

# 鵲豆耐高溫逆境種原篩選

花蓮區農業改良場

蔡秉芸

## 摘要

本次合作選擇 44 個亞蔬種原庫之鵲豆種原，並利用葉綠素螢光及細胞膜熱穩定性作為營養生長期之篩選指標，光合作用效率以熱處理與對照組之葉綠素螢光比例表示，並且以參試品系之平均表現 35%作為篩選門檻，而細胞膜熱穩定度則以相對傷害值顯示，以 50%作為篩選門檻，結果共有 6 個參試品系對熱具有耐性，然而葉綠素螢光及細胞膜熱穩定性之間並無相關性。

## 前言

鵲豆(*Lablab purpureus*)又稱為肉豆、扁豆或延籬豆，栽培上不僅可以將鮮莢及豆仁作為蔬菜使用，莖葉亦可作為綠肥、青刈飼料及覆蓋作物，可用於土壤保護及改良。數項研究已經顯示鵲豆具有耐酸、低氮肥以及耐乾旱的優良特性 (Mugwira & Haque, 1993; Robotham & Chapman, 2017)。全球暖化造成平均溫度與極端高溫都在上升，使作物生長面臨高溫逆境的挑戰(IPCC, 2014)，高溫造成退綠、生長遲緩、萎凋、組織壞死並造成作物減產，甚至無法生產。

在台灣東部，高溫限制鵲豆夏季生產，為促進夏季蔬菜穩定生產，耐熱品種為當前迫切需求，惟目前育種背景資訊不足，造成篩選合適的鵲豆種原困難，因此本研究目的即了解鵲豆於高溫逆境中的生理反應，並進一步篩選出適合的耐熱篩選生理指標，以加速育種進程。

本次與亞蔬合作利用細胞膜熱穩定性(Cell membrane stability, CMS)及葉綠素螢光指標  $F_v/F_m$ ，於苗期篩選鵲豆種原的耐熱性。高溫造成蛋白質變性、活性氧氧化物累積及增加細胞膜流動性，細胞膜熱穩定性已經被用於檢驗穀物、蔬菜、果樹及花卉作物 (Ahren & Ingram, 1988; Thiaw & Hall, 2004; Yeh & Hsu, 2004)，藉由測量葉片於高溫後電解質滲漏情況，能有效判斷耐熱性，耐熱品系在高溫中能維持較好的細胞選擇性通透能力，而維持較低的離子滲漏狀況，小麥、番茄及番椒皆已有使用細胞膜熱穩定性作為耐熱篩選的依據 (Blum & Ebercon, 1981; Camejo et al., 2005; Zhanget al., 2001)；而光合作用系統中，包含放氧複合體 (Oxygen-evolving complex; OEC)、ATP 生成與碳同化等三個步驟對高溫特別敏感，在輕微

升溫的狀況下，放氧複合體中的 D1 蛋白質易受活性氧化物破壞，同時修復路徑也會受到抑制 (Allakhverdiev et al., 2008)，核酮糖-1,5-雙磷酸羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase) 在高溫中與二氧化碳親合性降低，也會同時抑制光合作用效率。葉綠素螢光為一個非破壞性、高效率的光合作用效率測定指標，同時可以顯示作物光合作用系統二的及時狀況，在前人研究中以淨利用葉綠螢光確認玉米、番椒、菜豆的耐熱性(Sinasawat et al., 2004; Costa et al., 2003; Wang and Tseng, 2010)。

## 材料與方法

**實生苗準備：**本試驗測定 44 項亞蔬種原庫鵲豆品系(Table 1)，本次參試品系多來自於不同國家，以強化種原地理分佈多樣性，種子直播於裝有泥炭土及椰纖介質(沃鬆 1 號，大益農科，屏東)之三吋盆，栽培環境平均溫度為 27.0°C、光強為 16410 lux。

**細胞膜熱穩定度測量：**葉片樣品於植株第一對初生葉完全展開、第二節間尚未伸長時採第一對初生葉，每品系 3 重複，每個樣品以 6-mm 打洞器剪取 5 個葉圓片，並以去離子水小心清洗，避免外部物理傷害，將葉圓片置入含 1 毫升去離子水試管中，以鋁箔紙覆蓋試管口，放入循環式水浴槽處理 30°C 與 50°C 高溫 30 分鐘，處理結束後，加入 14 毫升室溫去離子水，於室溫靜置 12 小時，以電導度計 (CM31P portable electric conductivity meter, DKK-TOA Co., Tokyo)測定 30°C 處理電導度為 C1；50°C 處理電導度為 T1，之後放入滅菌釜以高溫 121°C 及高壓 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> 處理 20 分鐘，使細胞完全被破壞，試管取出後待溫度降至室溫，測定最後電導度(30°C 處理為 C2；50°C 處理為 T2)。利用下列公式，計算相對熱傷害值(relative injury, RI)： $RI(\%) = \{1 - [1 - (T1/T2)]/[1 - (C1/C2)]\} \times 100\%$ 。

**光合作用效率：**葉片樣品於植株第一對初生葉完全展開、第二節間尚未伸長時採第一對初生葉，每品系3重複，將葉片沿葉脈剪成兩半，分別放置於培養皿中，以石蠟膜密封，放入循環式水浴槽處理30°C與50°C高溫30分鐘，處理結束後等待樣品回復至室溫，以黑絨布覆蓋使葉片暗適應30分鐘以上，在黑絨布中以葉綠素螢光儀(MINI-PAM photosynthesis yield analyzer, Heinz Walz Co., Effeltrich)測定 PSII 光學反應最大螢光值(Fv/Fm)，利用下列公式，計算相對光合作用效率： $Relative\ photosynthesis\ efficiency\ (\%) = P50/P30 \times 100\%$ ，P表示Fv/Fm值，而50及30表示處理溫度。

**統計分析：**本試驗採完全逢機試驗設計，以SAS® 9.4 軟體進行統計分析，數據以Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ )檢定各處理間是否具顯著差異。

## 結果

**高溫逆境中細胞膜熱穩定性表現：**經 50°C 高溫處理，各品系鵲豆細胞膜相對傷害值表現約 30.3-82.4% (Figure 1, Table 2)，結果顯示細胞膜熱穩定性可偵測鵲豆品系間的耐熱性，若以相對傷害值 50%作為篩選門檻，各品系細胞膜相對傷害值低於 50%視為耐熱品系，可篩選出 12 個耐熱品系(Table 2)。

**高溫逆境中光合作用效率表現：**經 50°C 高溫處理，各品系鵲豆光合作用效率中維持在 19.9% -49.4% (Figure 2; Table 2)，若光合作用效率維持越高顯示該品系具較高耐之熱能力，本試驗以所有參試品系之光合作用效率表現平均 34.1%為篩選門檻，結果可篩選出 23 個耐熱品系(Table 2)。

**細胞膜熱穩定性及光合作用效率相關性分析：**將各品系鵲豆於高溫逆境中，細胞膜熱穩定性及光合作用效率表現進行相關性分析，以細胞膜相對傷害值 50%及光合作用效率表現 34.1%作為篩選耐熱品系門檻，其中有 15 個品系皆未達到兩個篩選門檻，而有 23 個品系通過其中一項門檻，同時通過 2 個篩選門檻僅有 6 個品系，由 Figure 3 可清楚看到細胞膜熱穩定性較高的品系，其在光合作用效率的表現並不一定較佳，而光合作用效率表現較好者，其細胞膜熱穩定性也未必較好，舉例來說，VI055928 (L39)在高溫逆境中光合作用效率能維持 49.9%，為所有品系中最佳狀態，然而相對傷害值卻高達 68.5%，明顯高於其他品系，顯示兩指標間並無相關性。

## 討論

細胞膜熱穩定度及葉綠素螢光皆常用於許多作物的耐熱性探測，然而本研究中兩者並無相關性，可能為品系間採取的耐熱生理路徑相異所導致，高溫中產生大量活性氧化物、蛋白質錯誤摺疊、酵素活性或親和性改變皆會影響細胞膜熱穩定度及葉綠素螢光，植物中耐熱機制包含熱休克蛋白、未摺疊蛋白質反應、活性氧化物清除劑等(Wahid *et al.*, 2007)。然而細胞膜上蛋白質通道及飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸及膽固醇等組成的改變，皆會影響細胞膜熱穩定度；另一方面，高溫

造成氣孔關閉、電子傳遞鏈失衡、核酮糖-1,5-雙磷酸羧化酶/加氧酶及其他酵素錯誤折疊，皆會影響光合作用效率(Crafts-Brandner & Law, 2000; Sinsawat et al., 2004)，進一步改變葉綠素螢光表現，基於本試驗中兩個耐熱指標所代表的可能為不同細胞部位破壞以及修復路徑，推論本次參試鵲豆品系對高溫耐受性應有數個機制共同作用。

而兩種指標的試驗數值在品系內的變異較品系間的變異大，可能是種原庫內收集品系大多為地方品種，品系內基因雜合度較高，致使表現差異較大，育種開始前應加強純化工作，另外細胞膜熱穩定度在甘藍及大豆研究中皆有較不敏感的狀況(Nyarko et al., 2008; Martineau et al, 1979)，前人研究也建議將各品系重複提高至六重複，試驗結果穩定較能有效提升。

本次試驗結果可應用於未來鵲豆耐熱選種，加速品種育成，促進轄區內原鄉地區特色作物發展，並穩定全球氣候變遷下作物穩定生產。

## 致謝

感謝亞蔬－世界蔬菜中心及農委會合作提供短期交流機會，另外也感謝徐泰鐵博士、van Zonneveld 博士於試驗中給予相當多的建議，並啟發我對試驗內容有更多思考，同時感謝 Jessica、Jenny、Shin-Yee、Eric、Mr. Huang、Aileen 以及許多無法一一提及的人，在台南的期間，不論在試驗上及生活上都給予我許多協助，最後特別感謝葉課長、千惠、中建以及其他許多同事，不在花蓮的這段期間協助我場內許多業務。

## 參考文獻

- Ahrens, M. J., & D. L. Ingram. 1988. Heat tolerance of citrus leaves. HortScience. 23:747-8.
- Allakhverdiev, S. I., V. D. Kreslavski, V. V. Klimov, D. A. Los, R. Carpentier & P. Mohanty. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. Photosynth. Res. 98(1-3): 541.
- Blum, A., & A. Ebercon. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat 1. Crop Sci. 21(1):43-47.

- Camejo, D., P. Rodríguez, M. A. Morales, J. M. Dell'Amico, A. Torrecillas & J. J. Alarcón. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *J. Plant Physiol.* 162(3):281-289.
- Costa, E. S., R. Bressan-Smith, J. G. Oliveira & E. Campostrini. 2003. Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica.* 41(1):77-82.
- IPCC. 2014. Intergovernmental panel on climate change. Climate change 2014: impacts, adaptation and vulnerability. Geneva.
- Krishnamurthy, L., P. M. Gaur, P. S. Basu, S. K. Chaturvedi, S. Tripathi, V. Vadez & A. Rathore. 2011. Large genetic variation for heat tolerance in the reference collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Plant Genet. Resour.* 9(1):59-69.
- Martineau, J. R., J. E. Specht, J. H. Williams & C. Y. Sullivan. 1979. Temperature tolerance in soybeans. I. evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.* 19(1):75-78.
- Mugwira, L. M., & I. Haque. 1993. Screening forage and browse legumes germplasm to nutrient stress: II. Tolerance of *Lablab purpureus* L. to acidity and low phosphorus in two acid soils. *J. Plant Nutr.* 16(1): 37-50.
- Nyarko, G., P. G. Alderson, J. Craigon, E. Murchie & D. L. Sparkes. 2008. Comparison of cell membrane thermostability and chlorophyll fluorescence parameters for the determination of heat tolerance in ten cabbage lines. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 83(5):678-682.
- Robotham, O. & M. Chapman. 2017. Population genetic analysis of hyacinth bean (*Lablab purpureus* (L.) Sweet, Leguminosae) indicates an East African origin and variation in drought tolerance. *Genet. Resour. Crop Evol.* 64(1):139-148.
- Sinsawat, V., J. Leipner, P. Stamp & Y. Fracheboud. 2004. Effect of heat stress on the photosynthetic apparatus in maize (*Zea mays* L.) grown at control or high temperature. *Environ. Exp. Bot.* 52(2):123-129.

- Crafts-Brandner, S. J. & R. D. Law. 2000. Effect of heat stress on the inhibition and recovery of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state. *Planta*. 212(1):67-74.
- Thiaw, S., & A. E Hall. 2004. Comparison of selection for either leaf-electrolyte-leakage or pod set in enhancing heat tolerance and grain yield of cowpea. *Field Crops Res.* 86(2-3):239-253.
- Wahid, A. & A. Shabbir. 2005. Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by presowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regul.* 46(2):133-141.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf & M. R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61(3):199-223.
- Wang, J. & M. Tseng. 2010. Heat tolerance evaluation of sweet pepper by chlorophyll fluorescence assessment and effective pollination. *J. Taiwan Agri. Res.* 59(4):237-248.
- Ye, C., M. A. Argayoso, E. D. Redoña, S. N. Sierra, M. A. Laza, C. J. Dilla, Y. Mo, M.J. Thomson, J. Chin, C.B. Delaviña & G. Q. Diaz. 2012. Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. *Plant Breeding.* 131(1):33-41.
- Yeh, D. M. & P. Y. Hsu, 2004. Heat tolerance in English ivy as measured by an electrolyte leakage technique. *J.Hort. Sci. Biotech.* 79(2):298-302.
- Zhang, Z., R. Li & J. Wang 2001. Effects of oxalate treatment on the membrane permeability and calcium distribution in pepper leaves under heat stress. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 27(2):109-113.

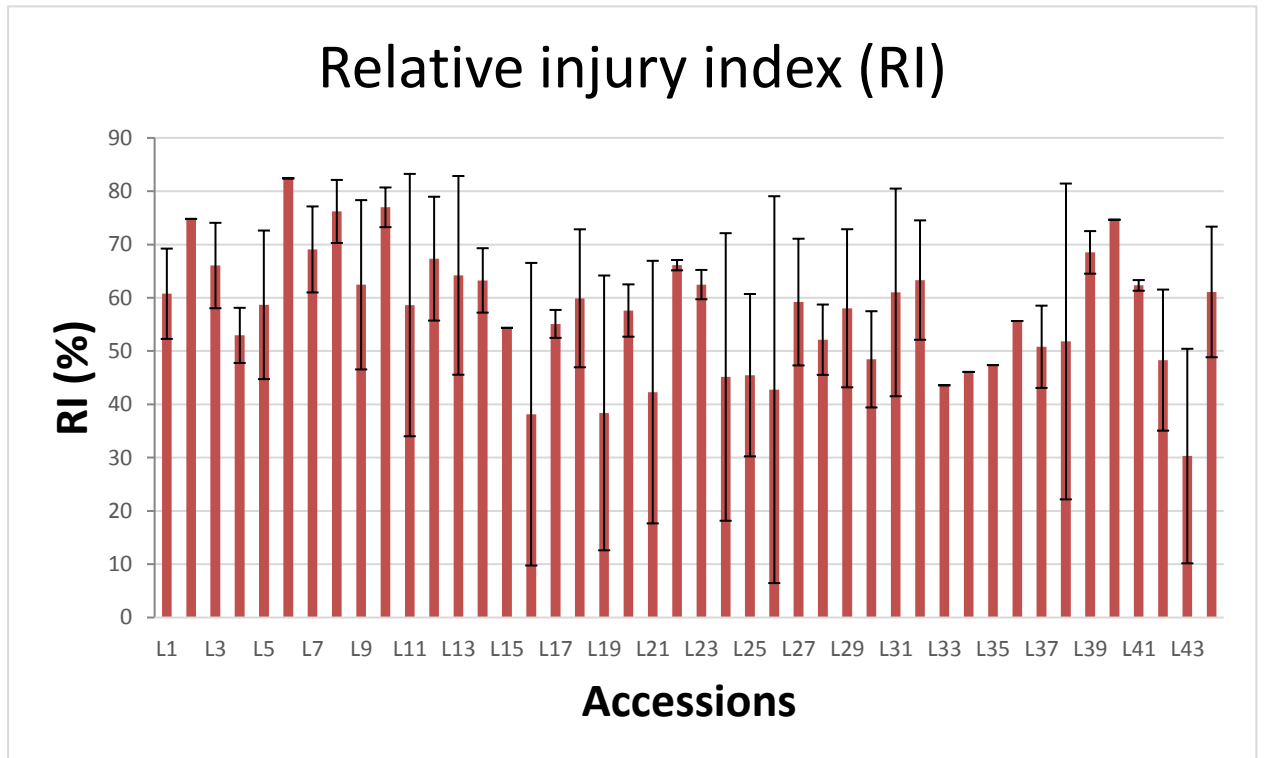


Fig. 1 Relative injury index of lablab primary leaves treated under 50°C for 30 min. Accessions with low values show high heat stress tolerance following this method.

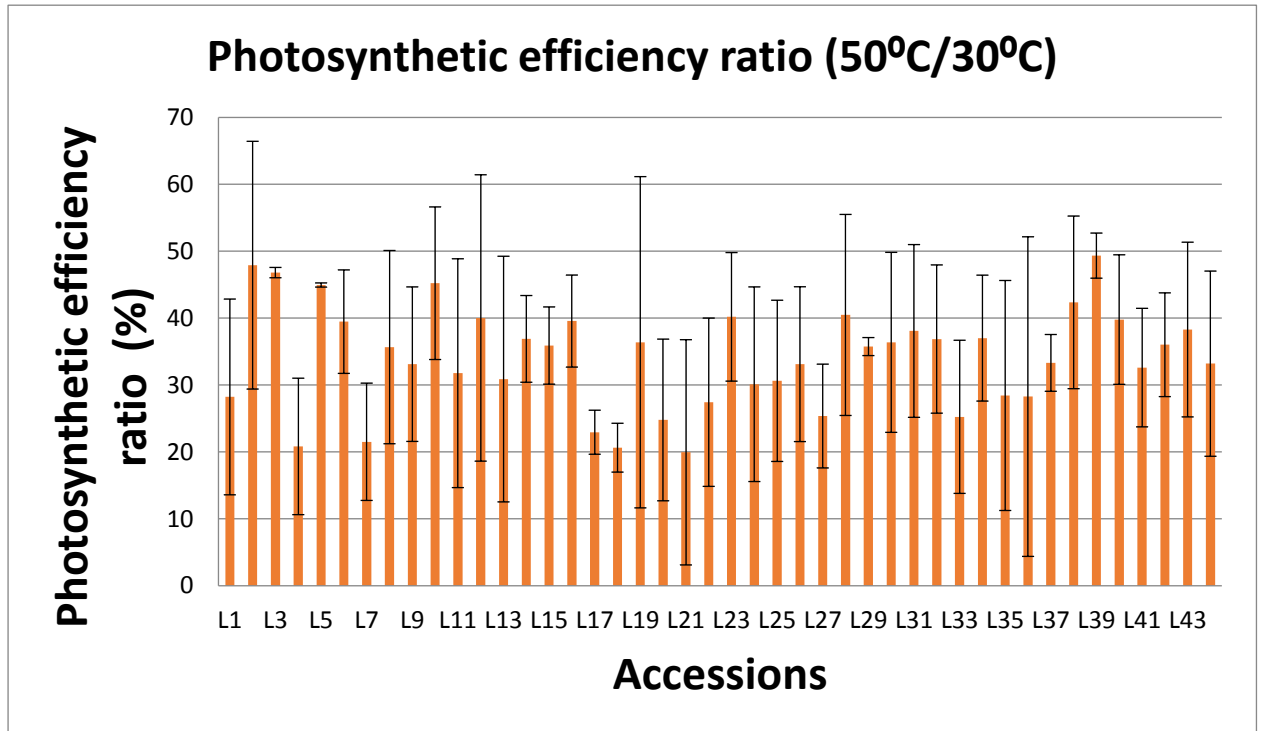


Figure. 2 Photosynthetic efficiency ratio of lablab primary leaves treated under 50°C for 30 min. Accessions with high values show high heat stress tolerance following this method.



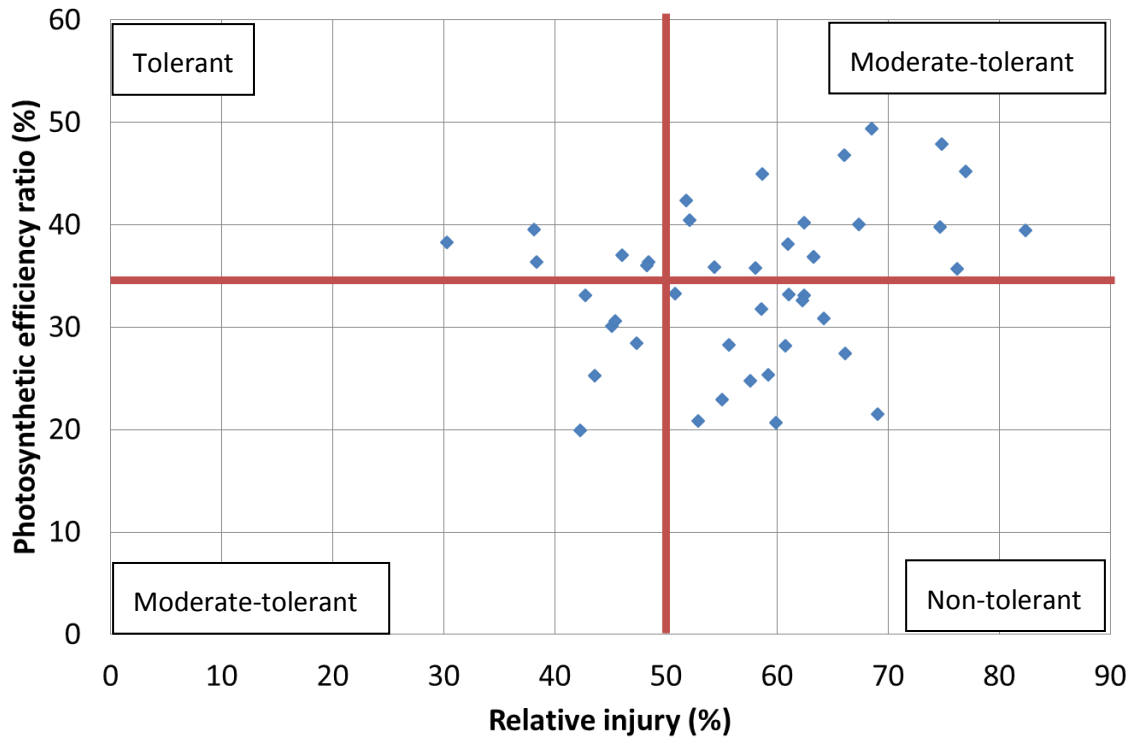


Fig. 3 Relationship between Cell Membrane Stability (CMS) and photosynthesis efficiency. The accessions in the upper-left square are heat tolerant according to these two methods. The accessions in the upper-right and lower-left square are heat tolerant according to one of the two methods. Accessions in the lower-right square are susceptible to heat according to the two methods.

Table 1 Passport data of 44 accessions of lablab from WorldVeg gene bank.

Test code	Accession No.	Cultivar	Collected Nation
L1	VI033686	KHALO SIMI	Nepal
L2	VI033689	SIMBI	Nepal
L3	VI033696	BARAMASI SIMI	Nepal
L4	VI033742	PARDA	Philippines
L5	VI034562		Malaysia
L6	VI036241	BATAO	Philippines
L7	VI036243	PUTI	Philippines
L8	VI039981	THUA PAEP SON	Thailand
L9	VI040057	THUA PAEP	Thailand
L10	VI040619	THUAPAEB	Thailand
L11	VI040869	THUA-RHA	Thailand
L12	VI043319		Indonesia
L13	VI043321		Indonesia
L14	VI046639	DAU VAN	Viet Nam
L15	VI047215-A	MAK PEP-LE	Lao People's Democratic Republic
L16	VI047701	SHEEM	Bangladesh
L17	VI047741	SHIM	Bangladesh
L18	VI047742	SHIM (SITAKUNDU TYPE)	Bangladesh
L19	VI047925	CHAPTA SHEEM	Bangladesh
L20	VI048064	KARTIKA SHEEM	Bangladesh
L21	VI048216	CHURI CHAI/ BATA CHAI/ LAL CHAI	Bangladesh
L22	VI048224	JAT CHAI	Bangladesh
L23	VI048353	DAU VAN DO	Viet Nam
L24	VI048595		Taiwan
L25	VI049394	THAU PAB	Thailand
L26	VI054751	PD-12	India
L27	VI054753	PER-12	India
L28	VI054754	V-10	India

L29	VI054755	IL-41089	India
L30	VI054852	MAK PEP	Lao People's Democratic Republic
L31	VI055040		Malaysia
L32	VI055218	KACANG SEPAT HIJAU	Malaysia
L33	VI055306		Australia
L34	VI055307-A		Australia
L35	VI055308		Ethiopia
L36	VI055312-A		Australia
L37	VI055316		Ethiopia
L38	VI055603	THUA PAEH	Lao People's Democratic Republic
L39	VI055928	MAK PEP	Lao People's Democratic Republic
L40	VI056060		Cambodia
L41	VI056099		Cambodia
L42	VI056369	VYUN	Uzbekistan
L43	VI056723		Ethiopia
L44	VI057087		Cambodia

Table 2 Mean values and selection of the 44 lablab accessions

Test code	Accession No.	Relative injury index (%)	Photosynthetic efficiency ratio (%)	Heat tolerance selection
L1	VI033686	60.8 <sup>abcde</sup> gh	28.2 <sup>abcde</sup> f	Non-tolerant
L2	VI033689	74.8 <sup>abc</sup>	47.9 <sup>def</sup>	Moderate tolerant
L3	VI033696	66.1 <sup>abcde</sup> fg	46.8 <sup>cde</sup> f	Moderate tolerant
L4	VI033742	52.9 <sup>cde</sup> ghi	20.8 <sup>abc</sup>	Non-tolerant
L5	VI034562	58.7 <sup>abcde</sup> ghi	45.0 <sup>abcde</sup> f	Moderate tolerant
L6	VI036241	82.4 <sup>a</sup>	39.5 <sup>abcde</sup> f	Moderate tolerant
L7	VI036243	69.1 <sup>abcde</sup>	21.5 <sup>ab</sup>	Non-tolerant
L8	VI039981	76.2 <sup>abc</sup>	35.7 <sup>abcde</sup> f	Moderate tolerant
L9	VI040057	62.4 <sup>abcde</sup> gh	33.1 <sup>abcde</sup> f	Non-tolerant
L10	VI040619	77.0 <sup>ab</sup>	45.2 <sup>ef</sup>	Moderate tolerant
L11	VI040869	58.6 <sup>abcde</sup> ghi	31.8 <sup>abcde</sup> f	Non-tolerant
L12	VI043319	67.3 <sup>abcde</sup> f	40.0 <sup>abcde</sup> f	Moderate tolerant
L13	VI043321	64.2 <sup>abcde</sup> gh	30.9 <sup>abcde</sup>	Non-tolerant
L14	VI046639	63.3 <sup>abcde</sup> gh	36.9 <sup>abcde</sup> f	Moderate tolerant
L15	VI047215-A	54.4 <sup>bcde</sup> ghi	35.9 <sup>bcde</sup> f	Moderate tolerant
L16	VI047701	38.2 <sup>fghi</sup>	39.6 <sup>abcde</sup> f	Tolerant
L17	VI047741	55.1 <sup>bcde</sup> ghi	23.0 <sup>abcde</sup>	Non-tolerant
L18	VI047742	59.9 <sup>abcde</sup> gh	20.6 <sup>a</sup>	Non-tolerant
L19	VI047925	38.4 <sup>hi</sup>	36.4 <sup>abcde</sup> f	Tolerant

L20	VI048064	57.6 <sup> abcdefghi</sup>	24.8 <sup> abc</sup>	Non-tolerant
L21	VI048216	42.3 <sup> ghi</sup>	19.9 <sup> abcd</sup>	Moderate tolerant
L22	VI048224	66.1 <sup> abcdefg</sup>	27.4 <sup> abcdef</sup>	Non-tolerant
L23	VI048353	62.5 <sup> abcdefgh</sup>	40.2 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L24	VI048595	45.1 <sup> defghi</sup>	30.1 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L25	VI049394	45.5 <sup> defghi</sup>	30.6 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L26	VI054751	42.8 <sup> defghi</sup>	33.1 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L27	VI054753	59.2 <sup> abcdefgh</sup>	25.4 <sup> abcdef</sup>	Non-tolerant
L28	VI054754	52.1 <sup> cdefghi</sup>	40.5 <sup> f</sup>	Moderate tolerant
L29	VI054755	58.0 <sup> abcdefghi</sup>	35.8 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L30	VI054852	48.5 <sup> cdefghi</sup>	36.4 <sup> abcdef</sup>	Tolerant
L31	VI055040	61.0 <sup> bcdefghi</sup>	38.1 <sup> bcdef</sup>	Moderate tolerant
L32	VI055218	63.3 <sup> abcdefgh</sup>	36.9 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L33	VI055306	43.6 <sup> defghi</sup>	25.3 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L34	VI055307-A	46.1 <sup> defghi</sup>	37.0 <sup> abcdef</sup>	Tolerant
L35	VI055308	47.4 <sup> defghi</sup>	28.4 <sup> abcdef</sup>	Moderate tolerant
L36	VI055312-A	55.6 <sup> bcdefghi</sup>	28.3 <sup> bcdef</sup>	Non-tolerant
L37	VI055316	50.8 <sup> bcdefghi</sup>	33.3 <sup> bcdef</sup>	Non-tolerant
L38	VI055603	51.8 <sup> bcdefghi</sup>	42.4 <sup> bcdef</sup>	Moderate tolerant
L39	VI055928	68.5 <sup> abcde</sup>	49.4 <sup> ef</sup>	Moderate tolerant
L40	VI056060	74.6 <sup> abcd</sup>	39.8 <sup> bcdef</sup>	Moderate tolerant
L41	VI056099	62.3 <sup> abcdefgh</sup>	32.6 <sup> abcdef</sup>	Non-tolerant

L42	VI056369	48.3 <sup>cdefghi</sup>	36.0 <sup>abcdef</sup>	Tolerant
L43	VI056723	30.3 <sup>i</sup>	38.3 <sup>abcdef</sup>	Tolerant
L44	VI057087	61.1 <sup>abcdefgh</sup>	33.2 <sup>abcdef</sup>	Non-tolerant

未來合作建議：

1. 持續強化與亞蔬交流，亞蔬中心為國際型的研究中心，其研究視野宏觀，關心全球蔬菜穩定供應及營養均衡，與亞蔬中心交流不僅在研究思考能有更多面相的發展，在南向政策之下，亞蔬對於南向國家甚至非洲市場及需求均有深入的了解，為我國農業走向國際不可或缺之夥伴，同時提供研究人員更國際化的發展方向。
2. 與種原庫合作，亞蔬中心種原庫收集來自全球的蔬菜種原，可利用的育種材料豐富，近來更進一步進行原生蔬菜的種原分析，以及綠豆的核心種原建立，未來相關育種者或相關研究人員有需求，建議可與種原庫洽商合作。
3. 邀請亞蔬研究人員至各試驗改良場所進行交流，在交流期間，亞蔬研究人員提及有意願與臺灣試驗改良場所進行研究合作，但對各試驗改良場所的研究方向、區域特以及相關的資源並不了解，有意願至各試驗改良場所進行短期交流，強化雙邊合作。