高溫逆境下青花菜之生理、組織結構變化及開花表現之研究[1]

陳葦玲[2]、蕭政弘[2]、蕭瑞展[3]

摘　要

臺灣夏季高溫造成青花菜花球品質不佳甚至不結花球，多仰賴進口以供應市場所需；因此本試驗以‘萬福’及‘清華’兩品種為材料，探討高溫逆境下青花菜生理變化，並觀察其組織結構差異性及開花表現，做為耐熱品種選育之參考。40/35℃高溫逆境下，青花菜小苗光合作用速率、葉綠素螢光Fv/Fm值及總葉綠素含量降低，反之蒸散速率、氣孔導度、過氧化氫含量、丙二醛含量及電解質滲漏率增加，抗氧化酵素SOD, CAT及GR活性亦提高，其中Fv/Fm可作為耐熱篩選的生理指標，兩品種間以‘萬福’耐熱性較佳。在顯微結構觀察方面，‘萬福’在40/30℃高溫處理4天後，葉片下表皮葉肉細胞呈現輕微皺縮現象，但氣孔仍正常開合，且有較發達的維管束組織，反之‘清華’葉肉細胞則嚴重萎縮且氣孔亦失去功能。此外，花芽分化期高溫逆境均延遲兩參試品種到可見花球天數，並增加花球不平整鬆散、萼片葉片化及花蕾褐化敗育等畸形率，又以‘清華’影響較大，但對開花率及花球下葉片數則無顯著差異。

關鍵字：逆境、光合作用、抗氧化酵素、解剖結構、花球

前　言

青花菜(*Brassica oleracea* L. var *italica*)為十字花科蔓苔屬蔬菜作物，由野生甘藍演化而來，原產於西歐義大利沿海，性喜冷涼，為綠植株春化型植物。臺灣自二次大戰結束後由美國引進，但因當時國人飲食習慣不易改變，且其葉球易黃化、保存期短，故市場消費量極少，直到1966年後，因優良品種的引進及採後處理技術普及，再加上近年來研究指出十字花科植物中的硫配醣體(glucosinolate)其水解物異硫氰酸酯(isothiocyanates)具有誘導預防癌症發生之代謝酵素作用之功效，降低癌症發生機會，而其中又以青花菜含量較高，消費量逐漸提升，栽培面積相對增加(1)。2012年臺灣青花菜栽培面積達1,265公頃，主要種植地區雲林縣、嘉義縣、高雄市與彰化縣，平均每公頃產量為22,153公斤(2)。

---

[1] 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0826號。

[2] 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員及副研究員。

[3] 國立成功大學生命科學系大學部學生。

高溫為影響作物生長之重要限制因子，其造成植物結構、型態、生理、生化甚至遺傳層次上之改變，進而影響產量與品質，又高溫逆境是指溫度上升並超過臨界值，通常高於正常生長溫度約10~15℃時，此情形對植物生長和發育造成不可逆之傷害[29]。青花菜營養生長及花球發育適溫分別為20~22℃與15~18℃，因此臺灣11月到隔年4月為青花菜之盛產期，平地5月到10月則因高溫導致青花菜生育差、不結球或花球品質不良現象如花球不平整、插葉、貓眼、焦蕾等，嚴重影響產量，必須自國外進口以填補國內供貨不足之問題。Dufault (1997)指出青花菜花球品質和產量主要是由溫度和品種決定，生長季節的平均溫度顯著影響許多經濟性狀如花球形狀、緊實度、大小等[10]，若花球形成期遇高溫則花品質劣化[26]，又植株營養生長狀況與花球重量及產量密切相關[13]。耐熱青花菜AV531在夏季(6~8月)田間花芽分化率達95±3.3%，不耐熱對照品種‘B75’僅有2.5±2.5%，若在花芽分化階段給予35℃高溫逆境10天，對AV531花球發育影響不大，但‘B75’花球正常率僅16.7%[4]。

為解決夏季青花菜生產之問題，耐熱品種選育為目前重要的育種方向，而若能瞭解其在高溫逆境下之生理反應及特性，則有助於育種工作的進行。因此，本試驗選用2個常見商業品種，瞭解其在高溫逆境下生理及生化反應，並觀察其開花表現及組織結構的差異性，試圖解釋其與耐熱表現之關聯性，以做為青花菜耐熱育種工作之參考。

材料與方法

一、植物材料

本試驗選用目前國內普遍栽培之青花菜‘清華’與較具耐熱性之‘萬福’兩品種，分別購自農友種苗公司及德城種苗行。種子播於高3.5 cm、體積16.4 cm^3、內含有機栽培介質7-03(Gramoflor GmbH & Co. Germany)之128格穴盤中，栽培於28/25℃人工氣候室，栽培期間視介質水分狀態澆水，此外每週施以稀釋1,000倍之Peter’s 20.0-4.4-24.9 N-P-K (The Scotts Co., Marysville, OH)一次。

二、試驗項目及方法

(一)高溫逆境下青花菜苗期生理及型態變化

播種後一個月移植到高7 cm × 寬8.8 cm之塑膠硬盆中，移植7天後之青花菜植株一半移置40/35℃人工氣候室，另一半則持續栽培於28/25℃溫度下，於移溫處理後1~4天每日取樣調查。

1.電子顯微鏡觀察

取28/25℃及40/35℃處理4天小苗之第三片完全展開葉及莖段，樣品固定於2.5% glutaraldehyde溶液2小時，再以0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)清洗3次後，經30%、50%、70%、80%、95%、100% EtOH及100%丙酮20分鐘系列濃度脫水，以臨界點乾燥機HCP-2 (Hitachi Ltd., Japan)乾燥後以鍍金機E1010 (Hitachi Ltd., Japan)覆膜120秒，以掃描式電子顯微鏡觀察。

2.光合作用、蒸散速率、氣孔導度及葉綠素螢光測定

以可攜式光合作用測定儀Li-6400 XT (Li-Cor Inc., Lincoln, NE., USA)量測植株第四片完全展開葉，量測時分別在28/25℃及40/35℃溫室內進行測量，葉室以紅藍LED燈提供200 μmol·m^{-2}·s^{-1} PPFD之光源，葉室內CO_2濃度則維持在400 μmol，流速設定為500 μmol·m^{-2}·s^{-1}。葉綠素螢光以Licor 6400 XT配合葉綠素螢光葉室Licor 6400-40 LCF測量植株第三片完全展開葉，葉片測量前先以黑暗馴化30分鐘。

3.葉綠素、過氧化氫、丙二醛含量及電解質滲漏率測定

葉綠素含量測定參考Wintermans和Mots (1965)[32]方法取植株第四片完全展開葉片尖端組織0.1 g以2 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)研磨成均質後吸取40 μL加入960 μL 100% EtOH均勻混合，於4℃、黑暗環境下靜置30分鐘後，經4℃、1,000 ×*g*離心15分鐘，取其上清液，利用分光光度計(Model U-3100, Hitachi Inc., Japan)測波長665及649 nm之吸光值，總葉綠素含量(mg·g^{-1}) = [(6.1×OD_{665}) + (20.04×OD_{649})] × 50 (dilution) ÷ 1000 ÷ FW (g)。

過氧化氫(H_2O_2)含量之測定參考Jana和Choudhuri (1981)[19]方法，取0.05 g第四片完全展開葉尖端組織以3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)研磨均質後，在4℃下以6000 ×*g*離心25分鐘，取其2 mL上清液加入1 mL 0.1% titanium chloride (溶於20% H_2SO_4)混合均勻，於室溫下以1,000 ×*g*離心15分鐘，取上清液以分光光度計測定410 nm之吸光值。H_2O_2含量(μmol·g^{-1}) = OD_{410} ÷ 0.28 (K, mM^{-1}·cm^{-1}) × 1.5 (dilution) ÷ FW (g)。

丙二醛(Malondialdehyde, MDA)依據Heath及Packer (1968)[15]之方法，取0.1 g第四片完全展開葉片尖端組織，以4 mL 5% trichloroacetic acid (TCA)研磨成均質後，於20℃下以10,000 ×*g*離心5分鐘，取0.75 mL上清液加入3 mL溶劑為20% TCA之5% thiobarbituric acid (TBA)混合均勻。將試管置於95℃熱水浴30分鐘後立即移入冰浴以中止反應。之後於4℃下以5,000 ×*g*離心10分鐘，取上清液以分光光度計測定532 nm及600 nm波長之吸光值。MDA含量(nmol·g^{-1}) = (OD_{532}-OD_{600}) ÷155 (K, mM^{-1}·cm^{-1}) × 5 (mL) × 4 (dilution) × 1000 ÷ FW (g)。

電解質滲漏率測量部分，取植株第四片完全展開葉先以去離子水擦拭過，再以直徑6 mm之打孔器均勻取樣打下6片葉圓片，放入含有1 mL去離子水之試管，置於25℃循環水浴槽中30分鐘後加入14 mL去離子水，於25℃下震盪24小時後以電導度計測量水溶液第一次電導度值(EC_1)，之後各試管再置於121℃殺菌釜中30分鐘，使細胞完全破壞，取出後待溫度降至室溫時，再測量液體第二次電導度值(EC_2)，電解質滲漏率計算為EC_1/EC_2×100%。

4.抗氧化酵素活性分析

(1)超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD; EC 1.15.1.1)

依據Paoletti等人(1986)[25]之方法加以修改後進行分析，取0.04 g第3片完全展開葉頂端組織，以液態氮於已預冷之研缽中研磨至均質粉末後加入3 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4)繼續研磨至均質，均質液以4℃、15000 ×g離心30分鐘，取200 μL上清液加入1.6 mL 100 mM triethanolamine-diethanolamine buffer (pH 7.4)、80 μL 7.5 mM β-NADH、50 μL EDTA/$MnCl_2$ (100 mM/50 mM, pH 7.0)及1 mL 10 mM 2-mercaptoethanol混合均勻，以分光光度測定波長340 nm下10分鐘內吸光值之變化(OD_{340})，空白試驗係以S.P.buffer取代酵素萃液者之吸光值變化作為基準OD，每單位酵素活性(unit)以每分鐘SOD抑制50% β-NADH氧化速率之吸光值變化表示。SOD活性(unit·g^{-1}) = (基準OD-OD_{340})÷(1/2基準OD)×15 (dilution)÷10 (min)÷FW (g)。

(2)過氧化氫酶(Catalase, CAT; EC 1.11.1.6)

依據Kato和Shimizu (1985)[20]之方法加以修改後進行分析，取0.04 g第3片完全展開葉頂端組織，以液態氮於已預冷之研缽中研磨至均質粉末後以4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)於已預冷研缽中研磨至均質，經4℃、12,000 ×g離心20分鐘，取200 μL之上清液，依序加入2.7 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.0)與100 μL 1 M H_2O_2混合均勻，以分光光度計於波長240 nm下偵測1分鐘內吸光值之變化(△OD_{240})，空白試驗係以95% EtOH取代反應溶液，每單位酵素活性係以每分鐘消耗1 nmole之H_2O_2表示。CAT活性(unit·g^{-1}) = △OD_{240} ÷ 40 (K, $mM^{-1}\cdot cm^{-1}$) × 3 (mL) ×20 (dilution) ÷ 1 (min) ÷ FW (g)。

(3)抗敗血酸過氧化酶(Ascorbate Peroxidase, APX; EC 1.11.1.11)

依據Nakano和Asada (1981)[24]之方法稍微修改進行分析，取0.04 g第3片完全展開葉頂端組織以液態氮研磨至粉末，加入4 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)於已預冷研缽中研磨至均質，經4℃、12,000 ×g離心30分鐘，取100 μL上清液依序加入5 mL potassium phosphate buffer (150 mM, pH 7.0)、1 mL 1.5 mM ascorbate、400 μL 0.75 mM EDTA和500 μL 6 mM H_2O_2均勻混合，以分光光度計於波長290 nm下量測1分鐘內吸光值之變化(△OD_{290})，以95% EtOH作為空白組，每單位酵素活性係以每分鐘消耗1 μmole之ascorbate表示。APX活性(unit·g^{-1}) = △OD_{290} ÷ 2.8 (K, $mM^{-1}\cdot cm^{-1}$) × 3 (mL) × 40 (dilution) ÷1 (min) ÷ FW (g)。

(4)麩胱甘肽還原酶(Glutathione reductase, GR; EC 1.6.4.2)

依據Foster和Hess (1980)[12]之方法加以修改後進行分析，取0.04 g第3片完全展開葉頂端組織以液態氮研磨成粉末，加入4 mL sodium phosphate buffer (50 mM pH 6.8)於已預冷研缽中研磨至均質，經4℃、12,000 ×g離心20分鐘，取200 μL上清液依序加入1 mL 150 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、300 μL 30 mM $MgCl_2$、500 μL 3 mM GSSG及1 mL 0.45 mM NADPH，混合均勻後以分光光度計於波長340 nm下，量測1分鐘內吸光值之變化(△OD_{340})，以95% EtOH作為空白組，每單位酵素活性係以每分

鐘消耗1 μmole NADPH表示。GR活性(unit·g^{-1}) = △OD_{340} ÷ 6.22 (K, $mM^{-1}·cm^{-1}$) × 3 (mL) × 20 (dilution) ÷ 1 (min) ÷ FW (g)。

(二)花芽分化期高溫對青花菜開花表現之影響

播種後1個月之穴盤苗移植至內含有機栽培介質之七吋盆並栽培於25/22℃人工氣候室中，待參試材料具有5片本葉時給予6℃、10天春化處理，而後回到25/22℃持續栽培到莖頂膨大至7 mm時(此為花芽分化鑑別依據)，一半植株移至40/35℃高溫處理10天再移置25/22℃人候室，另一半則持續維持在25/22℃，觀察處理間開花表現，包含定植到可見花球日(花球直徑達1 cm)、花下葉片數、定植到可採收日(花球鬆散前)、開花率及花球畸形率。

三、試驗設計與統計分析

本試驗採用完全逢機試驗設計(Completely Randomized Design, CRD)，每一處理為3重複，生理及開花調查每一重複分別取樣4及10株。試驗數據以CoStat 6.2統計軟體(CoHort Software, USA)進行最小顯著差(Least significant difference, LSD)分析，分析各處理間有無顯著差異(P＝0.05)，並以Sigmaplot 10.0 (SPSS Inc., USA)作相關性分析。

結　果

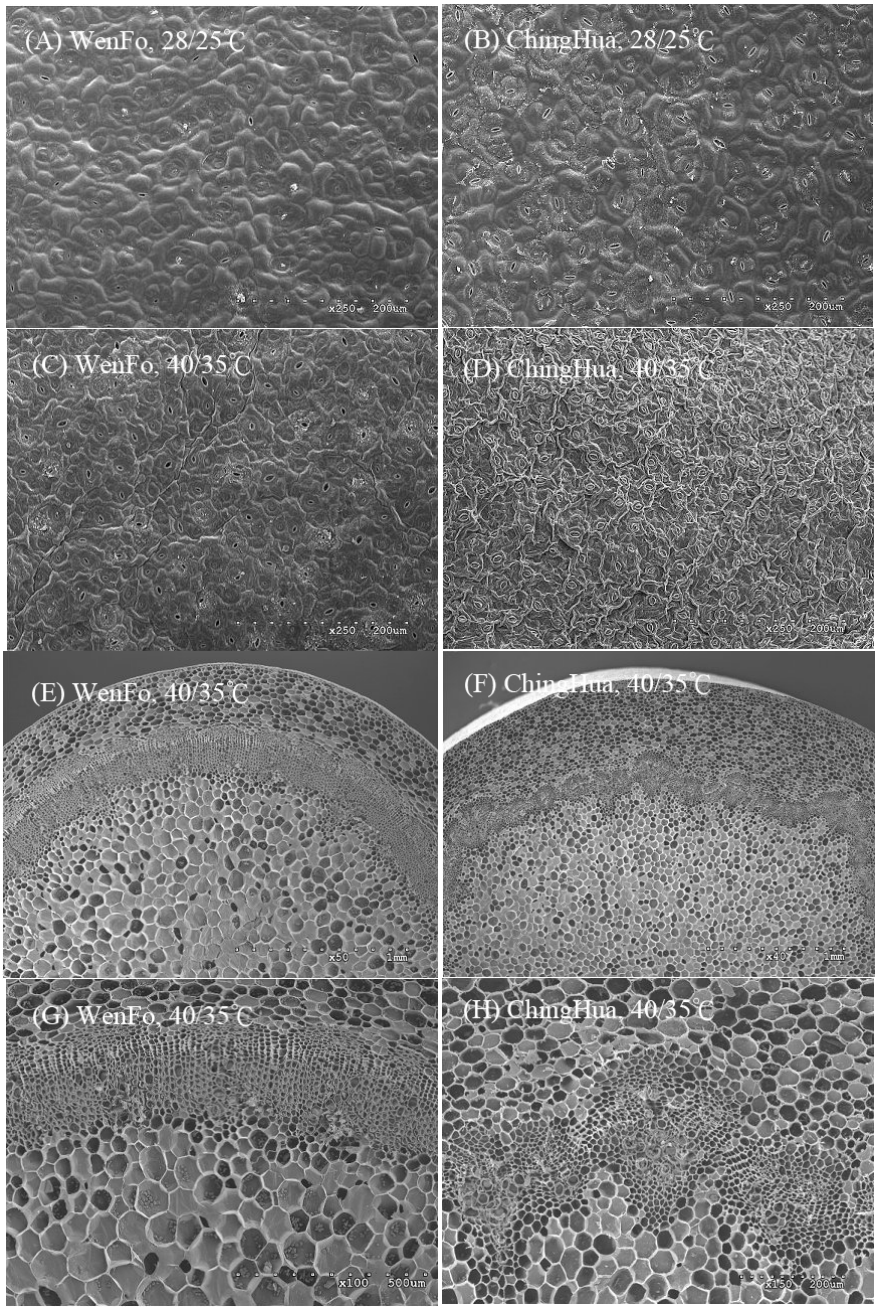
一、高溫逆境下青花菜苗期生理及型態變化

在葉片顯微結構觀察部分，兩青花菜品種栽培於28/25℃下其下表皮細胞排列及氣孔密度並無顯著差異，氣孔密度分別為‘萬福’ 289.2/$μm^2$、‘清華’293.6/$μm^2$ (數據未顯示)，但‘清華’蠟粉密度顯著多於‘萬福’ (圖一A, B)；在40/30℃高溫處理4天後，‘萬福’其表皮細胞呈現輕微皺縮現象，但植株氣孔仍正常開合，‘清華’葉肉細胞則萎縮情形嚴重且氣孔失去功能而關閉，此外，‘萬福’因表皮皺縮關係單位面積下氣孔密度增加至385.6/$μm^2$，‘清華’則因細胞皺縮嚴重無法計算(圖一C, D)。

在莖部橫切面觀察部份，40/35℃高溫處理4天對兩青花菜品種其形態結構並無影響，但品種間則有明顯差異。在28/25℃栽培下之‘萬福’莖部微管束組織(圖一E, G)相較於‘清華(圖一F, H)較為發達，總面積較大，由外而內其韌皮部、形成層及木質部組織細胞相連成一完整帶狀。

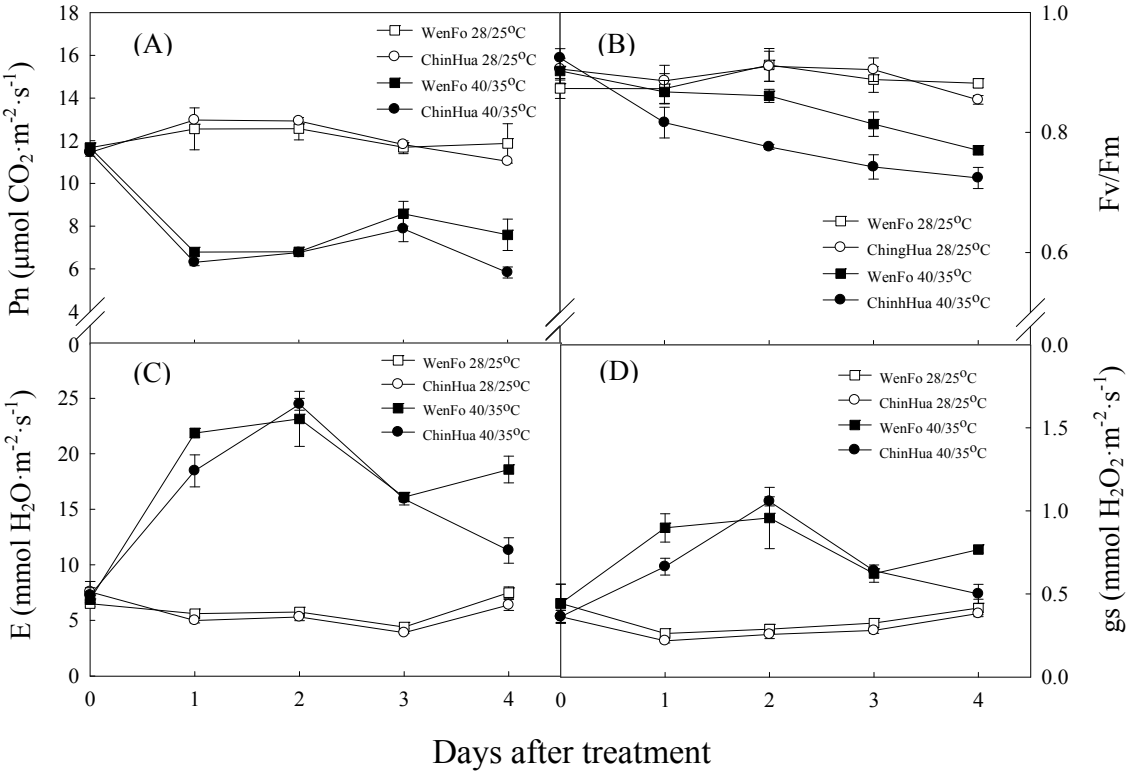
觀察兩品種青花菜在高溫逆境下其光合作用相關生理反應變化，40/35℃高溫逆境造成其淨光合作用速率下降，高溫處理第一天 ‘萬福’及‘青華’兩參試品種隨即分別從11.81和11.49 μmol $CO_2·m^{-2}·s^{-1}$降低至6.70和6.29 μmol $CO_2·m^{-2}·s^{-1}$，而後在第3天時其值均有些許上升，相對於 ‘萬福’在高溫處理第4天光合作用值維持約在7.78 μmol $CO_2·m^{-2}·s^{-1}$，‘清華’則顯著降低至5.92 μmol $CO_2·m^{-2}·s^{-1}$ (圖二A)。兩品種之葉綠素螢光Fv/Fm隨著高溫處理時間增加而下降，其中又以‘清華’下降幅度較大，且兩品種在第1天時間已有顯著差異，其值分別為萬福0.87、清華0.82，高溫處理第4天後更降低至0.77及0.73 (圖二B)。在蒸散速度及氣孔導度方面，28/25℃下兩參試品種值皆約介於6.4~7.4 mmol $H_2O_2·m^{-2}·s^{-1}$及0.34~0.43 mmol $H_2O·m^{-2}·s^{-1}$，40/35℃高

溫處理1~2天其值上升而後到第3天時下降，但仍高於28/25℃對照組，第四天時‘萬福’蒸散速率和氣孔導度些微上升，但‘清華’則持續減低至11.30 mmol $H_2O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$和0.50 mmol $H_2O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，又在高溫處理第1天時兩品種間呈顯著差異，以‘萬福’有較高之蒸散速率21.87 mmol $H_2O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$與氣孔導度0.90 mmol $H_2O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (圖二C和D)。



圖一、兩品種青花菜清華和萬福在 28/25℃栽培及 40/35℃處理 4 天後其細胞組織結構比較

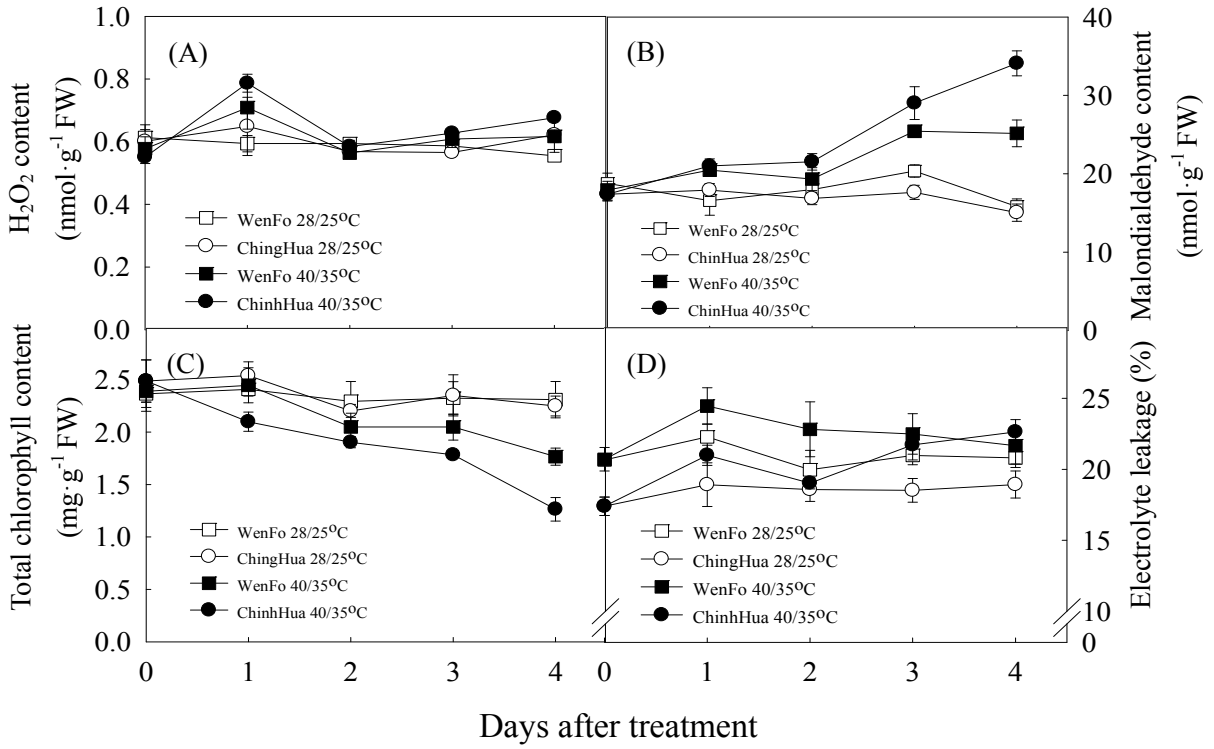
Fig. 1. Cellular structural comparison between two broccoli cultivars of Ching Hua and Wen Fo cultured under 28/25℃ and 40/35℃ for 4 days



圖二、二品種之青花菜小苗於 28/25℃和 40/35℃處理不同天數下其淨光合作用(A)、葉綠素螢光(B)、蒸散速率(C)及氣孔導度(D)之變化

Fig. 2. Changes of net photosynthetic rate, Pn (A), chlorophyll inflorescence, Fv/Fm (B), transpiration rate, E (C), and stomata conductance, gs (D) in two broccoli cultivars seedlings treated under 28/25℃ and 40/35℃ for various days

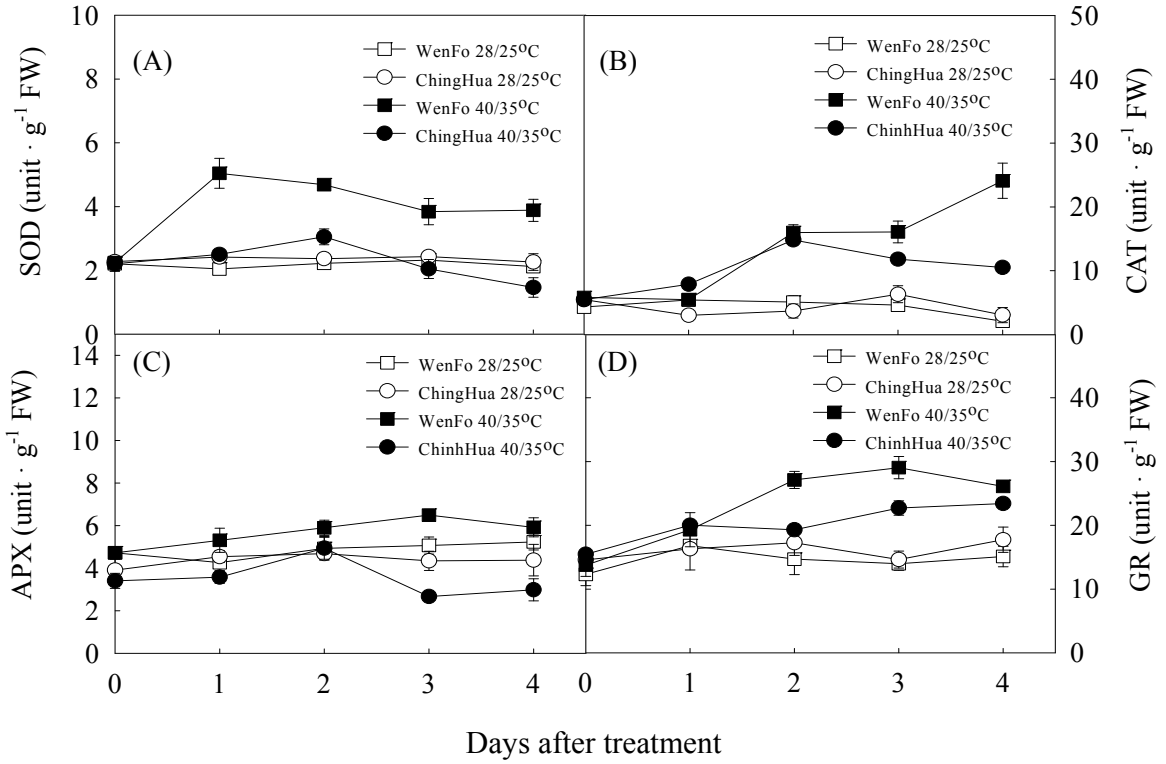
兩品種青花菜H_2O_2含量在40/35℃高溫處理下呈現先上升後下降再上升趨勢，處理第1天時即明顯增加達到一高峰，‘萬福’及‘清華’分別由第0天之0.58和0.55 nmol·g^{-1}FW提高至0.79和0.72 nmol·g^{-1}FW，而後第2天則減少至和未處理組含量相同，但第3天後H_2O_2含量開始增加，又以‘清華’增加量較多(圖三A)。丙二醛(MDA)含量代表脂質過氧化程度，隨著高溫處理日數增加MDA含量隨之增加，增加趨勢以第3~4天較為顯著，其中‘萬福’含量增加較少，且在第4天時呈一穩定值約25.16 nmol·g^{-1}FW，反之‘清華’則持續增加至33.87 nmol·g^{-1}FW (圖三B)。高溫逆境使得葉綠素含量減少且隨著高溫處理時間延長而持續下降，相較於‘萬福’ 較為緩和的趨勢，‘清華’在高溫處理第一天時即由2.49 mg·g^{-1}FW減少至2.10 mg·g^{-1}FW，且兩品種間差異顯著(圖三C)。在電解質滲漏率方面，40/35℃處理下兩品種之數值均高於28/25℃對照組，且在處理第一天時有顯著的上升，而後‘萬福’電解質滲漏率隨著處理時間增加逐漸下降，但‘清華’則反之在第2天下降後再次增加，高溫處理4天後滲漏率從17.42%增加至22.61%，增加幅度達29.79%，‘萬福’則只些微上升2.21% (圖三D)。



圖三、二品種之青花菜小苗於 28/25℃和 40/35℃處理不同天數下其葉片過氧化氫(A)、丙二醛(B)、總葉綠素含量(C)及離子滲漏率(D)之變化

Fig. 3. Changes of leaf hydrogen peroxide (A), malondialdehyde (B), total chlorophyll content (C), and electrolyte leakage (D) in two broccoli cultivars seedling treated under 28/25℃ and 40/35℃ for various days

檢視其抗氧化酵素活性變化，‘萬福’SOD活性在高溫處理後第一天顯著增加達5.04 unit·g^{-1}而後些微下降至第3天時呈一穩定值約3.84 unit·g^{-1}，但‘清華’SOD活性則遲至高溫處理第2天時有輕微提高，其值為3.01 unit·g^{-1}，而後隨著處理日數增加而下降，且低於未處理對照組(圖四A)。晚於SOD活性在高溫處理下增加的時間，CAT活性則在高溫處理第2天時增加，兩參試品種間增加量無顯著差異，而後‘清華’CAT活性降低但仍高於對照處理，反之‘萬福’CAT活性在4天處理觀察下都呈上升趨勢，第4天時其值達24.10 unit·g^{-1}，與28/25℃對照組2.10 unit·g^{-1}相比增加了約11.5倍(圖四B)。高溫與處理天數對APX活性變化無明顯影響，‘萬福’APX活性在40/35℃下稍高於28/25℃，但4天內變化則無差異，反之‘清華’在前兩天稍低或無差異於對照組，而後於第3天時降低至2.67 unit·g^{-1} (圖四C)。在GR活性變化方面，40/35℃高溫處理4天內其兩青花菜品種活性均高於對照組，且‘萬福’與‘清華’分別在第2及3天時明顯提高(圖四D)。



圖四、二品種之青花菜小苗於 28/25℃和 40/35℃處理不同天數下其葉片超氧化物歧化酶(A)、過氧化氫酶(B)、抗敗血酸過氧化酶(C)和谷胱甘肽還原酶(D)活性之變化

Fig. 4. Changes of leaf superoxide dismutase, SOD (A), catalase, CAT (B), ascorbate peroxidase, APX (C), and glutathione reductase, GR (D) activity of two broccoli cultivars seedling under 28/25℃ and 40/35℃ treatment for various days

二、花芽分化期高溫對青花菜開花表現之影響

花芽分化期高溫對青花菜兩參試品種開花率及花球下葉片數無顯著影響，但均延遲到可見花球天數及增加花球畸形率，‘萬福’到可見花球天數延遲3.9天，畸形花率為22.3%，‘清華’則延遲4.8天、畸形花率為77.8% (表一)。

圖五為青花菜‘清華’花芽分化期經35℃高溫處理10天後花球發育情形，可觀察到異常型態發育有部分花蕾萼片快速膨大或蓬鬆化(puffling)導致花蕾大小不均造成花球外觀凹凸不平(圖五A, B)、萼片快速伸長突出花球表面形成花葉球(圖五C)、花球分枝或花梗抽長使花球提早分離鬆散(圖五D)及花蕾褐化敗育(圖五E)；圖五F則為花芽分化期未經高溫逆境正常花球發育情形。

表一、花芽分化期 40/35℃處理對青花菜兩品種開花表現之影響

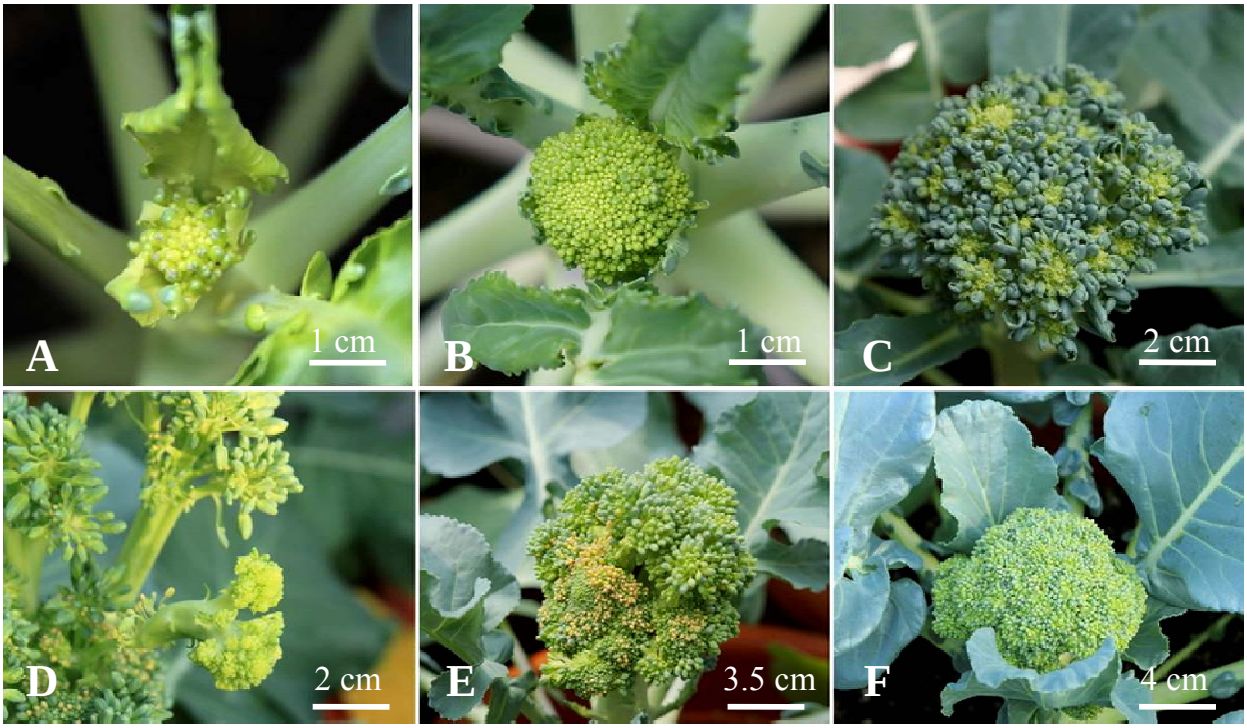
Table 1. Effect of 40/35℃ treatment during flower differentiation stage on flowering performance of two broccoli cultivars

Cultivar	Treatment	Rate of flowering	Days from planting to visible flower head	Leaf no. below flower head	Rate of abnormal flower head
WenFo	CK[3]	100.0 a[1]	25.8 c	17.3 a	0.0 c
	HS	100.0 a	29.7 b	17.8 a	22.3 b
ChingHua	CK	100.0 a	29.2 bc	17.8 a	0.0 c
	HS	100.0 a	34.0 a	17.3 a	77.8 a
Significant (P≦0.05)					
Heat treatment (H)		ns[2]	**	ns	***
Cultivar (C)		ns	**	ns	***
H × C		ns	ns	ns	***

[1] Means separation within columns by Fisher's LSD test at $P \leqq 0.05$

[2] ns, **, *** means non-significant and significant at $P \leqq 0.01$ and 0.001.

[3] CK and HS represent plants treated with 25/20℃ and 40/35℃, respectively.



圖五、青花菜'清華'花芽分化期受 40/35℃、10 天高溫其花球發育情形

Fig. 5. Flower head development of broccoli 'ChingHua' after 40/35℃ for 10 days during floral differentiation stage (A to E) 35℃, 10 days-high temperature stress; (F) 25/22℃ control

討　論

全球暖化問題日趨嚴重，極端的氣候發生漸頻繁，高溫成為影響作物生長之重要限制因子。青花菜性喜冷涼，且為綠植株春化型植物，欲降低作物在營養生長亦或生殖生長期間高溫逆境所造成之損失，除了從栽培管理面來改善外，亦須從作物生理及遺傳育種面著手。

光合作用為對高溫極為敏感的生理反應，且通常在外觀傷害出現前就能有顯著變化[8]。本試驗中，40/35℃高溫處理1天即造成淨光合作用效率減低，更導致光合作用系統二(photosystem II, PS II)之光化學活力和電子傳遞需求之間的不平衡[27]，因此造成過激化(over excitation)和造成PS II反應中心持續性的光抑制(photoinhibition)傷害，而使試驗結果中Fv/Fm值下降，可作為日後耐熱篩選之生理指標，亦不需破壞植體組織。

由圖二結果顯示，青花菜在高溫逆境下光合作用下降與其蒸散速率及氣孔導度提高並無相同變化趨勢，可說明其下降因非氣孔機能的限制，而可能是葉綠體或其他影響光合作用的因子因高溫導致功能及型態上的破壞所致，又高溫下氣孔導度和蒸散速率的增加，推測可能有助於葉面降溫和水分的吸收。此反應和淹水造成之光合作用降低原因相異，淹水逆境下氣孔關閉為重要反應之一，不耐淹水的番茄(*Solanum lycopersicum* L.)在淹水四小時後氣孔即關閉，光合作用亦受抑制[11]，又油菜(*Brassica napus* L.)在淹水逆境下光合作用明顯降低主要是因為氣孔導度降低[22]，說明了植物光合作用效率的減低因素會因所受到之逆境不同而有所差異。

高溫亦造成過氧化物的累積，進而導致細胞內胞器如葉綠體和粒線體脂質或細胞膜的過氧化[21, 23]。本試驗中高溫處理在二試驗品種中造成植體內MDA含量增加、葉綠素含量降低及電解質滲漏率提高，且隨著處理時間延長而增加或減少(圖三)，可能是因為植株胞器受過多氧化物如過氧化氫累積之氧化傷害所致。但在圖二A結果顯示，在高溫處理第一天時過氧化氫含量增加而後降低，又在第3天時再呈現持續上升趨勢，推測第一次的濃度增加此時過氧化氫角色應為訊息分子，誘導抗逆境反應，而第二次的濃度提高則為逆境造成過氧化物累積。

生物或非生物逆境下所產生之活性氧族(active oxygen species, AOS)如超氧自由基(superoxide radical, O_2^{-}・)、羥基自由基(hydroxyl radical, HO・)及過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)對細胞內組成份成氧化逆境(oxidative stress)。又H_2O_2在細胞內可扮演二次信號(secondary messenger)的角色，活化蛋白質激酶連級反應及調節細胞週期[28]，另有研究指出其在動植物體內可活化MAPK (mitogen-activated protein kinase)訊息傳遞路徑並導致下游與抗逆境相關基因表現[18]。

植物於高溫逆境下增加抗氧化酵素活性以清除自由基的累積對其耐受性扮演重要的角色，植物抗氧化酵素系統包含了superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、peroxidase (POX)、ascorbate peroxidase (APX)、gutathione reductase (GR)等抗氧化酵素。SOD為植物抗氧化系統的第一道防線，能將具有毒性的O_2^{-}・轉換成 H_2O_2後再經由其他具有清除植物體內過氧化氫的反應機制的抗氧化酵素(APX、CAT與POX)來清除之[21]。本試驗中高溫對APX活性變化並不顯著，且在試驗期間內變化不明顯，推測青花菜在高溫逆境下清除H_2O_2的主要酵

素應為CAT而不是APX。此外，其他分析酵素活性增加量皆以‘萬福’高於‘清華’，顯示‘萬福’具有較強的清除自由基能力，耐熱性較佳；又SOD活性在高溫處理第1天即上升而後才是CAT，亦符合前人研究論述。

在型態及組織之高溫適應變化方面，一般而言，型態組織有利於熱逸散、阻止水分散失及具有較佳的水份運輸潛力者有較佳的耐熱性，可作為耐熱育種篩選的依據。從細胞學角度以微觀結構鑑定雖然較複雜，但卻也較準確及客觀。前人研究指出，在同屬於十字花科蔬菜中的蘿蔔(*Raphanus sativus L.*)耐熱品種在高溫逆境下氣孔開度小、體積小、葉肉細胞排列緊密，很少出現質壁分離，葉柄維管束總面積大，總面積是不耐熱品種的1.5倍以上，且具有發達的形成層及厚壁組織[5]。而不結球白菜(*Brassica campestris* L. Chinese Group)及甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *Capitata*)在38~39℃高溫環境下，耐熱品種葉肉細胞結構仍能保持正常狀態和完整性，而不耐熱品種其葉綠體膜斷裂、解體、類囊體片層鬆散、排列紊亂，基質片層模糊不清[3]。本試驗中‘萬福’在40/35℃高溫環境下4天，其葉肉細胞較‘清華’少有原生質壁分離現象，細胞較為完整飽滿、氣孔仍具有開合的能力(圖一)，顯示其耐熱性較佳，可由高溫逆境下其蒸散速率及氣孔導度相對於‘清華’較高，及光合作用速率較佳作為印證(圖二)。而氣孔的開合能力維持的作用一為幫助植體散熱，另一則為持續蒸散作用促進水份吸收及運輸。此外，一般而言葉表皮蠟質較多可增加對光線的反射，降低葉面溫度的累積，但Welker等(1995)則認為葉片蠟粉密度與其對光的反射有關，但對耐熱性無影響，反而是蠟粉晶粒的結構影響較大，本試驗中較具耐熱性的‘萬福’品種蠟質反而較少，至於其結構上差異可在後續研究中進一步探討[31]。

青花菜商品部位為花球，花球的產量與品質影響農民收益，其花芽分化階段對高溫敏感[16]，影響花序分生組織的分化及花蕾形成；Björkman和Pearson (1998)指出在青花菜花芽分化各階段中，以straightened和bowed期(莖頂6~7 mm)對高溫最為敏感[7]；本試驗中春化後植株待莖頂膨大至7 mm時給予40/35℃高溫處理10天，花芽分化期高溫對其開花率並無顯著影響，但延遲了到可見花球天數和提高了畸形花球率，又以‘清華’影響較大(表一)，其花球1 cm時已出現花蕾大小不均表面凹凸情形(圖五A)，而後出現花蕾褐化敗育(圖五E)，部分萼片因高溫葉片化而呈現多葉芽情形(圖五C)，類似現象在辣椒(*Capsicum annuum* L)和豇豆(*Vigna unguiculata* (L.) Walp)亦有觀察到[9,14]；又高溫逆境下花球發育不良或敗蕾可能的原因為花器內植物賀爾蒙平衡失調[17]、光合作用同化物量低，導致細胞生長發育及分化異常，花器應而敗育脫落[6]及不正常分化有關[30]等，可在日後做進一步研究。

誌　謝

本實驗承蒙國立自然科學博物館李永毅博士協助掃描式電子顯微鏡觀察，謹致謝忱。

參考文獻

1. 王仕賢、謝明憲　2005　青花菜　p.451-454　增修訂三版臺灣農家要覽農作篇(二)　豐年社　臺北。
2. 行政院農業委員會農糧署　2012　農情報告資源網　http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp。
3. 苗琛、利容千、王建波　1994　熱脅迫下不結球白菜和甘藍葉片組織結構的變化　武漢植物學研究 12: 207-214。
4. 陳美蘭　2010　青花菜AV531耐熱特性之探討　國立臺灣大學園藝學系碩士論文　臺北。
5. 韓笑冰、利容千、王建波　1997　熱脅迫下蘿蔔不同耐熱品種細胞組織結構比較　武漢植物學研究 15: 173-178。
6. Aloni, B., T. Pashkar and L. Karni. 1991. Partitioning of C^{14}-sucrose and acid invertase activity in reproductive organs of pepper plants in relation to their abscission under heat stress. Ann. Bot. 67: 371-377.
7. Björkman, T. and K. J. Pearson. 1998. High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). J. Expt. Bot. 49: 101-106.
8. Camejo, D., P. Rodriguez, M. A. Morales, J. M. D. Amico, A. Torrecillas and J. J. Alarcón. 2005. High temperature effect on photosynthesis activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. J. Plant Physiol. 162: 281-289.
9. Dorland, R. E. and F. W. Went. 1947. Plant growth and controlled conditions. Ⅷ. Growth and fruiting of the chili pepper (*Capsicum annuum*). Amer. J. Bot. 34: 393-401.
10. Dufault, R. J. 1997. Determining heat unit requirements for broccoli harvest in coastal South Carolina. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 122: 169-174.
11. Else, M. A., K. C. Hall, G. M. Arnold, W. J. Davies and M. B. Jackson. 1995. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from root to shoot of flooded tomato plants. Plant Physiol. 107: 377-384.
12. 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.
13. Guan, P., Y. Chen and X. Yang. 1995. The observation of broccoli curd development characteristics with its breeding work investigation. Acta Hort. 402: 194-199.
14. Hall, A. E. 1992. Breeding for heat tolerance. p. 129-168. In: J. Janick (ed.). Plant Breeding Reviews. Vol. 10. John Wiley and Sons, New York.
15. 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.

16. Heather, D. W., J. B. Sieczka, M. H. Dickson and D. W. Wolfe. 1992. Heat tolerance and holding ability in broccoli. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 887-892.
17. Huberman, M., J. Riov, B. Aloni and R. Goren. 1997. Role of ethylene biosynthesis and auxin content and transport in high temperature-induced abscission of pepper reproductive organs. J. Plant Growth Regul. 16: 129-135.
18. Ichimura, K., C. Casais, S. C. Peck, K. Shinozaki and K. Shinasu. 2006. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 281: 36969-36976.
19. Jana, S. and M. Choudhuri. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquat. Bot. 12: 345-354
20. Kato, M. and S. Shimizu. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plant. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic dependent peroxidative degradation. Can. J. Bot. 65: 729-735.
21. Leshem, Y. Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. Free Rad. Biol. Med. 5: 3949.
22. Leul, M. and W. J. Zhou. 1999. Alleviation of waterlogging damage in winter rape by uniconazole application: Effect on enzyme activity, lipid peroxidation, membrane integrity. J. Plant Growth Regulat. 18: 9-14.
23. Liu, X. and B. Huang. 2000. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Sci. 40: 503-510.
24. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenging by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 22: 867-880.
25. Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali and A. Caparrini, 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Anal. Biochem. 154: 536-541.
26. Sharma, V. K. and J. C. Fletcher. 2002. Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. Plant Physiol.129: 31-39.
27. Souza, R. P., E. C. Machadoa, J. A. B. Silva, A. M. Lagôa, and J. A. G. Silveira. 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some assicated metabolic change in cowpea (*Vinga unguiculata*) during water stress and recovery. Env. Exp. Bot. 51: 45-56.
28. Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. 1995. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet derived growth factor signal transduction. Science 270: 296–299.
29. Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, and M. R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. Environ. Expt. Bot. 61: 199-223.

30. Warner, R. M. and J. E. Erwin. 2005. Prolonged high temperature exposure and daily light integral impact growth and flowering of five herbaceous ornamental species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 319-325.
31. Welker, O. A. and S. Furuya. 1995. Influence of heat stress on growth and leaf epicuticular structure of cabbages. J. Aro. Crop Sci. 174: 53-62.
32. Wintermans, J. F. G. M. and D. A. Mots. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll a and b and their pheophytins in ethanol. Biochim. Biophys. Acta. 109: 448-453.

Physiological, Anatomy Structural and Flowering Changes of Broccoli under High Temperature Stress[1]

We-Ling Chen[2], Cheng-Hung Hsiao[2] and Ruie-Jhan Hsiao[3]

ABSTRACT

In humid hot summer Taiwan, the marketing demand of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) relies on foreign imports due to its poor quality and low yield of flower head in local produce. For developing heat tolerant bred, the aim of this study was to investigate the physiological, micro-structural and flowering changes under heat stress.The seedlings of two tested broccoli cultivars of 'WenFo' and 'ChingHua'were measured. Results showed that characters of photosynthetic rate, chlorophyll inflorescence (Fv/Fm), and total chlorophyll content were decreased under 40/35°C condition, but the activities of transpiration rate, stomata conductance, hydrogen peroxide (H_2O_2) content, malondialdehyde (MDA) content, antioxidant enzyme activity of SOD, CAT and GR were increased. The Fv/Fm measure was found to be a useful physiological index for heat tolerant selection and 'WenFo' performed better heat tolerant capacity. From micro-structural observation, as compared with 'ChingHua', 'WenFo' showed slightly shrinkage in lower epidermis mesophyll cell, more active in stomata function, and well development in vascular bundle tissue in which treated under 40/35°C for 4 days long. In addition, heat stress during flower differentiation stage could delay the date to visible flower head and increase the character of uneven flower head appearance, head loosing, abnormal growth in petall and flower bud formation. However, the high temperature stress did not significantly impact the flowering rate and leaf development in lower shoot.

Key words: Stress, Photosynthesis, Antioxidant enzyme, Anatomical structure, Flower head

---

[1] Contribution No. 0826 from Taichung DARES, COA.

[2] Assistant and Associate Horticulturists, respectively of Taichung DARES, COA.

[3] Undergraduate Student of Dept. of Life Science, National Chang Kung University.