



植物對環境逆境之調控與應用

農業藥物毒物試驗所 蔣永正

一．前言

作物生育過程的每一階段都受到環境的影響與控制。植物和動物不同，無法自由移動尋找合適的環境，面對會影響生長或改變生理特性的逆境時，為了生存必須發展出適應環境的能力。環境中如日照強度、溫度、雨量、鹽分濃度、重金屬、除草劑及空氣、水等污染引起之異常，往往會促使植體內自由基及活性氧的產生。一般氧氣在參與細胞新陳代謝的過程中，容易被活化成為具強氧化力的活性氧。正常情況下，植物體內活性氧的產生和清除是處於動態平衡狀態。但逆境會導致抗氧化系統對活性氧的清除能力下降，發生氧化傷害，造成代謝功能的不可修復和細胞死亡。本文即針對植物的抗氧化系統，對環境逆境產生之活性氧化物的反應差異，藉以探討植物對逆境的調適作用及應用之可能性。

二．植物體活性氧化物（reactive oxygen species, ROS）的發生與作用

氧氣為植物生命活動中不可缺少的重要分子。一般在基底態之氧分子活性低，對有機物不會造成危害，但是活性氧化物則對細胞有毒害作用。當葉綠體光反應中心截取光能後，正常狀況下會產生氧氣及還原態的 NADPH，提供 CO₂ 固定所需之基質，但當 PS I 還原端之電子被帶到氧分子上，取代原來正常還原

NADP⁺ 的路徑，則會產生活性氧 O_2^- 並在超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）的歧化作用（dismutation）下轉變成另一個活性氧化物 H₂O₂。所以 SOD 既是活性氧的清除者又是製造者。OH⁻ 則由 H₂O₂ 與 Fe⁺² 的 Fenton reaction 所產生，為生物體系內最強之氧化物。

此外當葉綠素分子照光成為激態時，若將能量轉移至氧分子，則會形成另一種具高活性及擴散能力之 O_1 也可與有機分子作用，破壞光合作用相關胞器之膜

系，尤其當 CO₂ 同化速率降低時， O_1 的生成速率也愈高。因此葉綠體為活性氧化物產生之最主要的植物組織。其他如粒線體中呼吸作用的電子傳遞，過氧化體內光呼吸作用產生 H₂O₂ 等，亦為活性氧化物發生的場合。

植物細胞內許多正常進行的代謝反應；如光合作用及呼吸作用，均會產生不同種類的活性氧化物（表 1）；非生物性逆境引起之代謝路徑中，也會如位於過氧化體內之 glycolate oxidase，在光呼吸過程中產生 H₂O₂。此外 NADPH oxidase、amine oxidase 及 cell wall-bound peroxidases，亦為促使活性氧化物產生的途徑。

植物在正常生長狀況下，細胞中活性氧化物的產生量很低（ O_2^- 在葉綠體中的產生速率為 $240 \mu M s^{-1}$ ， H_2O_2 到達平衡的濃度為 $0.5 \mu M$ ），環境逆境會促使高濃度之活性氧化物產生（ O_2^- 高達 $240-720 \mu M s^{-1}$ ， H_2O_2 為 $5-15 \mu M s^{-1}$ ），包括乾旱、鹽害、寒害、熱休克、重金屬、紫外光、 O_3 及 SO_2 等空氣污染、機械傷害、營養失調、病原菌攻擊及光害等逆境，均會造成活性氧化物的過量產生。如 二氧化硫在葉綠體內形成亞硫酸鹽後，進一步氧化為硫酸鹽時，也會產生 O_2^- 。

O_2^- 、 H_2O_2 及 OH^- 都具有極強的反應活性；爭奪 PS I 末端電子，降低 NADPH 的生成，影響 CO_2 的固定； H_2O_2 非為自由基，但會參與細胞內許多氧化還原反應，在膜或水溶性區間可快速擴散，低濃度下即會導致敏感酵素的活化，但因為較其他過氧化物穩定，所以整體而言毒性較低。 OH^- 在細胞內可以和任何生物分子作用，雖然因此限制了其在細胞內的擴散及移動，但因為具有高度的反應活性，幾乎沒有特定的清除者。不過有報導提出，位於植物細胞壁之多醣類代謝作用似有清除 OH^- 之相關功能。

活性氧化物導致細胞死亡的途徑為膜脂的過氧化、蛋白質氧化、酵素活性抑制及 DNA 與 RNA 受損。但逆境期間促使活性氧化物產生，雖然對細胞造成威脅，卻也具有啟動逆境防禦系統的訊息傳導（signal transduction）功能；如活化細胞的死亡（programmed cell death, PCD）機制，即由過氧化逆境誘導細胞局部死亡。活性氧化物若被視作細胞逆境的監測指標時，其在細胞內的含量則需嚴格控制，因為在本身有毒但又具有參與訊息傳導功能的雙重角色下，需有適合之機制來調控細胞內的濃度。除了能夠微調活性氧化物至低量以達到訊息傳導的目的，又能夠將超量之活性氧化物解毒，以延續生物在逆境中之存活。

三．植物對氧化逆境之防禦系統

植物體清除活性氧的保護系統又稱為抗氧化系統，包括抗氧化酵素及非酵素型抗氧化劑（表 2），以應付具擴散性、水溶性及可與各種生物分子反應之活性氧化物，避免發生使活性物種毒性加強的連鎖反應。

（一）抗氧化酵素 清除系統

在 酵素抗氧化系統中 包括對活性氧直接作用的超氧歧化酶（SOD）、過氧化氫酶（catalase, CAT）、過氧化酶（peroxidase, POD），以及保持抗氧化物質還原性的 ascorbate-glutathione cycle 中的抗壞血酸過氧化酶（ascorbate peroxidase, APX）、穀胱苷肽還原酶（glutathione

reductase, GR)、及單脫氫抗壞血酸還原酶 (monodehydroascorbate reductase, MDHAR) 等。

1. 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

主要的作用是将 O_2^- 轉換成 H_2O_2 ，為防禦系統的第一線，進行之歧化作用會被金屬離子所催化。具有 Mn-SOD、Fe-SOD 及 Cu/Zn-SOD 三種同功酶，分別位於粒線體、葉綠體及細胞質，且均由核基因所控制。在菸草葉片中的 SOD 同功酶形式受發育階段的調控，幼葉中以 Cu/Zn-SOD 較多，活性隨葉

齡增加而下降；老葉中主要為 Fe-SOD 和 Mn-SOD。SOD 的活性由 O_2^- 和 H_2O_2 的濃度決定。逆境下細胞中的活性氧分子會升高，SOD 活性的表現也會增加。SOD 在不同逆境下的調控及反應有差別，顯示與植體對逆境的忍受性有關。

2. 過氧化氫酶 (catalase, CAT) 與過氧化酶 (peroxidase, POD)

CAT 對 H_2O_2 具專一性，可直接將其轉變為 H_2O ，對氧化逆境有極佳之保護作用。主要存在於過氧化體中，負責清除過氧化體中產生的 H_2O_2 。乙醛酸體中也發現有 CAT 的存在，主要是清除光呼吸過程或脂肪酸 β - 氧化反應形成的 H_2O_2 。由於 H_2O_2 可直接跨膜擴散，其他部分產生的 H_2O_2 也可擴散到過氧化

體中被 CAT 分解，與 SOD 協力清除植體內潛在危害的 O_2^- 和 H_2O_2 ，將 OH^- 發生的機率降至最低。

POD 廣泛存在於植物體內的不同組織，屬活性較高的誘導酶，能夠反應植物的代謝狀況和對環境的適應性。POD 具有雙重的作用特性，在逆境或衰老初期的表現為清除 H_2O_2 ，達到保護細胞的功能。但在逆境或衰老後期，則參與活性氧的生成、葉綠素的降解，引發膜脂過氧化作用，加速細胞的衰老死亡，成為植物的衰老指標。

3. 抗壞血酸過氧化酶 (ascorbate peroxidase, APX)、穀胱苷肽還原酶

(glutathione reductase, GR)、及單脫氫抗壞血酸還原酶

(monodehydroascorbate reductase, MDHAR) APX、GR 及

MDHAR 為葉綠體內 ascorbate-glutathione cycle 內的主要酵素。APX 為此循環的第一個酵素，可將 H_2O_2 還原成水，同時氧化 ascorbate 成為單脫氫抗壞血酸 (monodehydroxyascorbate, MDA)，MDA 與 ferredoxins 的非酵素反應，或利用 NADPH 在 MDAR 催化下可再還原成 ascorbate。

APX 在葉綠體內具有與葉綠體基質或類囊膜結合的兩種型式，另外還有細胞質同功酶。葉綠體內清除活性氧化物的作用主要發生在類囊膜表面，接近 PS I，以防止活性氧化物逃脫或互相反應，為防禦的第二道防線，以保護 Calvin cycle 中的敏感酵素受到攻擊。

GR 則以 NADPH 作為電子授與者，將 GSSG 還原成 GSH，完成了 ascorbate-glutathione cycle 的反應。GR 活性 80% 都在葉綠體內，粒線體及 cytosol 中也有部分同功酶。GR 及 APX 對逆境反應的活性變化頗分歧，與植物種類及活性氧化物來源都有關係。

細胞內 SOD 及 APX 或 CAT 間的平衡，可決定 O_2^- 及 H_2O_2 的濃度，此種平衡也包括金屬離子的隔絕，防止 Fenton reaction 的發生及生成 OH^- 。此外由 APX 及 CAT 與 H_2O_2 的親和力高低可知：APX (μM) 應負責活性氧化物訊息傳遞之微細調節，CAT (mM) 則負責逆境下移除過量產生之活性氧化物。

(二) 抗氧化劑 清除系統

主要指抗壞血酸 (ascorbate, ASA)、類胡蘿蔔素 (carotenoids) 及一些含硫基的低分子化合物，如還原型 穀胱苷肽 (reduced glutathione, GSH) 等，它們通過不同途徑直接或間接地將活性氧清除。

1. 抗壞血酸 (ascorbate, ASA)

ASA 可作為 APX 的反應基質，清除葉綠體內的 H_2O_2 ，同時在 類囊膜表面可保護或再生氧化態之 carotenes 及 tocopherols。但濃度過高會將 Fe^{+3} 還原成 Fe^{+2} ，反而造成 OH^- 的產生。

ASA 存在於葉綠體基質中，是 O_2^- 和 OH^- 的有效清除劑，同時也是的 淬滅劑 (quencher)。ASA 可以清除膜脂過氧化過程中產生的 多聚不飽和脂肪酸 (PUFA) 自由基。它不僅作為 APX 的反應基質，還可以當作抗氧化劑直接清除活性氧。ASA 可還原 O_2^- ，清除 OH^- ，淬滅 O_2^- ，歧化 H_2O_2 ，還可再生 tocopherol。由於 ASA 具有多種抗氧化功能，當 ASA 含量降低時，顯示植物抗氧化能力的整體衰退。

2. 類胡蘿蔔素 (carotenoids)

類胡蘿蔔素 會消除葉綠素的激化狀態及照光後產生之 O_2^- ，免除脂質的過氧化作用；激化之 carotene 則將能量傳遞至其他的天線色素，或以熱的型式消散而回到穩定的基底態。

類胡蘿蔔素存在於葉綠體內，一方面阻止激發態葉綠素分子的激發能從反應中心向外傳遞；另一方面，它也保護葉綠素分子免於遭受光氧化傷害。類胡蘿蔔素共有 α -carotene、 β -carotene 及葉黃素三種形式，以 β -carotene 含量最

高，為 $O_2^{\cdot -}$ 最有效的淬滅劑。但 β -carotene 的抗氧化作用受氧濃度的影響，低氧下有良好的抗氧化作用，高氧下則會轉化成自由基的形式，加速氧化的進程。

3. 還原型 穀胱苷肽 (reduced glutathione, GSH)

GSH 可有效還原或解毒許多氧化物種，本身可利用 NAD (P) H 再生，對與抗氧化系統有關之 ascorbate 或 tocopherol 的再循環利用十分重要，通常在逆境下 glutathione pools 有減少的趨勢。GSH 不僅參與 ascorbate 的再生 (ascorbate-glutathione cycle)，同時還可與 $O_2^{\cdot -}$ 和 OH^{\cdot} 等活性氧化物作用以保護蛋白質。

一般認為氧化型和還原型穀胱苷肽的總量下降，但 GSH/GSSG 比值高時，抗氧化保護作用較佳。但也有研究指出，GSH 大量增加，反而可能造成更大程度的氧化逆境。

GSH 可與包括 OH^{\cdot} 在內的多種自由基直接發生反應，並可將有機自由基 R 還原為 RH。還原型的穀胱苷肽可將系統中產生的雙脫氫抗壞血酸 (DHA) 還原成 ASA，GSSG 在 GR 作用下又還原成 GSH，GSH 還能與 α -tocopherol 協同作用，清除細胞內累積的自由基。

Ascorbate 及 glutathione 等抗氧化物在葉綠體內的濃度很高，兩者在細胞內的含量比為決定活性氧化物是否需要清除的依據。不同抗氧化物的氧化態與還原態比值 (如 GSSG/GSH)，也能夠作為調節活性氧化物清除機制之訊息。

4. 生育酚 (tocopherol)

最主要的 isomer 為 α -tocopherol，在終結自由基之連鎖反應上扮演重要角色。葉綠體膜系的脂質不飽和作用也需要大量的 α -tocopherol 參與。 α -tocopherol 是膜脂過氧化的有效抑制劑，其含量的增加，可能表示植物膜系對大量產生自由基的保護反應。

此外，苯甲酸、異丙醇可直接清除 OH^{\cdot} ，多酚、單甯與黃酮類等二次代謝物可直接清除 $O_2^{\cdot -}$ ，沒食子酸丙酯清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力與 SOD 十分接近。鋅含量高時，芥菜和綠豆體內自由基的產生增加，同時脯氨酸 (proline) 也大量累積。在分離的粒線體中，證實脯氨酸可減少高光照所誘導的自由基發生量。推測脯氨酸的累積與自由基的清除有關。其他如山梨醇 (sorbitol) 與甘露醇 (mannitol) 等滲透調節物質也具有清除活性氧，抑制膜脂過氧化的能力。

針對細胞能夠感應不同胞器發生之氧化逆境，及逆境訊息傳遞過程的研究，發現一種在各類逆境下釋出之荷爾蒙 (phytohormones)，可能擔負此種生理上的調節作用，即荷爾蒙在細胞面臨氧化還原的變化時，率先啟動防禦系統，將訊息傳達至不同的組織，且維持一段可供防禦機制啟動的較長期間。

四．植物 抗氧化系統對逆境之反應

抗氧化酵素及抗氧化劑分子在細胞內都有一定的含量水準，以應付正常代謝作用產生之活性物，或是突發逆境所誘導的毒害。以下就乾旱、重金屬及除草劑為例，說明 逆境下之 植物 抗氧化酵素或抗氧化分子的變化反應。

(一) 乾旱

棉花及 甘薯 等作物在輕微缺水下，SOD 活性上升，但 超過一定程度，活性則下降。不同品種之 SOD 活性對 乾旱 的敏感程度有差別。耐旱性越強之雲薑品種，隨乾旱時間延長，SOD 活性降低較慢。玉米不同生育期遭受到 乾旱時，SOD 活性均降低。

水稻不同品種之 POD 及 CAT 活性對乾旱的反應不同。CAT 活性均在輕度缺水時升高，重度乾旱時又下降，不同品種間之變化幅度不同。甘薯不論品種耐旱與否，隨缺水程度加深，POD 活性下降，CAT 活性呈升高趨勢。冬小麥在土壤缺水初期，劍葉的 AP 和 GR 活性均呈現先上升、後下降的變化趨勢，抗旱性強的品種 AP 活性變化與此相同，但 GR 活性卻持續上升。顯示在乾旱缺水下，一些植物葉綠體中的 H₂O₂ 是經由抗氧化酵素反應清除的，另一些植物中的 H₂O₂ 則可能是由其他途徑予以清除。

綜合上述試驗 結果，植物抗氧化酵素對乾旱逆境的反應，可能由其本身所感受到的水分缺少程度所啟動。通常發生輕中度之缺水逆境時，抗氧化酵素的活性增加，活性氧造成的傷害得以緩解。

小麥在輕度缺水時，耐旱品種的 ASA 和 GSH 含量變化不大。但在嚴重乾旱下，兩者含量會迅速下降，恢復供水後耐旱品種雖有所回升，但與對照處理有明顯差異。ASA 含量的下降，會直接導致活性氧清除能力的降低。以 30%PEG 模擬嚴重乾旱之環境條件，造成水稻膜脂過氧化及葉片白化現象，同時葉片中 ASA、GSH、 α -tocopherol 及 β - carotene 等抗氧化劑均顯著減少。但乾旱對豌豆的 ASA 含量無明顯影響，卻引起 β - carotene 含量增加 18%， α -tocopherol 增加 66%。

缺水逆境下 ASA 含量的下降，可能與 APX 活性升高有關。輕度乾旱下 ascorbate-glutathione cycle 可有效地清除 H₂O₂，保持 ASA 與 DHA 含量不變，GSH/GSSH 比值升高，因而提高植物對乾旱逆境的適應能力。

(二) 重金屬

O₂ α -tocopherol 是膜脂過氧化的有效抑制劑，其含量的增加，可能表示植物膜系對大量產生的自由基的保護反應。

O₂ α -tocopherol 是膜脂過氧化的有效抑制劑，其含量的增加，可能表示植物膜系對大量產生的自由基的保護反應。

土壤中重金屬 的污染往往不只一種，對植物造成的傷害亦非單一的結果。重金屬 (Hg、Cd、Pb、Cr 等) 是對植物生育具顯著毒性的污染物質，會引

起抗氧化系統的變化。低濃度重金屬逆境下，植物體內的活性氧酵素清除系統被誘

導而加快速率，SOD 活性逐漸增加，用以清除重金屬逆境引起過多的 O_2 ，但是當濃度繼續增加時，植物體中的增加超過了正常歧化能力的極限，造成細胞膜系及酵素系統的破壞，反而抑制 SOD 的活性提高。

銅離子會誘導脂質氧化酶 (lipoxigenase) 的活化，啟動脂質過氧化，減少葉綠素和血紅素 heme 含量，造成葉片白化現象。營養液中 Cd 含量在 1 ppm 時，能顯著增加白菜 POD、CAT 及 APX 活性，當增加至 10 ppm 時卻會明顯降低 SOD、POD、CAT 及 APX 活性，促使脫氫抗壞血酸還原酶和穀胱苷肽還原酶活性增加。

鉛對小麥 POD 具有啟動效應，且隨逆境程度的增加，效應越明顯。對 SOD 和 CAT 在逆境初期的表現為啟動效應，後期隨程度加重則為抑制效應，顯示 POD 在鉛引起之抗逆境反應中扮演關鍵角色。

(三) 除草劑

聯吡啶類 (bipyridinium) 除草劑巴拉刈光照下在葉綠體內，經由連鎖反應會不斷的產生 O_2 ，再由 SOD 的作用生成 H_2O_2 ， H_2O_2 則由 APX 及 GR 在 ascorbate-glutathione cycle 內催化 ascorbate 及 glutathione 的氧化及再還原反應，變成 H_2O 移出。在水稻切離葉片內發現，巴拉刈引起脂質過氧化毒害時，會伴隨 APX、GR 及 CAT 活性的降低，SOD 活性則在毒害發生至某一程度才會降低，但細胞內 H_2O_2 含量則無明顯變化，推測可能用為參與 Fenton reaction 產生 OH^- ；此外 GSH 等自由基清除劑以外施方式，可明顯抑制巴拉刈引起之脂質過氧化作用，及增加 CAT 及 POD 等抗氧化酵素活性。因此抗氧化酵素活性及擔任自由基清除劑之抗氧化物，與巴拉刈導致之脂質過氧化毒害程度有關。

巴拉刈處理抗、感野苘蒿 (*Conyza sumatrensis*) 後，以葉綠素螢光 Fv/Fm 達 50% 抑制計算其抗感比值，當抗感比大時，SOD 及 GR 活性均增高，抗感比相差小時，兩者的酵素活性也相當。巴拉刈處理之抗、感加拿大蓬 (*C. canadensis*) 植株，於噴施後 2 小時，抗性株內 APX 活性下降，24 小時後開始回升；GR 及 SOD 活性分別增加約 20-25% 及 58%；配合葉綠素螢光 Fv/Fm 計算之抗感比卻在 450-1000 範圍；顯示抗氧化酵素活性的增加程度與抗感比間似無明顯相關，即此種與生俱來之保護機制似不足以消除連續產生的過氧化物。從上述不同試驗結果顯示；細胞抗氧化酵素活性及抗氧化物含量，與巴拉刈在植體造成之氧化毒害程度有關，但是否為構成抗性的主要機制，尚須進行系統研究以提供足以研判之完整數據。

五．結語

植物對逆境的抗性與特定酵素或同功酶的表現與啟動有關。由植物抗氧化酵素活性或抗氧化劑含量對逆境壓力反應的變化，可應用為栽培環境中異常因子

發生的偵測指標。但因為逆境類別、強度與曝露期長短等的不同，及作物品種、生育期與酵素類型的差異，導致植物對逆境壓力的生理反應極為複雜，造成試驗結果的分歧及缺乏可供應用的一致性結論。有關植物抗氧化系統對逆境壓力的反應，雖已累積可觀的研究資料，但針對抗氧化酵素在逆境壓力中活性變化的機制、作物品種間反應差異的原因、抗氧化劑及滲透調節物質的作用途徑與關鍵步驟等尚須深入探討，才可進一步利用為提高作物抗性能力的準確依據。

表 1 植體內發生的活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS)

表一 植體內發生的活性氧化物 (Reactive oxygen species, ROS)

產生機制	存在之胞器位置	ROS 種類
Photosynthesis: electron transport PS I or PS II	Chloroplast	O_2^-
Respiration: electron transport	Mitochondria	O_2^-
Glycolate oxidase	Peroxisome	H_2O_2
Excited chlorophyll	Chloroplast	O_2^-
NADPH oxidase	Plasma membrane	O_2^-
Fatty acid β - oxidation	Peroxisome	H_2O_2
Oxalate oxidase	Apoplast	H_2O_2
Xanthine oxidase	Peroxisome	O_2^-
Peroxidase, Mn^{2+} and NADH	Cell wall	H_2O_2
Amine oxidase	Apoplast	H_2O_2

資料來源：Mittler, R. 2002

表 2 植體內存在之抗氧化酵素及抗氧化物

表二 植體內存在之抗氧化酵素及抗氧化物

酵素或抗氧化物	存在之胞器位置	作用之 ROS 種類
Superoxide dismutase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	O_2^-
Ascorbate peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2
Catalase	Peroxisome	H_2O_2
Glutathione peroxidase	Cytosol	H_2O_2 , ROOH
Peroxidase	Cell wall, Cytosol, Vacuole	H_2O_2
Thioredoxin peroxidase	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria	H_2O_2
Ascorbic acid	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2
Glutathione	Chloroplast, Cytosol, Mitochondria, Peroxisome, Apoplast	H_2O_2 , O_2^-
α - Tocopherol	Membrane	ROOH, O_2^-
carotenoids	Chloroplast	O_2^-

資料來源：Mittler, R. 2002

