

水稻葉片葉綠素生合成與降解途徑之研究¹

楊志維²、黃文達³、楊棋明⁴

摘 要

本研究旨在探討水稻品種農林 8 號及其不同程度缺乏無葉綠素 b 之突變種，於生育期間葉片之葉綠素 (chlorophyll, Chl)、生合成中間物包括 protoporphyrin IX (PPIX)、magnesium protoporphyrin IX (MGPP) 及 protochlorophyllide (Pchlide) 與降解代謝物包括 chlorophyllide (Chlide)、pheophytin (Phe) 及 pheophorbide (Pho) 等含量變化與降解途徑，水稻肥培管理、遭遇病蟲害逆境及生育階段不同等因素都會影響色素的組成。研究結果顯示，水稻品種農林 8 號之 Chl 及其代謝物含量皆明顯高於突變種。Chl 及 Phe 等極性較小之代謝物，其含量隨生育日數增加而下降，吡啉 (PPIX、MGPP、Pchlide) 及 Chlide 等極性較大之代謝物，其含量同樣亦隨生育日數增加而下降。水稻品種農林 8 號及其突變種在生育階段前期，也即營養生長期至生殖生長期，葉綠素之降解途徑傾向以 Chl→Phe→Pho 為主要降解途徑 (major route)，而以 Chl→Chlide→Pho 為次要途徑 (minor route)；但隨著葉片逐漸成熟與老化，其葉綠素降解之途徑卻有明顯的不同，亦即在生育階段後期，也即生殖生長期至成熟期，葉綠素之降解途徑傾向以 Chl→Chlide→Pho 為主要降解途徑，而以 Chl→Phe→Pho 為次要途徑。藉由建立水稻生育期間色素生合成及降解途徑變化，並以此為基礎，探討色素含量與反射光譜之關聯性，未來將可利用非破壞性之方法輔助應用於判讀水稻生長狀態、生育時期、肥培管理、病蟲害預警及最終產量預估，以期達遙測技術在精準農業應用之實務化。

關鍵詞：水稻、葉綠素、生成、降解、代謝物。

¹ 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究報告第 437 號。

² 桃園區農業改良場助理研究員(通訊作者, zwyang@tydais.gov.tw)。

³ 國立台灣大學農藝學系助理教授。

⁴ 中央研究院生物多樣性研究中心副研究員。

前 言

水稻為人類主要糧食之一，栽培地區遍佈世界多國，分布緯度甚廣，也是臺灣地區栽培面積最大產值最高的糧食作物。臺灣之稻作產業兼具生態性、生活性及生產性等三生功能，稻作生產同時影響農田生態環境、農村景觀及農民收益。水稻具有多種葉色，包括綠色、紫色、黃（綠）色等，在葉片生長、發育與老化過程，光合色素質量的變化伴隨著顏色的轉變，而在正常生長狀況下，不同顏色之葉片其光合色素質量是否有差異是值得探討之課題。另葉片色素含量的改變除了造成視覺上的差異外，在反射光譜上亦產生變化（Matile *et al.*, 1992a; Gitelson and Merzlyak, 1994, 1996），此即為利用光譜進行遙測監控之重要基礎。

高等植物葉片中含有多種色素，參與各項生理活動，含量最多的為光合色素（photosynthetic pigments），為葉片進行光合作用時捕捉日光輻射能所需，包括類胡蘿蔔素（carotenoid, Car）和葉綠素（chlorophyll, Chl），與其生合成及降解代謝物。這些光合色素均以非共價鍵結合（non-covalent binding）方式與特定蛋白質結合成所謂的色素蛋白複合體（pigment-protein complexes），而位於葉綠體之類囊膜上（Markwell *et al.*, 1979）。高等植物 Chl 包括 Chl a 及 Chl b，植物的葉片均可合成，而 Chl a/b 比值在正常狀況下約為 3（Chang and Troughton, 1972）。在多種植物上已發現缺乏 Chl 突變種（Chl-deficient mutant），例如大麥（*Hordeum vulgare*）、豌豆（*Pisum sativum*）、玉米（*Zea mays*）、小麥（*Triticum aestivum*）、甜苜蓿（*Melilotus alba*）、單胞藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）等及其它植物（Markwell *et al.*, 1986）。缺乏 Chl 突變種可分為兩類，一為幾乎測不到 Chl b，稱為無 Chl b 突變種（Chl b-lacking mutant），其 Chl a/b 比值接近無限大；另一種則為 Chl b 產生量較少，稱之為缺乏 Chl b 突變種（Chl b-deficient mutant），通常此種植物 Chl a/b 比值大於 4，葉色為淡黃綠色（King, 1991; Yang *et al.*, 1993）。通常 Chl 缺乏突變種都有較高的 Chl a/b 比值及較低的 Chl 總量，且對溫度及光線極為敏感（Yang *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1995; Chen and Yang, 1995）。Chl a 及 b 之含量會隨光環境而調控，其 Chl a/b 比值亦隨環境而改變。正常植物在強光下，其 Chl a/b 比值會稍高於 3，在弱光下此比值則小於 3。陰性植物（shade plant）因長期處於弱光環境，其 Chl a/b 比值會低於 3，而陽性植物（sun plant）因處於較強光環境，其 Chl a/b 比值通常高於 3（Boardman, 1980; Yang *et al.*, 1994）。因此，Chl a/b 比值也可作為植物適應光環境的指標（Dale and Causton, 1992）。

葉片顏色主要由其所含之色素種類及含量而定，植物葉片的葉綠素含量不僅在不同的發育階段有所變化，在老化的過程中亦逐漸地減少色素含量而改變顏色 (Hendry *et al.*, 1987; Matile *et al.*, 1989; Matile *et al.*, 1992a)。在完全黑暗環境中生長之黃化幼苗經照光後，開始合成葉綠素而綠化 (Barry *et al.*, 1991)。落葉植物在秋天葉片老化過程中，其葉片色素質量產生變化 (Hendry *et al.*, 1987; Matile *et al.*, 1989)，葉片顏色也因而轉變 (Matile *et al.*, 1992b)。植物遭受逆境時，譬如淹水、乾旱、高低溫、除草劑或病蟲害時，葉片色素含量與顏色變化與自然老化時之情形相似 (Hendry *et al.*, 1987)。水稻葉片葉綠素累積的供給面與消耗面都受到三種酚酸的影響，若供給面受到抑制，消耗面則可能受到促進，而導致葉綠素的短缺 (Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003)。果實發育或後熟過程中，各種色素質量產生變化，伴隨著果皮顏色的轉變，通常由綠色變為黃色、紅色、橙色、褐色、藍色或雜色等 (Hsu *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996)。因此，葉綠素含量可作為諸如逆境傷害、光合作用能力、生長發育階段及生產力之生理指標 (Whittaker and Marks, 1975; Danks, 1983)。

在水稻方面，葉綠素突變種之葉片通常可分類為 *albino*、*chlorina* (Zhang *et al.*, 2006)、*stripe*、*virescent* (Sugimoto *et al.*, 2004)、*yellow-green* 及 *zebra* (Kusumi *et al.*, 2000)，雖然從這些突變種中有許多基因功能已被確認，但其遺傳機制大部分都還未知 (Chen *et al.*, 2008)。葉綠素是植物用來捕捉光能的主要色素，葉綠素缺陷突變種導致具 *chlorina* 的外表性狀存在於各種植物中包含阿拉伯芥 (Meinke and Koornneef, 1997)。利用 T-DNA 插入突變體已成功從阿拉伯芥中分離出一些基因，最近研究中，使用 T-DNA 基因捕捉系統 (gene-trap system) 已成功確認 *OsCHLH* 基因調控水稻 Mg-chelatase 最大的 subunit (Jung *et al.*, 2003)。阿拉伯芥突變種 *ch42* 是無法將鎂離子螯合在 PPIX 而形成 MGPP，進而經過一連串的酵素作用轉化成葉綠素分子 (Koncz *et al.*, 1990; Walker and Willows 1997; Rissler *et al.*, 2002)。螯合鎂離子在葉綠素生成過程中扮演重要的角色，抑制 tetrapyrrole 路徑的葉綠素支鏈第一步驟會降低葉綠素含量 (Papenbrock *et al.*, 2000)，導致形成黃到淡綠色葉片的外表性狀 (Jensen *et al.*, 1996; Mochizuki *et al.*, 2001)。

植物色素的降解是按遺傳設定好的順序進行複雜的生理生化過程，但其降解途徑可能受到外在因子影響而轉變。在鴛鴦湖自然保護區植物葉綠素降解模式之研究中，以自然及人為兩種方式進行實驗，結果顯示不同的環境因子會影響葉綠素降解途徑的選擇，其一的主要途徑為 Chl→Chlide→Pho，而以 Chl→Phe→Pho 為副，另一的主要

途徑為 $\text{Chl} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{Pho}$ ，而以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Chlide} \rightarrow \text{Pho}$ 為副 (Yang *et al.*, 1997a, b)。正常種虎尾蘭的葉綠素降解途徑，是以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{Pho}$ 為主要途徑，而以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Chlide} \rightarrow \text{Pho}$ 為次要途徑，而虎尾蘭缺葉綠素突變種則反之 (Chen *et al.*, 2003)。在甘藷葉的研究中，幼葉階段都傾向以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Chlide} \rightarrow \text{Pho}$ 為主要降解途徑，而以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{Pho}$ 為次要途徑；但是隨著葉片的生長發育，甘藷葉可能改變為以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{Pho}$ 為主要降解途徑，而以 $\text{Chl} \rightarrow \text{Chlide} \rightarrow \text{Pho}$ 為次要途徑，隨著生長階段的變化，Chl 降解途徑也隨之轉換 (Hsu *et al.*, 2003)。

本研究以水稻品種農林 8 號及其突變種為材料，探討葉片葉綠素與其生合成與降解代謝物之含量變化，並以此為基礎，進一步探討色素含量與反射光譜之關聯，以作為精準農業應用上之參考。

材料與方法

一、植物材料

本研究 2007 年於關渡農田進行一期作田間試驗，以水稻品種農林 8 號及其不同程度缺少或無葉綠素 b 之突變種 (chlorophyll b-deficient or -lacking mutant) 為試驗材料，包括日本栽培種農林 8 號 (Norin 8) 為正常綠色 (Chl a/b=2.5~3)、突變種黃綠色 *chl* (Chl a/b= ∞)、*chl1* (Chl a/b=10~15)、*chl6* (Chl a/b=15~25) 及黃色 *LT8* (Chl a/b=4~6)。試驗材料以每叢 3-5 株，行株距 0.30 m × 0.15 m 移植至關渡田間，採完全逢機設計，三重複，小區面積 500 m²。水稻栽培管理依當地慣行法實施，再參酌水稻生育狀況與氣候條件，進行施肥及病蟲害防治等田間管理。水稻移植田間後第 30、60、90 及 120 天由上往下取第 2 葉身完全展開葉片，進行光合色素生成代謝物及降解產物之測定。

二、葉綠素生成及降解產物的測定

根據 Yang 等 (1998) 所建立之方法進行測定，其步驟簡述如下：

1. 葉綠素 (Chl) 的測定

植物樣品以液態氮急速冷凍，並以研鉢磨成細粉後進行冷凍乾燥。秤取 0.01 g 樣品細粉，以 80% 丙酮萃取色素，在 4,500 rpm 離心 5 分鐘，取上清液，以 Hitachi U-2000 分光光度計測定 $A_{663.6}$ 及 $A_{646.6}$ 的吸收值。兩者分別為 Chl a 及 Chl b 的強

吸收處。以 Porra 等 (1989) 的公式計算 Chl *a* 與 Chl *b* 的含量。

2. 不同極性降解物的分離

以同體積正己烷與前述丙酮萃取液混合，以震盪器激烈混合後靜置，直到明顯分層。此時上層為極性較弱的正己烷層，下層為極性較強的丙酮層，分別含不同極性的各類色素。

3. 脫植醇或未酯化色素 (dephytylated or nonesterified pigments) 的測定

取上層液測 A_{661} 的吸收值，此為脫植醇色素的綜合吸收值。以吸收值直接比較。

4. 含植醇或酯化色素 (phytylated or esterified pigments) 的測定

其中 A_{666} 即為未脫植醇色素之吸收值。以吸收值直接比較。

5. PPIX、MGPP 及 Pchlide 的測定

丙酮層的 A_{575} 、 A_{590} 、 A_{628} 之吸收值分別為 PPIX、MGPP 及 Pchlide 的吸收值，以 Kahn 等 (1976) 之公式計算其濃度。

6. Chlide *a* 及 Chlide *b* 的測定

丙酮層的 A_{667} 及 A_{650} 分別為已脫植醇 Chlide *a* 及 Chlide *b* 之吸收值，其計算公式是根據測定 chlorophyllase 活性的方法 (McFeeters et al., 1971)。該方法以測定生成物 Chlide *a* 及 Chlide *b* 的吸收值後，再利用 Beer-Lambert 公式換算出兩生成物的莫耳濃度。

7. 將正己烷層液體以氮氣吹乾後，以 80% 丙酮充分溶解，並加 50 μ L 的 12.5% HCl 破壞 Chl，測定 $A_{665.4}$ 及 $A_{653.4}$ 的吸收值。 $A_{665.4}$ 、 $A_{653.4}$ 分別為未脫植醇 Phe *a* 及 Phe *b* 的吸收值，亦利用公式換算出兩物的莫耳濃度 (Lichtenthaler, 1987)。

三、資料統計分析

利用 SAS 軟體 (Version 9.1, SAS Institute) 進行所有測量結果的統計分析，並以 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test, LSD test) 比較平均值之差異顯著性。

結果與討論

一、葉綠素合成及降解途徑

葉綠素合成係由麩氨酸 (glutamate) 經十幾個步驟反應而來，合成過程出現吡啶環 (porphyrin ring) 的基本結構後直到形成 protoporphyrin IX (PPIX)，再經鎂原子嵌入吡啶環成為 magnesium protoporphyrin IX (MGPP)，進而轉化為 protochlorophyllide (Pchl_{id})，然後形成葉綠素。

葉綠素降解時，自 Chl 轉化為 pheophorbide (Pho) 有兩種可能途徑，每一途徑都需二個步驟。其一為先經由 chlorophyllase 催化，脫去植醇鏈 (phytol chain) 生成 chlorophyllide (Chl_{id})，再脫去鎂離子生成 Pho；或者先經由 Mg-dechelataase 催化，脫去鎂離子生成 pheophytin (Phe)，繼而脫去植醇鏈生成 Pho (Hendry *et al.*, 1987; Matile *et al.*, 1996)。

二、葉綠素 (Chlorophyll, Chl)

水稻品種農林 8 號整體葉綠素含量最高，介於 2,398-9,520 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW；其次為 *chl1*、*chl6* 及 *chl*，介於 527-6,154 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW，最低為 *LT8*，介於 1,360-3,197 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW。試驗材料在一期稻作生育期間，葉片葉綠素含量變化整體趨勢隨著生育日數增加而下降 (表 1)。

葉綠素是一般植物中最常見的色素，其主要結構為一吡啶環，中心鍵結一個鎂離子，側鏈為一長鏈的植物醇 (phytol chain)，其依據 porphyrin ring 上鍵結基團之不同又可分葉綠素 a 及葉綠素 b。以台農 67 號水稻在台北縣新店台大安坑農場之生長為例，自播種到抽穗期之後期約 95 天，其葉綠素含量達最高峰並開始進入降解大於合成之時期 (楊, 2001)。以葉綠素合成與降解角度觀之，水稻於秧苗期及營養生長期，其葉綠素不斷的累積，導因於兩時期之葉綠素合成速率遠大於降解速率。當開始進入生殖生長期之幼穗形成期，此時仍需活躍的光合作用以提供醣類積儲之來源，故葉綠素含量仍處於高峰階段。爾後進入後半段的孕穗期與抽穗期，其葉綠素累積進入降解大於合成之時期，越往後之生長期，葉綠素降解與合成速率之差距越大。

三、葉綠素 a/b 比值

試驗材料在一期稻作生育期間，葉片葉綠素 a/b 比值之變化與其葉片色素特性相吻合（表 1）。農林 8 號葉片 Chl a/b 比值在全生育期間均接近 3，與一般正常狀況下高等植物葉片之 Chl a/b 比值相似，顯示其可適應於一般光照環境下生長，葉綠素 a 及葉綠素 b 在生育期間合成及降解速率同步進行；而 *LT8*、*chl1*、*chl6* 及 *chl* 葉片 Chl a/b 比值在全生育期間明顯遠高於 3，且其葉綠素含量遠低於正常植物葉片，以致葉片呈現黃綠色，黃色葉甘藷亦有此現象（Hsu *et al.*, 2003），因此，突變種 *LT8*、*chl1*、*chl6* 及 *chl*，可能對光線和溫度都甚為敏感（Yang *et al.*, 1990；Yang *et al.*, 1993）。突變種 *LT8*、*chl1*、*chl6* 及 *chl*，其葉綠素 a/b 比值在生育期間整體趨勢為先升後降，相對而言，突變種由營養生長期進入生殖生長期間，Chl a 之累積速率遠大於 Chl b，進入生殖生長期後，Chl a 及 b 間的累積速率差距逐漸縮小，而進入成熟期後，Chl a/b 均呈快速下降趨勢，顯現 Chl a 的降解速率比 Chl b 快。高等植物中，除了綠葉之外，尚有許多其它綠色組織存在，例如花萼、花瓣、豆科植物之莢、種皮、子葉等，稱之為非葉綠色組織（NLGT, Non-leaf green tissues），一般來說，非葉綠色組織之葉綠素含量及 Chl a/b 比值和葉片間之歧異度很大，學者們亦於近年來分析兩者間的 Chl 含量和 Chl a/b 比值變化，有系統的檢測 22 種野生高等植物葉片及 68 個非葉綠色組織之 Chl 含量和 Chl a/b，結果發現，葉片的 Chl 含量之平均值是非葉綠色組織的 8.5 倍，而葉片在正常生長狀態下的 Chl a/b 為 3.09 ± 0.45 ，但非葉綠色組織的 Chl a/b 為 2.80 ± 0.56 （楊，2004）。

四、吡啉化合物（Porphyrin）

由表 2 可知，水稻品種農林 8 號、*chl1*、*chl6* 及 *chl* porphyrin 含量在生育期間整體趨勢為持續下降。在個別吡啉莫耳百分比（mole percent of porphyrins）方面，農林 8 號及其突變種之三種吡啉莫耳百分比在全生育期間，PPIX 累積較多，顯示其轉化成 MGPP 之速率較慢，而 MGPP 一旦轉化成 Pchlde 後即刻繼續轉化成下一個代謝物，因此 Pchlde 之莫耳百分比為三者最低。此種 PPIX→MGPP→Pchlde 轉化速率的差異，在不同物種間有不同之型態，例如在甘藷葉該等轉化速率的快慢即呈相反的趨勢（Hsu *et al.*, 2003）。而大部分正常植物綠葉，亦即正常高等植物此三種吡啉的生合成速率都保持著動態平衡（Hsu *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996）。

表 1. 水稻品種農林 8 號及其突變種生育期間葉片葉綠素、葉綠素 a 及葉綠素 b 含量及其比值之變化

Table 1. Change of Chl, Chl a and Chl b concentrations and Chl a/b ratio in the leaves of rice variety Norin No. 8 and its mutants during development.

品種(系) Variety (Line)	移植天數 Days after transplanting	葉綠素 a Chl a ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	葉綠素 b Chl b ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	葉綠素 a+b Chl a+b ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	葉綠素 a/b Chl a/b
Norin 8	30	7,122 ± 238a ^z	2,399 ± 153a	9,520 ± 383a	2.97 ± 0.11e
	60	5,094 ± 101b	1,573 ± 39b	6,667 ± 132b	3.24 ± 0.06e
	90	4,801 ± 181b	1,519 ± 78b	6,320 ± 254b	3.16 ± 0.07e
	120	1,801 ± 122e	597 ± 32c	2,398 ± 154f	3.01 ± 0.05e
LT8	30	2,319 ± 74e	353 ± 27d	2,671 ± 77f	6.60 ± 0.54d
	60	1,693 ± 83e	229 ± 20e	1,922 ± 103f	7.40 ± 0.30d
	90	2,697 ± 60d	500 ± 21c	3,197 ± 67e	5.40 ± 0.23d
	120	1,072 ± 40f	289 ± 14d	1,360 ± 38g	3.72 ± 0.26d
Ch11	30	5,579 ± 380b	552 ± 85c	6,131 ± 465b	10.19 ± 0.94c
	60	3,797 ± 90c	321 ± 27d	4,117 ± 111d	11.88 ± 0.85c
	90	3,840 ± 237c	284 ± 8d	4,124 ± 245d	13.50 ± 0.46c
	120	783 ± 113f	104 ± 19f	887 ± 131g	7.56 ± 0.66c
Ch16	30	5,600 ± 62b	554 ± 24c	6,154 ± 46b	10.13 ± 0.52c
	60	3,574 ± 122c	289 ± 8d	3,863 ± 122e	12.35 ± 0.54c
	90	3,107 ± 34d	223 ± 3e	3,331 ± 37e	13.90 ± 0.12c
	120	889 ± 52f	91 ± 7f	980 ± 46g	9.84 ± 1.37c
Ch1	30	5,213 ± 92b	102 ± 21f	5,315 ± 84c	53 ± 13b
	60	4,217 ± 113c	62 ± 16f	4,279 ± 103d	71 ± 17b
	90	3,781 ± 102d	17 ± 11g	3,799 ± 112e	335 ± 25a
	120	489 ± 64f	38 ± 7g	527 ± 60g	13 ± 4c

^z 平均值 ± 標準偏差 (n=3)。

同行英文字母相同者表示經 Fisher 的最小顯著差異性測驗在 5% 水準差異不顯著。

^z Mean ± standard deviation (n=12).

Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

表 2. 水稻品種農林 8 號及其突變種生育期間葉片吡啉化合物總量及莫耳百分比之變化
 Table 2. Change of total porphyrin concentration and individual mole percentage in the leaves of rice variety Norin No. 8 and its mutants during development.

品種(系) Variety (Line)	移植天數 Days after transplanting	吡啉化合物 Total porphyrin (nmole g ⁻¹ DW)	吡啉化合物莫耳百分比 Mole percentage of porphyrin (%)		
			吡啉原 IX PPIX	鎂吡啉原 IX MGPP	葉綠素原 Pchl _a
Norin 8	30	1,706 ± 132a ^z	80 ± 1.3a	20 ± 1.7a	0.2 ± 0.4d
	60	1,501 ± 132a	75 ± 1.6b	22 ± 1.7a	3.3 ± 1.0c
	90	718 ± 44b	71 ± 9.5b	21 ± 5.9a	8.2 ± 4.2c
	120	613 ± 84b	82 ± 5.6a	17 ± 4.9b	0.5 ± 0.8d
LT8	30	818 ± 70b	77 ± 3.3b	17 ± 3.6b	6.2 ± 1.7c
	60	688 ± 62b	56 ± 9.0c	25 ± 3.0a	18.2 ± 2.0a
	90	616 ± 94b	67 ± 4.5b	15 ± 2.6b	18.0 ± 2.4a
	120	489 ± 18c	92 ± 6.7a	8 ± 2.0c	0.0 ± 0.0d
Ch11	30	1,218 ± 13b	75 ± 3.5b	22 ± 1.2a	3.1 ± 2.0c
	60	1,047 ± 89b	71 ± 1.4b	21 ± 1.8a	7.7 ± 0.7c
	90	756 ± 50b	71 ± 2.8b	15 ± 2.5b	14.2 ± 1.4b
	120	444 ± 13c	92 ± 7.2a	8 ± 3.0c	0.0 ± 0.0d
Ch16	30	1,272 ± 25b	76 ± 6.9b	20 ± 6.7a	3.8 ± 0.3c
	60	913 ± 74b	70 ± 6.8b	24 ± 4.4a	6.5 ± 2.3c
	90	593 ± 50c	58 ± 4.7c	26 ± 5.0a	15.8 ± 7.6b
	120	586 ± 143c	95 ± 4.5a	5 ± 4.5c	0.0 ± 0.0d
Ch1	30	1,176 ± 37b	70 ± 1.0b	24 ± 1.3a	6.5 ± 1.0c
	60	1,029 ± 13b	68 ± 1.7b	23 ± 1.4a	9.1 ± 0.6c
	90	617 ± 62b	56 ± 5.0c	22 ± 3.0a	22.1 ± 3.9a
	120	444 ± 49c	86 ± 4.0a	14 ± 5.0b	0.7 ± 1.1d

^z 平均值 ± 標準偏差 (n=3)。

同行英文字母相同者表示經 Fisher 的最小顯著差異性測驗在 5% 水準差異不顯著。

^z Mean ± standard deviation (n=12).

Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

五、脫植醇葉綠素 (Chlorophyllide, Chlide) 與脫鎂葉綠素 (Pheophytin, Phe) 及其比值

水稻品種農林 8 號、*ch11*、*ch16* 及 *chl* 整體 Chlide 含量較高，介於 0.19-0.64 mM g⁻¹ DW；最低為 *LT8*，介於 0.28-0.35 mM g⁻¹ DW，Chlide 含量變化整體趨勢隨著生育日數增加而下降（表 3）。水稻品種農林 8 號整體 Phe 含量最高，介於 641-3,256 μg g⁻¹ DW；其次為 *ch11*、*ch16* 及 *chl*，介於 177-1,851 μg g⁻¹ DW；最低為 *LT8*，介於 359-964 μg g⁻¹ DW，Phe 含量變化整體趨勢與葉綠素含量變化一致（表 3）。

水稻品種農林 8 號整體 Phe/Chlide 比值最高，介於 1,921-5,132；其次為 *LT8*、*ch11*、*ch16* 及 *chl*，介於 983-3,210。參試水稻品種及其突變種生育期間 Phe/Chlide 比值變化整體趨勢為先升後降（表 3），此顯示水稻在生育階段前期，也即營養生長期至生殖生長期，葉綠素之降解途徑傾向以 Chl→Phe→Pho 為主要降解途徑，而以 Chl→Chlide→Pho 為次要途徑；但在生育階段後期，也即生殖生長期至成熟期，葉綠素之降解途徑則傾向以 Chl→Chlide→Pho 為主要降解途徑，而以 Chl→Phe→Pho 為次要途徑。

六、含植醇與脫植醇色素 (Phytylated and dephytylated pigments) 及其比值

水稻品種農林 8 號及其突變種在一期作生育期間，含植醇與脫植醇色素總含量亦有差異，整體趨勢與葉綠素含量變化一致。水稻品種農林 8 號整體含植醇/脫植醇色素比值最高，介於 8.7-26.2；其次為 *LT8*、*ch11*、*ch16* 及 *chl*，介於 4.2-16.5（表 4）。含植醇色素即為酯化之色素，包括 Chl 及 Phe；而脫植醇色素則為未酯化的色素，包括 Chlide 及 Pho (Shioi and Sasa, 1986)。葉片含植醇與脫植醇色素總含量變化趨勢與 Chl 之含量變化趨勢類似，此與甘藷葉之研究相符合 (Hsu *et al.*, 2003)。含植醇/脫植醇色素比值整體趨勢為先升後降，此顯示水稻在生育階段前期，也即營養生長期至生殖生長期，葉片之 Chl 與 Phe 含量增加時，Chlide 與 Pho 之含量則減少，此一結果與前述 Phe/Chlide 比值結果一致，即 Chl 降解時，主要為先經由 Mg-dechelatase 催化脫去鎂離子後生成 Phe，再脫去植醇鏈後生成 Pho；但在生育階段後期，也即生殖生長期至成熟期，葉片之 Chl 與 Phe 含量減少時，Chlide 與 Pho 之含量則增加，此一結果亦與前述 Phe/Chlide 比值結果一致，即 Chl 降解時，主要為先經由 chlorophyllase 催化，脫去植醇鏈 (phytol chain) 生成 Chlide，再脫去鎂離子生成 Pho。

吡啉（包括 PPIX、MGPP 及 Pchlide）、Chlide 及 Pho 等 Chl 的代謝物均無植醇鏈，故其極性較大且易溶於水；而 Chl 及 Phe 則均含植醇鏈，其極性較小且為脂溶性。此化學結構的差異造成極性的差異，也因而造成該等物質在葉綠體內基質（stroma）或類囊膜（thylakoid）上分布的差異。明顯地，Chl 合成過程中的代謝物或降解物，只要缺植醇鏈，基本上可能都分布在水溶性較大的基質中；而若有植醇鏈，即存在於脂溶性較大的類囊膜上。水稻品種農林 8 號及其突變種隨著生育日數增加，極性較小的代謝物包括 Chl 及 Phe 均呈現減少的趨勢，而極性較大的代謝物包括吡啉及 Chlide 同樣呈現減少的趨勢，此與甘藷葉研究不同（Hsu *et al.*, 2003）。雖然兩者減少趨勢相同，但極性較小的代謝物，包括 Chl 及 Phe，在水稻生育階段前期，也即營養生長期至生殖生長期，下降的速率較慢，但極性較大的代謝物，包括 Chlide 及 Pho，下降的速率則較快，結果導致含植醇/脫植醇色素比值上升；但在生育階段後期，也即生殖生長期至成熟期，葉片之 Chl 與 Phe 下降的速率較快，但 Chlide 與 Pho 下降速率則趨緩，此一結果導致水稻生育後期含植醇/脫植醇色素比值下降。

在本研究中，水稻品種農林 8 號及其突變種在一期作生育期間，Phe/Chlide 比值整體趨勢為先升後降，此顯示水稻在生育階段前期，也即營養生長期至生殖生長期，葉綠素之降解途徑傾向以 Chl→Phe→Pho 為主要降解途徑，而以 Chl→Chlide→Pho 為次要途徑；但在生育階段後期，也即生殖生長期至成熟期，葉綠素之降解途徑傾向以 Chl→Chlide→Pho 為主要降解途徑，而以 Chl→Phe→Pho 為次要途徑，此可能為水稻葉片在老化過程中，會抑制 Mg-dechelatease 作用，或相對地增強 chlorophyllase 催化作用所致。該等隨生長階段變化或外在因子的影響，Chl 降解途徑也隨之轉換的現象，是否發生在其他植物？另外，為何會有該等途徑的轉換？實值得進一步研究。藉由建立水稻生育期間色素生合成及降解途徑變化，並以此為基礎，探討色素含量與反射光譜之關聯性，未來將可利用非破壞性之方法輔助應用於判讀水稻生長狀態、生育時期、肥培管理、病蟲害預警及最終產量預估，以期達遙測技術在精準農業應用之實務化。

表 3. 水稻品種農林 8 號及其突變種生育期間葉片脫植醇與脫鎂葉綠素及其比值的變化
 Table 3. Change of Chlide and Phe concentrations and Phe/Chlide ratio in the leaves of rice variety Norin No. 8 and its mutants during development.

品種(系) Variety (Line)	移植天數 Days after transplanting	脫植醇葉綠素 Chlide (mM g ⁻¹ DW)	脫鎂葉綠素 Phe (μg g ⁻¹ DW)	脫鎂/脫植醇葉綠素 Phe/Chlide
Norin 8	30	0.64 ± 0.01a ^z	3,256 ± 150a	5,056 ± 258a
	60	0.37 ± 0.02d	1,902 ± 137b	5,132 ± 158a
	90	0.61 ± 0.04a	2,191 ± 43b	3,606 ± 180b
	120	0.33 ± 0.01d	641 ± 67c	1,921 ± 210c
LT8	30	0.35 ± 0.03d	823 ± 40c	2,324 ± 71c
	60	0.32 ± 0.03d	964 ± 51c	2,991 ± 149b
	90	0.33 ± 0.02d	733 ± 113c	2,239 ± 231c
	120	0.28 ± 0.02e	359 ± 60d	1,283 ± 288d
Ch11	30	0.48 ± 0.02c	1,304 ± 64c	2,702 ± 70b
	60	0.57 ± 0.03a	1,814 ± 134b	3,166 ± 131b
	90	0.47 ± 0.01c	1,248 ± 60c	2,652 ± 132b
	120	0.20 ± 0.04e	259 ± 30d	1,360 ± 340d
Ch16	30	0.41 ± 0.04c	1,223 ± 50c	2,995 ± 197b
	60	0.58 ± 0.02a	1,851 ± 14b	3,210 ± 69b
	90	0.40 ± 0.01c	854 ± 103c	2,151 ± 244c
	120	0.24 ± 0.02e	279 ± 14d	1,181 ± 91d
Ch1	30	0.63 ± 0.04a	1,649 ± 20b	2,630 ± 165b
	60	0.51 ± 0.04b	1,356 ± 41c	2,680 ± 104b
	90	0.50 ± 0.02b	1,087 ± 100c	2,184 ± 244c
	120	0.19 ± 0.04e	177 ± 19d	983 ± 314d

^z 平均值 ± 標準偏差 (n=3)。

同行英文字母相同者表示經 Fisher 的最小顯著差異性測驗在 5%水準差異不顯著。

^z Mean ± standard deviation (n=12).

Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

表 4. 水稻品種農林 8 號及其突變種生育期間葉片含植醇與脫植醇色素及其比值之變化
 Table 4. Change of phytylated and dephytylated pigment concentrations and phy/dephy ratio in the leaves of rice variety Norin No. 8 and its mutants during development.

品種(系) Variety (Line)	移植天數 Days after transplanting	含植醇色素 Phytylated (A ₆₆₁ g ⁻¹ DW)	脫植醇色素 Dephytylated (A ₆₆₆ g ⁻¹ DW)	含植醇/脫植醇色素 Phy/Dephy
Norin 8	30	372 ± 6b ^z	24.0 ± 1.8b	15.5 ± 1.0b
	60	533 ± 18a	27.6 ± 1.5a	19.4 ± 1.6b
	90	359 ± 13b	13.8 ± 1.2c	26.2 ± 1.5a
	120	118 ± 4d	13.6 ± 1.0c	8.7 ± 0.9d
LT8	30	119 ± 10d	11.3 ± 1.1c	10.6 ± 1.2c
	60	167 ± 7d	12.7 ± 0.2c	13.2 ± 0.6c
	90	203 ± 5c	12.3 ± 1.1c	16.5 ± 1.2b
	120	71 ± 2e	10.5 ± 0.7c	6.8 ± 0.6d
Ch11	30	262 ± 6c	21.3 ± 3.7b	12.5 ± 1.7c
	60	395 ± 36b	25.6 ± 3.9b	15.5 ± 1.4b
	90	274 ± 11c	19.0 ± 0.9b	14.4 ± 0.7c
	120	51 ± 6e	7.8 ± 0.7c	6.5 ± 1.0d
Ch16	30	389 ± 5b	31.6 ± 1.8a	12.3 ± 0.7c
	60	248 ± 9c	15.8 ± 1.9c	15.8 ± 1.9b
	90	220 ± 6c	15.7 ± 1.2c	14.1 ± 1.3c
	120	56 ± 4e	10.5 ± 2.3c	5.4 ± 0.8d
Ch1	30	361 ± 10b	30.8 ± 2.5a	11.8 ± 1.3c
	60	289 ± 10c	21.0 ± 2.0b	13.8 ± 1.1c
	90	273 ± 5c	21.0 ± 1.2b	13.0 ± 0.5c
	120	31 ± 7e	7.8 ± 1.5c	4.2 ± 1.7d

^z 平均值 ± 標準偏差 (n=3)。

同行英文字母相同者表示經 Fisher 的最小顯著差異性測驗在 5%水準差異不顯著。

^z Mean ± standard deviation (n=12).

Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

參考文獻

- 楊志維。2001。衛星遙測與灰系統理論應用於水稻(*Oryza sativa* L.)營養生長期之監測。國立台灣大學農藝學研究所碩士論文。
- 楊棋明、吳雅婷、劉翠雅、黃文達、黃秀鳳、趙璧玉。2004。高等植物非葉綠色組織葉綠素含量及其 a/b 比值之初探。華岡農科學報。13:27-34。
- Barry, P., A. J. Young, and G. Britton. 1991. Accumulation of pigments during the greening of etiolated seedlings of *Hordeum vulgare* L. J. Exp. Bot. 42:229-234.
- Boardman, N. K. 1980. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. Annu. Rev. plant Physiol. 28:355-377.
- Chang, F. H. and J. H. Troughton. (1972) Chlorophyll a/b ratios in C₃-C₄-plants. Photosynthetica 6:57-65.
- Chen H. Y. and C. M., Yang. 1995. Temperature sensitivity of chlorophyll expression in the leaves of *Ficus microcarpa* cv. Golden-leaves. Proc. Natl. Sci. Council. ROC. Pt.B. 19: 196-200.
- Chen, H. Y., Y. K. Lu, C. H. Chou, and C. M. Yang. 1996. Analysis of pigment degradation in exocarp of papaya during late ripening. J. Chinese Agric. Chem. Soc. 34:460-468.
- Chen, H. Y., C. C. Li, and C. M. Yang. 2003. Analysis of the chlorophyll biosynthetic and degradative pathways in a chlorophyll-deficient mutant of *Sansevieria trifasciata*. J. Agric. Assoc. China 4: in press.
- Chen Q. L. F. Wang, N. Su, H. D. Qin, H. B. Niu, J. L. Wang, H. Q. Zhai, and J. M. Wan. 2008. Photosystem 2 photochemistry and pigment composition of a yellow mutant of rice (*Oryza sativa* L.) under different irradiances. Photosynthetica 46(1):35-39.
- Dale, M. P. and D. R. Causton. 1992. Use of the chlorophyll a/b ratio as a bioassay for the light environment of a plant. Functional Ecol. 6:190-196.
- Danks, S. M. 1983. Photosynthetic Systems. Structure Function and Assembly, Wiley, New York.
- Gitelson, A. A. and M. N. Merzlyak. 1994. Spectral reflectance changes associated with autumn senescence of *Aesculus hippocastanum* L. and *Acer platanoides* L. leaves. Spectral features and relation to chlorophyll estimation. J. Plant Physiol. 143:286-292.

- Hendry, G. A. F., J. D. Houghton, and S. B. Brown. 1987. The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytol.* 107:255-302.
- Hsu, B. D. and J. Y. Lee. 1995. The photosystem II heterogeneity of chlorophyll b-deficient mutants of rice: a fluorescence induction study. *Aust. J. Plant Physiol.* 22:195-200.
- Hsu, J. C., Y. K. Lu, and C. M. Yang, 1995. Analysis on pigments in the exocarp of orange fruit. *Taiwania* 40:83-90.
- Hsu, M. H., W. D. Huang, Z. W. Yang, Y. Z. Tsai, C. M. Yang, and S. S. Chang. 2003. Study on the chlorophyll biosynthetic and degradative pathway in the leaves of three sweet potatoes. *Chinese Agron. J.* 13:87-98.
- Jensen, P.E., R.D. Willows, B. L. Petersen, U. C. Vothknecht, B. M. Stummann, C. G. Kannangara, D. Von Wettstein, and K. W. Henningsen. 1996. Structural genes for Mg-chelatase subunits in barley: XANTHA-F, -G and -H. *Mol. Gen. Genet.* 250: 383-394.
- Jung, K.H., J. H. Hur, C. H. Ryu, Y. J. Choi, Y. Y. Chung, A. Miyao, H. Hirochika, G. H. An. 2003. Characterization of a rice chlorophyll-deficient mutant using the T-DNA gene-trap system. *Plant Cell Physiol.* 44: 463-472.
- Kahn, V. M., Avivi-Bieise, N. and D. Von Wettstein. 1976. Genetic regulation of chlorophyll synthesis analyzed with double mutants in barley. In: *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria* (ed. by Bhuchler, T.). pp. 119-131. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- King, J. 1991. The chlorophyll-deficient mutants. In: *The Genetics Basic of Plant Physiological Processes* (ed. by King, J.) pp.153-166. Oxford University Press, Inc.
- Koncz, C., R. Mayerhofer, Z. Koncz-Kalman, C. Nawrath, B. Reiss, G. P. Redei, and J. Schell. 1990. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 9:1337-1346.
- Kusumi, K., H. Komori, H. Satoh, K. Iba. 2000. Characterization of a zebra mutant of rice with increased susceptibility to light stress. *Plant Cell Physiol.* 41:158-64.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods Enzymol.* 148:350-382.
- Markwell J. P., J. P., Thornber, R. T., Boggs. 1979. Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

76:1233-1235.

- Markwell, J. P., S. J. Danko, H. Bauwe, J. Osterman, H. J. Gorz, and F. A. Haskins. 1986. A temperature-sensitive chlorophyll *b*-deficient mutant of sweetclover (*Melilotus alba*). *Plant Physiol.* 81:329-334.
- Matile, P., T. Duggelin, M. Schellenberg, D. Rentsch, K. Bortlik, C. Peisker, and H. Thomas. 1989. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? *Plant Physiol. Biochem.* 27:595-604.
- Matile, P., B. M. Flach, and B. M. Eller. 1992a. Autumn leaves of *Ginkgo biloba* L.: Optical properties, pigments and optical brighteners. *Bot. Acta* 105:13-17.
- Matile, P., M. Schellenberg, and C. Peisker. 1992b. Production and release of a chlorophyll catabolite in isolated senescent chloroplasts. *Planta* 187:230-235.
- Matile, P., S. Hortensteiner, H. Thomas, and B. Krautler. 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* 112:1403-1409.
- McFeeters, R. F., C. O. Chichester, and J. R. Whitaker. 1971. Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (Tree-of-Heaven). *Plant Physiol.* 47:609-618.
- Meinke, D. and M. Koornneef. 1997. Community standards for Arabidopsis genetics. *Plant J.* 12:247-253.
- Mochizuki, N., J. A. Brusslan, R. Larkin, A. Nagatani, and J. Chory. 2001. Arabidopsis genome's uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2053-2058.
- Papenbrock, J., H. P. Mock, R. Tanaka, E. Kruse, and B. Grimm. 2000. Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiol.* 122:1161-1169.
- Porra, R. J., W. A. Thompson, and P. E. Kriedelman. 1989. Determination of accurate extraction and simultaneously equation for assaying chlorophyll a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta* 975:384-394.
- Rissler, H.M., E. Collakova, D. DellaPenna, J. Whelan, and B. J. Pogson. 2002. Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second CHLI gene of magnesium chelatase in Arabidopsis supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.* 128:770-779.

- Shioi, Y. and T. Sasa. 1986. Purification of solubilized chlorophyllase from *Chlorella protothecoides*. *Methods Enzymol.* 123:421-427.
- Sugimoto, H., K. Kusumi, Y. Tozawa, J. Yazaki, N. Kishimoto, S. Kikuchi, K. Iba. 2004. The virescent-2 mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant Cell Physiol.* 45:985-996.
- Walker, C.J. and R.D. Willows. 1997. Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem. J.* 327:321-333.
- Whittaker, R. H. and P. L. Marks. 1975. pp.55-118. In: Lieth, H. and R. H. Whittaker. (ed.) *Primary Productivity of the Biosphere*. Springer-Verlag, New York.
- Yang, C. M., J. C. Osterman, and J. P. Markwell. 1990. Temperature-sensitivity as a general phenomenon is a collection of chlorophyll-deficient mutants of sweetclover (*Melilotus alba*). *Biochem. Genet.* 28:31-40.
- Yang, C. M., J. C. Hsu, and Y. R. Chen. 1993. Light- and temperature- sensitivity of chlorophyll-deficient and virescent mutants. *Taiwania* 38:49-56.
- Yang, C. M., J. C. Hsu, and C. F. Shih. 1994. Response of chlorophyll a/b ratio in Yuan-Yang Lake bryophytes to the alteration of light intensity. *Proc. Nat. Sci. Counc. ROC, Part B, Life Sci.* 18:134-137.
- Yang C. M., J. C., Hsu, Y. K., Lu. 1995. Light-sensitivity of chlorophyll expression in the leaves of *Ficus microcarpa* cv. Golden-leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36:215-221.
- Yang, C. M., K. W. Chang, M. H. Yin, and H. M. Huang. 1998. Methods for the determination of the chlorophylls and their derivatives. *Taiwania* 43:116-122.
- Yang, C. M., C. N. Lee, and C. H. Chou. 2002. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:299-304.
- Yang, C. M., C. H. Chou, I. F. Chang, and S. J. Lin. 2003. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: (in press).
- Zhang, H.T., J. J. Li, J. H. Yoo, S. C. Yoo, S. H. Cho, H. J. Koh, H. S. Seo, N. C. Paek. 2006. Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol. Biol.* 62:325-337.

Study on the Chlorophyll Biosynthetic and Degradative Pathways in the Leaves of Paddy Rice¹

Zhi-Wei Yang², Wen-Dar Huang³, and Chi-Ming Yang⁴

Abstract

We examined the contents of chlorophyll (Chl), biosynthetic intermediates (protoporphyrin IX, PPIX; magnesium protoporphyrin IX, MGPP; protochlorophyllide, Pchlde), and degradative intermediates (chlorophyllide, Chlide; pheophytin, Phe; pheophorbide, Pho) in the leaves of rice with five different types of chlorophyll b-deficient or -lacking mutants during their growth and development. The levels of less polar (LP) intermediates such as Chl and Phe decreased with increasing growth stage, and the levels of more polar (MP) intermediates such as porphyrins (PPIX, MGPP, Pchlde), and Chlide were also decreased. The biosynthetic and degradative rate of Chl in rice variety Norin No. 8 was higher than that in tested rice mutants due to smaller amounts of Chl and intermediates. Chl→Phe→Pho was the major route of Chl degradation at vegetative stage in five rice lines, while Chl→Chlide→Pho was the minor route. When leaves were aging and senescent, Chl→Chlide→Pho was the major route, and Chl→Phe→Pho became the minor route of Chl degradation.

Keywords: Paddy Rice, Chlorophyll, Carotenoid, Biosynthesis, Degradation Intermediates

¹. Contribution No.437 from Taoyuan DARES, COA.

². Assistant Researcher (Corresponding author, zwyang@tydais.gov.tw) Taoyuan DARES, COA.

³. Assistant Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University.

⁴. Associate Research Fellow, Biodiversity Research Center, Academia Sinica.