中光系統II(photosystem II, PS II)是反映高溫逆境最敏感的位置。Fv為最低至最高螢光量間的差值，Fm是黑暗狀態下，照射飽和光源後螢光最高值，Fv/Fm(黑暗狀態下，PSII光學反應最大螢光值)的比值是描述光合作用胞器生理狀況的重要參數，透過葉綠素螢光(chlorophyll fluorescence)釋放量作估算，可表示光合作用活性高低的指標。當逆境發生時，影響PS II電子的傳導，進而降低Fv/Fm的比值，因此在生理研究中，會以此值作為描述逆境發生的指標。植物在高溫逆境下，有種子發芽降低、充實不良、生長緩慢和早期抽苔等現象。45°C以上之高溫逆境下，玉米葉片的葉綠素螢光之最大螢光參數(Fv/Fm)、有效螢光參數(Φ PS II)明顯下降，非光化學淬熄係數(non-photochemical quenching coefficient, qN)有明顯上升趨勢，綜合各葉綠素螢光參數之變化，可提供耐熱品系評估之利用。葉片螢光值具有高遺傳力，對不同逆境有一致表現，而對產量也具有極高相關性。葉綠素螢光測定具有使用方便、靈敏度高且不具破壞性，可作為偵測光合作用胞器的激發能量，提供光合作用機制及調節的觀察，並篩選作物對環境之耐性如高低溫、乾旱、高光逆境及潛在生產等。

關鍵語：光合作用、高溫逆境、葉綠素螢光

前言

光合作用是植物物質轉換與能量代謝的關鍵，葉片光合作用速率大多以二氧化碳交換速率表示，由氣孔內腔二氧化碳固定量說明同化作用情形，對環境逆境具有敏銳且直接之反應⁽³⁾。

光合作用裝置所吸收之光能可能的路徑為，光所激發能量經由兩個光系統(PSI及PSII)由光能轉為化學能。光化學(以速率常數 K_p 指明)反應的能量產生ATP及NADPH，為固定CO₂產生醱類動力的來源。在正常環境

¹ 高雄區農業改良場助理研究員

下，低光下之光化學反應會有較高效率，葉片所吸收的光量子超過 90% 用於光合作用上。葉片受光所激發能量除光化學外，可透過熱形式進行吸收過剩光能的非光化學消散(K_D)及葉綠素螢光(K_F)將過多能量排除於植體外，螢光是由葉綠素a 所激發而來，少於 3% 的吸收光能可能以葉綠素螢光散失，但此路徑並不是安全消耗過多光能的路徑，但不失為一個敏感的探針(圖 1)⁽⁴⁾。

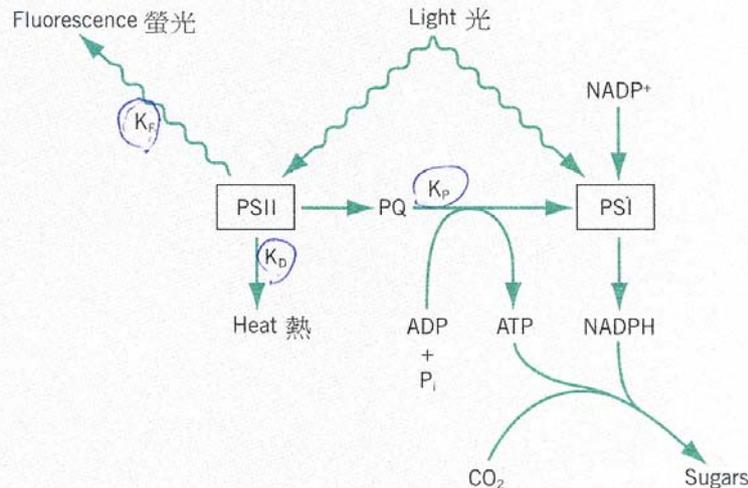


圖 1. 模式圖解說明光合作用裝置所吸收之光能可能的結局

Fig. 1 Model showing the likely outcome of the absorption of light energy by photosynthesis device. (Hopkins and Hüner, 2006)

高等植物葉綠體類囊體膜中的反應，對於高溫十分敏感易受傷害，其結果是影響光合作用的效率，以光系統 II (PS II) 和其相關的釋氧複合體 (oxygen-evolving complex) 尤其敏感。首先，釋氧複合體因熱而失去活性，造成電子傳送到光系統 II 受到阻礙。其次，高溫影響類囊體膜的流動性，干擾色素蛋白複合體的側向分布。這樣的改變會干擾電子傳遞的效率和光磷酸化作用。再者，高溫對光合作用的限制，通常可見葉綠素的螢光猝然增強，這很容易在葉片上偵測到。這個螢光的增強，反映了對於光系統 II 能量轉移系統，產生不可逆的傷害。結果是，多吸收的能源，不能經由光化學作用被 PS II 所利用，而必須以光的型式輻射回去⁽⁴⁾。

對於評估環境不良所導致作物生長的傷害，可透過植株本身的一些特徵加以偵測，包括外觀上的改變，例如：高粱種子發芽降低及鞘葉縮短⁽¹⁷⁾、大麥穀粒充實不良⁽¹⁴⁾、十字花科蔬菜易早期抽苔⁽⁸⁾、胡蘿蔔空心根增加品質變差⁽⁶⁾和豆科著莢率低⁽¹⁸⁾，等現象。但外觀表現時，已是受害較為嚴重，回復不易。而透過植株本身生理表現及生化反應，可在受害初期及偵測出傷害，對於災害預測及防範措施的研擬較具可行性。

高溫逆境下，淨光合作用會明顯的下降，而耐熱性強的植物在高溫的條件下可以保持相對正常的生理狀態，維持較高的光合作用以供應植物生長與生存的需要。PS II 光反應系統是反映高溫逆境最敏感的位置，葉綠素螢光可作為偵測光合作用胞器之激發能量，並提供光合作用機制及調節的觀察^(2, 19)。

本文擬針對植物的葉綠素螢光在高溫逆境下之反應及偵測上的應用進行文獻蒐集及整理，期能探討應用於作物的生產及耐熱性評估，以輔助耐熱品種的選拔。

葉綠素螢光測定之原理

高等作物或藻類利用太陽光能進行光合作用時，是由植物光合作用胞器內天線(antenna)色素吸收太陽光可視光線，這些主要吸收光能的色素為葉綠素 a 和 b。色素分子吸收光能後能量轉變。色素分子吸收藍光(430nm)或紅光(670nm)後，分別激發為第二單線態(E_2)或第一單線態(E_1)， E_1 轉變為第一三線態，他們進一步回到基態(E_0)時則產生螢光或磷光(圖 2)⁽³⁾。

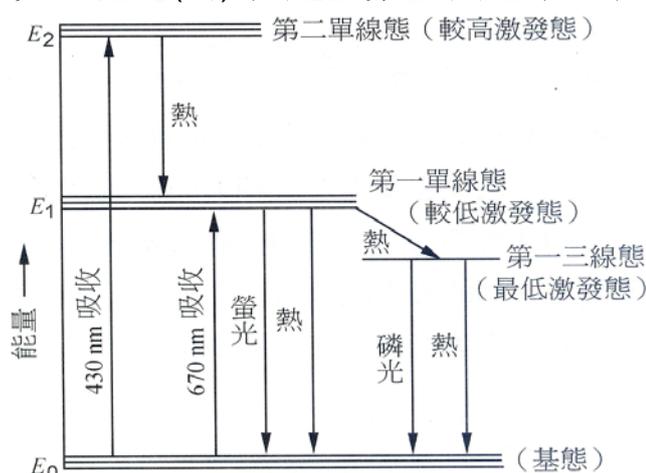


圖 2. 色素分子吸收光能後能量轉變

(潘, 2008)

Fig. 2 The pattern of energy evolution after the pigment molecules absorb light energy.

當一葉片或藻類懸浮培養在室溫下，於暗中適應 5 至 60 分鐘，此時間依使用種類而定，全部的電子會被PSI光合電子傳遞鏈消耗，引發全部PSII反應中心至打開的構形【P680 Pheo QA】內。所有開放構形的PSII反應中心所產生的最小螢光，稱為 F_0 螢光；若樣品曝於足以去啟動光合作用的光強度下，可以檢測得知複雜變換的螢光訊息。此過程由德國學者Kautsky和Hirsch發現，故稱為Kautsky效應 (Kautsky effect)⁽¹⁾。

由最小螢光值 (The minimal fluorescence in dark; F_0) 快速升高至開始

的最大螢光釋放量(The maximum fluorescence in dark; F_m)，是由吸收的光非常迅速地透過能量轉移和光化學關閉PSII反應中心【P680 Pheo QA】，而其速度比藉由PSI、系統間電子傳遞和最後二氧化碳同化作用再打開PSII反應中心的速度還要快。其後在螢光產量上的減少或螢光淬熄，反映PSII反應中心再打開，這是由於更緩慢的酵素催化反應所誘導，其中涉及ATP和NADPH生合成，最後吸收的光能依序被參與二氧化碳同化的生物化學反應所消耗。因此，葉綠素螢光產量和光合作用的速率成反比。就植物生化觀點，螢光參數的改變所代表的生理意義為：

螢光放射速率 F ，一般以佔葉片吸收光線的通量(flux)(I_a)的比例表示，

$$F = I_a \times K_F / \Sigma K_I$$

K_F ：螢光速率常數

ΣK_I ：所有速率常數 ($K_P + K_D + K_F + K_r$) 的總和。

ΣK_I 受光線照射葉片後所有光反應的總和，包括：

K_P ：光化學反應

K_D ：熱量放射

K_F ：螢光放射量

K_r ：激發能量傳送至非螢光反應色素

所以整個螢光產量(fluorescence yield)可表示為

$$\Phi F = F / I_a = K_F / \Sigma (K_P + K_D + K_F + K_r)$$

螢光產量在光反應過程中有最低值 (ΦF_o) 及最高值 (ΦF_m)。最低值出現在反應中心完全活化， P_{680} 完全被激發，並用於光化學反應， K_P 值遠大於 $K_D + K_F + K_r$ 的和，此時得到光反應所需最高的光量子產量。

隨著反應過程， Q_A 完全被完全還原， P_{680} 無法再被激發 (反應中心停留在 $ZP_{680} \text{pheo}Q_A$ 階段) 此時 $K_P = 0$ ，相對的，螢光反應可得到最高螢光產量 ΦF_m 。

最低至最高螢光量間的差值為 F_v ($F_v = F_m - F_o$)。 F_v / F_m 的比值可表示為光化反應過程的螢光潛在產量(potential yield, ΦF)。

F_v / F_m (最大螢光參數) 的比值是描述光合作用胞器生理狀況的重要參數，此比值在環境適當下，不同物種或品種是在相當狹窄得範圍內 (0.834 ± 0.004)。當逆境發生時，將影響PSII電子的傳導，進而降低 F_v / F_m 的比值，因此在生理研究中，會以此值作為描述逆境發生的指標。

在暗適應葉片的螢光測定值僅黑暗下最小螢光值 (F_o) 及照射飽和光源後最大螢光 (F_m) 兩個數值，但在光照下， F_o 及 F_m 值會隨光強度及葉片反應而變動，故一般會以 F_o' 及 F_m' 表示在光照下的測值。暗適應葉片是以飽和光強

($3,000 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以上)中止光反應，會有最高螢光值(F_m)，但光適應葉片同樣以飽和光源照射， F_m' 會較 F_m 值為低， F_m' 值低表示用於光化學能量轉換成以熱方式消散。因此利用 F_o ， F_m ， F_o' ， F_m' 及 F_t (光照下葉片本身螢光量釋放量)可定義兩種螢光參數，光化學淬熄(photochemical quenching; qP)及非光化學淬熄(non-photochemical quenching; qN)，又非光化學淬熄若不考慮 F_o 則以NPQ表示。

qP 及 qN 數值為0到1之間，NPQ則是0到10之間。

qP 是由 F_m' 扣減光照及黑暗下最低螢光量的比值，表示固定光強下，光量子產量的比值。 qN 是指能量不是用於光化學的部分，一般是以螢光及熱的方式釋放。當 qN 值的比值在0~0.4之間是類囊體能量消散部分，NPQ並不敏感， qN 值超過0.4之後，天線(antenna)系統的能量開始過高，此時NPQ值迅速上升。因此，NPQ是天線系統中激發能量以熱釋放的部分，是過多光能(excess light energy)的指標，利用 qN 及NPQ差異說明不同部位能量過高的情形。另一螢光參數為，PSII電子傳遞的光量子產量(Φ_{PSII})可定義為 $Fv'/Fm' \times qP$ 。

總之，葉綠體內捕光葉綠素(light harvesting chlorophyll; LHC)蛋白質傳送光能至光系統過程中有些釋放的機制，其中葉綠素所吸收的光能在第一激發態時，大約有3~9%的光能轉為螢光，植物所釋放螢光的波長大約在660~800 nm之間。反應中心所釋放的螢光主要來自於PSII反應中心。當葉片或葉綠體處於暗適應狀態(dark-adapted)，電子傳遞路徑的氧化或還原中間代謝物皆回到相同狀態，在該葉片上光照則在PSII促使螢光迅速放射⁽³⁾。

不同逆境下的葉綠素螢光反應，大致上會有 F_o 增加， F_m' 、光量子產量及PSII效率下降的現象⁽¹⁾。當植物遭遇逆境，不論經由代謝過程、水分平衡或是直接對葉片表層結構的破壞，會使葉綠體對照射在葉表面的輻射能有不同反應機制。PSII反應中心關閉，95-97%葉片所吸收能量以熱釋放，2.5-5.0%則以螢光釋放。此種方式可視為是一種植物防禦機制，以防止在高光下過多光能無法轉為化學能，對植物體產生毒害。

高溫逆境下作物葉綠素螢光之反應

根據作物對熱逆境產生的不同反應，可進行耐熱性篩選。常採用的包括外觀形態或經濟性狀鑑定法、種子或花粉活力鑑定、葉綠素螢光反應、細胞膜熱穩定性及光合反應等方法，由於光化學及熱的偵測較為困難，可透過螢光的釋放量作一估算。因此，利用葉綠素螢光可作為作物對環境耐性之選拔工具，包括高低溫⁽⁹⁾、乾旱⁽²⁰⁾和高光逆境⁽¹⁵⁾。

玉米幼苗葉片（一片本葉）分別置於 25°C 及 41°C 生長，至第三片葉施於 25, 30, 35, 40, 45, 50°C 的高溫處理，並於黑暗中 20 分鐘後偵測。研究發現，在高溫下生長的葉片有較高耐熱性表現，且在 41°C 生長的玉米幼苗較生長於 25°C 的玉米幼苗可承受 10-15°C 高溫的忍耐力。45°C 以上之高溫逆境下，玉米葉片的葉綠素螢光之最大螢光參數(Fv/Fm)、有效螢光參數(ΦPSII)明顯下降，非光化學淬熄係數(non-photochemical quenching coefficient, qN)有明顯上升趨勢，綜合各葉綠素螢光參數之變化，可作為耐熱品系評估之利用(圖 3)⁽¹⁹⁾。

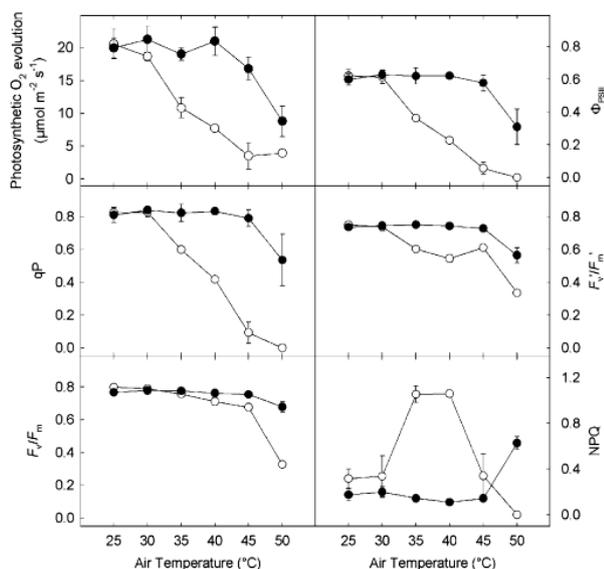


圖 3. 生長在 25°C (空心) 和 41°C (實心) 的玉米葉片，在黑暗中經歷 20 分鐘中高溫逆境後，各種光合作用參數的反應。

Fig. 3. The effects of 20 min heat stress in the dark on photosynthetic parameters of maize leaves grown at 25 °C (open symbols) and 41 °C (filled symbols).

(Sinsawat et al., 2004)

小糠草(Bentgrass)放置於在 20/16°C (日/夜溫) 的生長箱中生長 45 天候，進行熱馴化處理，每 7 天逐步升高 5°C 從 20 至 35°C 後至於 40°C 28 天，每 7 天調查一次，對照組則由 20°C 直接放置於 40°C 生長箱中。植物經過熱馴化後，遭遇熱逆境時可保持較高的光合速率(圖 4)，葉綠素及類胡蘿蔔素的含量(圖 5)⁽¹²⁾。

在高溫下不同之番茄品種的反應，Campbell-28(栽培種，不耐熱) 和 Nagcarlang (野生種，耐熱)，兩個品種在 25°C/16 小時光期，21°C/8 小時暗期生長，並於生長到 4 片本葉時進行高溫處理，2 小時光期適應後，置於 45 °C/2 小時，葉片溫度 40°C，對照組為於 25°C 生長，偵測葉綠素螢光成分。試驗結果為經高溫逆境後，Campbell-28 的最小螢光(Fo)增加，螢光變量(Fv)減少，最大螢光參數(Fv/Fm)及有效螢光參數(FPSIIopen)降低，而 Nagcarlang 有無高溫處理則無明顯差異(圖 6)。耐熱性品種呈現葉綠素 a/b 比值增加，及葉綠素/類胡蘿蔔素比值下降(圖 7)，表示這些改變與番茄的耐熱性有關⁽⁷⁾。

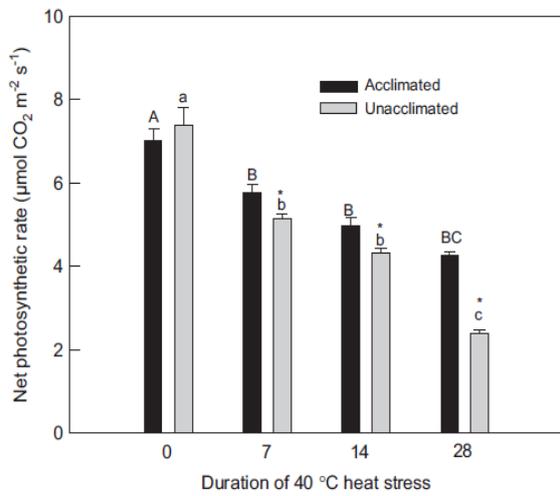


圖 4. 經熱馴化的小糠草，給予40°C熱逆境後葉片淨光合速率 (Pn)的反應
 Fig. 4. Effects of heat acclimation on the responses of leaf net photosynthetic rate (Pn) in creeping bentgrass to heat stress at 40 °C.
 (Liu and Huang, 2008)

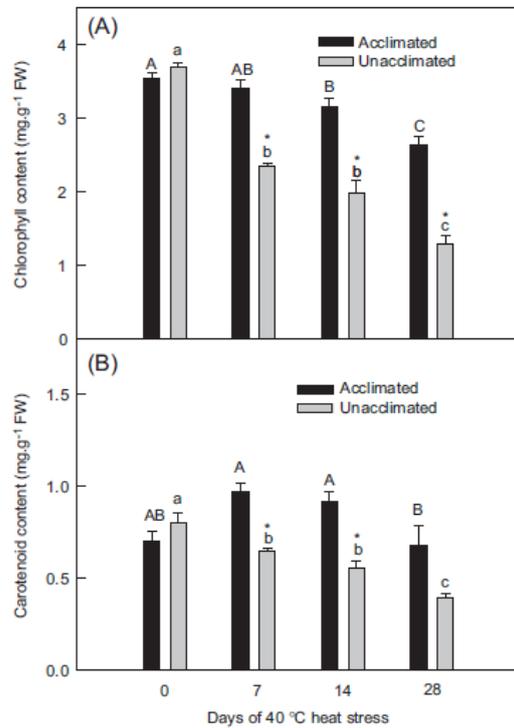


圖5. 經熱馴化的小糠草給予40°C熱逆境後，對葉片葉綠素含量和胡蘿蔔素含量之影響
 Fig. 5. Effects of heat acclimation on the responses of leaf chlorophyll content and carotenoid content in creeping bentgrass to heat stress at 40°C.
 (Liu and Huang, 2008)

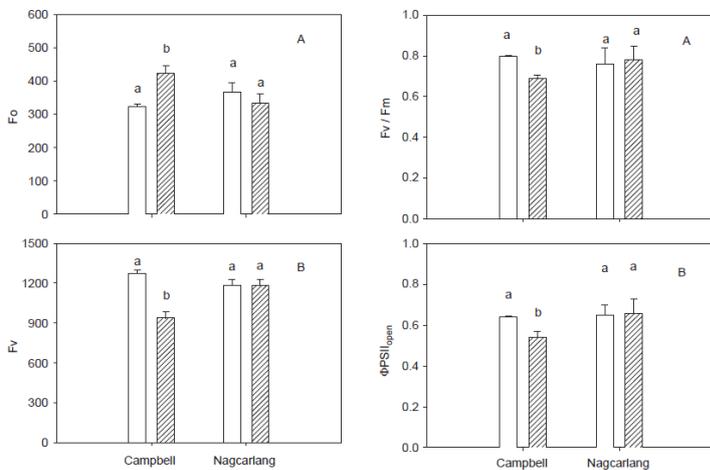


圖6. Campbell-28和Nagcarlang兩品種對照組(空心)和逆境處理(斜線)在最小螢光(Fo)(A)和螢光變量(Fv)(B)(左)與最大螢光參數 (Fv/Fm)(A)和有效螢光參數(FPSIIopen)(B)(右)。
 Fig. 6. (A and B) Initial (Fo) and variable (Fv) chlorophyll fluorescence yield (left) and (A and B) Maximum photochemical efficiency of PSII in dark adapted leaves (Fv/Fm) and efficiency of the open reaction centre (FPSIIopen) (right) in leaves of control (white bars) and stressed plants (striped bars) of Campbell-28 and Nagcarlang.
 (Camejo et al., 2005)

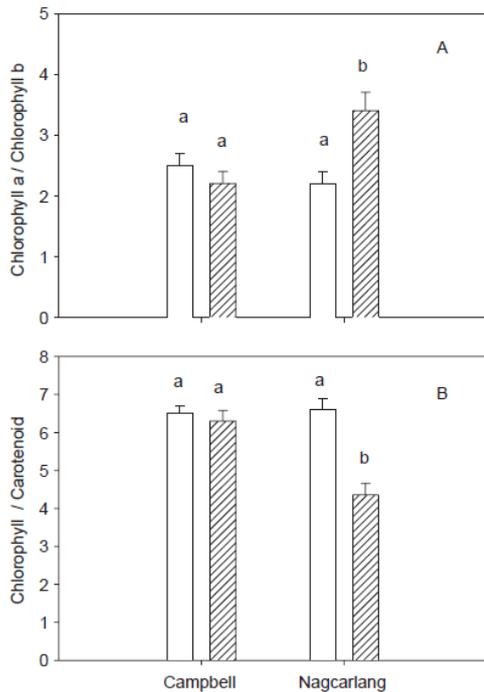


圖 7. Campbell-28和Nagcarlang兩品種對照組(空心)和逆境處理(斜線)在葉綠素a/葉綠素b的比值和葉綠素/胡蘿蔔素比值。
 Fig. 7. (A and B) Chlorophyll a/b ratio and chlorophyll / carotenoid ratio in leaves of control (white bars) and stressed plants (striped bars) of Campbell-28 and Nagcarlang.
 (Camejo *et al.*, 2005)

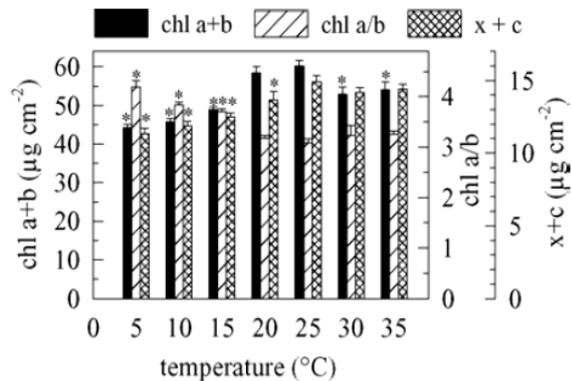


圖 8. 甜菜置於不同溫度2小時後,各項光合色素(葉綠素a+b,葉綠素a/b和胡蘿蔔素,x+c)的表現。
 Fig. 8. Photosynthetic pigment contents (chlorophyll a + b, chlorophyll a/b and total carotenoids, x + c) in *B. vulgaris* plants after 2 h exposure to different values of temperature.
 (D'Ambrosio *et al.*, 2006)

甜菜種植於夜溫 4-10°C,日溫 16-23°C,植後 30 天進行熱逆境處理 28/16°C (日/夜)。在葉綠素a+b的含量上,以 25°C為對照,除 20°C外,其餘溫度均有明顯減少,低溫降幅最多。葉綠素a/b之比值,在 5-15°C時顯著增加,顯示在低溫時受到chlorophyll b的影響。類胡蘿蔔素與葉綠素a+b趨勢相似,但 5-20°C與對照(25°C)有明顯差異(圖 8)⁽⁹⁾。

葉綠素螢光在耐熱篩選之應用及其遺傳

在選拔品系過程中,每一雜交組合有龐大的分離族群,選拔族群中產量表現若能透過生理特性以簡單、快速及經濟的特性達成,將有助於選拔效率,

而這個生理特性需能反映產量或乾物重累積的潛力。

Wang等(2008)指出葉綠素含量是由複等位基因所控制，且與光合效率呈正相關。學者利用具有Gc基因(chlorophyll content gene, Gc)的深綠葉特性的水稻(Chongqing2)與綠色葉的栽培種水稻(Zhenshan 97B)育成的同遺傳背景系(NIL-H, NIL-L)。田間種植，分別在三葉、六葉、九葉、十二葉、種植後二十天及抽穗期採取葉片，以溶解色素之方法分析葉綠素等。結果顯示導入Gc之NIL-H相較於NIL-L，表現出葉綠素b增加，葉綠素a及類胡蘿蔔素並沒有增加(表1)。NIL-H的光合速率相較於NIL-L提高13.86~22.35%(表2)。葉綠素a和葉綠素b為捕光色素，細胞具有較高的葉綠素含量可蒐集和傳輸更多的光能，因此提高光合效率⁽²²⁾。

表1. 水稻近同源系品系H和L在不同生長期葉綠素的含量。

Table 1. Chlorophyll contents of near-isogenic rice lines (NIL) H and L at different growth stages

Plant material	Chl a (mg g ⁻¹)	Chl b (mg g ⁻¹)	Chl a+Chl b (mg g ⁻¹)	Car (mg g ⁻¹)
NIL-H 3-leaf	2.48±0.13	1.23±0.05 [†]	3.71±0.12	1.26±0.08
NIL-L 3-leaf	2.35±0.11	0.62±0.07	2.96±0.09	1.12±0.10
NIL-H 6-leaf	2.53±0.13	1.29±0.05 [†]	3.82±0.10	1.35±0.11
NIL-L 6-leaf	2.46±0.14	0.63±0.03	3.09±0.14	1.52±0.07
NIL-H 9-leaf	2.77±0.15	1.39±0.06 ^{**}	4.15±0.17 [†]	1.87±0.10
NIL-L 9-leaf	2.63±0.08	0.68±0.03	3.31±0.11	1.31±0.09
NIL-H 12-leaf	2.85±0.13	1.38±0.09 ^{**}	4.22±0.15 ^{**}	1.24±0.13
NIL-L 12-leaf	2.68±0.11	0.68±0.05	3.36±0.09	1.37±0.11
NIL-H 20 d after	2.47±0.09	1.24±0.08 [†]	3.72±0.10	1.72±0.09
NIL-L Heading	2.42±0.11	0.62±0.03	3.03±0.12	1.23±0.10

[†] and ^{**} levels of probability of 95% and 99%, respectively.

[‡]All values average of six replicates (mean±SD).

(Wang et al., 2008)

表2. 水稻近同源系品系H和L在不同生長期光合作用的表現。

Table 2. Photosynthesis of near-isogenic rice lines (NIL) H and L at different growth stages

Plant material	Temperature of leaf (°C)	Effective radiation (μmol m ⁻² s ⁻¹)	CO ₂ content (μLL ⁻¹)	Photosynthetic rate (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Increase in NIL-H (%)
NIL-H 3-leaf	22.32	1446.49	383.26	8.43	22.35
NIL-L 3-leaf	22.41	1437.56	386.15	6.89	0
NIL-H 6-leaf	24.17	1522.72	367.41	9.28	21.47
NIL-L 6-leaf	23.92	1536.34	366.50	7.64	0
NIL-H 9-leaf	27.43	1588.15	349.71	9.87	20.22
NIL-L 9-leaf	27.25	1594.46	351.12	8.21	0
NIL-H 12-leaf	34.24	1648.73	398.23	11.72	18.74
NIL-L 12-leaf	34.28	1632.51	402.69	9.87	0
NIL-H 20 d after	35.17	1631.42	446.31	11.01	13.86
NIL-L Heading	35.40	1688.64	442.78	9.67	0

(Wang et al., 2008)

Araus等人(1998)以144種小麥基因型在三種不同水分環境之田間進行

葉綠素螢光測定，測定時期為小麥開花後三周之劍葉，結果發現 F_0 、 F_m 、 F_0 到 F_m 一半時間($t_{1/2}$)及 F_v/F_m 等數值，四種螢光值和產量都有顯著依存性，若以遺傳力的表現，每一基因型之 F_0 、 F_m 及 $t_{1/2}$ 有很高的遺傳力， F_v/F_m 則不顯著，螢光測值和產量的相關性以 $t_{1/2}$ 最高($r=-0.92$)，其次是 F_0 ($r=0.88$)， F_m ($r=0.74$)和 F_v ($r=0.71$)，相反的， F_v/F_m 相關係數僅有0.34(圖 9)。

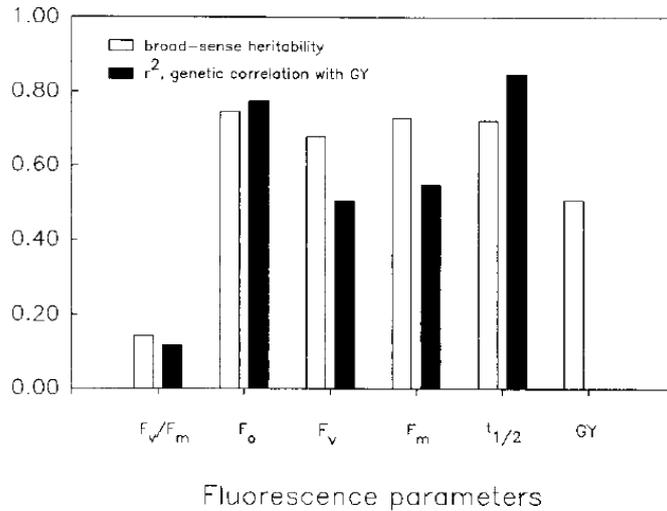


圖 9. 各項螢光參數的廣義遺傳率 (h^2 , 空心)和穀粒產量遺傳相關 (r^2 , 實心)之研究。
 Fig. 9. Broad-sense heritability (h^2 , open bars) and coefficient of determination of the genetic correlation with grain yield (r^2 , filled bars) of the various fluorescence parameters studied

(Araus et al., 1998)

一般高產的基因型具有較低 $t_{1/2}$ 及較高的 F_0 和 F_m ，在前期休耕或乾燥環境下，各基因型均有一致的表現，即 F_v/F_m 、 F_m 及 $t_{1/2}$ 下降而 F_0 值上升(表 3)。結果顯示，葉片螢光值具有高遺傳力，對不同逆境有一致表現，而對產量也具有極高相關性。因此，葉綠素螢光值應可作為品種產量表現或環境忍受性之選拔指標⁽⁵⁾。

表3. 敘利亞西北部的硬粒小麥基因型，不同栽培環境下穀粒產量與各項葉片原始螢光參數之相關性。

Table 3. Correlation coefficients of the relationships between grain yield (GY) and various non-modulated chlorophyll fluorescence parameters measured in the flag leaves of the set of the Durum Core Collection genotypes cultivated in three different environments in Northwest Syria.

Environments, number of genotypes	F_v/F_m	F_0	F_m	F_v	$t_{1/2}$
Breda, n = 144	0.007	0.487***	0.370***	0.300***	-0.489***
Tel Hadya Rainfed, n = 144	0.171*	0.455***	0.443***	0.411***	-0.407***
Tel Hadya Irrigation 1st, n = 124	0.300***	0.237**	0.322***	0.322***	-0.303***
Tel Hadya Irrigation 2nd, n = 124	0.228*	0.541***	0.489***	0.464***	-0.544***

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

(Araus et al., 1998)

在葉的成熟度與光合作用及葉綠素含量的變化之研究上，利用榆樹 3—11 天的葉片，進行生長中其光合作用速率及葉綠素含量的變化分析，榆樹葉在 3 天後開始低光合活性光合速率，隨著葉片長大 P_n (Photosynthetic rate, P_n ; 光合速率) 增加，總葉綠素含量增加趨勢與 P_n 一樣(圖 10)⁽¹⁰⁾。

年輕的葉片其最大螢光值(F_m)和光化學最大淬熄產量(ϕ_{po} , The maximum quantum yield of PSII primary photochemistry) 跌幅較成熟葉片大， F_o 值較高，顯示幼嫩葉片(3 天)不耐高溫。在葉片生長階段，遭受熱逆境時，改善釋氧複合體(OEC)的穩定，可增加 PSII 的耐熱性(圖 11)⁽¹⁰⁾。

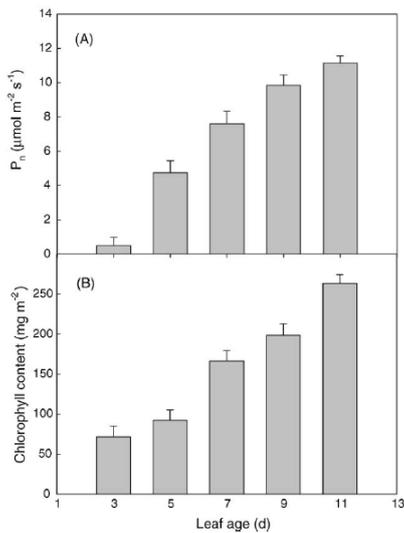


圖 10. 榆樹從新葉到完全展開，光合速率(P_n)(A)和葉綠素含量(Chl)(B)的變化。

Fig. 10. Photosynthetic rate (P_n) (A) and chlorophyll content (Chl) (B) in elm (*Ulmus pumila*) leaves from emergence to full expansion.

(Jiang *et al.*, 2006)

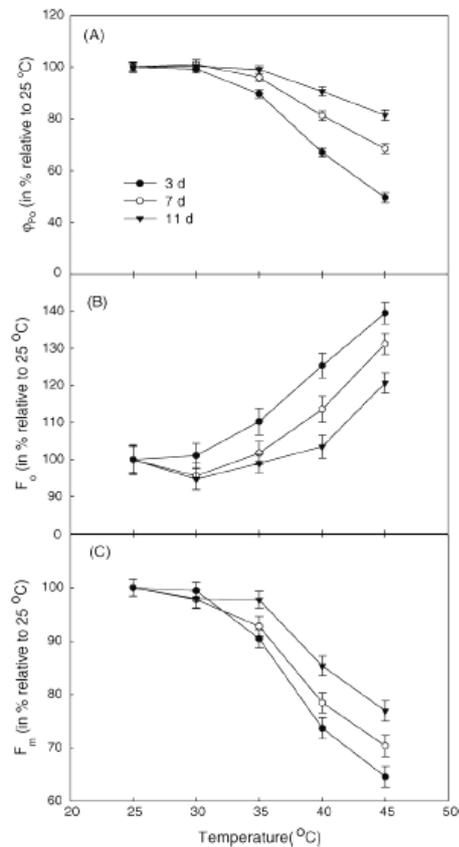


圖 11. 年輕至成熟葉片在黑暗中至於各種溫度 15 分鐘後，光化學最大淬熄產量(ϕ_{po})(A)，最小螢光值(F_o)(B)和最大螢光值(F_m)(C)。

Fig. 11. The maximum quantum yield of primary photochemistry (ϕ_{po}) (A), the minimal fluorescence (F_o) (B) and the maximum fluorescence (F_m) (C) in young and mature leaves exposed to various temperatures in the dark for 15 min.

(Jiang *et al.*, 2006)

利用葉綠螢光進行熱逆境的評估，應用非常廣泛且透徹，但都是在實驗室或固定的環境中進行評估。想要了解在自然田間(動態的環境)時，高溫下的葉綠素螢光的變化與光合作用的關係。姚等(2009)利用梗稻、秈稻、陸稻及國外栽培品種共 24 種，以了解不同水稻葉片在田間(及動態氣候條件)之固碳作用及葉綠素螢光參數之相關係數，由結果顯示，電子傳遞速率(electron transfer rate; ETR)與同化速率之相關係數(r^2)達 0.81(圖 12)，在葉片光合作用及葉綠素螢光參數之相關性上，包括螢光參數之 F_v'/F_m' ， qP 及 ETR 與光合作用速率達顯著相關，又氣孔導度及葉片溫度則和螢光參數無直接相關性(表 4)。

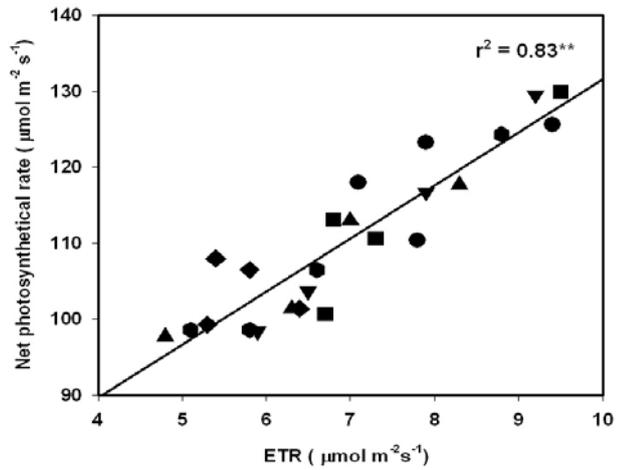


圖 12. 水稻24種品種之葉片淨光合作用及電子傳遞速率之相關性。(姚等, 2009)

Fig. 12. Correlation between the net photosynthetic rate (AN) and electron transport rate (ETR) of rice leaves for 24 cultivars in field-scale. Each symbol represents the mean for one cultivar. (**Extremely significant at the 0.01 probability level.)

表 4. 24種水稻品種之葉片光合作用參數及葉綠素螢光參數之相關性

Table 4. Correlation coefficients of parameters between the chlorophyll fluorescence and the photosynthesis in leaves, for 24 varieties of rice in different light environments.

Item	Fv/Fm	Fo'	Fm'	Fv'/Fm	ETR	qp	NPQ
Gross photosynthesis rate (A_G)	0.148	0.297	-0.261	-0.454 ^z	0.532**	-0.457*	0.188
Net Photosynthesis rate (A_N)	0.156	0.312	-0.215	-0.603**	0.813**	-0.645**	0.186
Stomatal conductance	-0.05	0.039	-0.095	-0.110	-0.006	-0.111	0.056
Leaf temperature	-0.119	0.037	-0.375	-0.325	-0.049	-0.337	0.300

^z **Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels according to the analysis of two-tailed test. (姚等, 2009)

結論

光合作用是作物產量形成的基礎，光合速率隨溫度而改變，高溫逆境對光合作用活性影響明顯。高溫使螢光測值 F_v/F_m 下降，也就是 PSII 光化學

反應效率下降，因為電子傳遞活動被中斷及 PSII 中氧化酶減少保持 Rubisco 催化的能力，導致 RuBP 再生力下降，而抑制光合作用。

溫度影響葉綠素a/b比值、葉綠素a+b含量，及葉綠素/類胡蘿蔔素比值，這些改變與耐熱性有關。葉綠素a和葉綠素b為捕光色素，高溫逆境下細胞具有較高的葉綠素含量可蒐集和傳輸更多的光能，因此提高光合效率^(7, 9,22)。綜合各葉綠素螢光參數之變化，如：Fv/Fm、ΦPS II、qN，可提供耐熱品系評估之利用。由試驗結果的得知，葉綠素螢光產量與光合作用速率成反比，且葉片螢光值具有高遺傳力，與產量也具有極高相關性。因此，葉綠素螢光值應可作為品種產量表現或環境忍受性之選拔指標^(5,19)。溫度和光期的改變，會影響PSII的熱穩定性，而植物經過熱馴化後，遭遇熱逆境時可保持較高的光合速率，葉綠素及類胡蘿蔔素的含量，高溫下生長有較高耐熱性表現^(11,12)。

Thoren等(2010)為了解自然光下葉片光合作用速率與葉綠素螢光的關係，在田間測量可變光狀況下以雷射光(Laser-induced)誘導雙波長葉綠素螢光，顯示與太陽光直射狀態F690/F730的比例呈現線性影響。但是田間動態性環境下的葉綠素螢光之量測資料與光合作用速率相關性，需要更多試驗證實兩者相關性。利用遙測作物葉片的葉綠素釋放螢光估算光合作用為近年來研究的趨勢，雷射誘發螢光(laser-induced fluorescence; LIF)是逐漸成熟的技術，以激光誘導雙波長葉綠素螢光顯示與太陽光直射狀態F690/F730的比例呈現線性影響。可用於田間大面積測量，是利用於螢光偵測上極佳的工具^(2,21)。

高等植物葉綠體類囊體膜中的反應，對於高溫十分敏感易受傷害，葉綠素螢光(K_F)可做為一個敏感的探針。葉綠素螢光分析可應用於生理生態之研究，並作為大量材料篩選光合作用潛力工具之一。但因為葉綠素螢光測值取得容易且大量，故必須注意試驗設計及執行，以確保所得數據都是有用的。

參考文獻

1. 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 50:31-41.
2. 姚銘輝、陳守泓、漆匡時.2007. 利用葉綠素螢光估算作物葉片之光合作用. 台灣農業研究 56:224-236.
3. 潘瑞熾. 2008. 植物生理學. 藝軒圖書出版社. 台北. 台灣.
4. Hopkins, W.G. and P.A. Hüner. 徐善德、廖玉琬編譯. 2006. 植物生理學. 偉明圖書有限公司. 台北. 台灣.

5. Araus, J. L., T. Amaro, J. Voltas, H. Nakkoul, and M.M. Nachit. 1998. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crops Research* 55:209-223.
6. Basu, P.S. and J.S. Minhas. 1991. Heat tolerance and assimilate transport in different potato genotype. *J. Exp. Bot.* 42:861-866
7. Camejo, D., P. Rodríguez, MA. Morales, J.M. Dell'Amico, A. Torrecillas, and J.J. Alarcón. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162:281-289
8. Chen, T.H.H., Z.Y. Shen, and P.H. Lee. 1982. Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Sci.* 22, 719–725
9. D'Ambrosio, N., C. Arena, and A. V. De Santo. 2006. Temperature response of photosynthesis, excitation energy dissipation and alternative electron sinks to carbon assimilation in *Beta vulgaris* L. *Env. Exp. Bot.* 55 : 248-257
10. Jiang, C. D., G. M. Jiang, X. Wang, L. H. Li, D.K. Biswas, and Y. G. Li. 2006. Increased photosynthetic activities and thermostability of photosystem II with leaf development of elm seedlings (*Ulmus pumila*) probed by the fast fluorescence rise OJIP. *Environmental and Experimental Botany* 58:261–268.
11. Kouřil, R., P. Ilík, P. Tomek, J. Nauš, and A. Poulíčková. 2001. Chlorophyll fluorescence temperature curve on *Klebsormidium flaccidum* cultivated at different temperature regimes. *J. Plant Physiol.* 158:1131-1136
12. Liu, X. and B. Huang. 2008. Photosynthetic acclimation to high temperatures associated with heat tolerance in creeping bentgrass. *J. Plant Physiol.* 165: 1947-1953
13. Maxwell K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.
14. Prasad, P.V.V., K.J. Boote, L.H. Allen Jr., J.E. Sheehy, and J.M.G. Thomas. 2006. Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress. *Field Crops Res.* 95: 398-411

15. Quiles, M. J. 2005. Photoinhibition of photosystems I and II using chlorophyll fluorescence measurements. *J. Biol. Educ.* 39: 136-138.
16. Salvucci, M.E. and S.J. Crafts-Brandner. 2004. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiol. Plant* 120:179-186
17. Setimela, P.S., D.J. Andrews, J. Partridge, and K.M. Eskridge. 2005. Screening sorghum seedlings for heat tolerance using a laboratory method. *Eur. J. Agron.* 23: 103-107
18. Shonnard, G. C. and P. Gepts. 1994. Genetics of heat tolerance during reproductive development in common bean. *Crop. Sci.* 34:1168-1175
19. Sinsawat, V., J. Leipner, P. Stamp, and Y. Fracheboud. 2004. Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Env. Exp. Bot.* 52: 123-129
20. Souza R. P., E. C. Machado, J. A. B. Silva, A. M. Lagoa, and J. A. G. Silveira. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environ. Exp. Bot.* 51:45-56
21. Thoren, D., P. Thoren, and U. Schmidhalter. 2010. Influence of ambient light and temperature on laser-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Europ. J. Agron.* 32:169-176
22. Wang, F., G. Wang, X. Li, J. Huang, and J. Zheng. 2008. Heredity, physiology and mapping of a chlorophyll content gene of rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 165:324-330