

國立台灣大學園藝學系
Department of Horticulture
National Taiwan University

碩士論文

Master Thesis



指導教授：王自存 博士
Advisor : Dr. Tsu-Tsuen Wang

乙烯誘導芥藍葉片老化過程中之抗氧化反應

Antioxidant Responses in Ethylene-Induced Leaf Senescence
of Chinese Kale

研究生：張嘉滿 撰
Graduate Student : Chia-Man Chang

中華民國九十三年七月

July, 2004

目 錄

壹、前言.....	1
貳、前人研究.....	4
一、葉片老化與乙烯之研究.....	5
(一) 高等植物內乙烯生合成之途徑與作用機制.....	5
(二) 乙烯對葉片老化之影響.....	8
(三) 1-MCP 對葉片老化之影響.....	9
二、活性氧與葉片老化之研究.....	12
(一) 活性氧之形成與種類.....	12
(二) 活性氧之作用.....	13
(三) 活性氧之來源.....	15
(四) 活性氧與葉片老化.....	16
(五) 脂質過氧化作用與葉片老化之關係.....	17
三、抗氧化系統與葉片老化之關係.....	19
(一) 植物之抗氧化機制.....	19
(二) 葉片老化過程中抗氧化酵素活性之表現.....	22
參、材料與方法.....	25
一、材料種植與處理.....	25
二、試驗方法.....	26
(一) 不同濃度乙烯處理.....	26
(二) 1 ppm 乙烯處理.....	26
(三) 1-MCP 處理.....	27
三、測定項目.....	29
(一) 葉綠素測定.....	29
(二) 蛋白質含量測定.....	30
(三) Malondialdehyde (MDA) 含量之測定.....	30
(四) H ₂ O ₂ 含量之測定.....	31
(五) 抗氧化酵素活性分析.....	32
1. Ascorbate peroxidase 之抽取及活性分析.....	32
2. Catalase 之抽取及活性分析.....	33
3. Glutathione reductase 之抽取及活性分析.....	34
4. Peroxidase 之抽取及活性分析.....	34
5. Superoxide dismutase 之抽取及活性分析.....	36
四、供試藥劑原液與配製.....	37

五、試驗儀器	38
肆、結果	39
一、乙烯對切離葉片老化之影響	39
二、 H_2O_2 、脂質過氧化作用含量與切離葉片老化之關係	46
三、抗氧化酵素與切離葉片老化之關係	48
四、乙烯與 1-MCP 對切離葉片抗氧化酵素反應之影響	53
伍、討論	60
一、乙烯對切離葉片老化之影響	60
二、 H_2O_2 、脂質過氧化作用含量與切離葉片老化之關係	61
三、抗氧化酵素與切離葉片老化之關係	64
四、乙烯與 1-MCP 對切離葉片抗氧化酵素反應之影響	67
陸、結論	70
柒、中文摘要	73
捌、英文摘要	75
玖、參考文獻	77

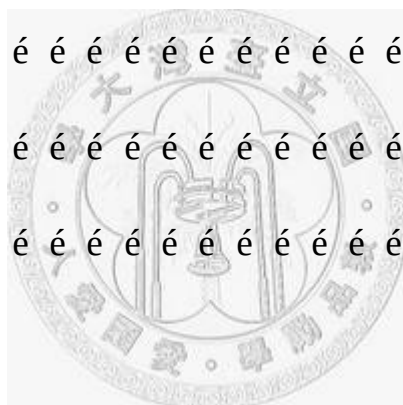


圖 次

圖 1.	乙烯生合成途徑與楊氏循環	6
圖 2.	乙烯作用抑制劑 2,5-norbornadiene (NBD)、diazocyclopentadiene (DACP)、1-methylcyclopropene (1-MCP) 等環狀烯類化合物	10
圖 3.	抗氧化防禦系統	20
圖 4.	25°C 下芥藍苗切離葉片不同乙烯濃度處理對葉綠素計 SPAD 讀值變化之影響	40
圖 5.	25°C 下芥藍苗切離葉片不同濃度乙烯處理 3 天對葉綠素計 SPAD 讀值變化之影響	42
圖 6.	25°C 下芥藍苗切離葉片不同濃度乙烯處理 3 天後的黃化變化	43
圖 7.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對葉綠素計 SPAD 讀值 (A), 黃化指數 (B) 與蛋白質含量變化之影響	44
圖 8.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對蛋白質含量變化之影響	45
圖 9.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 H ₂ O ₂ (A) 與 MDA (B) 變化之影響	47
圖 10.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 SOD (A)、APX (B) 與 GR (C) 比活性變化之影響	49
圖 11.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 CAT (A) 與 POD (B) 比活性變化之影響	50
圖 12.	25°C 下芥藍苗切離葉片空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 SOD (A)、GR (B)、POX (C)、CAT (D) 與 APX (E) 活性變化之影響	52
圖 13.	25°C 下 1-MCP 與乙烯對芥藍苗切離葉片葉綠素計 SPAD 讀值 (A) 與葉片黃化指數 (B) 之影響	54
圖 14.	25°C 下 1-MCP 與乙烯對芥藍苗切離葉片黃化之影響	55
圖 15.	25°C 下 1-MCP 與乙烯對芥藍苗切離葉片蛋白質含量之影響	56
圖 16.	25°C 下 1-MCP 與乙烯對芥藍苗切離葉片 H ₂ O ₂ (A) 與 MDA (B) 含量之影響	58
圖 17.	25°C 下 1-MCP 與乙烯對芥藍苗切離葉片 GR (A) 與 POX (B) 比活性之影響	59

縮寫字表

ACC	1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylic acid
AOS	active oxygen species
APX	ascorbate peroxidase
AsA	ascorbate
BSA	bovine serum albumin
CAT	catalase
DHA	dehydroascorbate
DHAR	dehydroascorbate reductase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FW	fresh weight
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione, reduced form
GSSH	glutathione, oxidized form
1-MCP	1-methylcyclopropene
MDA	malondialdehyde
MDHA	monodehydroascorbate
MDHAR	monodehydroascorbate reductase
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
OD	optical density
POX	peroxidase
SOD	superoxide dismutase
TBA	thiobarbituric acid
TCA	trichloroacetic acid
Tea-Dea	triethanolamine - diethanolamine
Tris	tris (hydroxymethyl) - aminomethane

前言

乙烯是一種植物荷爾蒙，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，以及誘使白化幼苗的三相反應 (triple responses) 等 (Abeles et al., 1992)。對多數葉片而言，乙烯具有促進其老化變黃之作用 (Abeles et al., 1992; Buchanan et al., 2000)；在採後生理上，乙烯的重要影響之一就是促進葉菜之黃化 (Saltveit, 1999)。

從植物生理的立場而言，葉片老化是葉片發育後期細胞緩慢死亡的階段，係由遺傳控制的細胞自行崩解過程 (Buchanan et al., 2000)。葉片老化時，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、細胞膜系滲漏情形增加、胞器構造瓦解、DNA 與 RNA 等遺傳分子發生損傷突變、最後就是細胞死亡 (Taiz and Zeiger, 1998)。許多因子都會促使葉片開始進入老化，包括內在的自然增齡 (aging)、授粉、荷爾蒙，及外在的環境因子如黑暗，與母株分離 (detachment)、乾旱、病菌侵害等 (Nooden, 1988)。在細胞的層面，目前許多研究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; Thompson, 1988)。

氧化逆境是指細胞內活性氧 (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。AOS 是植物體內

正常代謝過程中可能的生成物，如葉綠體內超氧自由基 (superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$) 的產生是由於 O_2 接收光系統 I (photosystem I, PS I) 的電子所致；而粒線體內的 $O_2^{\cdot-}$ 則是 ubiquinone 的氧化還原失序所致 (Buchanan et al., 2000)。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 (Buchanan et al., 2000)。植物細胞在正常生長情況下只有少量 AOS 存在，但在生物性 (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 (Hodges and Forney, 2000)，同時會導致葉片加速老化 (Philosoph-Hadas et al., 1991; Bartoli., 1996)，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 生成的抗氧化調節機制主要由不同的抗氧化物及一些抗氧化酵素所組成。抗氧化物包含水溶性與脂溶性的分子，包括了抗壞血酸 (ascorbic acid)、還原態的穀胱甘肽 (glutathione, GSH)、 α -生育酚 (α -tocopherol) 及類胡蘿蔔素 (carotenoids) 等，可直接清除細胞質或細胞膜中的自由基。抗氧化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)。這些酵素

中，有些可以直接與自由基反應將其清除，如 SOD、APX、CAT、POX 等；有些則擔任將被氧化的分子還原再生的任務，如 GR。

不同植物葉片在正常老化或逆境誘導老化過程中，其抗氧化系統的酵素活性表現不一。在老化速度較快的菠菜品種 'Spokane F1' 中，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)。在玉米晚生品種 Deccan 103 與早生品種 X 3342 中，各抗氧化酵素在葉片老化過程中均有增加，但 Deccan 103 的 Mn - SOD isozyme 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 H_2O_2 代謝相關酵素 (POX、CAT、APX、SOD) 的活性 (林，1996)。在葉綠素降解速率由小到大依序為 watercress、parsley、sage 的三種可食性藥草中，parsley 的 CAT、POX 活性最高而總還原能力居中 (Philosoph-Hadas et al., 1994)。因此，不同種類的葉片在老化時，其抗氧化防禦機制的反應各有不同。

本研究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自由基所造成傷害間之關係，以明瞭芥藍葉片在受到乙烯影響而加速黃化的過程中，其抗氧化酵素系統的反應；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。

前人研究

老化 (senescence) 是生物發育程序中，最後必然發生的階段。從植物生理的立場而言，植物在生長發育末期，個體內部的整體合成速率逐漸小於整體分解速率，細胞會逐漸失去其基本生理功能的能力，最後導致組織、器官或整個植物體死亡。

葉片老化是葉片發育後期細胞緩慢死亡的階段，係由遺傳控制的細胞自行崩解過程 (Buchanan et al., 2000)。葉片老化階段會伴隨著一連串變化的產生，形態上有胞器構造次序瓦解、細胞膜系滲漏情形增加、核內含物逐漸凝集、細胞液胞化；生理生化上如可溶性蛋白質分解與新蛋白質的合成、葉綠素含量減少，光合作用效率降低、DNA 與 RNA 等遺傳分子發生損傷突變、最後就是細胞死亡 (Taiz and Zeiger, 1998)。一般葉片老化常以葉綠素與 (或) 蛋白含量的減少作為指標 (Thomas and Stoddart, 1981)。

許多因子都會促使葉片開始進入老化，包括內在的自然增齡 (aging)、授粉、荷爾蒙，及外在的環境因子如黑暗，與母株分離 (detachment)、乾旱、病菌侵害等 (Nooden, 1988)。在細胞的層面，目前許多研究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; Thompson, 1988)。葉片老化何時開始決定了葉片生命週期的長短。

一、葉片老化與乙烯之研究

乙烯 (C_2H_4) 是一種天然產生的氣態植物荷爾蒙，存在於許多高等植物的器官，在常溫狀態下為無色無味的簡單烯烴。乙烯在植物的生長發育過程中擔任重要的調節任務，影響許多植物生長與分化的反應，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，以及誘使白化幼苗的三相反應 (triple responses) 等 (Abeles et al., 1992)。

(一) 高等植物內乙烯生合成之途徑與作用機制

植物體內的乙烯生合成路徑主要是 Yang 氏 (1985) 及其研究團隊所完成 (圖 1)。在甲硫氨酸循環 (Methionine cycle 或 Yang cycle) 中，乙烯的前驅物 L-Methionine 經由 AdoMet 合成酶 (S-adenosyl-L-methionine synthetase) 催化促使與 ATP 作用轉變為活化態的 S-adenosyl-methionine (SAM)，再經由關鍵性酵素 ACC 合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACC synthase) 將 SAM 轉變為主要產物 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 與次要產物 methylthioadenosine (MTA)。ACC 為乙烯立即前驅物，再進一步由 ACC 氧化酶 (ACC oxidase) 作用為乙烯，乙烯形成時也會產生 CO_2 與 HCN。小部分 ACC 會經由 ACC N-malonyl-transferase 轉變為 N-malonyl ACC 貯存在植物體內，而 MTA 會再經由 Methionine

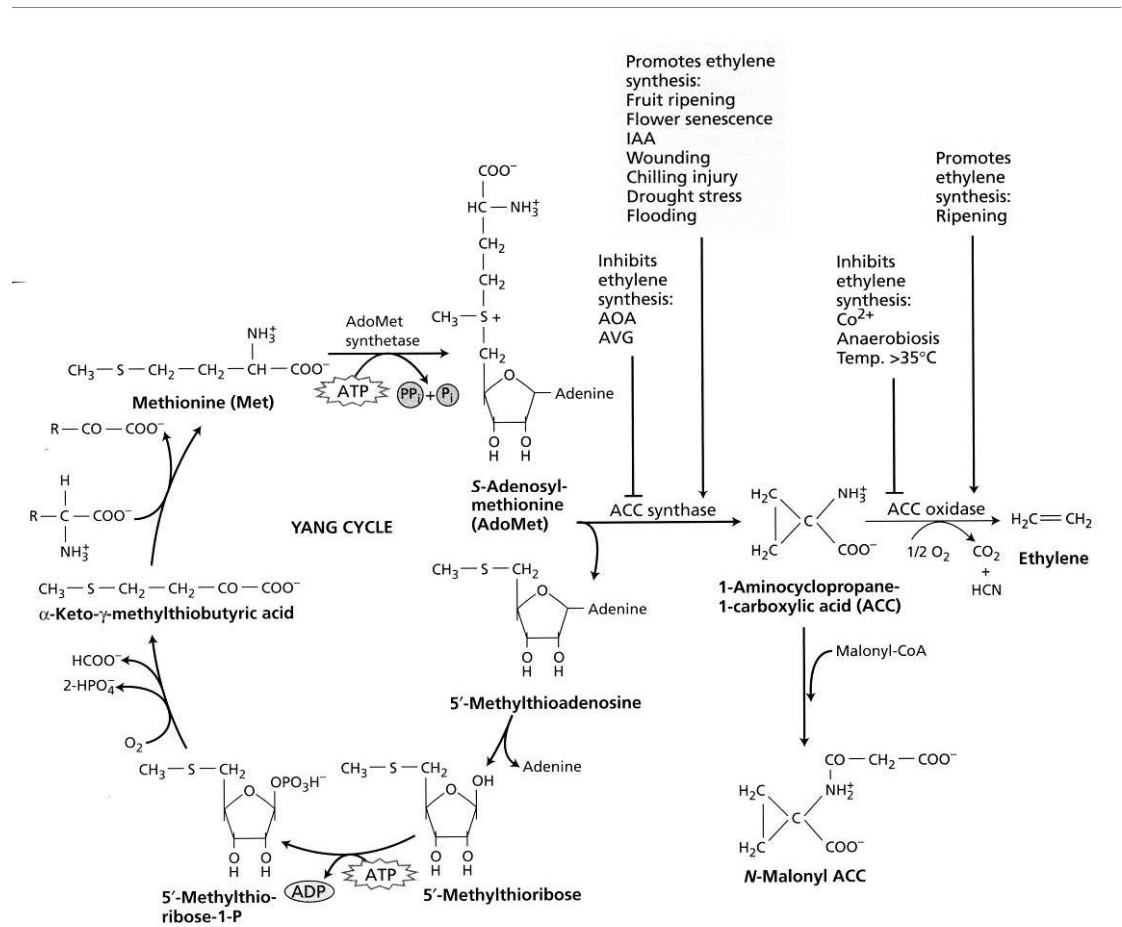


圖 1. 乙烯生合成途徑與楊氏循環

Fig. 1. Ethylene biosynthesis pathway and the Yang cycle (Taiz and Zeiger, 2002).

cycle 重新循環為 Methionine (Yang, 1985)。

目前對於乙烯生合成機制與其對植物影響的生理反應已有相當程度的了解，但對於乙烯如何調控植物生理反應與植物如何感受並利用乙烯進行訊息傳導，則並為完全明瞭。近年來利用分子生物技術進行研究，對於植物體存在乙烯受體 (ethylene receptor) 來負責接受乙烯訊息與調控生理作用的假說，已有不少成果。Bleecker 等人 (1988) 利用遺傳分析法篩選數個對乙烯不敏感的阿拉伯芥突變品系；結果指出，突變株簇生型葉片的老化比野生型葉片晚，再之後更進一步指出突變株中與光合作用相關的基因的表現量高於野生型，而與老化相關基因在突變株葉片中的表現是延遲的，因此乙烯被認為是活化老化相關基因，抑制光合作用相關基因而達到促進加速老化的結果。之後將在乙烯不敏感突變品系中篩選出的 ETR1 (ethylene receptor 1) 突變基因 (Chang et al., 1993)，轉殖在酵母菌載體中表現，該基因產物具有與乙烯結合的能力，推測此蛋白為乙烯受體 (Chang and Meyerowitz, 1995)。乙烯需與乙烯受體結合後才有作用，若與乙烯受體無法結合或結合力弱，則降低植物對乙烯的敏感度，因而對植物生理反應的影響變低。

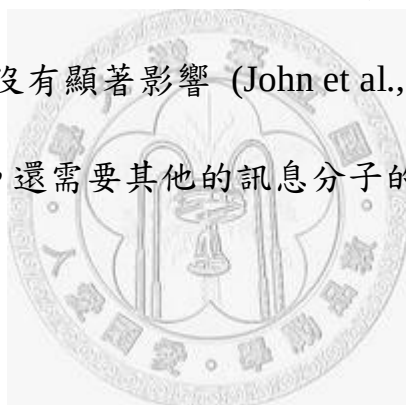
(二) 乙烯對葉片老化之影響

乙烯生成的形式在葉片老化過程中可分為四種 (高, 1994)。第一種是乙烯生成高峰在葉綠素分解之前, 如水稻 (Kao and Yang, 1983); 第二種是乙烯形成高峰出現在葉綠素分解時, 如菸草和燕麥 (Aharoni et al., 1979; Gepstein and Thimann, 1981; Chen et al., 1991); 第三種是乙烯高峰在葉片老化過程中會出現兩次 (Hachett and Goldthwaite, 1982); 第四種是乙烯形成量在葉片老化過程中保持恆定, 不會有高峰出現, 如玉米等 (Warman and Solomos, 1988; Kao, 1992)。

對多數葉片而言, 乙烯具有加速葉片老化變黃之作用 (Buchanan et al., 2000)。外加乙烯處理菸草、菜豆和甜菜葉片, 乙烯處理組葉片有加速黃化的現象 (Aharoni and Leiberma, 1979a; Aharoni and Leiberma, 1979b)。水稻切離葉片的乙烯高峰出現時間在葉綠素降解之前, 外加 ACC 可促進葉綠素分解, 以 AVG、AOA、 Co^{2+} 和 CO_2 等乙烯生合成抑制劑或作用抑制劑處理水稻切離葉片, 也能延長緩切離葉片的黃化, 因此推論乙烯可能與葉片老化之控制有關 (Kao and Yang, 1983)。外加乙烯可以加速細胞膜上脂質降解速率和老化的發生 (Kim and Wills, 1995; Hodges and Forney, 2000)。乙烯會促使長春藤葉片 nucleotide 增加, 如 ADP、ATP、UDP 與 GDP, 其中 ATP 的增加推測可能是負責將葉片中的養分轉運送到植物母體的工作 (Warman and Solomos,

1988)，這與葉片進入老化階段，葉片中的光合作用產物與礦物元素會回收至植物體貯藏再利用的現象相吻合。

利用乙烯反應突變體以及乙烯抑制劑能延緩葉片老化，帶有乙烯生成酵素反義基因的番茄轉殖株可以將葉片黃化現象延後約達一週才發生 (Picton et al., 1993)。反義番茄老化葉片中，葉綠體降解前就檢測出 ACC 氧化酶的表現量增加 (John et al., 1995)。反義抑制 ACC 氧化酶可以延緩植物細胞的衰老與死亡 (John et al., 1995)。在許多植物中，過量生成乙烯並不一定促使葉片提早老化與果實後熟，ACC 合成酶的過量表現對葉片老化也沒有顯著影響 (John et al., 1995)，說明乙烯對老化的調控並不是獨立的，還需要其他的訊息分子的參與 (Pennel and Lamb, 1997)。



(三) 1-MCP 對葉片老化之影響

根據乙烯生合成的特性與對植物產生影響的方式，來達到延緩或抑制乙烯作用的目的，主要可分成三種控制方法：(1) 抑制乙烯生合成：抑制 ACC synthase (ACS) 與 ACC oxidase (ACO) 活性，如 AVG 和 AOA 可以抑制 ACS 活性， Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 p-chloromercuribenzoate 和 AIB (α -aminoisobutyric acid) 可以抑制 ACO 活性；(2) 避免或降低與乙烯接觸的機會，利用隔絕 (包裝)、臭氧、紫外線或乙烯吸收劑 (高錳

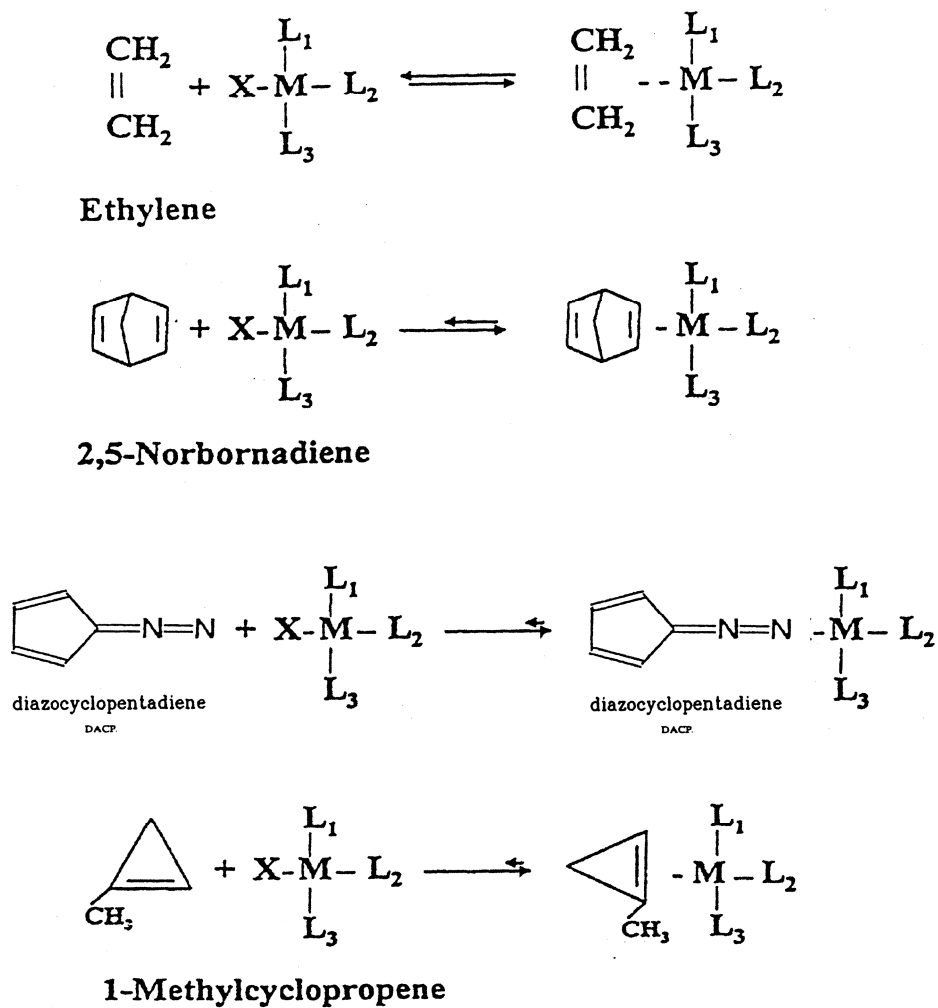


圖 2. 乙烯作用抑制劑 2,5-norbornadiene (NBD)、

diazocyclopentadiene (DACP)、1-methylcyclopropene (1-MCP) 等

環狀烯類化合物 (Sisler and Serek, 1999).

酸鉀) 等降低空氣中乙烯的濃度；(3) 抑制乙烯作用：抑制乙烯與乙烯受體結合，如乙烯作用抑制劑 CO_2 、2,5 - norbornadiene (NBD)、STS (silver thiosulfate)、diazocyclopentadiene (DACP)、1-MCP (1-methylcyclopropene) 等環狀烯類化合物 (圖 2) (Sisler, et al., 1999)。

1-MCP 是一氣態的乙烯作用抑制劑，它與乙烯受體的結合力 (affinity) 較乙烯高 10 倍以上，能以較低的濃度與乙烯受體結合，抑制內生或外在乙烯的作用 (Blankenship and Dole, 2003)。1-MCP 目前已商業化，最早用於花卉，商品名為 EthylBloc；其後被准許應用於可食性作物，商品名為 SmartFresh，二者在美國都是檢驗合格使用的產品 (Blankenship and Dole, 2003)。1-MCP 在台灣商品名為益其補，為白色粉末，需溶於水中才釋放出無色無味的 1-MCP 氣體。標準狀態下，由益其補粉末釋放出 1-MCP 大約需要 20-30 分鐘，若環境溫度較低則需要較長時間才能完全釋放，密閉空間處理 24 小時後，1-MCP 濃度只剩約最初的 1/3 (5°C 下)。1-MCP 處理可以抑制胡荽 (parsley) 葉綠素降解與因乙烯的存在造成葉菜類葉片黃化與葉緣褐化，達到延緩老化之效 (Able et al., 2002; Jiang et al., 2002)。容易老化的青花菜，以 1 ppm 1-MCP 處理後在貯藏於 5°C 環境中，貯放時間可由原來的 16.7 天延長到 60.6 天 (Ku and Will, 1999)，同時也可以降低呼吸率與敗壞的發生率 (Fan and Mattheis, 2000a; Fan and Mattheis, 2000b)。青花菜貯存在

10°C 環境中 12 天，不論環境中乙烯是否存在，1-MCP 都能抑制青花菜葉片黃化，同時降低呼吸速率 (Fan and Matthesis, 2000a)。若以 1-MCP 預處理之後再處理乙烯，可以防止乙烯阻礙植物組織中的電子傳遞、增加植物組織蛋白質及膜蛋白質的含量和增加原生質膜上膜脂質等，防止植物組織老化等傷害 (Serek et al., 1995)。

二、活性氧與葉片老化之研究

(一)活性氧之形成與種類

自由基是指一種可單獨存在的分子、原子或離子，其原子最外層軌域具有不成對電子 (unpaired electron)。反應活性高且極度不穩定的自由基，半衰期相當短，會迅速與附近分子碰撞搶奪一個電子來形成一個電子對，達到自己穩定的狀態。失去電子的分子會變成不穩定分子，進一步造成連鎖反應，促使自由基產生 (Salin, 1987; Thompson et al., 1987; Halliwell, 1994; Dat et al., 2000)。

氧是所有需氧植物所必須，是植物光合作用的副產物，在自然狀態下是以基態氧分子 (O_2 或 3O_2 ，又稱三重態) 存在，相當安定，且對生物體不具毒性。當氧參與化學反應過程而發生電子結構改變時，會轉變成為帶有成對電子的不穩定狀態，且反應性高，即所謂的自由基 (free radical)。活性氧 (active oxygen species, AOS) 的種類包括超氧自由基

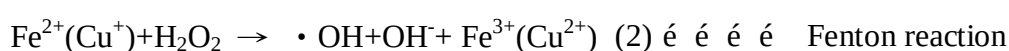
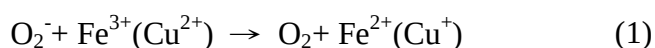
(superoxide radical, O_2^-)、氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\cdot OH$)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 等等 (Salin, 1987; Thompson et al., 1987; Smirnoff, 1993; Yu, 1994; Alscher et al., 1997)。

(二)活性氧之作用

超氧自由基 (O_2^-) 是最常見的氧自由基，由氧分子還原為水的反應中進行一電子還原反應形成的最初產物。 O_2^- 半衰期很短 (2-4 ϵs)，反應活性強，一些特定的胺基酸如 histidine、methionine、tryptophan 容易被 O_2^- 氧化。在細胞環境中， O_2^- 容易攻擊細胞膜引起脂質過氧化作用與造成單股 DNA 斷裂 (Salin, 1987; Thompson et al., 1987; Smirnoff, 1993; Yu, 1994; Alscher et al., 1997; Dat et al., 2000)。 O_2^- 帶有負電荷，不容易接近細胞膜組成份脂肪酸的負電荷團，因此無法直接透過細胞膜，與其他活性氧相較，對細胞造成的毒害較低，但 $O_2^- \cdot$ 的存在對細胞而言相當重要， O_2^- 一旦產生，很容易經由連鎖反應產生如 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等其他活性氧。

過氧化氫 (H_2O_2) 是氧分子還原為水的反應中進行一電子還原反應的二級產物，半衰期較長 (1 ms)，與 O_2^- 一樣皆具有破壞細胞大分子的能力，會對含有 SH 基團分子氧化，使含硫的酵素分子失去活性 (Salin, 1987; Thompson et al., 1987; Smirnoff, 1993; Yu, 1994; Alscher et

al., 1997; Vandenabeele et al., 2000)。由於 H_2O_2 的分子特性，可由產生的部位通透過疏水性細胞膜擴散至其他處。 H_2O_2 對細胞的主要毒性是引發後續自由基毒性更強的 $\cdot\text{OH}$ 生成。當細胞內存在過渡金屬 (transition metals) Fe 或 Cu 時， H_2O_2 與 O_2^- 可經由 Haber-Weiss 或 Fenton 反應形成 $\cdot\text{OH}$ ：



氫氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 是氧分子還原為水的反應中最後產物，為活性氧中活性最強之物質 (半衰期 $< 1 \text{ ms}$)，與生化大分子的親和能力很高 ($K > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)，對細胞內所有組成份進行反應，如蛋白質分子結構進行修飾導致變性，容易被蛋白質水解酵素分解，誘使 DNA 突變及產生脂質過氧化作用 (Salin, 1987; Thompson et al., 1987; Smirnoff, 1993; Yu, 1994; Alscher et al., 1997; Dat et al., 2000)。植物細胞內並不具有清除此種自由基的酵素機制，因此 $\cdot\text{OH}$ 過多產生的結果會導致細胞死亡 (Vranova et al., 2002)。

活性氧的存在對於細胞雖具有毒性，但在細胞中有時也可以作為訊息傳導物質 (Vranova et al., 2002)。大豆細胞受到外來病原菌感染時，植物殺菌素的誘導生成會受到 diphenylene iodonium (DPI, NADPH

oxidase 抑制劑) 與 SOD 抑制 O_2^- 的生成而受阻 (Jabs, et al., 1997)。
 H_2O_2 或 menadione (O_2^- 產生物質) 處理玉米幼苗會誘導耐寒性增加 (Prasad et al., 1994)。UV-B 處理菸草葉片誘導 PR-1 蛋白質的產生，需要 AOS 含量的累積 (Green and Fluhr, 1995)。由 Auxin 誘導的根部向地性生長與其誘導 AOS 有關 (Joo et al., 2001)。內生或外加 H_2O_2 含量越高可以促進枸杞體胚形成 (Cui et al., 1999)。植物細胞中的活性氧可以扮演重要的訊息傳導分子，低濃度 AOS 可以誘導防禦基因與植物適應環境的反應，高濃度則誘發細胞死亡，為了維持這雙重角色的平衡性，AOS 在細胞內的濃度需受到嚴密的調控 (Vranova et al., 2002)。



(三)活性氧之來源

AOS 是植物細胞一般代謝反應產物，主要產生的胞器是葉綠體 (chloroplast)、粒線體 (mitochondria)、過氧化體 (peroxisome)、glyoxysome。葉綠體是大部分 AOS 的主要產生胞器，當固碳作用受到限制時， $NADP^+$ 供給不足導致氧分子接收光系統 I (photosystem I, PS I) 的電子產生 O_2^- (Vandenabeele et al., 2000)。粒線體的 O_2^- 則是 ubiquinone 的氧化還原失序所致 (Buchanan et al., 2000)。過氧化體與 glyoxysome 也會產生 AOS，尤其是過氧化氫。含油份很高的種子發芽時，glyoxysome 中的脂質 (lipid) 可經由脂肪酸 (fatty acid) 的 β

-oxidation 和 glycolate 循環，產生碳水化合物作為幼苗生長之用。過氧化體為避免光氧化作用 (photooxidation) 而進行光呼吸 (photorespiration) 作用過程中，藉由 glycolate oxidase 的催化，將 glycolate 轉變為 glyoxylate 的反應會伴隨 H_2O_2 的釋放。另外，細胞壁在有 Mn^{2+} 存在下，藉由細胞壁上的過氧化酶消耗 NADH 產生 O_2^- 。植物細胞壁上的 amine oxidase 會將二元胺或多元胺氧化後會產生 H_2O_2 (Federico and Angelini, 1991)，存在於細胞膜上的 NADPH oxidase 可以將 O_2 催化為 O_2^- 後，再由 SOD 的作用，在細胞壁上將 O_2^- 轉變為 H_2O_2 (Neil et al., 2002)。此外，在高等植物乙烯合成途徑中，由 ACC 經由 ACC oxidase 轉變為乙烯的催化過程中，也需要氧氣的參與 (Yang, 1985)。

(四)活性氧與葉片老化

西元 1955 年 Harman 提出衰老自由基理論 (free radical theory of aging)，認為衰老是活性氧對於細胞傷害攻擊所造成的。當 AOS 的產生與移除失去細胞內氧化還原的穩定狀態時，會導致 AOS 累積；AOS 反應活性很高，會去攻擊細胞內組成份，尤其是構成細胞膜的脂質所造成的傷害，引起氧化逆境 (oxidative stress) (Buchanan et al., 2000)。

AOS 在植物細胞正常生長情況只有少量存在 ($240 \text{ } \mu\text{M s}^{-1} \text{ O}_2^-$ 或

0.5 μM H_2O_2)。當植物遭遇到許多生物性 (biotic) 或非生物性 (abiotic) 逆境時，如乾旱、淹水、臭氧、鹽分、重金屬、高光強度、創傷、病蟲害等，常會使得葉綠體與粒線體的電子傳遞鏈受阻，無法順利傳送電子，游離的電子常會與氧結合形成活性氧，因此增加植物細胞中活性氧含量 (240-720 μM O_2^- 或 5-15 μM H_2O_2) (Dat et al., 2000; Hodges and Forney, 2000; Polle, 2001)，導致葉片加速老化 (Philosoph-Hadas et al., 1991; Bartoli, 1996)。菸草葉片的老化，可能是自由基累積過多產生脂質過氧化作用 (lipid peroxidation)，因此 AOS 被認為與葉片老化有關 (Dhindsa et al., 1981; Philosoph-Hadas et al., 1994)。

(五)脂質過氧化作用與葉片老化之關係

植物葉片老化過程中，細胞膜或胞內之膜通透性 (membrane permeability) 會改變，而膜通透性改變常伴隨著脂質過氧化作用 (lipid peroxidation) 的發生 (Ferguson and Simon, 1973)。脂質過氧化作用是植物細胞老化過程中重要的生理作用之一 (Dhindsa et al., 1981; Kunnert and Ederer, 1985; Thompson et al., 1987; Strother, 1988)。天然的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 中，常帶有兩個雙鍵夾著一個甲烯基 (diene) 之構造，這種構造經由 Lipoxygenase (LOX) 催化酵素性氧化或活性氧引發的非酵素性作用，與氧分子發生過氧化反應生成

自由基 lipid hydroperoxide，而觸發脂質過氧化反應。脂質過氧化是一種連鎖反應，會不斷產生自由基，以供觸發進一步的過氧化。脂質過氧化作用重要的裂解產物有丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、乙烷、戊烷、與乙烯等等。這些有害的碳氫裂解氧化產物會導致細胞膜滲漏 (Leshem, 1986; Zhuang et al., 1995)。

在光線中小麥與黑麥葉片老化時，總過氧化物含量與脂質過氧化作用產物 MDA 含量會隨著葉片老化程度增加而增加 (Kar and Feierabend, 1984)。老化之燕麥切離葉片中，MDA 含量較高，而 SOD 及 CAT 活性有下降之現象 (Dhindsa et al., 1982)。脂質過氧化作用被認為是由自由基所引起 (Dhindsa et al., 1981; Thompson et al., 1987)。使用自由基清除劑還原態 GSH 與 sodium benzoate 處理可延緩由 MJ (methyl jasmonate) 誘導水稻切離葉片的老化與 MDA 含量的增加 (Hung and Kao, 1998)。採收後的園產品在貯藏過程中，其綠色組織的老化亦與脂質過氧化作用有關。10 ppm 乙烯處理會加速菠菜葉片葉綠素降解，同時也會促進 MDA 含量的累積與產生不穩定的自由基 hydroperoxide (Yamauchi and Watada, 1991)。洋芫荽切離葉片老化過程中，脂質過氧化作用與葉綠素、蛋白質含量的變化為負相關關係 (Meir et al., 1992)。由於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，因此脂質過氧化作用產物 MDA 含量可用來當作切離葉片老

化程度的指標與遭受氧化逆境程度 (Hodges et al., 2000)。

三、抗氧化系統與葉片老化之關係

(一)植物之抗氧化機制

在正常植物細胞中，或多或少會自行產生一些活性氧，為因應活性氧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活性氧在細胞內之累積，主要由非酵素型 (non-enzymatic) 的抗氧化物 (antioxidants) 及一些酵素型 (enzymatic) 抗氧化酵素 (antioxidant enzymes) 所組成 (圖 3)。抗氧化物包含水溶性與脂溶性的分子，包括了抗壞血酸 (ascorbic acid, AsA)、還原態的穀胱甘肽 (glutathione, GSH)、 α -生育酚 (α -tocopherol) 及類胡蘿蔔素 (carotenoids) 等，可直接清除細胞質或細胞膜中的自由基。抗氧化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 (Halliwell, 1974; Buchanan et al., 2000)。

SOD (E.C. 1.15.1.1) 廣泛分佈在有氧呼吸的有機體中，扮演控制細胞間 superoxide 含量的角色。SOD 在高等植物細胞中，依組織不同而

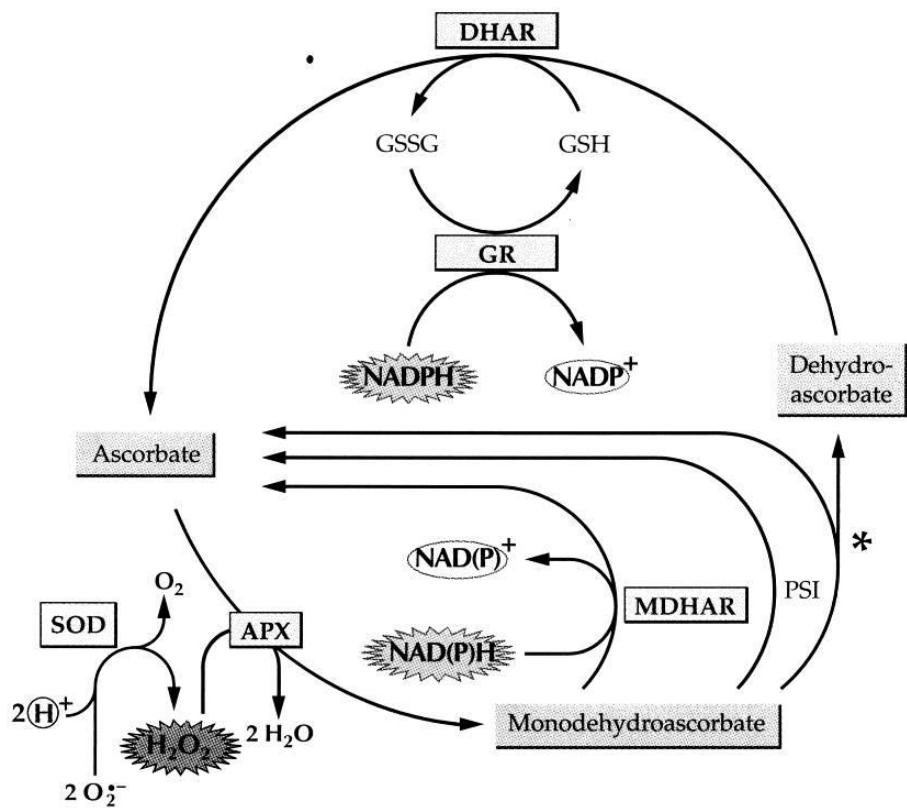


圖 3. 抗氧化防禦系統

Fig. 3. Antioxidant defense system. (Buchanan et al., 2000)

含有不同金屬輔基，CuZn-SOD 主要存在葉綠體與細胞質，Mn-SOD 主要存在粒線體基質中，Fe-SOD 只存在部分雙子葉植物葉綠體中。當細胞產生活性氧如 O_2^- 時，會經由抗氧化防禦系統的第一道防線 SOD 負責將 O_2^- 歧化成為 O_2 與 H_2O_2 ，防止自由基進一步的生成。

植物體抗氧化酵素系統中的 CAT (分佈於過氧化體、乙醛酸循環體等微體)、POX (分佈於細胞壁、細胞膜、細胞質及其他內質網、高爾基體、液泡等胞器)、APX (分佈於細胞質、粒線體與葉綠體) 的角色是負責清除工作將之代謝為 H_2O 。CAT (EC 1.11.1.6) 是帶有 heme 的四元體酵素，存在於 peroxisome、glyoxysome 與一些含有產生 H_2O_2 酵素 (glycolate oxidase) 的胞器中。經由 SOD 歧化而來的 H_2O_2 會更進一步經由 CAT 作用 $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ，保護細胞避免因 H_2O_2 累積而引起傷害。

POX (EC 1.11.1.7) 亦是帶 heme 結構的蛋白質，所催化的反應為 $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$ 。POX 具有不同型的同功異構酵素 (isozyme)，有些可將 indole-3-acetic acid (IAA) 氧化分解，有些則具有 ACC oxidase 酵素功能。POX 除了具有清除 H_2O_2 的機制外，在菠菜、芫荽等葉片中，亦發現具有 peroxidase-hydrogen peroxide 系統，即在有 H_2O_2 與酚類物質的存在下，會以葉綠素 a 為基質，參與葉綠素之分解反應 (Yamauchi and Minamide, 1985; Yamauchi and Watada, 1991)。

POX 其中利用 ascorbate 為反應受質的 APX (EC 1.11.1.11，分佈在細胞質、過氧化體、粒線體、葉綠體內的基質與類囊膜)，所負責清除 H_2O_2 的反應，是與 GR (EC 1.6.4.2，分佈在細胞質與葉綠體) 一同參與所謂 Halliwell-Asada 循環或直接稱之為 ascorbate-glutathione 循環 (Asada, 1992)。APX 利用 ascorbate 為反應受質，將 H_2O_2 還原為水，而 ascorbate 則轉變成 dehydroascorbate (DHA) 或 monodehydroascorbate (MDHA)。MDHAR 亦可以自發反應或藉由 MDHA reductase (MDHAR) 催化再生為 ascorbate；DHA 可以自發反應或藉由 DHA reductase (DHAR) 催化再生為 ascorbate。DHAR 催化反應需要 GSH 為反應受質，反應後 GSH 被氧化為氧化態 glutathione (GSSG)。GSSG 再經由 glutathione reductase (GR) 的催化反應，同時消耗 NAPH 再生為 GSH。抗氧化酵素的存在除了負責清除 AOS，同時幫助植物細胞內 ascorbate (ASA/DHA) 與 glutathione (GSH/GSSG) 維持在很高的氧化還原狀態 (Buchanan et al., 2000)。

(二)葉片老化過程中抗氧化酵素活性之表現

燕麥葉片與大羊蹄 (*Rumex obtusifolius*) 葉圓片老化時，MDA 含量增加，可能是 SOD 與 CAT 活性下降導致自由基累積而促進脂質過氧化作用的發生，最終細胞膜崩解 (Dhindsa et al., 1982)。不同植物葉片

在正常老化或逆境誘導老化過程中，抗氧化系統的酵素活性表現不一，如老化速度較快的菠菜品種 'Spokane F1' 的 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 抗氧化酵素在葉片老化過程中均有增加，Deccan 103 的 Mn-SOD (SOD isozyme) 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 H_2O_2 代謝相關酵素 (POX、CAT、APX、SOD) 的活性 (林, 1996)。淹水前處理誘導菸草葉片在復氧環境中產生氧化逆境時，CAT 與 SOD 活性較對照組低，造成菸草葉片的氧化傷害 (Hurng and Kao, 1994)。葉綠素降解速率由小到大依序為 watercress > parsley > sage 的三種可食性藥草，parsley 的 CAT、POX 活性最高而總還原能力居 (Philosoph-Hadas et al., 1994)。因此，不同種類的葉片在老化時，其抗氧化防禦機制的反應各有不同。

已有研究利用基因轉殖技術，將抗氧化酵素導入植物體內，觀察其表現是否可以提高植物對逆境之抗性。菸草轉殖株大量表現 Cu/Zn SOD 的結果顯示，對於高光強度及低溫確實具有抗性表現 (Sen Gupta et al., 1993)。苜蓿轉殖株表現 Mn-SOD 可以在凍害逆境後仍具有生長勢，而且可以增加在冬天田間的存活率 (McKersie et al., 1996, 1997)。轉殖阿拉伯芥過氧化氫體上的 APX 基因至菸草植株中，轉殖植株對於氧

化逆境的抵抗性有提高的效果，菸草植物轉殖 GR 基因後可以提高對巴拉刈的抗性 (Creissen et al., 1996)。



材料與方法

一、材料種植與處理

本試驗以農友[®]蕙津[®]品種芥藍 (*Brassica oleracea* L. Albograbra Group cv. [®]Veg Gin[®]) 種子為試驗材料。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 48 小時，以提高種子發芽率與發芽整齊度。播種前預先將蔬菜育苗介質 BVB 4 加水拌濕，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。播種後將每一穴盤置入一塑膠淺盤後放在 25°C，70% 濕度的恆溫庫中育苗，光強度 5000 lux，每日照光 18 小時。澆水原則是要看到介質轉為淺棕色時才進行澆水，澆水方式是將水倒入塑膠淺盤中，待介質呈現深棕色後，將多餘的水倒出。

為取得葉片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手續。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 3000 倍之 Peter[®] 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 2000 倍之 Peter[®] No.1 (20-20-20) 營養液一次。之後每隔四天施用一次 1000 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、試驗方法

(一) 不同濃度乙烯處理

每片切離葉片貼上經過編號的小標籤，根據 0、0.1、1、10 ppm 乙烯濃度處理，依序編號為 A1—A10、B1—B10、C1—C10、D1—D10。將裝有切離葉片的三角瓶分別放入置於 25°C 恆溫庫內的容積 16 公升的四個呼吸缸中，呼吸缸外表被覆鋁箔紙，維持缸內黑暗環境。以含 0、0.1、1、10 ppm 乙烯的空氣以每小時 8 公升的流速分別通入前述四個容積 16 公升呼吸缸中，連續 8 天。每日測量不同濃度乙烯處理的切離葉片葉綠素讀值一次。

(二) 1 ppm 乙烯處理

每片切離葉片貼上經過編號的小標籤，不含乙烯處理組編號為 C1—C80 (C 代表 CK)，乙烯處理組編號為 E1—E80 (E 代表 Ethylene)。另外再取 20 片葉片將之編號為 O1—O20 代表第 0 天的葉片。將裝有編號 C1—C80 與 E1—E80 切離葉片的三角瓶分別放入置於 25°C 恆溫庫內的容積 16 公升的兩個呼吸缸中，每缸 20 瓶，呼

吸缸外表被覆鋁箔紙，維持缸內黑暗環境。

以含 0、1 ppm 乙烯的空氣以每小時 8 公升的流速分別通入前述兩個容積 16 公升呼吸缸中，連續 4 天。通入空氣的呼吸缸中裝有編號 CK1—CK80 切離葉片三角瓶，乙烯處理組裝有編號為 E1—E80 切離葉片三角瓶。每日測量編號 C61—C80 與 E61—E80 的切離葉片葉綠素讀值一次。處理開始後第 1、2、3、4 天依序取出編號 C1—C20、C21—C40、C41—C60、C61—C80 與 E1—E20、E21—E40、E41—E60、E61—E80 的葉片。加上未處理的第 0 天編號為 O1—O20 的 20 葉片，從中選擇外觀表現一致的 10 片葉片，每葉片取出後，經天平秤重後裝入封口袋，並在袋上紀錄該片葉片重量、處理項目與固定日期，然後用液態氮固定後置於 -80°C 凍箱存放，留做之後測定蛋白質、MDA 與 H_2O_2 含量與抗氧化酵素活性之用。測定之前從每日凍存的無乙烯與有乙烯兩處理中之 10 片葉片，以 2 片為一樣品作 1 重複，無乙烯與有乙烯處理各 5 重複，亦即每處理均有取樣 5 天。

(三) 1-MCP 處理

每片切離葉片貼上經過編號的小標籤，不含乙烯處理組編號為 AA1—AA20 (A 代表 Air) 與 AE1—AE20 (E 代表 Ethylene)，1-MCP 處理組編號為 MA1—MA20 (M 代表 1-MCP) 與 ME1—ME20。將裝

有編號 AA1—AA20、AE1—AE20 與 MA1—MA20、ME1—ME20 切離葉片的三角瓶分別放入置於 25°C 恆溫庫內的容積 16 公升的兩個呼吸缸中，每缸 10 瓶，呼吸缸外表被覆鋁箔紙，維持缸內黑暗環境。

分別以密閉處理空氣或 1-MCP 氣體燻蒸 1 天後，AA1—AA20、MA1—MA20 與 AE1—AE20、ME1—ME20，以不含乙烯或含 1 ppm 乙烯的空氣的處理方式，連續 3 天以每小時 8 公升的流速分別通入兩個容積 16 公升呼吸缸中，每缸 10 瓶，呼吸缸外表被覆鋁箔紙，維持缸內黑暗環境。每日測量切離葉片 SPAD 讀值一次。乙烯處理 3 天後，從四組處理中選擇外觀表現一致的 10 片葉片，經天平秤重後裝入封口袋，並在袋上紀錄該片葉片重量、處理項目與固定日期，然後用液態氮固定後置於 -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。測定之前從乙烯連續處理 3 天後凍存的四處理組中之 10 片葉片，以 2 片為一樣品作 1 重複，各 5 重複。

1-MCP 的用量，依使用容積為 16 公升呼吸缸之體積，計算並秤取 8.8 mg 的益奇補粉末 (EthylBloc，是含有 1-MCP 之商業產品，由利統公司生產。其有效濃度為 0.43%) 置於 50 mL 燒杯中，將燒杯放入呼吸缸，加入 5 mL 去離子水，迅速將呼吸缸密封，使呼吸缸內濃度達到 1 ppm，進行燻蒸處理，空氣 (對照組) 則是使用同體積的去離子

水。1-MCP 用量之計算：

$$\frac{X \text{ ppm}}{0.9 \text{ ppm}} = \frac{W / V}{1.5 / 3000}$$

W：益奇補粉末重量
V：呼吸缸內部體積

三、測定項目

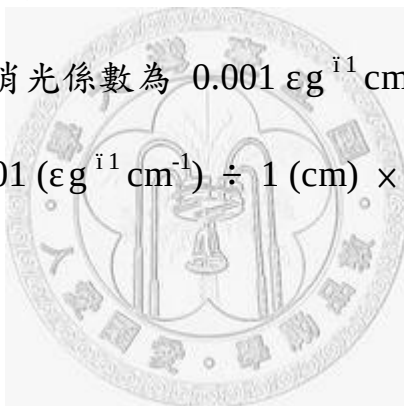
(一) 葉綠素測定

仿王氏 (2000) 方法，以葉綠素計每日測量留在呼吸缸中的 1 ppm 乙烯處理編號 C61—C80 和 E61—E80 與 1-MCP 處理編號 AA1—AA10、AE1—AE10、MA1—MA10 和 ME1—ME10 的每一片切離葉片 SPAD 讀值一次，共測四天。每片葉前端葉脈兩側測兩點後求平均值，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：

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%。使用葉綠素計時應注意葉片是否失水軟垂，此時測得的 SPAD 值會偏高而失去準確度。

(二) 蛋白質含量測定

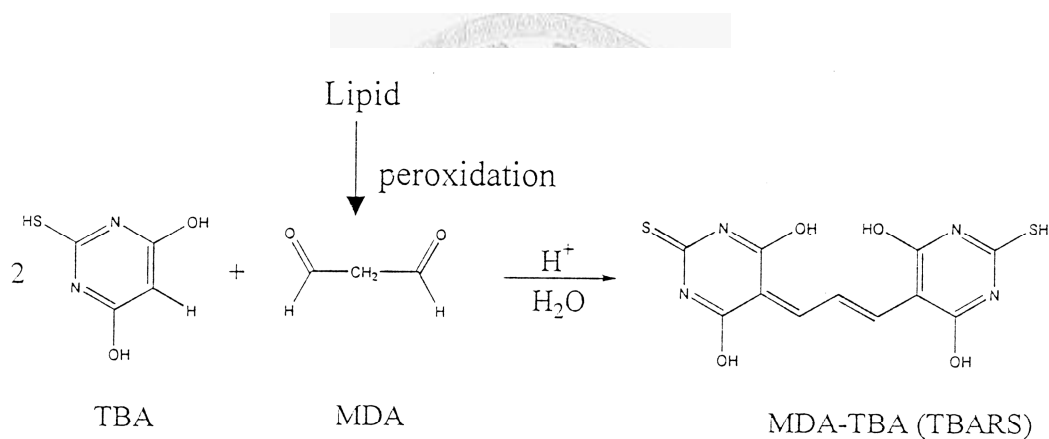
蛋白質含量之測定是參考 Bradford (1976) 測定方法。取 2 片芥藍葉片，加入 2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 研磨成均質後，在 4°C 下以 17,600 g 離心 20 分鐘。取 20 μ L 上清液加入 5 mL 之 dye solution，靜置約 10 分鐘，測定 595 nm 波長之吸光值。對照組是以 20 μ L sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8) 取代上清液，再依相同步驟進行呈色反應。蛋白質含量的估計係依據以 5 μ g ~ 100 μ g 小牛血清蛋白 (BSA, bovine serum albumin) 依同樣步驟所作出的標準曲線，求得消光係數為 0.001 μ g⁻¹ cm⁻¹。樣品中蛋白質含量 (mg g⁻¹) 是 $A_{595} \div 0.01 (\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}) \div 1 (\text{cm}) \times 100 (\text{稀釋倍數}) \div 1000 \div \text{樣品原始鮮重 (g)}$ 。



(三) Malondialdehyde (MDA) 含量之測定

MDA 含量，可作為脂質過氧化作用之指標。MDA 含量之測定，採用 Heath and Packer (1968) 之方法。取 2 片芥藍葉片，加入 4 mL TCA (trichloroacetic acid) (5%, w/v) 研磨成均質後，在 20°C 下以 10,000 g 離心 5 分鐘，吸取 1 mL 上清液，加入 4 mL TBA (thiobarbituric acid) [5%, w/v, 溶於 TCA (20%, w/v) 中] 混合均勻。將試管置於 95°C 下熱水浴 30 分鐘後，迅速地將試管加入冰中終止反應。冰浴 5 分

鐘後取出試管，將試管瓶蓋打開以超音波振盪器震盪除去氣泡，在室溫下以 5,000 g 離心 10 分鐘後，取上清液以光電比色計測定 532 nm、600 nm 波長之吸光值。空白試驗是以 1 mL 之 TCA (5%, w/v) 代替萃取液，加入 4 mL TBA (thiobarbituric acid) 進行反應。反應後產物之消光係數為 $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。樣品中 MDA 之含量 (nmol g^{-1}) 為 $(A_{532} - A_{600}) \div 155 (\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 5 (\text{反應體積, mL}) \div 1 (\text{cm}) \times 4 (\text{稀釋倍數}) \times 1000 \div \text{樣品原始鮮重 (FW, g)}$ 。



(四) H_2O_2 含量之測定

H_2O_2 含量之測定是參考 Jana and Choudhuri (1981) 方法。其測定原理是利用過氧化氫與 titanium chloride (TiCl_4) 反應後會產生黃色的複合物，以該複合物在波長 410 nm 下之吸光值來估算過氧化氫含量。取 2 片芥藍葉片以 3 mL 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 2 mL 上清液，加入 1 mL TiCl₄ 混合均勻，於室溫下以 5,000 rpm 離心 15 分鐘後，取上清液以光電比色計測定 410 nm 之吸光值。空白試驗是以 2 mL TiCl₄ sodium phosphate buffer 取代上清液。反應後產物之消光係數為 0.28 mM⁻¹ cm⁻¹。樣品中所含 H₂O₂ 之含量 (nmol g⁻¹) 為 $A_{410} \div 0.28 \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \div 1 \text{ (cm)} \times 1.5 \text{ (稀釋倍數)} \div \text{樣品原始鮮重 (FW, g)}$ 。

(五) 抗氧化酵素活性分析

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

APX 之活性測定是參考 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 g 離心 20 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 (crude enzyme extract)。取 0.1 mL 酵素萃取液，加入 1 mL potassium phosphate buffer (150 mM, pH 7.0)，1 mL ascorbate (1.5 mM)，0.4 mL EDTA (0.75 mM)，0.5 mL H₂O₂ (6 mM) 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 (ΔA_{290}) 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。反應後產物之消光係數為 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹。樣品中 APX 活性 (units g⁻¹ FW) 為 $\Delta A_{290} \div 2.8 \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 3 \text{ (反應體積, mL)} \div 1 \text{ (cm)} \times 40 \text{ (稀}$

釋倍數) $\div$ 1 (分鐘) $\div$ 樣品原始鮮重 (FW, g)。酵素活性單位 (unit) 為每分鐘消耗 $1 \mu\text{mol}$ 之 ascorbate。其比活性 ($\text{units mg}^{-1} \text{protein}$) 為 APX 活性 (units g^{-1}) $\div$ 萃取液的蛋白質含量 (mg g^{-1})。

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

CAT 之活性測定主要是參考 Kato and Shimizu (1985) 方法。取 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 g 離心 20 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 (crude enzyme extract)。取 0.2 mL 酵素萃取液，加入 2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0)，0.1 mL H_2O_2 (1 M) 於石英管混合均勻後，以光電比色計測定波長 240 nm 之吸光值 (ΔA_{240}) 反應 1 分鐘，空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。反應後產物之消光係數為 $40 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 。樣品中 CAT 活性 ($\text{units g}^{-1} \text{FW}$) 為 $\Delta A_{240} \div 40 (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 3$ (反應體積，mL) $\div$ 1 (cm) $\times$ 20 (稀釋倍數) $\div$ 1 (分鐘) $\div$ 樣品原始鮮重 (FW, g)。酵素活性單位 (unit) 為每分鐘消耗 $1 \mu\text{mol}$ 之 H_2O_2 。其比活性 ($\text{units mg}^{-1} \text{protein}$) 為 CAT 活性 (units g^{-1}) $\div$ 萃取液的蛋白質含量 (mg g^{-1})。

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

GR 之活性測定主要是參考 Foster and Hess (1980) 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 12,000g 離心 20 分鐘後，所得上清液即為酵素萃取液 (crude enzyme extract)。取 0.2 mL 酵素萃取液，加入 1 mL TRIS-HCl buffer (150 mM, pH 7.5)，0.3 mL MgCl_2 (30 mM)，0.5 mL oxidized form glutathione (GSSG, 3 mM)，1 mL reduced form nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, 0.45 mM) 於石英管內混合均勻後。以光電比色計測定波長 340 nm 之吸光值 (ΔA_{340}) 反應 1 分鐘，偵測 NADPH 的氧化使得吸收值減少的量。空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。每分鐘吸光度 (ΔOD) 之變化，定義為一單位酵素活性 (unit)。樣品中 GR 活性 (units g^{-1} FW) 為 $\Delta A_{340} \times 20$ (稀釋倍數) $\div 1$ (分鐘) $\div$ 樣品原始鮮重 (FW, g)。酵素活性單位 (unit) 為每分鐘消耗 $1 \mu\text{mol}$ 之 H_2O_2 。其比活性 (units mg^{-1} protein) 為 GR 活性 (units g^{-1}) $\div$ 萃取液的蛋白質含量 (mg g^{-1})。

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

Peroxidase 之活性測定是參考 MacAdam et al. (1992) 方法。取 2

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

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 (crude enzyme extract)。取 0.2 mL 酵素萃取液，加入 1.6 mL Tea-Dea buffer (triethanolamine -diethanolamine, 100 mM, pH7.4), 0.08 mL reduced form nicotinamide adenine dinucleotide (NADH, 7.5 mM), 0.05 mL EDTA / MnCl₂ (100 mM / 50 mM, pH 7.0), 1 mL 6-mercaptoethanol (10 mM) 於石英管混合均勻後，以光電比色計測定波長 340 nm 之吸光值 (ΔA_{340}) 反應 10 分鐘之吸光值 (A_{340})，空白試驗以 0.2 mL 萃取緩衝液代替酵素萃取液。樣品中 SOD 活性 (units g⁻¹ FW) 為 (空白試驗 Δ OD - 樣品 Δ OD) $\div$ 1 / 2 Δ OD (mM⁻¹cm⁻¹) $\times$ 15 (稀釋倍數) $\div$ 10 (分鐘) $\div$ 樣品原始鮮重 (FW, g)。其比活性 (units mg⁻¹ protein) 為 SOD 活性 (units g⁻¹) $\div$ 萃取液的蛋白質含量 (mg g⁻¹)。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 (Δ OD)。

四、供試藥劑原液與配置

1. EthylBloc：利統股份有限公司出品。
2. Dye solution：以 50 mL 乙醇 (95%，v/v) 將 100 mg 之 Coomassie Brilliant Blue G-250 完全溶解後，加入 100 mL phosphoric acid (85%，w/v)，加入去離子水定量至 1 L。以濾紙過濾後之濾液置於褐色瓶中，存放於 4°C 中備用。
3. TiCl_4 (titanium chloride, 0.1%，v/v)，溶於 20% (v/v) H_2SO_4 ：將 20 mL 濃 H_2SO_4 加入裝有適量去離子水的燒杯中，待冷卻後加入 100 μL TiCl_4 後，再以去離子水定量至 100 mL。(TiCl₄ 為劇毒發煙物，配置時需配戴手套於通風櫥中操作)。
4. TBA [5%，w/v，溶於 TCA (20%，w/v) 中]：取 20 g TCA 加入 80 mL 去離子水中，加熱並攪拌，待完全溶解後再加入 0.5 g TBA 繼續加熱及攪拌，溶解完全後待冷卻再以去離子水定量至 100 mL。
(TCA 為具腐蝕性之強酸結晶粉末，配置時需配戴手套)。
5. 測定方法中使用到的 TBA、 H_2O_2 、ascorbate、GSSG、NADPH、NADH 等藥劑，進行測定時需新鮮配置。

五、試驗儀器

1. 葉綠素計：Minolta SPAD-502 chlorophyll meter
2. 分光光度計：U2100, Hitachi
3. 超低溫高速離心機：Super T21, SORVAL



結果

一、乙烯對切離葉片老化之影響

葉片進入老化生理變化的過程中，在外觀上最明顯的改變就是葉片黃化，因此一般都以葉綠素含量降低的程度作為切離葉片老化的指標 (Thomas and Stoddart, 1981)。根據紀 (2003) 使用 SPAD 葉綠素測定法，與使用乙醇或 DMF (N,N-Dimethylformamide) 等有機溶劑萃取出葉綠素後，再以分光光度計讀取特定波長之吸光值的方法相比較，結果指出葉片 SPAD 讀值與其葉片中的總葉綠素或葉綠素 a 含量都呈現高度相關，SPAD 讀值可用來代表葉片的葉綠素含量，因此本試驗利用 SPAD 葉綠素計測定法的非破壞性特性，連續測定同一片切離葉片的 SPAD 讀值來代表葉綠素含量，並換算成黃化指數以表現黃化趨勢。

分別以 0、0.01、1、10 ppm 乙烯處理芥藍切離葉片觀察葉片在黑暗環境 25°C 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 SPAD 值無顯著差異，葉片外觀尚未有黃化發生。乙烯處理 3 天後，乙烯處理組切離葉片 SPAD 值平均值明顯低於對照組 (圖 4)，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 值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。

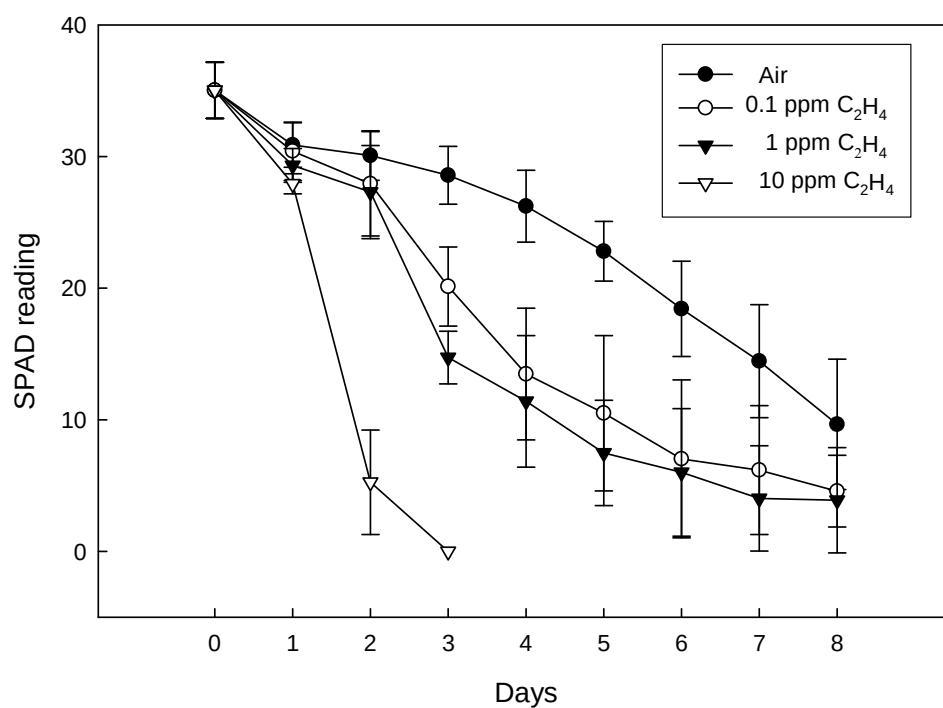


圖 4. 25°C 下薊津芥藍苗切離葉片以不同乙烯濃度處理對葉綠素計 SPAD 讀值變化之影響。

Fig. 4 Changes in readings of SPAD chlorophyll meter of detached leaves of 薊津芥藍 Chinese kale seedlings treated with fresh air and various concentration of C₂H₄ at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 10 replications.

為了瞭解乙烯促進芥藍切離葉片老化是在何時發生，根據圖 5 結果指出，以 10 ppm 乙烯處理切離葉片 3 天，對於促進葉片老化現象的效果過於強烈，即在處理 3 天後葉片已經嚴重老化乾枯；而 0.1 ppm 與 1 ppm 乙烯處理的 SPAD 值雖無顯著差異，但經 1 ppm 乙烯處理 3 天後，切離葉片的外觀表現會較為一致 (圖 6)，且葉片外觀已出現黃化，因此之後的試驗採用 1 ppm 乙烯濃度為最適濃度進行 4 天的時程 (time course) 處理及分析。

以純空氣 (對照) 或 1 ppm 乙烯連續處理芥藍苗切離葉片 4 天中，前 2 天 SPAD 值無顯著差異 (圖 7A)，葉片外觀尚未有黃化發生。第 3 天開始乙烯處理組的葉片 SPAD 平均值明顯低於對照組 (圖 7A)，黃化指數已經達到 50% (圖 7B)，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 SPAD 值持續下降，而到第 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 7B)。

葉片老化中，蛋白質含量的改變也是重要的生理變化之一。由圖 8 結果得知，不論有無乙烯處理，蛋白質含量在處理期間的前 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 1 ppm 乙烯連續處理 3 天後，芥藍苗切離葉片開始老化。

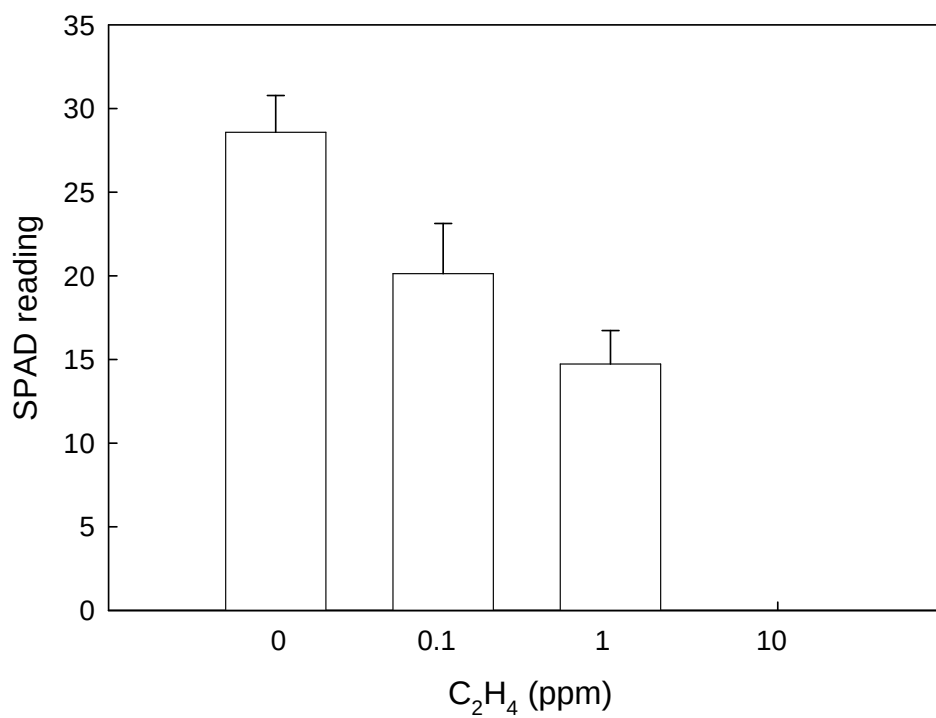


圖 5. 25°C 下薊藍苗切離葉片以不同濃度乙烯處理 3 天對葉綠素計 SPAD 讀值變化之影響。SPAD 讀值係於處理第 3 天測定。

Fig.5 Changes in readings of SPAD chlorophyll meter of detached leaves of 薊藍 Chinese kale seedlings treated with various concentrations of C_2H_4 for 3 days at 25 °C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 10 replications.

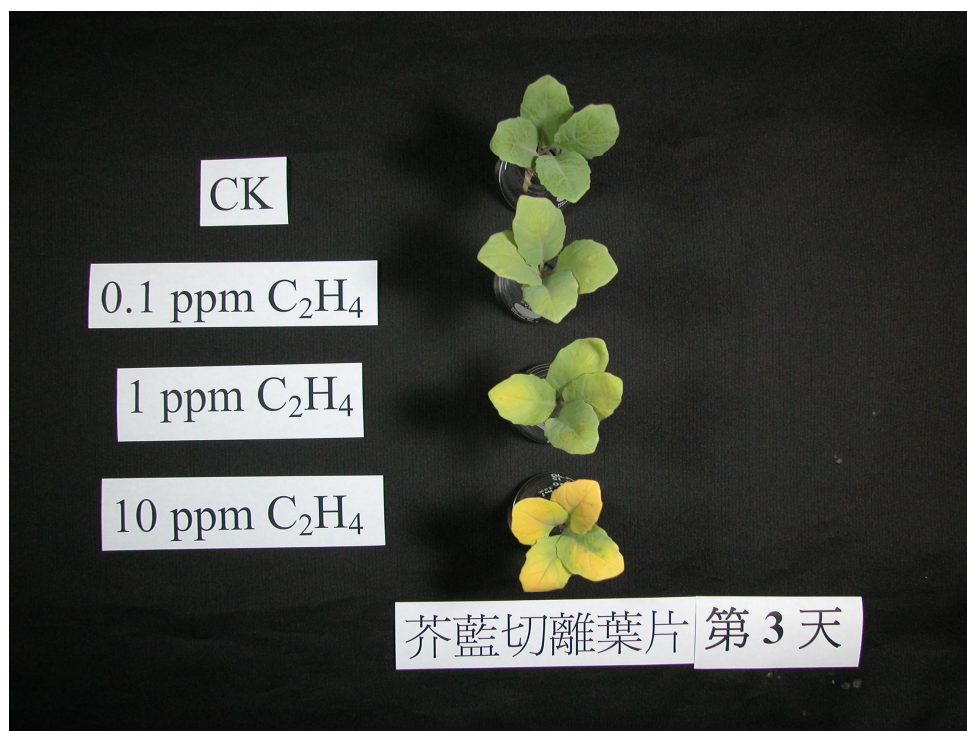


圖 6. 25°C 下蔥薹芥藍苗切離葉片以不同濃度乙烯處理 3 天後的黃化變化

Fig. 6 Yellowing of detached leaves of Chinese kale seedlings treated with various concentrations of C_2H_4 at 25°C.

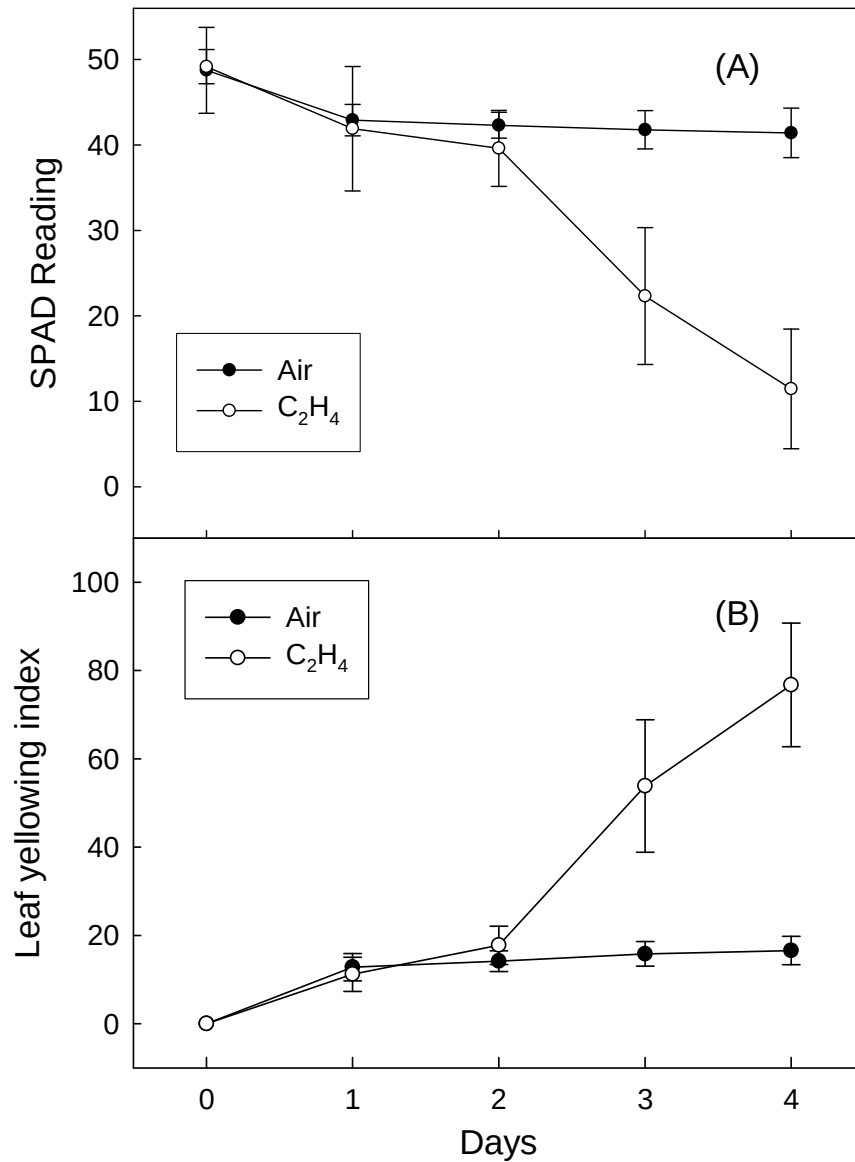


圖 7. 25°C 下薊藍苗切離葉片以空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對葉綠素計 SPAD 讀值 (A), 黃化指數 (B)。圖 (B) 中第 0 天為葉片剛切離時的黃化指數。

Fig. 7 Changes in readings of SPAD chlorophyll meter (A) and yellowing index (B) of detached leaves of 薊藍 Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 10 replications.

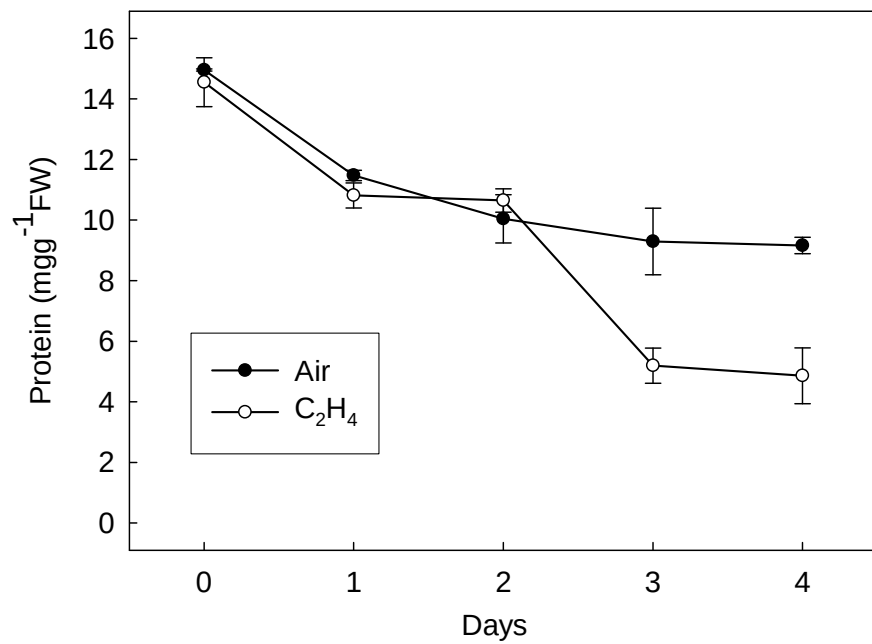


圖 8. 25°C 下薊薹藍苗切離葉片以空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對蛋白質含量變化之影響。

Fig. 8 Changes in protein content of detached leaves of *Brassica chinensis* seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

二、脂質過氧化作用、 H_2O_2 含量與切離葉片老化之關係

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, 1986 ; Philosoph-Hadas et al., 1994)，而 MDA 與 H_2O_2 含量是一般常用來當作氧化逆境的指標，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 4 天中，乙烯處理組的 H_2O_2 含量在處理 1 天後即開始明顯高於對照組 (圖 9A)，隨著處理天數增加， H_2O_2 含量僅有些微下降；對照組的 H_2O_2 含量在處理 2 天內並無顯著變化，之後明顯下降。

對照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 9B)。對照組在芥藍切離葉片老化過程中，MDA 含量並無顯著變化。乙烯處理組的 MDA 含量自處理第 2 天開始增加並高於對照組，且隨著處理天數增加，MDA 含量也逐漸增加。此結果說明乙烯處理芥藍苗切離葉片，會促使活性氧含量增加，加速脂質過氧化作用發生，顯示切離葉片遭受到由乙烯誘導的氧化逆境傷害。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，可以由圖 7(A) 及圖 9(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

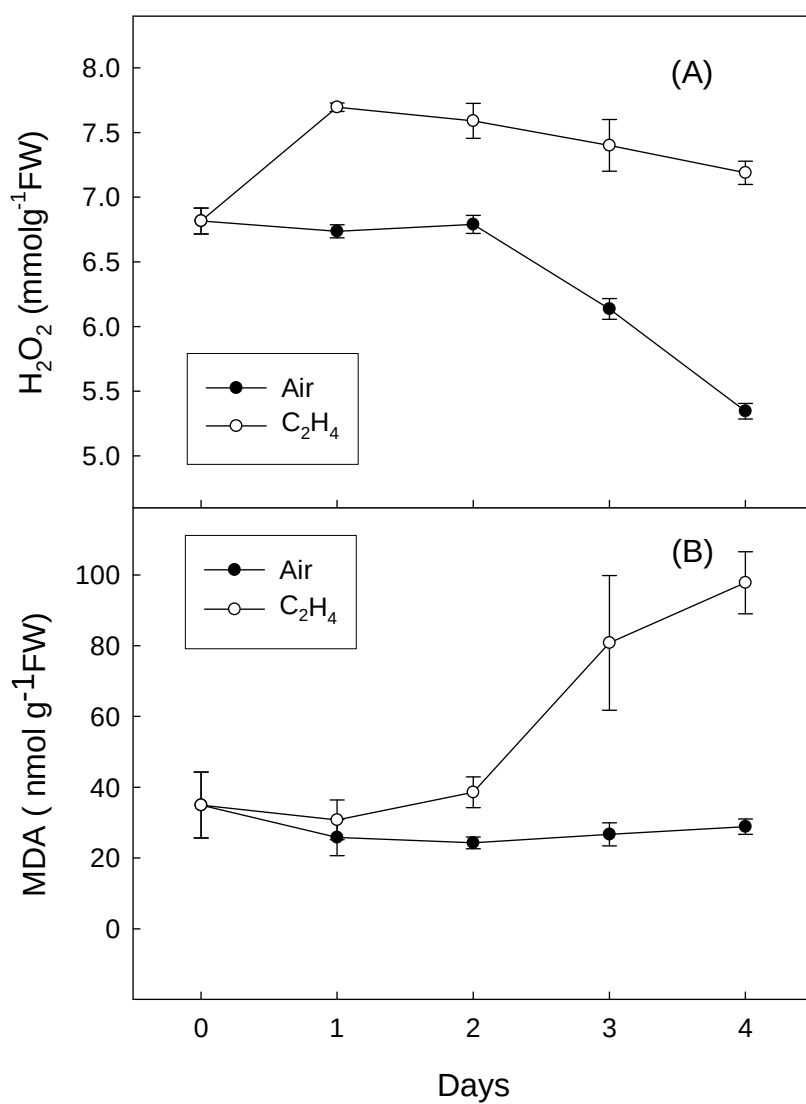


圖 9. 25°C 下薊藍苗切離葉片以空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 H₂O₂ (A) 與 MDA (B) 變化之影響。

Fig. 9 Changes in H₂O₂ (A) and MDA (B) level of detached leaves of 薊藍 Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean ± S.E. of 5 replications.

經乙烯處理後，是先遭受氧化逆境，然後葉片老化 (SPAD 值下降) 才開始表現。

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，其本身通常會誘導相關抵抗氧化逆境的機制來因應。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的 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 10A)，兩處理間 SOD 比活性的開始出現變化時間較晚，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 10B)，但變化不大。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 10C)。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 11A)，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 11B)。由此得知，切離葉片經乙烯處理後，SOD、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

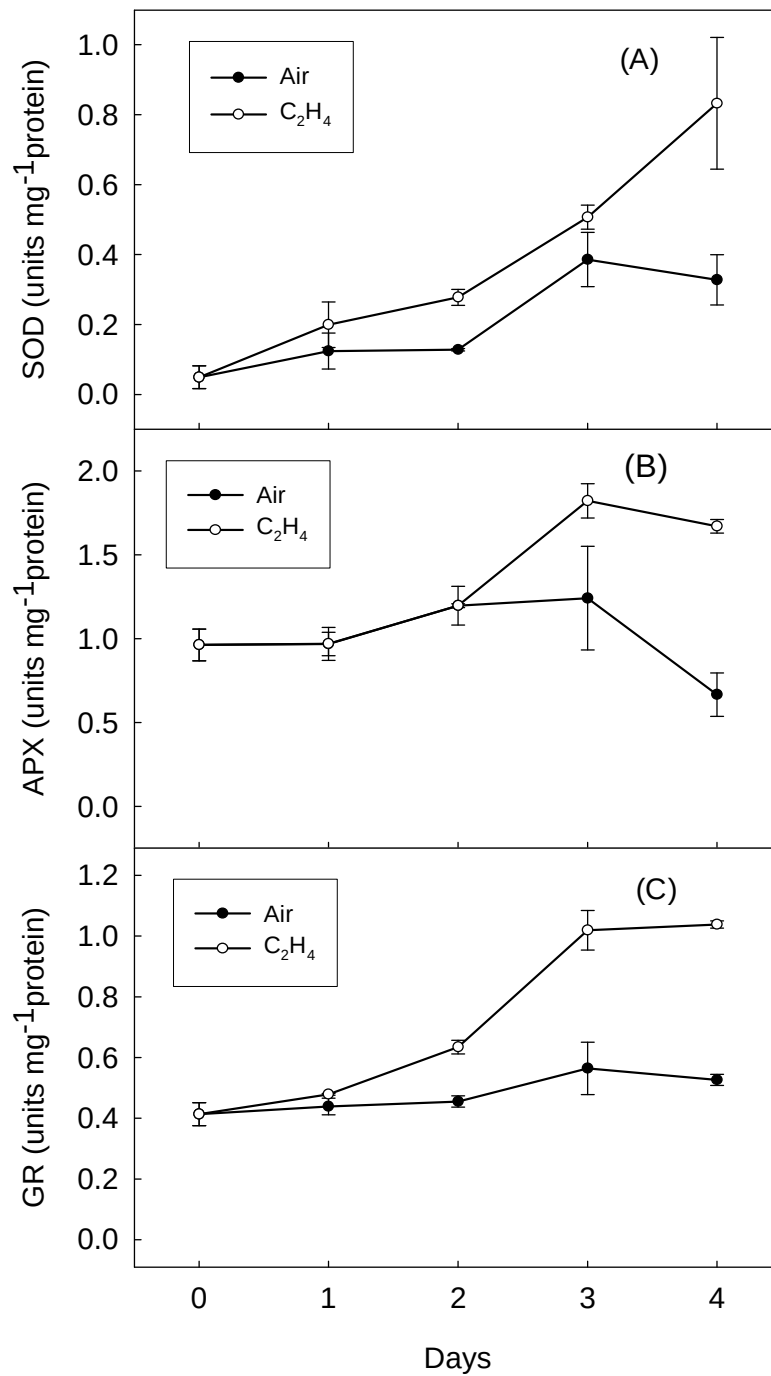


圖 10. 25°C 下 6 蕙 津 6 芥 藍 苗 切 離 葉 片 以 空 氣 與 乙 烯 (1 ppm) 處 理 對 SOD (A)、APX (B) 與 GR (C) 比 活 性 變 化 之 影 響。

Fig. 10 Changes in the specific activities of superoxide dismutase (A), ascorbate peroxidase (B) and glutathione reductase (C) of detached leaves of 6Veg Ginô Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

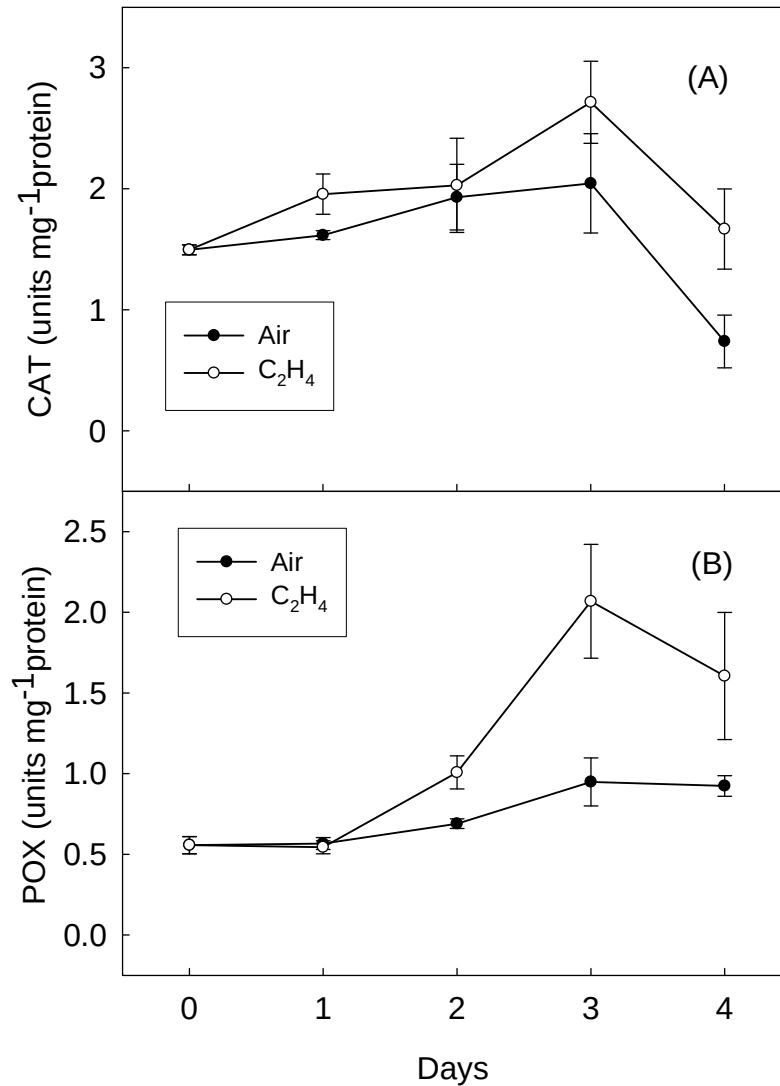


圖 11. 25°C 下薊薊藍苗切離葉片以空氣與乙烯 (1 ppm) 處理對 CAT (A) 與 POD (B) 比活性變化之影響。

Fig. 11 Changes in the specific activities of catalase (A) and peroxidase (B) of detached leaves of Chinese kale seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

受到氧化逆境程度的影響而改變其比活性。

圖 12 是將抗氧化酵素以鮮重為分母的活性單位 ($\text{units g}^{-1}\text{FW}$) 來表示的結果。在葉片老化時，SOD、GR (圖 10A、C) 與 POX (圖 11B) 等三種酵素的比活性 ($\text{units g}^{-1}\text{protein}$) 會隨時間而增加。對照組與乙烯處理組的 SOD 活性亦是隨著處理時間增加而增加的趨勢，但兩處理組間的活性差異不大 (圖 12A)。對照組的 GR 活性隨著處理時間而逐漸降低 (圖 12B)，乙烯處理組的 GR 活性在第 1 天開始高於對照組，且隨著處理時間增加而增加。乙烯處理組的 POX 活性從第 1 天開始高於對照組，兩處理組間的 POX 活性均逐漸增加 (圖 12C)。CAT 不論是以比活性或活性單位表示，均無顯著差異 (圖 11A、12D)。APX 的比活性在乙烯處理第 3 天才增加，對照組與乙烯處理組的 APX 活性在處理 1 天後均下降，但對照組的 APX 活性下降較多，第 2 天之後下降更多，但乙烯處理組的 APX 活性則維持一穩定狀態 (圖 12E)。

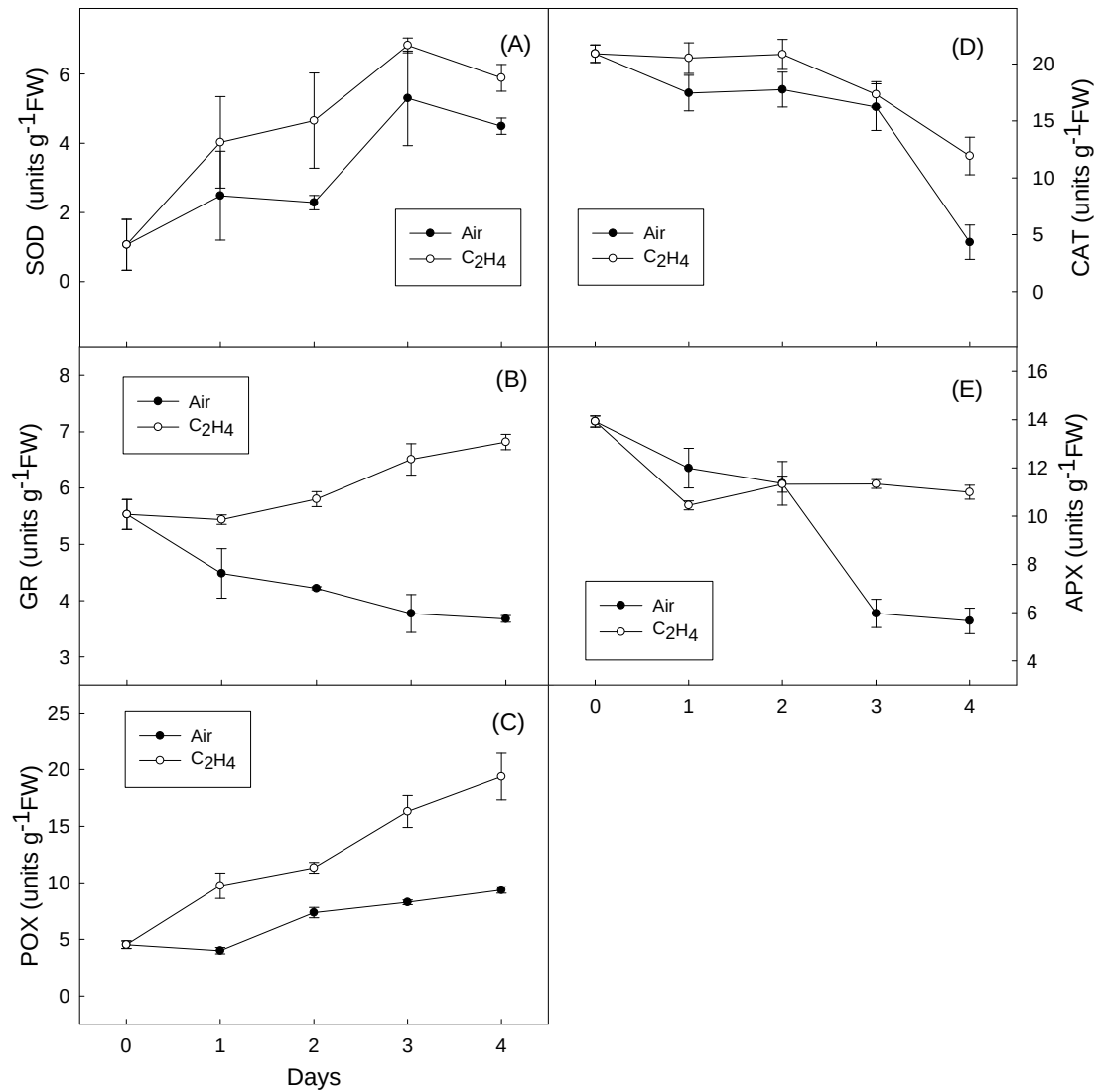


圖 12. 25°C 下 6 蕙 津 芥 藍 苗 切 離 葉 片 以 空 氣 與 乙 烯 (1 ppm) 處 理 對 SOD (A)、GR (B)、POX (C)、CAT (D) 與 APX (E) 活 性 變 化 之 影 響。

Fig. 12 Changes in the activities of superoxide dismutase (A), glutathione reductase (B), peroxidase (C), catalase (D) and ascorbate peroxidase (E) of detached leaves of 6蕙 津 芥 藍 seedlings treated with fresh air and C₂H₄ (1 ppm) at 25°C. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

四、乙烯與 1-MCP 對切離葉片抗氧化酵素反應之影響

1-MCP 為一氣態的乙烯作用抑制劑，許多研究指出 1-MCP 處理可以延緩葉片老化與抑制葉綠素降解 (Ku and Wills, 1999; Fan and Matthesis, 2000; Able et al., 2002; Jiang et al., 2002)。根據圖 7 之結果，乙烯會促進切離葉片的黃化，而乙烯連續處理 3 天後，空氣組與乙烯處理組切離葉片在葉綠素含量 (SPAD 值)(圖 7A) 才出現明顯差異，所以採用 1-MCP 密閉處理 1 天後再乙烯連續處理 3 天的方式，來觀察 1-MCP 對切離葉片老化的影響。

以 1-MCP 密閉燻蒸處理 1 天後再 1 ppm 乙烯流通處理 3 天，芥藍切離葉片的葉綠素含量 (SPAD 值) 明顯的比只以乙烯處理(即無 1-MCP 處理) 來的高 (圖 13A)，葉片外觀也明顯黃化 (圖 14)。而 1-MCP 密閉燻蒸處理 1 天後，不論再以空氣或乙烯流通處理 3 天，其葉綠素含量變化與以空氣密閉處理 1 天再空氣流通處理 3 天均無明顯差異。空氣組與乙烯處理組切離葉片在葉片黃化指數變化方面，在乙烯連續處理 3 天後才出現明顯差異 (圖 13B)。1-MCP 前處理切離葉片的蛋白質含量變化也比只以乙烯處理 (即無 1-MCP 處理) 來的高 (圖 15)。

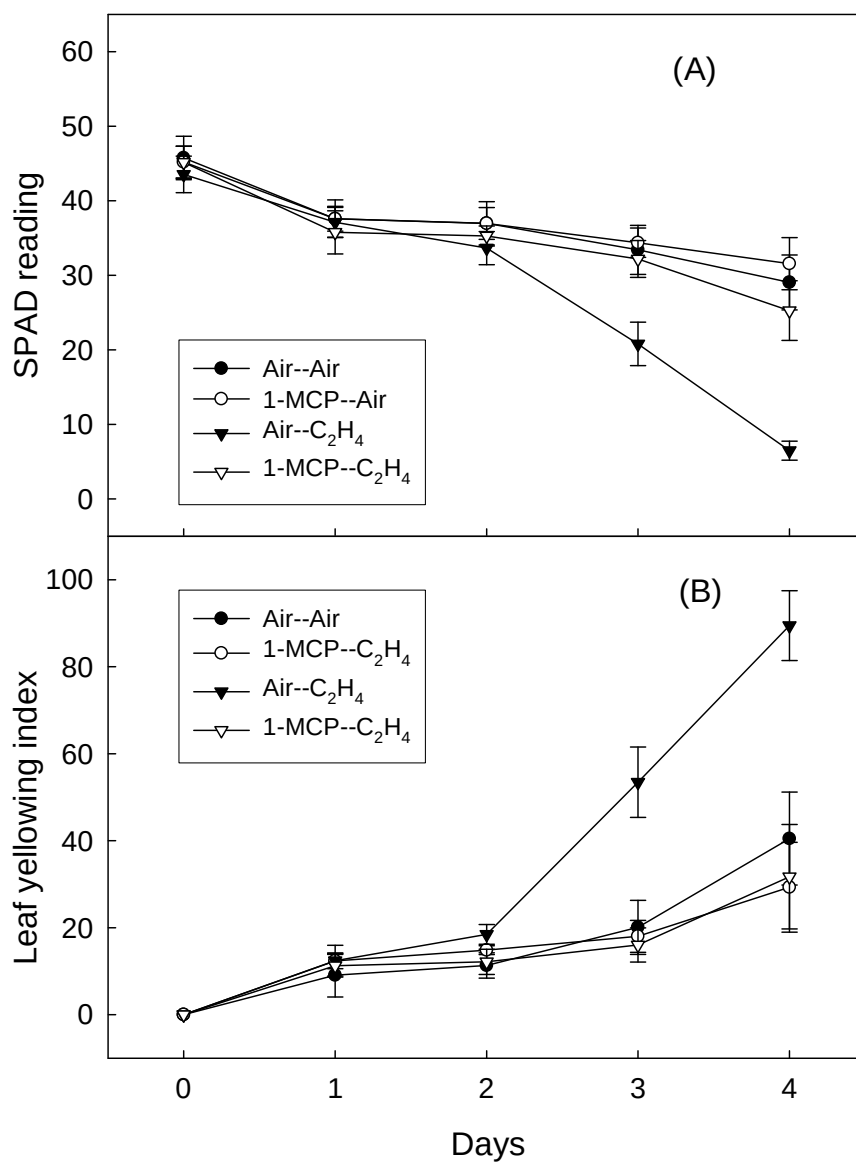


圖 13. 25°C 下 1-MCP 與乙烯對薊藍苗切離葉片葉綠素計 SPAD 讀值 (A) 與葉片黃化指數 (B) 之影響。

Fig. 13 Effect of 1-MCP and ethylene on readings of SPAD chlorophyll meter (A), yellowing index (B) in detached leaves of Chinese kale seedlings at 25°C. Detached leaves were pretreated with air or 1-MCP (1 ppm) for 24h and then treated with air and ethylene (1 ppm) for three days, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E. of 10 replications.

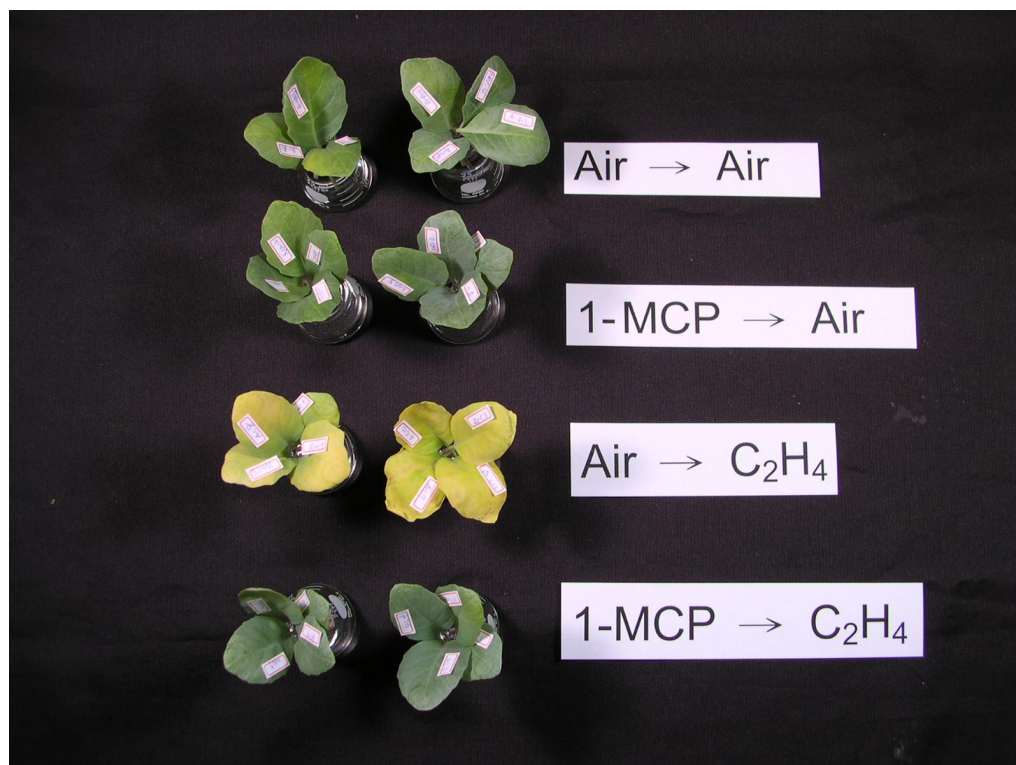


圖 14. 25°C 下 1-MCP 與乙烯對薊藍苗切離葉片黃化之影響。

Fig. 14 Effect of 1-MCP and ethylene on yellowing in detached leaves of 薊藍 Chinese kale seedlings at 25°C. Detached leaves were pretreated with air or 1-MCP (1 ppm) for 24h and then treated with air and ethylene (1 ppm) for 3 days.

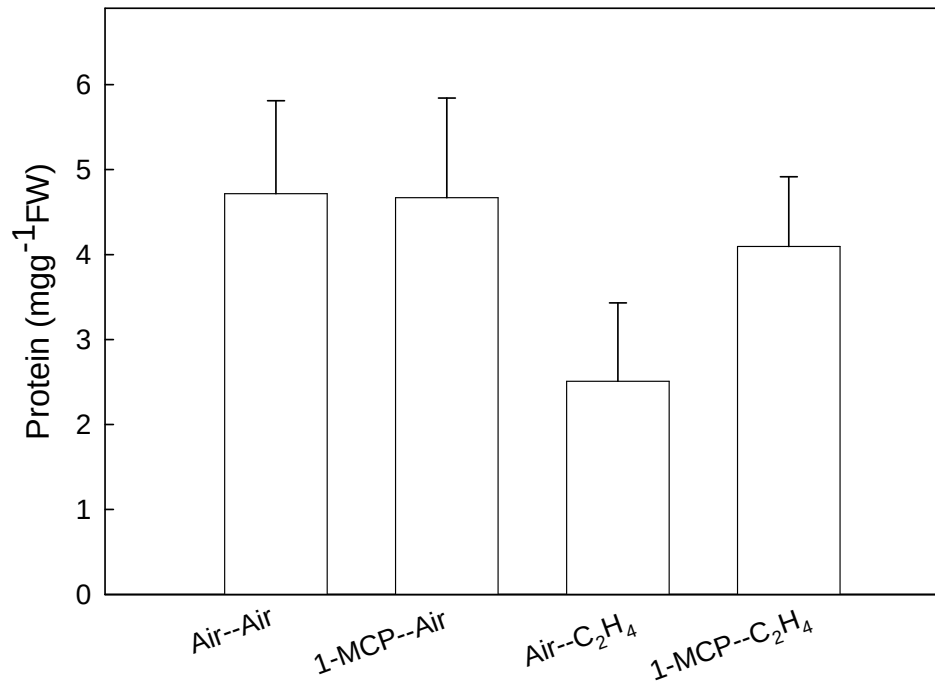


圖 15. 25°C 下 1-MCP 與乙烯對薊藍苗切離葉片蛋白質含量之影響。

Fig. 15 Effect of 1-MCP and ethylene on protein content in detached leaves of Chinese kale seedlings at 25°C. Detached leaves were pretreated with air or 1-MCP (1 ppm) for 24h and then treated with air and ethylene (1 ppm) for three days, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

乙烯處理會使得芥藍切離葉片遭受氧化逆境，導致 H_2O_2 、MDA 含量與抗氧化酵素比活性增加，因此藉由使用乙烯作用抑制劑 1-MCP 驗證前處理 1-MCP 是否可以減輕由乙烯所引起的氧化逆境程度。密閉空氣處理 1 天後再 1 ppm 乙烯流通處理 3 天，芥藍切離葉片內的 H_2O_2 與 MDA 含量明顯的比只以空氣處理 (即無乙烯處理 3 天) 來的高 (圖 16A、B)，若密閉處理 1 ppm 1-MCP 1 天後再乙烯處理 3 天，則 H_2O_2 與 MDA 含量與只處理空氣 (無 1-MCP 處理)、1 ppm 1-MCP 處理再乙烯處理的芥藍切離葉片無明顯差異，顯示前處理 1-MCP 會使得氧化逆境程度的減輕，並保護切離葉片不受乙烯的傷害。

前述結果顯示，當氧化逆境增加時，GR 與 POX 比活性是較早增加的酵素 (圖 10A、10C 與 11B)，所以沿用同樣的方式來探討前處理 1-MCP 後再乙烯處理對這兩種酵素比活性之影響。1-MCP 1 天再乙烯處理 3 天後，其 GR 與 POX 比活性皆比只處理空氣 (即無 1-MCP 處理) 之酵素比活性來的低 (圖 17A、B)。密閉處理 1 ppm 1-MCP 1 天後再乙烯處理 3 天，則 GR 與 POX 比活性與只處理空氣 (無 1-MCP 處理)、1 ppm 1-MCP 處理再乙烯處理的芥藍切離葉片無明顯差異。結果顯示處理 1-MCP 會降低氧化逆境程度，不會促使負責防禦工作的抗氧化酵素比活性增加。

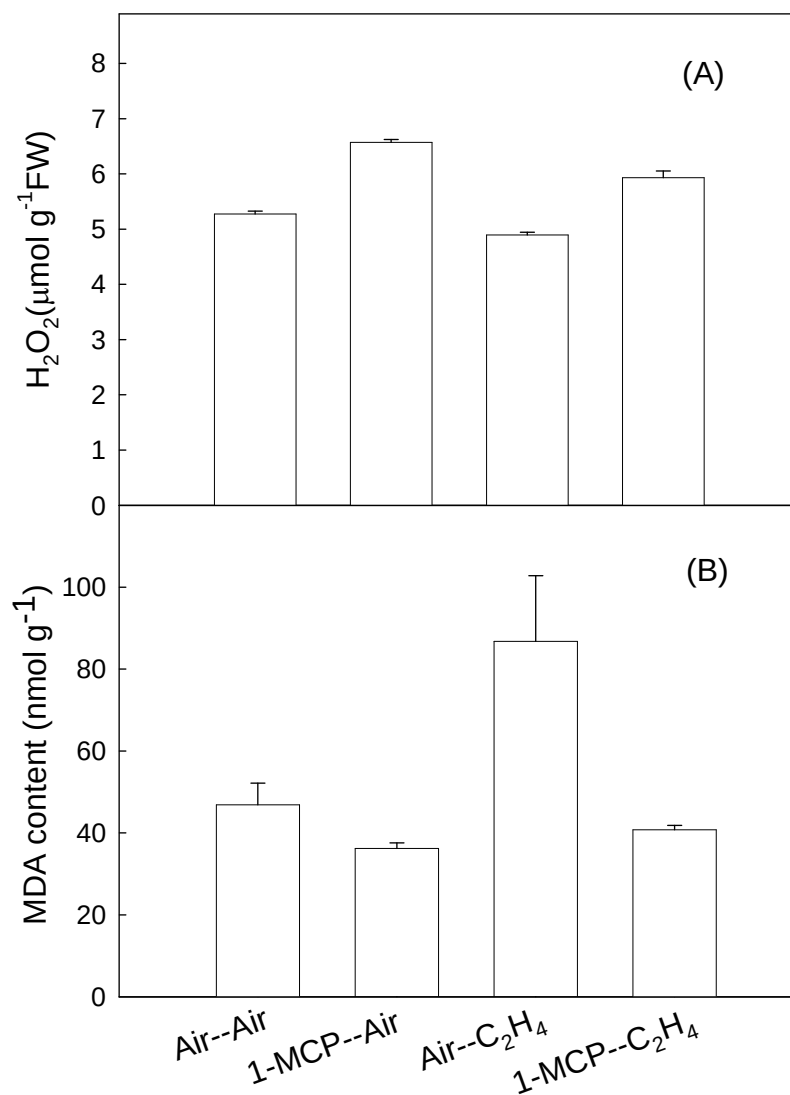


圖 16. 25°C 下 1-MCP 與乙烯對薊藍苗切離葉片 H₂O₂ (A)與 MDA (B)含量之影響。

Fig. 16 Effect of 1-MCP and ethylene in MDA level in detached leaves of 薊藍 Chinese kale seedlings at 25°C. Detached leaves were pretreated with air or 1-MCP (1 ppm) for 24h and then treated with air and ethylene (1 ppm) for three days, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

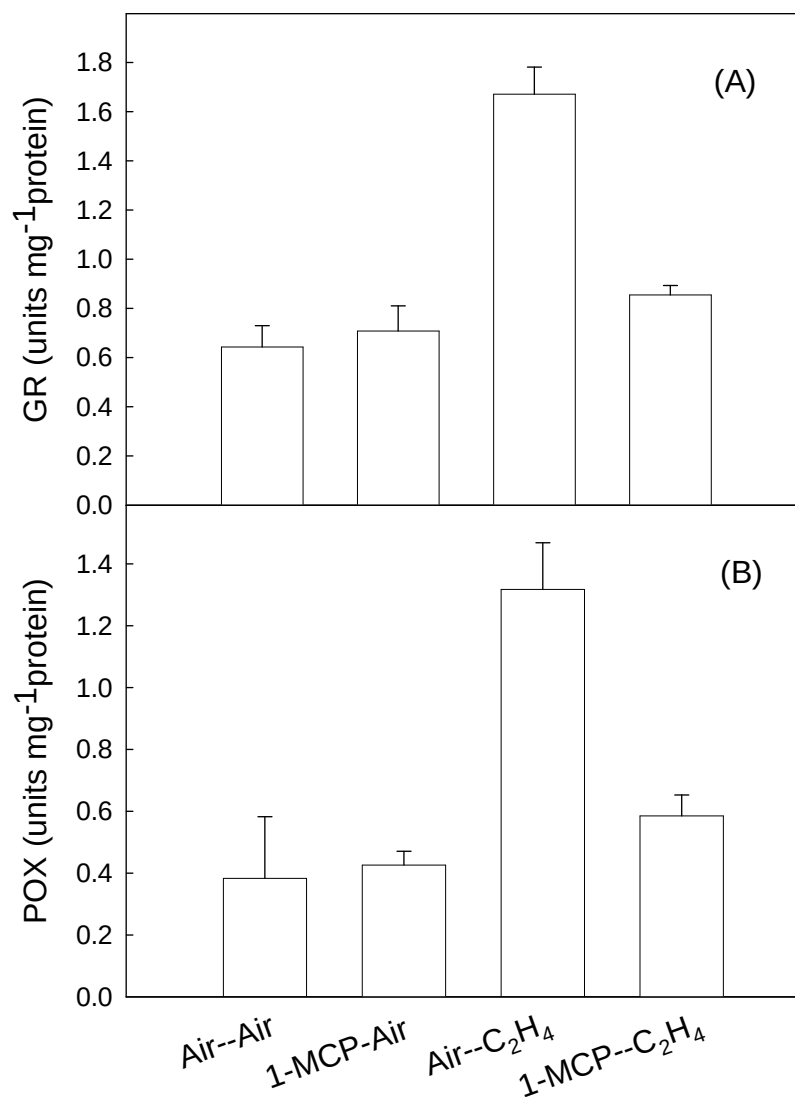


圖 17. 25°C 下 1-MCP 與乙烯對薊藍苗切離葉片 GR (A)與 POX (B) 比活性之影響。

Fig. 17 Effect of 1-MCP and ethylene in the specific activities of GR (A) and POX (B) in detached leaves of Chinese kale seedlings at 25°C. Detached leaves were pretreated with air or 1-MCP (1 ppm) for 24h and then treated with air and ethylene (1 ppm) for three days, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E. of 5 replications.

討論

一、乙烯對切離葉片老化之影響

乙烯在切離葉片老化上扮演的重要角色早有報告，外加乙烯處理可以加速葉片黃化與葉綠素降解 (Aharoni and Lieberman, 1979; Kao and Yang, 1983; Abeles et al., 1992; Buchanan et al., 2000)。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，原因是兩者處理的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的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)。唐氏 (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、蕓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種類。芥藍切離葉片對於乙烯處理引起的反應與處理的濃度、時間有很大的關連，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 4、5 說明葉綠素降解速率與乙烯濃度確有正相關關係，與之前的研究結果相符合 (紀，2003)。

0.1 ppm 與 1 ppm 乙烯對於促進黃化的效果雖然相似，然而 0.1ppm 乙烯促進試驗材料老化的表現並不一致，推測其原因，可能是

切離葉片個體本身的差異，以及對於低乙烯濃度 (0.1 ppm) 反應略微遲鈍，因此乙烯不容易促使對乙烯似乎較具有耐受性的葉片產生老化作用。

芥藍切離葉片在 25°C 下以 1 ppm 乙烯連續處理切自 3 週苗齡之芥藍苗第二片本葉，乙烯處理組葉片的 SPAD 平均值在處理 2 天後開始明顯低於純空氣 (對照) 組 (圖 7A)，處理 3 天後的葉片黃化指數已達為 60% (圖 7B)；同樣苗齡的芥藍切離葉片在 20°C 環境中，以 1 ppm 乙烯連續處理 3 天後，葉片的黃化指數約為 40% (紀，2003)。溫度是影響植物呼吸作用及其他生理代謝的最重要的一項環境因子。葉片老化時，胺基酸和醣類等呼吸作用的基質會增加，會促使呼吸率上升 (Tetley and Thimann, 1974)。切離葉片黃化速率較快的原因可能是因為在溫度較高 (25°C) 的環境當中，與老化相關的生理代謝反應速率比較快所致。

二、H₂O₂ 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 (Tetley and Thimann, 1974; Sarkar and Choudhuri, 1981)。植物細胞中產生的活性氧在低濃度時可以誘導防禦基因抵抗病原菌與非生物性逆境，高濃度則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)。活性氧中的 H₂O₂ 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，會與 $O_2^{\cdot -}$ 經由 Haber-Weiss 反應產生毒性較強的 $OH^{\cdot}$ ，能對細胞造成嚴重傷害，因此 H_2O_2 在調節植物抗氧化系統中的其他 AOS 濃度非常重要 (Salin, 1988; Hodges and Forney, 2000)。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（處理 4 天期間），植物細胞仍具有調控內生活性氧含量的能力；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)。前人報告外加乙烯可以加速細胞膜上脂質降解速率和老化的發生 (Kim and Wills, 1995; Hodges and Forney, 2000)。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降解、滲漏增加、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的產物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量的多少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; Kunert and Ederer, 1982; Hurng and Kao, 1994; Hung and Kao, 1998; Hodges et al., 1999; Hodges and Forney, 2000)。

本研究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 9A)，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)，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 (lipid peroxidation) 有關，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 (Dhindsa et al., 1981; Leshem, 1988; Hodges and Forney, 2000)。

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、catalase、peroxidase、ascorbate peroxidase、glutathione reductase 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 $O_2^{\cdot -}$ 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) 清除。

本試驗中的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 10A)，且兩處理間 SOD 比活性的開始出現變化時間較晚，可能乙烯處理芥藍切離葉片老化過程中， $O_2^{\cdot -}$ 不是大量累積的活性氧，因此負責清除工作的 SOD 比活性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，所催化的作用是將細胞中累積的 H_2O_2 轉變為 O_2 與 H_2O ，避免 H_2O_2 累積對細胞造成毒害。在本試驗的結果顯示，乙烯處理葉片老化過程中，CAT 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)，可能在芥藍切離葉片中 POX 是主要清除 H_2O_2 的酵素而非 CAT，似乎說明芥藍切離葉片中 CAT 活性的高低與老化程度無關，與其他葉片老化時 CAT 活性降低的結果不同 (Dhindsa et al., 1981; 林，

1996; 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 10C)；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 GSSH 還原為 GSH。APX 的比活性在第 3、4 天增加 (圖 10B)，推測此時 ascorbate 開始參與清除活性氧的機制，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，因此其參與清除活性氧的機制與維持氧化還原狀態平衡的能力，尚待後續的研究證明。

脂質過氧化作用與活性氧被認為與葉綠素降解 (degradation) 或褪色 (bleaching) 有關 (Heath and Packer, 1968; Orthoefer and Dugan, 1973; Imamura and Shimizu, 1974; Zhuang et al., 1995; Hodges et al., 1996)。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 hydroperoxide，造成葉綠素降解，APX、GR、POX 活性增加的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。

芥藍切離葉片 POX 比活性的增加與葉綠素的減少也可能有關；因為 POX 除了具有清除 H_2O_2 的機制外，在菠菜、芫荽等葉片中，亦發現具有 peroxidase-hydrogen peroxide 系統，即在有 H_2O_2 與酚類物質的存在下，會以葉綠素 a 為基質，參與葉綠素之分解反應 (Yamauchi and Minamide, 1985; Yamauchi and Watada, 1991)，Kato 與 Shimizu (1986) 在菸草老化葉片中也發現 POX 活性，而且 peroxide 與 total phenolic 含量均比年輕葉片高，但目前並未完全瞭解此代謝途徑之角色。

在葉片老化過程中，蛋白質含量會有逐漸下降之現象。以活性單位來表示抗氧化酵素時，若比活性是增加或不變，而酵素活性表現出下降的現象，此表示在葉片老化時，抗氧化酵素是屬於原本就存在於葉片中，且不容易因為蛋白質的水解而被降解掉，因而隨老化之進行，在整體的蛋白質組成中的比例提高。若比活性是增加，而酵素活性表現出增加，則表示在葉片老化時，此種抗氧化酵素原本就存在於葉片中，且會在受到乙烯處理而產生的氧化逆境中變得更多，因此使此抗氧化酵素在整體蛋白質組成中之比例亦增加。綜合圖 10、11、12 的結果，推論芥藍切離葉片中的 SOD、APX、GR 與 POX 屬於原本就存在，且在氧化逆境中會被誘導增加的酵素。

葉片遭受氧化逆境進入老化時，抗氧化酵素活性的改變通常是其同功異構酵素之組成發生了改變 (del Rio, et al., 1998; Prochazkova et al, 2001)。芥藍切離葉片老化中，抗氧化酵素 APX、GR 與 POX 比活性之變化與各自同功異構酵素的活性表現所代表的生理意義，仍有待進一步研究證明。

四、乙烯與 1-MCP 對切離葉片抗氧化酵素反應之影響

1-MCP 是一氣態乙烯作用抑制劑，能明顯抑制花卉之老化及保護花卉不受乙烯傷害，延緩更年性果實的更年期上升和增加青花菜的貯藏壽命，是一種很有效的乙烯作用抑制劑 (Fan et al., 1999; Jiang et al., 1999; Ku and Wills, 1999; Porat and Shlomo, 1995; Serek and Sisler, 1995)。以 1 ppm 1-MCP 前處理 1 天後，不論在空氣或乙烯處理 3 天的切離葉片，葉綠素、蛋白質含量與空氣前處理 1 天者，並無顯著差異，顯示乙烯促進葉綠素降解的作用受到 1-MCP 的抑制，並且有效延緩葉片的老化。芥藍苗切離葉片以 1-MCP 前處理 1 天再處理乙烯 3 天時，葉綠素含量會略低於空氣或乙烯處理 3 天的切離葉片，可能原因是 1-MCP 雖然已經先與葉片上的乙烯受體結合，但可能 1-MCP 的處理濃度不高、處理時間不長，與乙烯受體結合未達飽和狀態，而葉片又產生新的乙烯受體與乙烯結合，因此切離葉片仍會受到乙烯的影響而黃

化。

1-MCP 處理芥藍切離葉片後，會降低脂質過氧化作用的進行與過氧化氫的含量，因而保護切離葉片不受乙烯引起的氧化逆境傷害。由於 1-MCP 抑制乙烯對芥藍切離葉片的作用，切離葉片為因應乙烯所引發的氧化逆境而誘導出的抗氧化酵素 GR、POX 等抗氧化酵素的比活性，在各 1-MCP 處理組的表現與對照組無顯著差異，而只做乙烯處理的切離葉片，GR、POX 等抗氧化酵素的比活性均高於其他處理。有一些研究指出，乙烯可以誘導 POX 活性增加 (Gahagan et al., 1968; Ku et al., 1970)，被誘導出的 POX 活性也可促進乙烯生合成 (Boyer and de Jaegher, 1986)。Gong 與 Mattheis (2003) 以 1-MCP 處理青花菜的小花蕾後再做乙烯處理，原本由乙烯誘導增加的 chlorophyllase 及 POX 酵素活性均受到抑制，說明青花菜小花蕾存在著 peroxidase-hydrogen peroxide 系統，其葉綠素代謝反應受到乙烯調控；本試驗亦有相似的結果，表示芥藍切離葉片可能也具有此一系統存在。

乙烯處理芥藍切離葉片老化過程中，觀察到葉綠素與蛋白質含量下降、過氧化氫與 MDA 含量增加、抗氧化酵素 APX、GR、POX 比活性增加等現象，而 1-MCP 處理可以抑制上述之變化，由此結果可以推論，乙烯處理所加速的芥藍切離葉片老化，可能是由於自由基含量增加，脂質過氧化作用程度加劇，誘發氧化逆境促使抗氧化酵素比活性增

加，但是所誘導出的抗氧化酵素比活性仍無法抵抗嚴重的氧化逆境，葉片最終還是邁向老化。



結論

本論文以對乙烯頗為敏感的蕓薹品種芥藍 (*Brassica oleracea* L. Albograbra Group cv. 'Veg Gin') 切離葉片為材料，探討 25°C 黑暗環境下，乙烯促進葉片老化時，脂質過氧化作用、 H_2O_2 含量及抗氧化酵素活性之變化，並以乙烯作用抑制劑 1-MCP 處理切離葉片，驗證這些變化是否確實由乙烯處理所引起。

分別以 0、0.01、1、10 ppm 乙烯處理芥藍切離葉片 3 天後，乙烯處理組切離葉片 SPAD 值平均值明顯低於對照組；隨著乙烯濃度提高，SPAD 讀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。芥藍切離葉片以 1 ppm 乙烯處理 4 天中，對照組與乙烯處理組切離葉片 H_2O_2 、MDA 含量早於 SPAD 讀值表現出差異，說明乙烯連續處理對芥藍切離葉片造成氧化逆境而加速葉片老化， H_2O_2 與 MDA 含量開始增加的時間可以做為芥藍切離葉片開始老化的最初指標。

乙烯加速芥藍切離葉片老化過程中，抗氧化酵素系統中的 SOD 之比活性差異並不顯著，可能切離葉片老化過程中， $O_2^{\cdot -}$ 不是大量累積的活性氧，因此負責清除工作的 SOD 比活性不會隨著氧化逆境程度增加而被誘導表現。CAT 與 POX 是負責催化 H_2O_2 分解的酵素，CAT 比活性並沒有顯著的差異，而 POX 的比活性最早增加，可能在芥藍切

離葉片中 POX 是主要清除 H_2O_2 的酵素而非 CAT，說明芥藍切離葉片中 CAT 活性的高低與老化程度無關。

Ascorbate-glutathione 循環中，GR 比活性則在乙烯處理後第二天開始增加，推測在芥藍切離葉片遭受氧化逆境時還原態 GSH 最先用於清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 與 H_2O_2 等 AOS。APX 比活性隨後增加，推測此時 ascorbate 開始參與清除活性氧的機制。

葉片老化過程中，蛋白質含量會有逐漸下降現象。乙烯處理的芥藍切離葉片中，SOD、GR 與 POX 比活性增加，而活性增加或不變，表示芥藍切離葉片中 SOD、GR 與 POX 屬於原本就存在，且受氧化逆境被誘導增加的酵素。APX 比活性增加，而活性下降，屬於不容易被水解的酵素。

乙烯作用抑制劑 1-MCP 前處理芥藍切離葉片，乙烯處理所造成的切離葉片老化，脂質過氧化作用、過氧化氫含量及 GR、POX 比活性等之增加現象都會被 1-MCP 所抑制，顯示氧化逆境與抗氧化酵素比活性之改變確實由乙烯作用所引起，然而所誘導出的抗氧化酵素比活性仍無法抵抗氧化逆境，導致葉片老化。

本論文之結果顯示，乙烯處理誘導芥藍切離葉片開始老化，是由於乙烯促使內生 H_2O_2 含量的增加，造成脂質過氧化作用程度加劇，誘發氧化逆境，促使切離葉片抗氧化酵素 APX、GR 與 POX 比活性增加，

但是所誘導出的抗氧化酵素比活性仍無法抵抗嚴重的氧化逆境，加速切離葉片老化。



中文摘要

本試驗以對乙烯頗為敏感的葉菜類作物蕓薹 (Brassica oleracea L. Albograbra Group cv. 蕓薹) 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酵素之活性的反應，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 天中，明顯加速葉片黃化。乙烯處理第 3 天葉綠素與蛋白質含量顯著低於對照(空氣)組。過氧化氫 (H_2O_2) 與 malondialdehyde (MDA) 含量在乙烯處理第 1、2 天開始增加並高於對照組。植物抗氧化防禦系統的抗氧化酵素 ascorbate peroxidase (APX)、glutathione reductase (GR) 與 peroxidase (POX) 等抗氧化酵素比活性在乙烯處理 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 H_2O_2 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 等抗氧化酵素比活性也被誘導增加。

在乙烯處理之前先以乙烯作用抑制劑 1-MCP 處理芥藍切離葉片，會完全抑制葉片之老化反應以及由乙烯所造成之各項反應，包括葉綠素蛋白質含量降低， H_2O_2 、MDA 含量增加及 APX、GR、POX 比

活性增加等現象。此結果進一步顯示乙烯會使葉片發生氧化逆境而加速葉片老化。在本試驗中，切離葉片的抗氧化酵素比活性雖因氧化逆境發生而增加，但由於持續的乙烯處理仍造成無法抵抗的氧化逆境，葉片最後變黃老化。



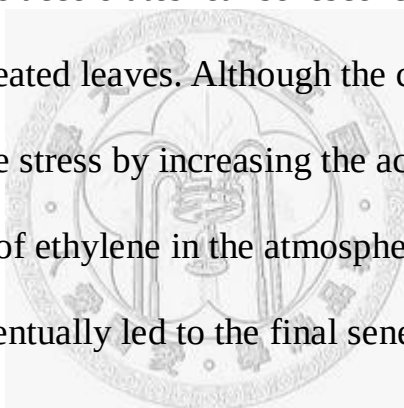
Summary

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 was the second fully developed leaf of 3-week old seedling of the ethylene-sensitive 'Veg Gin' Chinese kale (*Brassica oleracea* L. Albograbra 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 its 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 its specific activities.

Treating excised leaves with the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene (1-MCP) before ethylene treatment, inhibited ethylene induced leaf senescence as well as all the ethylene-induced responses, including the accumulation of H_2O_2 and MDA, and the increase in enzyme activities of APX, GR and POX. These results further support the suggestion that ethylene accelerates leaf senescence through enhancement of oxidative stress in treated leaves. Although the cellular antioxidant system responded to the stress by increasing the activity of antioxidant enzymes, the presence of ethylene in the atmosphere caused an irresistible oxidative stress that eventually led to the final senescence and yellowing of the leaf.



參考文獻

- 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).
- 林照能. 1996. 水稻老化葉片之研究. 台大農藝學系研究所碩士論文.
- 高景輝. 1987. 植物生長與分化. 茂昌圖書有限公司. 451~454 頁.
- 高景輝. 1994. 植物荷爾蒙生理. 華香園出版社. 451 頁.
- 高景輝. 1992. 水稻葉片老化之控制與代謝 15 年研究之回顧. 科學農業 40 : 83~87.
- 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. 台大園藝學系研究所碩士論文. 86pp.
- 唐志婷. 1997. 低氧及乙烯處理對綠色蔬菜採後黃化之影響. 台大園藝學系研究所碩士論文. 96pp.
- Abdi, N., W. B. McGlasson, P. Holford, M. Williams, and Y. Mizrahi. 1998. Responses of climacteric and suppressed-climacteric plums to treatment with propylene and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 14 : 29-39.
- Abe, K. and A. E. Watada. 1991. Ethylene absorbent to maintain quality of lightly processed fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 56 : 1589-1592.
- Able, A. J., L. S. Wong, A. Prasad, and T. J. O'Hare. 2002. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharvest Biol. Technol.* 26 : 147-155.
- Abeles, F. B., P. W. Morgan, M. E. Saltveit. 1992. *Ethylene in Plant biology*. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 414 p.
- Aharoni, N. and M. Lieberman. 1979a. Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 64 : 801-804.
- Aharoni, N. and M. Lieberman. 1979b. Patterns of ethylene production in senescencing leaves. *Plant Physiol.* 64 : 796-800.
- Alscher, R. G., J. L. Donahue, and C. L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants : Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100 : 224-233.

- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase : a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85 : 235-241.
- Bartoli, C. G., M. Simontacchi, E. Montaldi, and S. Puntarulo. 1996. Oxidative stress, antioxidant capacity and ethylene production during ageing of cut carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *J. Exp. Bot.* 297 : 595-601.
- Blankenship, S. M. and J. M. Dole. 2003. 1-Methylcyclopropene : a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28 : 1-25.
- Bleecker, A. B., M. A. Estslle, C. Somerville, and H. Kende. 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241 : 1086-1089.
- Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu, and D. Inze. 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 13 : 199-218.
- 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.
- Buchanan, B. B., W. G. Ruissem, and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md. American Society of Plant Physiologists. pp.1044-1203.
- Chang, C., S. F. Kwok, A. B. Bleecker, and E. M. Meyerowitz. 1993. *Arabidopsis* ethylene-responses gene ETR1 : similarity of product to two-component regulators. *Science* 262 : 539-544.
- Chang, C. and E. M. Meyerowitz. 1995. The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: a eukaryotic two-component signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 : 4129-4133.
- Chen, C. T., C. C. Li, and C. H. Kao. 1991. Senescence of rice leaves XXXI. Changes of chlorophyll, protein, and polyamine contents and ethylene production during senescence of a chlorophyll-deficient mutant. *J. Plant Growth Regul.* 10 : 201-205.
- Creissen, G., P. Broadbent, R. Stevens, A. R. Wellburn, and P. Mullineaux. 1996. Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants. *Biochem. Soc.* 24 : 465-469.
- Cui, K., G. Xing, X. Liu, G. Xing, and Y. Wang. 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci.* 146 : 9-16.

- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze, and F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 : 779-795.
- del Rio, L. A., L. M. Sandalio, F. J. Corpas, E. Lopez-Huertas, J. M. Palma, and G. M. Pastori. 1998. Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiol. Plant.* 104 : 673-680.
- 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.
- Dhindsa, R. S., P. L. Plumb-Dhindsa, and D. M. Reid. 1982. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effect of some phytohormones and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol Plant.* 56 : 453-457.
- Fan, X. and J. P. Mattheis. 2000a. Yellowing of broccoli in storage is reduced by 1-methylcyclopropene. *HortScience* 35 : 885-887.
- Fan, X. and J. P. Mattheis. 2000b. Reduction of ethylene-induced physiological disorders of carrots and iceberg lettuce by 1-methylcyclopropene. *HortScience* 35 : 1312-1314.
- Fan, X., S. M. Blankenship, and J. P. Mattheis. 1999. 1-Methylcyclopropene inhibits apple ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 : 690-695.
- Federico, R. and R. Angelini. 1991. Polyamine catabolism in plants. In : R. D. Slocum, H. E. Flores (eds.). *The Biochemistry and physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 41-56.
- 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.
- Foyer, C. H., M. Lelandais, and K. J. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92 : 696-717.
- Gahagan, H. E., R. E. Holm, and F. B. Abeles. 1968. Effect of ethylene on peroxidase activity. *Physiol. Plant. Suppl.* 21 : 1270-1279.
- Gepstein, S. and K. V. Thimann. 1981. The role of ethylene in the senescence of oat leaves. *Plant Physiol.* 68 : 349~354.

- Gong, Y. and J. P. Matteis. 2003. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets. *Plant Growth Regul.* 40 : 33-38.
- Green, R. and R. Fluhr. 1995. UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7 : 203-212.
- Halliwell, B. 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase : solutions to problems of living with oxygen. *New Phytol.* 73 : 1075-1086.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and Antioxidants : A personal view. *Nutri. Rev.* 52 : 253-265.
- Harman, D. 1956. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11 : 298-300.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hung, W. P. and C. H. Kao. 1994. Lipid peroxidation and antioxidative enzymes in senescing tobacco leaves during post-flooding. *Plant Sci.* 96 : 41-44.
- 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.
- Jabs, T., M. Tschope, C. Colling, K. Hahlbrock, and D. Scheel. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 : 4800-4805.

- Jana, S. and M. Choudhuri. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. *Aquat. Bot.* 12 : 345-354.
- Jiang, Y., D. C. Joyce, and A. J. Macnish. 1999. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biol. Technol.* 16 : 187-193.
- Jiang, W., Q. Sheng, X. Zhou, M. Zhang, and X. Liu. 2002. Regulation of coriander senescence by 1-methylcyclopropene and ethylene. *Postharvest Biol. Technol.* 26 : 339-345.
- John, I., R. Drake, A. Farrell, W. Cooper, P. Lee, P. Horton, and D. Grierson. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant J.* 7 : 483-490.
- Joo, J. H., Y. S. Bae, and J. S. Lee. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol.* 126 : 1055-1060.
- Kao, C. H. 1992. Role of ethylene in senescence of detached corn leaves. *Chinese Agron. J.* 2 : 207~212.
- Kao, C. H. and S. F. Yang. 1983. Role of ethylene in the senescence of detached rice leaves. *Plant Physiol.* 73 : 881~885.
- Kar, M. and J. Feierabend. 1984. Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta* 160 : 385-391.
- Kato, M and S. Shimizu. 1985. Chloryphyll metabolism in higher plant. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can J. Bot.* 65:729-735.
- Kim, G. H. and R. B. H. Wills. 1995. Effect on ethylene on storage life of lettuce. *J. Sci. Food. Agric.* 69 : 191-201.
- Ku, H. S., S. F. Yang, and H. K. Pratt. 1970. Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. *Plant Cell Physiol.* 11 : 241-246.
- Ku, V. V. V. and R. B. H. Wills. 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 17 : 127-132.
- Kunnert, 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.
- Leshem, Y. Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Rad. Biol. Med.* 5 : 39-49.

- Leshem, Y. Y., A. H. Halevy, and C. Frenkel. 1986. Processes and control of plant senescence. Elsevier, Inc., Amsterdam. p. 70.
- 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.
- McKersie, B. D., S. R. Bowley, E. Harjanto, and O. Leprince. 1996. Water- deficient tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119 : 839-847.
- McKersie, B. D., J. Murnaghan, and S. R. Bowley. 1997. Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. *Acta Physiol. Plant.* 19 : 485-495.
- Meir, S., S. Philosoph-Hadas, and N. Aharoni. 1992. Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117 : 128-132.
- Mondal, R. and M. A. Choudhuri. 1982. Regulation of senescence of excised leaves of some C₃ and C₄ carbon pathways species by endogenous H₂O₂ Hydrogen peroxide. *Biochem. Physiol.* P. 177 : 403-417
- NaKano, Y and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22 : 867-880.
- Neil, S., R. Desikan, and J. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5 : 388-395.
- Nooden, L.D. 1988. The phenomenon of senescence and aging. In: *Senescence and Aging in Plants*. L.D. Nooden and A.C. Leopold. Eds. Academic Press, London. pp. 1-50.
- Orthoefer, F. T. and L. R. Dugan, Jr. 1973. The coupled oxidation of chlorophyll a linoleic acid catalyzed by lipoxidase. *J. Sci. Food Agric.* 24 : 357-365.
- 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.
- Pennell, R. I. and C. Lamb. 1997. Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* 9 : 1157-1168.
- 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.

- 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.
- Picton S., S. L. Barton, M. Bouzayen, A. J. Hamilton, and D. Grierson. 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.* 3 : 469-481.
- 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.
- Porat, R., E. Shlomo, M. Serek, E.C. Sisler, and A. Borochoy. 1995. 1-Methylcyclopropene inhibits ethylene action in cut flowerw. *Postharvest Biol. Technol.* 6 : 313-319.
- Prasad, T. K., M. D. Anderson, and C. R. Stewart. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105 : 619-627.
- 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.
- Salin, M. L. 1987. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant.* 72 : 681-689.
- Saltveit, J. R. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15:279-292.
- 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.
- Sen Gupta, A., R. P. Webb, A. S. hoalday, and R. D. Allen. 1993. Overex- pression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103 : 1067-1073.
- Serek, M., E. C. Sisler, and M. S. Reid. 1995. 1-methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119 : 1230-1233.

- Sisler, E. C., M. Serek, E. Dupille, and R. Goren. 1999. Inhibition of ethylene responses by 1-methylcyclopropene and 3-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 27 : 105-111.
- Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plant to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125 : 27-58.
- Strother, S. 1988. The role of free radicals in leaf senescence. *Gerontology* 34 : 151-156.
- Sylvestre I., M. J. Droillard, J. M. Bureau, and A. Paulin. 1989. Effects of the ethylene rise on the peroxidation of membrane lipids during the senescence of cut carnations. *Plant Physiol. Biochem.* 27 : 407-413.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. Senescence and programmed cell death. In : *Plant Physiology*. 2nd ed. Sinauer Association, Inc., Massachusetts. pp. 476-478.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Ethylene : The gaseous hormone. In : *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Association, Inc., Massachusetts. p. 521.
- 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.
- Thomas, H. and J. L. Stoddart. 1981. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31 : 83-111.
- Thompson, J. E., R. L. Legge, and R. F. Barber. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New phytol.* 105 : 317-344.
- Thompson, J.E. 1988. The molecular basis for membrane deterioration during senescence. In: *Senescence and Aging in Plants*. L.D. Nooden and A.C. Leopold. Eds. Academic Press, London. pp. 51-83.
- 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.
- Warman, T. W. and T. Solomos. 1988. Ethylene production and action during foliage senescence in *Hedera helix* L. *J. Exp. Bot.* 39 : 685~694.
- Wintermans, J. F. G. M. and A. DeMots. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta* 109 : 448-453.
- Yamauchi, N. and T. Minamide. 1985. Chlorophyll degradation by peroxidase

- in parsley leaves. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 54 : 265~271.
- Yamauchi, N. and A. E. Watada. 1991. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 : 58~62.
- 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.
- Yang S. F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. HortScience 20 : 41~45.
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74 : 139-162
- Vranova, E., D. Inze, and F. V. Breusegem. 2002. Signal transduction during oxidative stress. J. Exp. Bot. 53 : 1227-1236.
- 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.

