

ISSN : 1015-5864

行政院農業委員會高雄區農業改良場

研究彙報

第 22 卷 第 1 期

中華民國 100 年 12 月

目 錄

專題論述

1. 蓮霧及赤楠屬植物生殖及育種研究
.....陳思如 1
2. 玉米抗玉米穗蟲之機制與育種選拔
.....黃祥益 12

研究報告

3. 無機鹽對藥用植物藥樺試管苗生長之影響
.....黃柄龍 22

行 政 院
農 業 委 員 會

高雄區農業改良場 編 印

屏東縣長治鄉德和村德和路 2-6 號
中華民國 100 年 12 月

行政院農業委員會高雄區農業改良場

研究彙報

第 22 卷 第 1 期

中華民國 100 年 12 月



行政院
農業委員會 高雄區農業改良場 編印

屏東縣長治鄉德和村德和路 2-6 號
中華民國 100 年 12 月

**RESEARCH BULLETIN OF KAOHSIUNG DISTRICT
AGRICULTURAL RESEARCH AND EXTENSION STATION**

Vol.22, No.1

Dec. 2011

Contents

1. A Survey of the Reproductive and Breeding Biology of Wax Apple
and *Syzygium* Species
..... Szu-Ju Chen11
2. Mechanism and Selection of Maize Resistance to Corn Earworm
..... Hsiang-Yi Huang21
3. Effects of Salinity Stress on Growth of *Pluchea indica* (L.) Less.
Seedlings *In Vitro* Culture Ping-Lung Huang32

Published by

Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station

**2-6, Dehe Rd., Dehe Village, Changjhih Township,
Pingtung County 90846, Taiwan (R.O.C.)**

蓮霧及赤楠屬植物生殖及育種研究

陳思如¹

摘要

蓮霧(*Syzygium samarangenes* Merr. et Perry)為台灣重要熱帶果樹之一，於其他東南亞國家亦有商業栽培，為從根本改善其栽培上易裂果及高溫著色不良等問題，期藉由雜交育種育成低裂果率、果色深紅且口感佳之品種，本文彙整蓮霧同屬(赤楠屬)植物生殖特性之研究報告，供建構蓮霧育種技術之參考。赤楠屬植物花形相似，但物種間及品種間結實特性不同，部分物種之種子具有多胚性，且具有無融合生殖的能力，部分則未經授粉無法著果。蓮霧品種間結實特性亦有差異，部分品種未經授粉可單為結果，部分品種不易結子，無子果實除了來自單為結果，也源於授粉後種子敗育。於2008年2月中旬在屏東採集‘粉紅種’蓮霧新鮮花粉，其花粉無活力，且授粉後無法結子，同年3月下旬溫度回升之後所綻放之花朵則可產生具萌發能力之花粉，且授粉於‘Thub Thim Chan’可雜交結子。

關鍵字：多胚性、花粉活力、種子敗育、單為結果、無融合生殖

前言

蓮霧(*Syzygium samarangenes* Merr. et Perry)為桃金娘科(Myrtaceae)赤楠屬之熱帶果樹，原產於馬來西亞及印度安曼群島，於印尼、泰國、台灣及馬來西亞等熱帶地區皆有大規模商業栽培^(16, 21)，全台栽培面積約為5,634公頃，總產量為59,675公噸，以屏東縣為主要產區，約占總栽培面積的79% (99年農業統計年報)。台灣蓮霧主要栽培品種為‘粉紅種’(或稱‘南洋種’)及其芽條變異所選育之大果品系(一般稱之為‘大果種’)，但兩者在栽培上皆有易裂果的問題，造成果實易失水、腐敗及外觀不良，此外，高溫環境不利蓮霧果皮花青素的累積⁽⁵⁾，因此夏季蓮霧果色常較淡，不符合市場期望。為能穩定生產、提高收益，產業上亟需育成具有低裂果率、高溫期果色深紅之特性、且果肉緻密、口感脆甜之改良品種。

近年來自國外引進推廣栽培之泰國種‘Thub Thim Chan’及‘印尼大果種’為較具經濟生產價值之新興品種，但其品種特性皆仍有改良空間。‘Thub Thim Chan’具有低裂果率及夏季果色鮮紅之特性，但果肉纖維較粗、口感較差，

¹高雄區農業改良場助理研究員

未熟採收有澀味，且耐寒性不佳，低溫易造成嚴重落葉，此外，‘Thub Thim Chan’枝梢生長速度快，較不易受到蟲類為害，但枝條較脆，易受風害而斷枝或落葉。而‘印尼大果種’果型碩大、具蒲桃香氣、果肉細緻多汁、酸度較低，但果色偏綠、紅色淡，經產期調節生產之冬果色澤較深紅，但果皮易發生紅斑及壞疽，6月生產之夏果則罹病率高，因此適合生產的季節為2月至5月。為改善目前栽培品種之缺點，除了改進栽培技術以外，利用雜交育種結合不同品種之優良特性，為突破目前栽培技術瓶頸之治本方法。

蓮霧同屬植物種質資源

蓮霧各栽培國家之栽培種不同，且不同栽培種間之果形及果色具有高度歧異性，台灣主要栽培品種為‘南洋種’及其大果品系，皆屬果形鐘形、果皮粉紅色之品種，台南新市生產之‘新市白’蓮霧，果皮為淡綠至白色，亦有綠色長形果品種之商業生產，印尼爪哇為蓮霧原生地，擁有最豐富的品種，當地廣泛栽培的品種包括‘Citra’、‘Cincalo’、‘Lilin Merah’、‘Camplong’、‘Kaget’和‘Semarang Prada’；而泰國主要栽培品種為‘Phet Ban Plew’(錐形、綠果)、‘Phet Sai Rung’(鐘形、綠果、粉色條斑)、‘Thun Klao’(長形、綠果)、‘Phet Jin Da’(長形、綠果、粉色條斑)、‘Number One’(鐘形、綠-粉色)、‘Phet Sam Phran’(鐘形、綠-紅色)、‘Dang Indo’(長錐形、深紅色)、‘Phet Nam Pueng’(長鐘形、紅色)及‘Thub Thim Chan’(長形、深紅色)；馬來西亞主要栽培品種為‘Pale Green’、‘Dark Red’、‘Light Red’和‘Green’⁽²¹⁾，越南的栽培種亦有各種果形、大小及紅或綠之果色的差異⁽¹⁰⁾，各栽培種之果形由橢圓形、扁圓形、短錐形、錐形、鐘形、長鐘形等，果皮顏色由乳白、白、淺綠、綠、綠-粉、粉紅、紅至深紅色，果肉色澤白、綠或紅，新葉顏色有黃綠、粉紅、紫紅色或褐色，果實大小、口感及香氣亦有明顯差異，因此在育種上有豐富變異之材料可供做親本進行雜交組合，後裔族群的性狀變化亦值得期待。

蓮霧同屬(赤楠屬)的經濟作物與野生種質資源亦十分豐富，其花朵及果實形態具有相似性，因此其花朵發育及生殖之特性值得參考，以建立蓮霧雜交育種技術。赤楠屬經濟作物包括蒲桃[*Syzygium jambos* (L.) Alston]、馬來蒲桃[*S. malaccense*(L.) Merr. et L. M. Perry](果樹)⁽³⁾、肯氏蒲桃(*S. cumini*)、(觀賞樹木)、水蓮霧[*S. aqueum*(Alston) Merr. et L. M. Perry]、番櫻桃(riberry, lilly pilly, *S. luehmannii*)(觀果庭園樹)及丁香(*S. aromaticum*)(香料)等(表1)。其中丁香^(17,18)、蓮霧⁽⁴⁾、番櫻桃⁽²⁰⁾、同屬野生種*S. megacarpum*及*S. formosum*⁽⁸⁾與澳洲雨林樹種*S. cormiflorum*⁽⁹⁾之開花及生殖特性之研究曾被發表。

表 1. 赤楠屬(*Syzygium*)經濟作物種質資源Table 1. Commercial species germplasm of *Syzygium*

學名	英文名	中文名	應用
<i>S. samarangensis</i>	Wax apple	蓮霧	果樹
<i>S. javanicum</i>			
<i>S. malaccensis</i>	Malay rose apple	馬來蒲桃	果樹
<i>S. jambos</i>	Jambo	蒲桃	果樹
<i>S. pycnanthum</i>	Wild Rose apple	野蓮霧	觀賞樹木
<i>S. aquem</i>	Water rose apple	水蓮霧	觀賞樹木
<i>S. cumini</i>	Java plum	肯氏蒲桃、董寶蓮	觀賞樹木
<i>S. luehmannii</i>	Riberry, Small-leaf Lilly Pilly	番櫻桃	觀賞樹木
<i>S. paniculatum</i>	Magenta Lilly Pilly	錐花蒲桃、小彈珠	觀賞樹木
<i>S. aromaticum</i>	Clove	丁香	香料

赤楠屬植物之花器形態

赤楠屬植物花朵形態為兩性花、花萼筒為球形或略為延長、萼片 4 或 5 片、花瓣 4 或 5 枚，無雄蕊或雄蕊多數、花絲為細絲狀、合生於一個小窪、大多具有花絲早期脫落(caducous)的特性，花朵開放時花絲展開如粉撲狀、花藥分布於一個平面上、縱向開裂，花托中央伸出絲狀花柱 1 枚，柱頭小，子房下位、中軸胎座、分為 2 到 3 室、每室中有多個胚珠；果實為漿果、種子少、球形或不規則扁狀壓縮、種皮鬆散或緊黏於果皮、具有明顯的子葉⁽⁷⁾。赤楠屬不同種植物間開花習性略有差異，但都有雄蕊早衰的現象。澳洲雨林樹種 *S. cormiflorum* 開花時間不分日夜，花藥於開花後隨即開裂，而開花後 2.5 天雄蕊即脫落，柱頭則於開花後快速生長至與花絲等長，並停止生長，在開花後 4-5 天雄蕊脫落之後，花柱才延長到最大長度，於第 7.5 天褐化，而第 27.2 天雌蕊脫落⁽⁹⁾。

赤楠屬植物自然及人工授粉習性

花蜜為赤楠屬植物的特徵，因此其自然授粉媒介以動物為主，如東半球地區(Old World)的赤楠屬植物利用花蜜吸引鳥類及哺乳動物傳粉⁽¹⁴⁾；‘See-nak’蓮霧、蒲桃及同屬野生種 *S. megacarpum* 及 *S. formosum* 僅有少數的日間訪花動物參與其授粉，應為常自交作物，其中以黃腹花蜜鳥(*Nectarinia jugularis*)為主，其次依序為蜜蜂(*Apis cerana*)、螞蟻(*Oecophylla smaragdina*)及其他兩種未鑑識之物種)及小灰蝶(*Lycaenidae*)⁽⁸⁾。雖然大多數的研究都認為赤楠屬植物需靠蟲媒授粉，但根據 Reddi and Rangaiah



圖 1. 赤楠屬(*Syzygium*)植物花朵形態類似，花絲合生於一個小窪，花朵開放時花絲展開如粉撲狀‘粉紅種’蓮霧(左)及蒲桃(右)之花朵；。

Fig. 1. Similar flower morphology appears in *Syzygium* species. Filaments are congregated around a small cave in the central of receptacle, and the flower shape looks like a powder puff as blooming. Flower of ‘Pink’ wax apple and *S. jambos*.

(1999-2000)之研究，肯氏蒲桃雖有多種訪花昆蟲，但若以網袋避免昆蟲授粉，僅靠風力授粉仍可獲得相同的結子率，顯示在其研究所調查的環境中，肯氏蒲桃並不需依賴蟲媒授粉⁽¹⁹⁾。

而澳洲雨林樹種*S. cormiflorum*為異花授粉植物(xenogamous)，但仍有部分自交親合性，自花授粉成功率為 10-32%，同株異花授粉成功率為 16-60%，族群內異花授粉成功率為 58-82%，而族群間異花授粉成功率為 80-92%⁽⁹⁾，顯示異交較自交容易產生種子，Arathi等(1996)也觀察到肯氏蒲桃在授粉後有部分胚敗育(abortion)的現象，顯示授粉後可能有篩選的機制⁽⁶⁾。

花粉及柱頭的親合力隨開花階段而不同，需掌握適當之授粉時機。番櫻桃在花被剛打開時柱頭尚無接受力，需至花柱伸直以後才能觀察到柱頭上的花粉萌發，至開花後第 2 天花絲展開時，柱頭接受力才達到最高⁽²⁰⁾，而肯氏蒲桃之柱頭於雄蕊凋落後 24 小時才具有接受力⁽¹⁹⁾。桑吉巴(Zanzibar type)丁香開花後花藥隨即開裂，花粉活力及柱頭接受力(receptivity)亦於開花後 2 天達到最高(圖 2)，花絲於開花後 2 天即脫落，開花 3 天後柱頭出現阻塞，接著萎凋、褐化，並在 4 天後脫落⁽¹⁷⁾，因此丁香的人工授粉需於開花前 2 天進行除雄及隔離，除雄 4 天後以開花後 48 小時的花粉進行人工授粉，人工授粉的花朵約有 50%可著果，約 25%可結子⁽¹⁸⁾。由此可知，開花當天並不是花粉活力及柱頭親合力最旺盛的時候，但即使於活力最旺盛的情形下進行授粉，結子率仍十分有限，顯示還有其他影響結子的因子。

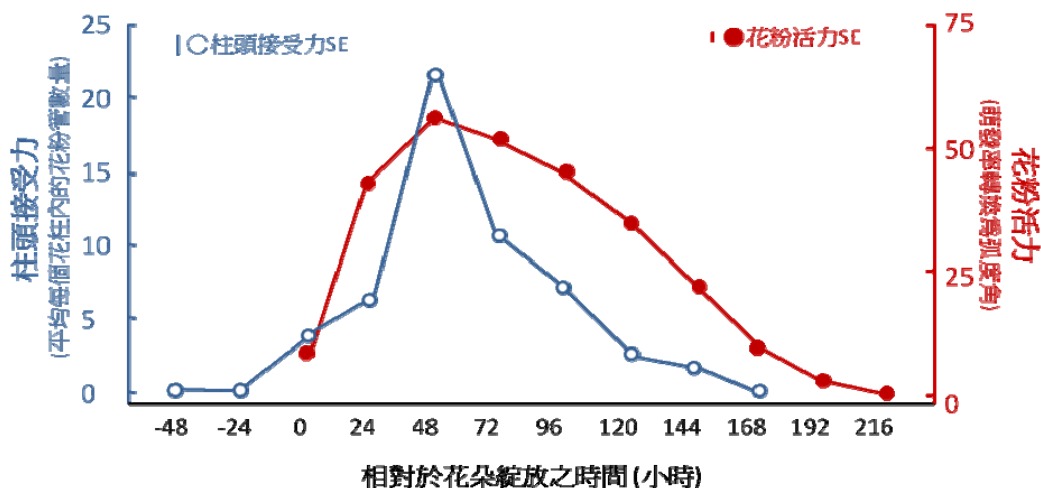


圖 2. 丁香開花後花粉活力(-●-)及柱頭接受力(-○-)隨時間之變化(改編自 Pool and Bermawie, 1986)。

Fig. 2. Pollen viability(-●-) and stigma(-○-) receptivity with respect to time of anthesis. Means are for five flower from each of five trees. Pollen viability means have been transformed from percentage of angle (modified from Pool and Bermawie, 1986).

赤楠屬植物結實特性

赤楠屬部分植物之種子具有多胚性(polyembryony)，主要是來自無融合生殖(apomixis)的無性胚(asexual embryo)⁽¹⁴⁾。澳洲瀕危雨林樹種錐花蒲桃(*S. paniculatum*)每個種子內可能有 1 到 9 個胚不等，透過微衛星標記分析其遺傳特性顯示多為無性胚，甚至有性胚在種子發育過程即因受到無性胚的增殖競爭而敗育，因此野生族群不僅個體間歧異度低，且異質結合性低^(22,23)。此外，蒲桃、馬來蒲桃、*S. siamense*及印度保育樹種*S. mundagom*也都曾被發表可產生多胚性種子，具有由珠心或珠被產生的無性胚^(8,12,14.)。但番櫻桃、澳洲雨林樹*S. cormiflorum*於蕾期除雄後進行套袋隔離，若不進行授粉，皆未曾觀察到產生有種子的果實^(9,20)，而丁香授粉未成功的花朵在幼果期即自然落果⁽¹⁸⁾，亦未調查到無性種子的產生。

番櫻桃果實中常有 1 顆種子，但亦有少子或無子品系如‘Glover’s Seedless’及‘Vic’s Choice’，自然情形下約有 60-80%的無子率，種子多經由自交授粉而產生，人工授以自交花粉後可觀察到花粉管在花柱中生長，但著果後卻無種子產生，可能是由於授精前障礙或胚珠敗育⁽²⁰⁾。赤楠屬的*S. cormiflorum*及肯氏蒲桃授粉後胚珠敗育的現象曾被發表，開放授粉的*S.*

*cormiflorum*花朵中有超過四分之一發生自發性敗育，並有 11.14%發生胚珠腐爛，可能授粉後有淘汰自交胚之篩選機制，以供應其他來自異交授粉之種子足夠的養分⁽⁹⁾。

授粉後胚珠的敗育(abortion)可能是受到荷爾蒙的調控，肯氏蒲桃子房內有 30 個以上的胚珠，在授粉後第 2 天有 8-10 個受精的胚珠開始發育，但最後常只有 1 個能順利發育成種子，顯示受精後的胚珠間有淘汰的機制；將肯氏蒲桃之胚珠進行離體培養，於培養基中外加發育中的胚珠的萃取物，則胚珠敗育的比率較高，若外加敗育的胚珠或胎座的萃取物，則胚珠敗育比率與不添加的對照組無顯著差異，而培養基中添加乙烯作用抑制劑-硫代硫酸銀(silver thiosulfate, STS)，則可有效降低因外加萃取物所造成之胚珠敗育比率⁽⁶⁾。Krishnamurthy等(1997)進一步分析肯氏蒲桃優勢種子萃取物，結果指出造成種子敗育的物質應是一種分子量小、具有高度擴散性的吡啶類化合物，其作用方式是抑制次要的種子吸收養分⁽¹³⁾。

蓮霧人工雜交授粉結實之研究

蓮霧產期調節之冬果經常無子，但夏果常有 1-2 顆種子，瞭解其果實結子之條件，有助於雜交育種工作之進行。蓮霧單為結果(parthenocarpic)與結子特性依品種而異，根據Chantaranothai和Parnell(1994)年的研究，泰國'See-nak'蓮霧除雄後套袋隔離仍可產生無子果實及少數有子果實，而同屬的蒲桃可產生少量無子果實，但*S. megacarpum*及*S. formosun*則無法未經授粉而結果，顯示蓮霧較其他同屬植物更具單為結果的能力，且有機會產生無性種子⁽⁸⁾。越南南部栽培的綠果蓮霧品系未經授粉仍可結成無子果實，但長紅品系未經授粉則無法著果，顯示此綠果品系具有單為結果能力，但未出現無融合生殖之現象，以自交花粉進行人工授粉可提高著果率及有子果實的數量，但無子果實的數量也顯著增加，顯示無子蓮霧一部分是來自單為結果，另一部分則來自授粉後種子敗育的果實⁽¹⁰⁾。至於台灣生產的冬果蓮霧無子現象，是由於花粉活力低落造成的單為結果？或是產期調節後果實發育期間氣候條件不利於胚的發育而造成種子敗育所致？值得進一步探討。

王(1988)指出，粉紅種蓮霧開花時若遇溫度高於 25℃，花粉可發芽並經授精作用產生種子，因此在 4 到 6 月正期果常有種子，冬果發育期間的低溫不利於花粉萌發，是造成冬果無子的原因⁽²⁾。但溫度不僅為花粉管萌發之影響因子，亦早在花粉發育期間即決定了是否產生具有活力的花粉。‘肯辛頓’芒果(*Mangifera indica* L. cv. 'Kensington')花粉發育適溫為 15-33℃，發育過程中若遇夜溫低於 10℃，則產生的花粉活力低落，易造成著果率下降，尤以

小孢子母細胞減數分裂至液胞期(vacuolated stage)對低溫較敏感⁽¹¹⁾。蓮霧與芒果皆屬熱帶果樹，因此生產冬果時，花粉活力低落亦可能是造成不易結子的主要原因。

筆者曾採集 2008 年 2 月中旬綻放之‘粉紅種’蓮霧花粉，以離體萌發方式進行活力檢定，花粉均無法萌發，且授粉後無法結子，根據高雄區農業改良場氣象站於 2008 年 1-3 月間紀錄之氣溫資料，當年於 1 月中旬後氣溫開始下降，於 2 月 3 日至 21 日期間之當日最低溫皆低於 15°C，其中以 2 月 9 日及 11、12 日之當日最低溫接近 10°C，分別為 9.9、10.2 及 10.5°C，而 3 月以後氣溫逐漸回升，3 月 7 日以後未再出現低於 15°C 之氣溫(圖 3)。然而，筆者於 3 月下旬採集之‘粉紅種’蓮霧花粉則有萌發能力，以此花粉雜交授粉於預先除雄之‘Thub Thim Chan’蓮霧花朵柱頭，於授粉隔日取花柱壓片，以 aniline blue 染色進行螢光顯微鏡觀察，可觀察到花粉管在花柱內往胚珠方向生長，同批授粉之果實於 5 月中至下旬採收，每顆果實結子 0 至 3 顆不等，人工授以具有活力之花粉卻仍產生部分無子果實，不排除受精前障礙或種子敗育的現象亦是造成蓮霧無子的原因之一。

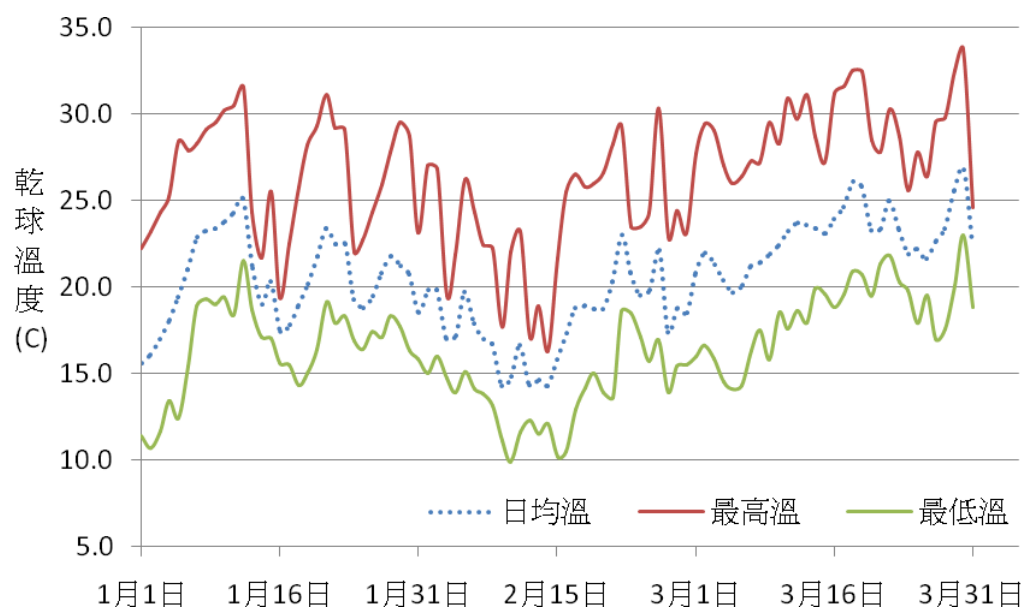


圖 3. 2008 年 1-3 月間高雄區農業改良場(屏東縣長治鄉)日均溫變化

Fig. 3. Daily average temperature from January to March in 2008, monitored in Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station (Changjhih Township, Pingtung County, Taiwan).

結論

目前台灣蓮霧生產仍有栽培成本高、易裂果及品質不穩定等問題；近年來已陸續引進國外栽培品種，增加品種多樣性；根據產地氣候與土質的差異、生產目標及預定產期的不同，可選擇較適當的品種進行栽培。引進之品種雖改善部分產業問題，但亦產生新的栽培問題，如耐寒性、適口性不佳、著色不如市場期望或生理障礙等，除了需要根據不同品種建立適當的栽培模式之外，仍應透過雜交育種來重組各品種之性狀，以篩選適合本土栽培之新品種，以根本解決產業問題，並降低生產成本、穩定生產，並提高農友收益。

關於蓮霧育種及有性生殖之相關研究十分有限，為能掌握授粉時機及有效雜交結子之方法，進而建立高效率之蓮霧雜交育種技術，本文藉由田間觀察及彙整相關研究報告，以瞭解蓮霧生殖之特性。蓮霧不同栽培種間之果實性狀及葉形、葉色等具有高度多樣性，正如Ikeda(1979)即針對越南南部蓮霧栽培品系進行調查，可依據果色、果形及大小分類為 14 群，而不同品種間結實特性亦有差異，部分品系具有無子或少子特性，有的則多數果實具有種子，有的品系具有單為結果的能力，有的則無⁽¹⁰⁾，而廖(2006)亦指出品種間雜交結子率有高低之差⁽⁴⁾。顯示蓮霧品種間除了果實形質特性多樣化之外，其結實特性亦有相當的差異，其遺傳組成應有高度的歧異性。

目前蓮霧育種之目標為育成低裂果率、大果、果色深紅且口感優良的新品種，以改善目前南洋種及大果品系裂果率高及著色不穩定的問題，為配合市場對於高優質果品之定義，也需要選育果型較大的品種。引進推廣栽培之‘Thub Thim Chan’具有裂果率低、果色深紅、著色穩定之特性，而‘印尼大果種’裂果率低且果形碩大，若能利用雜交育種將此二品種之優勢導入口感較佳之傳統品種，則有機會獲得更具市場競爭力之新品種。此外，利用蓮霧種原性狀高歧異度之特性，亦有機會育成特殊、多元之品種，以拓展新市場。除了建立品種間雜交授粉之技術外，未來在性狀遺傳特性之分析及實生苗選拔方面，亦值得深入探討，以擬定親本選擇及品系篩選之適當策略。

果樹育種耗費時間、人力及空間等資源甚鉅，因此建立高效率之雜交授粉技術為蓮霧育種首要工作，以因應大規模的育種工作之執行。透過參考赤楠屬各種作物之生殖特性，可套用於蓮霧生殖特性之調查研究，瞭解適當的除雄、授粉、花粉採集之時機與方法，有助於建構蓮霧雜交授粉之流程，以精簡育種工作之人力及物力資源，並加速新品種之育成。

參考文獻

1. 王德男、徐秀鳳. 1988. Auxin 對蓮霧新梢生長與果實品質之影響. 中國園藝. 34:283-292.
2. 王德男. 1988. 植物生長調節劑在蓮霧栽培上之應用. 植物生長調節劑在蓮霧栽培上之應用研討會專輯. p253-265.
3. 康有德. 2006. 水果世界. 國家圖書館出版. 臺灣臺北市.p217-219.
4. 廖一彰. 2006. 蓮霧品種間開花、果實品質及實生變異. 國立屏東科技大學農園生產系碩士論文. 71pp.
5. 潘曉華. 2002. 溫度對蓮霧果實特徵與生理的影響. 國立屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文. 118pp.
6. Arathi, H. S., K. N. Ganeshiah, R. Uma Shaanker, and S. G. Hegde. 1996. Factors affecting embryo abortion in *Syzygium cuminii* (L.) Skeels (Myrtaceae). Int. J. Plant Sci. 157(1):49-52.
7. Chang, C.E. 1994. Myrtaceae. In: Huang, T. C. et al (eds.) Flora of Taiwan. 2nd. ed. Vol. III p.890. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei.
8. Chantaranonthai, P. and Parnell, J. A. N. 1994. The breeding biology of some Thai *Syzygium* species. Trop. Ecol. 35(2):199-208.
9. Crome, F. H. J. and A. K. Irvine. 1986. "Two Bob Each Way": The pollination and breeding system of the Australian rain forest tree *Syzygium cormiflorum* (Myrtaceae). Biotropica. 18(2): 115-125.
10. Ikeda, M. 1979. Studies on fruit characteristics and seedless fruit formation of Semarang rose apple, *Syzygium javanicum* Merr. & Perry, in south Vietnam. Mem. Fac. Agr. Kagoshima Uni. 15:55-62.
11. Issarakraisila, M. and J. A. Considine. 1994. Effect of temperature on pollen viability in mango cv. 'Kensington'. Ann. Bot. 73:231-240.
12. Jose, P. A., N. Mohanan, and A. Hussain. 2009. Occurrence of twin seedlings in *Humboldtia vahliana* Wight and *Syzygium mundagam* (Bourd.) Chithra – Two endemic trees of Southern Western Ghats. Indian Forester. 135(2):290-292.
13. Krishnamurthy, K. S., R. U. Shaanker, and K. N. Ganeshiah. 1997. Seed abortion in an animal dispersed species, *Syzygium cuminii* (L.) Skeels (Myrtaceae): The chemical basis. Curr. Sci. 73(10):869-873.

14. Lughadha E. N. and C. Proença. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 83:480-503.
15. Mudiana, D. and E. Ariyanti. 2010. Flower and fruit development of *Syzygium pycnanthum* Merr. & L. M. Perry. *Biodiversitas.* 11(3):124-128.
16. Nakasone, H. Y. and P. E. Robert. 1998. Tropical fruits. Biddles Ltd., UK.
17. Pool, P. A. and N. Bermawie. 1986. Floral biology in the Zanzibar type clove (*Syzygium aromaticum*) in Indonesia. *Euphytica* 35(1):217-223.
18. Pool, P. A. and N. Bermawie. 1987. Procedure for artificial cross pollination in clove (*Syzygium aromaticum*). *Euphytica* 36(2):479-482.
19. Reddi, E.U.B., and K. Rangaiah. 1999. Breeding systems and pollination agents of the Indian Blackberry, *Syzygium cuminii* (L.) skeels (Myrtaceae). *J. Palynol.* 35/36:117-128.
20. Sanewski, G.M. 2010. Understanding the cropping behavior of riberry (*Syzygium luehmannii*). Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 28pp
21. Shü, Z.H., Z. Meon, R. Tirtawinata, and C. Thanarut. 2008. Wax apple production in selected tropical asian countries. *Acta Hort.* 773:101-164.
22. Thurlby, K.A.G., W.B. Sherwin, M. Rossetto, and P.G. Wilson. 2007. Reproductive biology of the Magenta Lily Pilly (*Syzygium paniculatum*) and its implications for conservation. The final report on the Australian Floral Foundation funded project. 32pp.
23. Thurlby, K. A. G., C. Connelly, P.G. Wilson, and M. Rossetto. 2011. Development of microsatellite loci for *Syzygium paniculatum* (Myrtaceae), a rare polyembryonic rainforest tree. *Conservation Genet. Resour.* 3:205-208.

玉米抗玉米穗蟲之機制與育種選拔

黃祥益¹

摘要

玉米穗蟲 (*Helicoverpa zea* (Boddie), corn earworm) 為鱗翅目 (Lepidoptera)，夜蛾科 (Noctuidae) 昆蟲，是玉米的主要害蟲之一，對玉米生產的經濟危害非常大。在美國，每年因玉米穗蟲所引起之玉米生產損失估計約佔 2.5%，而甜玉米則高達 50%。玉米對玉米穗蟲之抗性是由玉米絲狀花柱 (silk) 中所產生的類黃酮化合物 C-glycosyl flavone 使幼蟲在啃食絲狀花柱之後生長受到抑制甚至死亡。在抗性品種的絲狀花柱中主要被分離出的類黃酮化合物有 maysin、apimaysin 及 methoxymaysin 等 3 種。其中最重要的是 maysin，經由餵食絲狀花柱發現 maysin 濃度與玉米穗蟲幼蟲體重呈現明顯的負相關。C-glycosyl flavone 合成是經由類花青素/類黃酮合成路徑 (phenylpropanoid / flavonoid pathway) 的分支路徑而得。其表現受到多個數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 的調控。這些 QTL 中以第 1 條染色體上的 *p1* 基因座最具代表性，*p1* 的存在可促進絲狀花柱中 maysin 的累積，決定 maysin 含量。環境差異、所在染色體的位置、不同基因座間的交通作用都可能影響 *p1* 的表現，進而造成品種間抗性表現差異。由於 maysin 抑制玉米穗蟲生長，在進行抗性品系選拔時可以作為選拔指標。其次，建立 QTL 圖譜之分子標誌也可應用於品種篩選，藉此可減少田間選拔工作量及空間。除了利用分子標誌及實驗室輔助選育的方法之外，田間危害評估仍是重要的抗蟲育種選拔依據。

關鍵字：玉米穗蟲、類黃酮、數量性狀基因座、選拔

前言

玉米穗蟲 (學名：*Helicoverpa zea* (Boddie)，英名：corn earworm) 為鱗翅目 (Lepidoptera)，夜蛾科 (Noctuidae) 昆蟲。是玉米的主要害蟲之一，其對玉米的生產的經濟危害非常大，尤其是甜玉米。在美國，玉米每年因玉米穗蟲引起生產損失估計約佔 2.5%，但是甜玉米卻高達 50%⁽⁵⁾。而玉米穗蟲的危害對象廣泛，不僅止於玉米，在番茄上被稱為番茄夜蛾 (tomato fruitworm)、棉花稱為棉鈴蟲 (cotton bollworm)，其他寄主作物如菜豆、甘藍、

¹高雄區農業改良場助理研究員

萵苣、甜椒、苜蓿、紫花苜蓿、菸草、大豆、高粱等^(5,11)。由於玉米是非常重要的大宗穀物及蔬菜，所以針對玉米穗蟲進行抗蟲育種在產業上有其需要性，且目前對於玉米抗蟲性的機制及其抗性遺傳背景已有基本的瞭解，也被應用於相關的育種計畫及遺傳研究當中。

玉米穗蟲概述

玉米穗蟲雌蟲通常在夜間活動，將卵產於玉米心葉，果穗或絲狀花柱(silk)上。卵呈饅頭形，顏色淡灰。幼蟲孵化後於果穗頂部取食絲狀花柱，排出咖啡色糞便，到四齡後則開始順著絲狀花柱蛀入果穗中咬斷絲狀花柱、取食嫩果及玉米粒，造成嚴重為害。部分幼蟲白天躲藏在苞葉的縫隙間或葉鞘內，夜間出來取食。幼蟲有互相殘食的習性，每個果穗僅有 1 隻幼蟲，因此有「一穗一蟲」的說法。幼蟲體色會因每次脫皮而有所改變，包括綠色及淺黑色或粉紅色，體表有稀疏細毛。幼蟲至五齡即成熟，但田間採得之幼蟲有時可發育到六齡。老熟幼蟲有些在玉米穗上化蛹，部分在土中化蛹，蛹紅褐色。雌性成蟲為黃褐色，雄蟲灰黃褐色，外橫線及腎狀花紋為暗褐色，體色變化大，從淺綠到暗綠、黃褐、暗褐色等。白天棲息於雜草或玉米葉下，夜間飛出活動、交尾，一年可發生 6-7 代⁽¹⁾。在台灣地區春作玉米後期偶爾有大發生的情形，早播秋作玉米較晚作受害嚴重。

玉米對玉米穗蟲抗性機制

玉米對玉米穗蟲的抗性機制被認為屬於抗生素性(antibiosis)，在一些具有抗性的品種或品系的絲狀花柱中被分離出一群黃酮(flavone)化合物，具有抑制玉米穗蟲幼蟲生長的效果^(3,8)。此類黃酮化合物為C-glycosyl flavone(順式糖苷黃酮)，包含 maysin (5,7,3',4'-tetrahydroxy)、apimaysin (5,7,4'-trihydroxy)及methoxy-maysin (5,7,4'-trihydroxy 3'-methoxy)。此 3 種化合物的基本化學結構是相同的，其差異僅在位於B環(B-ring)上的官能基不同，maysin鍵結羥基(-OH)，apimaysin鍵結一個氫原子(-H)，而methoxymaysin則結合甲氧基(-OCH₃)(圖 1)⁽⁶⁾。這 3 種化合物的合成是經由類花青素/黃酮合成路徑(phenylpropanoid / flavonoid pathway)的分支路徑而得。

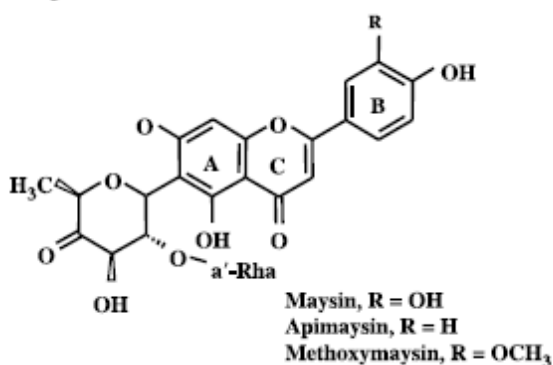


圖1. C-glycosyl flavone的化學結構
Fig. 1. Chemical structure of C-glycosyl flavone.
(Cortés-Cruz et al., 2003)

黃酮合成酵素位於細胞內質網中參與反應，合成後的產物貯存於液泡中或分泌至細胞壁中。C-glycosyl flavones的具有抗性的主要原因由於此類化合物被玉米穗蟲的幼蟲攝食進入腸道後，轉變為更具毒性的‘醌’(quinones)。醌類化合物可以降低游離氨基酸、蛋白質與巰基(-SH)、胺基(-NH₂)之間的鍵結能力，造成幼蟲和蛹的重量下降，生長遲緩，並使蛹期延長^(3,8)。Maysin是此類化合物中效果最強的，apimaysin降低幼蟲體重的效果只有maysin的一半。不同品種玉米對玉米穗蟲生長的抑制效果並未依絲狀花柱中的總flavones含量比例呈現，但二者間呈現顯著的負相關性⁽⁸⁾。Byrne等人(1998)⁽²⁾於2個地點種植抗蟲品種(GE37)、感蟲品種(FF8)玉米及二者雜交後之自交後代(F_{2:3}世代)，分別分析絲狀花柱中的maysin濃度，發現maysin濃度越高的絲狀花柱在餵食後，幼蟲的體重越輕，二者呈現極顯著的負相關($r = -0.43$ 及 -0.53 , $p < 0.001$)。抗性與感性品種間maysin之遺傳率高(0.65 及 0.68)顯示在育種選拔上身具潛力(表 1)。

表 1. 玉米(GE37 × FF8)F_{2:3}族群之親本、雙親中值及F_{2:3}後裔絲狀花柱中maysin濃度的平均、標準誤差及廣義遺傳力

Table 1. Means and standard errors of parents, mid-parent, and F_{2:3} lines, and broad-sense heritabilities for silk maysin concentration and corn earworm larval weight in the population (GE37 × FF8)F_{2:3}

	Silk maysin concentration		Larval weight
	Columbia, MO	Tifton, GA	Tifton, GA
	----- % fresh silk weight -----		mg
GE37	0.989 ± 0.415	0.722 ± 0.140	91.7 ± 12.4
FF8	0.243 ± 0.056	0.309 ± 0.036	259.6 ± 24.6
Mid-parent mean	0.616 ± 0.095	0.516 ± 0.102	175.7 ± 55.8
F _{2:3} population mean	0.409 ± 0.010	0.305 ± 0.009	144.6 ± 7.1
Heritability (h ²)	0.65	0.68	0.98
90% C.I. on h ²	(0.56, 0.72)	(0.61, 0.75)	(0.97, 0.98)

(Byrne et al., 1998)

玉米對玉米穗蟲抗性之遺傳模式

C-glycosyl flavone合成及表現受到許多個數量性狀基因座(quantitative trait locus, QTL)所控制^(9,10)，其中最重要的是位於第1條染色體的p1基因座上。絲狀花柱maysin含量的表現主要由p1決定，由分離的F₂世代分析結果p1占58%^(3,7,8,9,13)。p1在玉米類花青素/黃酮生合成路徑中占有重要的地位，控制maysin及類花青素3-deoxyanthocyanin共同前驅物chalcone合成至二者合成的分支路徑(圖2)。除調控maysin合成之外，p1基因對於apimaysin

和methoxymaysin的合成有極顯著的相關性，即使在不同的玉米品種間均有穩定的表現(表 2)^(3,14)。

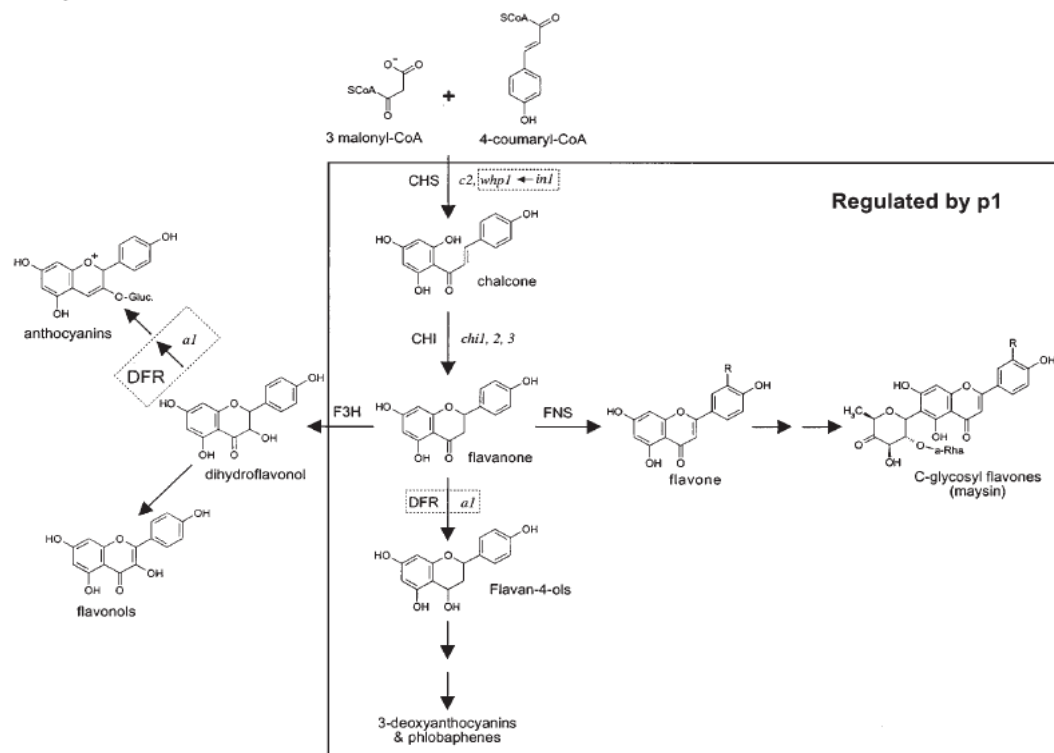


圖 2. 玉米 maysin and 3-deoxyanthocyanin 的合成路徑

Fig 2. Proposed maysin and 3-deoxyanthocyanin pathway in maize.
(McMullen *et al.*, 2001)

表 2. 玉米 GT-A1 × GT119 單交組合之 F_{2:3} 族群中絲狀花柱 maysin、3'M+A 及 chlorogenic acid 濃度複因子變方分析^a

Table 2. Multiple-factor analyses of variance for silk maysin, 3'M+A, and chlorogenic acid concentrations in the F_{2:3} population derived from the single cross GT-A1 × GT119

Locus	Bin ^b	Maysin	3'M+A	Chlorogenic acid
<i>p1</i>	1.03	0.0001	0.0001	0.0001
<i>csu1066</i>	2.05	0.0010	0.0001	0.0001
<i>php20608</i>	4.10	-	0.0001	-
<i>p1×csu32</i>		-	-	0.0030
R ² (%) ^c		59.3	54.2	53.3

^a Level of probability for the F-test in a multiple-factor analysis of variance.

^b QTL positions refer to the UMC 1999 Maize Map Standard. Chromosome was dissected into Bin regions.

^c Percentage of total phenotypic variance explained by the multiple-locus model for each compound.
(Widstrom *et al.*, 2003)

在*p1* 基因座上含有 5 對對偶基因分別控制不同的組織功能。其中 3 對則與玉米絲狀花柱中黃酮合成有關，分別是*P1-rrb*、*P1-wrb*及*P1-wwb*，此 3 對基因並且與果皮、穗軸顏色及絲狀花柱褐化有關⁽⁸⁾。同時也與苞葉、種皮等組織花青素的合成與表現有交互作用⁽¹⁴⁾。

與maysin合成有關的QTL除第 1 條染色體上的*p1* 之外，其他各條染色體上均存在相關的QTL(表 3)，有些研究已將這些QTL在染色體上的位置標定完成(圖 3)⁽⁹⁾。這些QTL對maysin的生合成雖然有影響，但不如*p1* 基因座重要。例如位於第 9 條染色體(chromosome 9)的*rem 1*。這個基因座在抑制玉米穗蟲幼蟲重量或黃酮合成路徑的功能及角色實際上並不清楚，且其與maysin含量及餵食後幼蟲重量並無顯著的相關性。但*rem 1* 的存在與*p1* 產生交互作用在餵食幼蟲體重的表現上卻有顯著的相關性。此外，位於第 6 條染色體(chromosome 6)的*sm1* 也被觀察到與maysin含量有關，不過，其機制仍不清楚⁽²⁾。

表 3. 與 C-glycosyl flavone 合成有關之基因座在玉米染色體上的位置

Table 3. The correlative loci for C-glycosyl flavone synthesis on maize chromosomes' position

Chromosome	Correlation loci			Relative reference
	Maysin	Apimaysin	Other flavones	
1	<i>bz2, p1, umc166b, umc167a</i>	<i>p1</i>	<i>p1</i>	2,3,8,14
2	<i>whp1</i>			2
3	<i>a1</i>		<i>a1</i>	7,9
4	<i>c2</i>			2
5	<i>bng609, pr1</i>	<i>pr1</i>		8,9
6	<i>pl1, sm1, cus70</i>			2
7	<i>asg34(msd)</i>			9
8	<i>npi268, nl2.369</i>			3,7
9	<i>c1, bp1, bz1, wx1, sh1, umc105, umc113a, rem 1</i>		<i>umc105a</i>	2,3,8
10	<i>r1,</i>			2,3

除化學抑制物質造成玉米抗玉米穗蟲原因之外，物理特性也有部分功效，例如果穗苞葉硬度及緊實度會影響幼蟲攝食意願及增加幼蟲鑽入玉米果穗阻力，植體表面絨毛也影響雌蟲產卵意願，但這些性狀對玉米穗蟲的抗禦多為輔助性的抗性⁽¹²⁾。

抗蟲品系的選拔方法

由玉米穗蟲幼蟲餵食試驗中觀察到絲狀花柱中 maysin 含量與幼蟲體重呈現負相關，因此，進行田間抗蟲品系選拔時，可歸納出下列方式篩選抗蟲品系。

一、分析絲狀花柱中 maysin 及 total flavones 的含量：

配合田間蟲害調查結果訂定具抗蟲效果絲狀花柱 maysin 最低含量，作為種原及雜交後裔早期世代篩選指標，可節省大量田間選拔及調查的勞力。須注意的是此指標須與經濟臨界閾值(Economic threshold)直接相關。

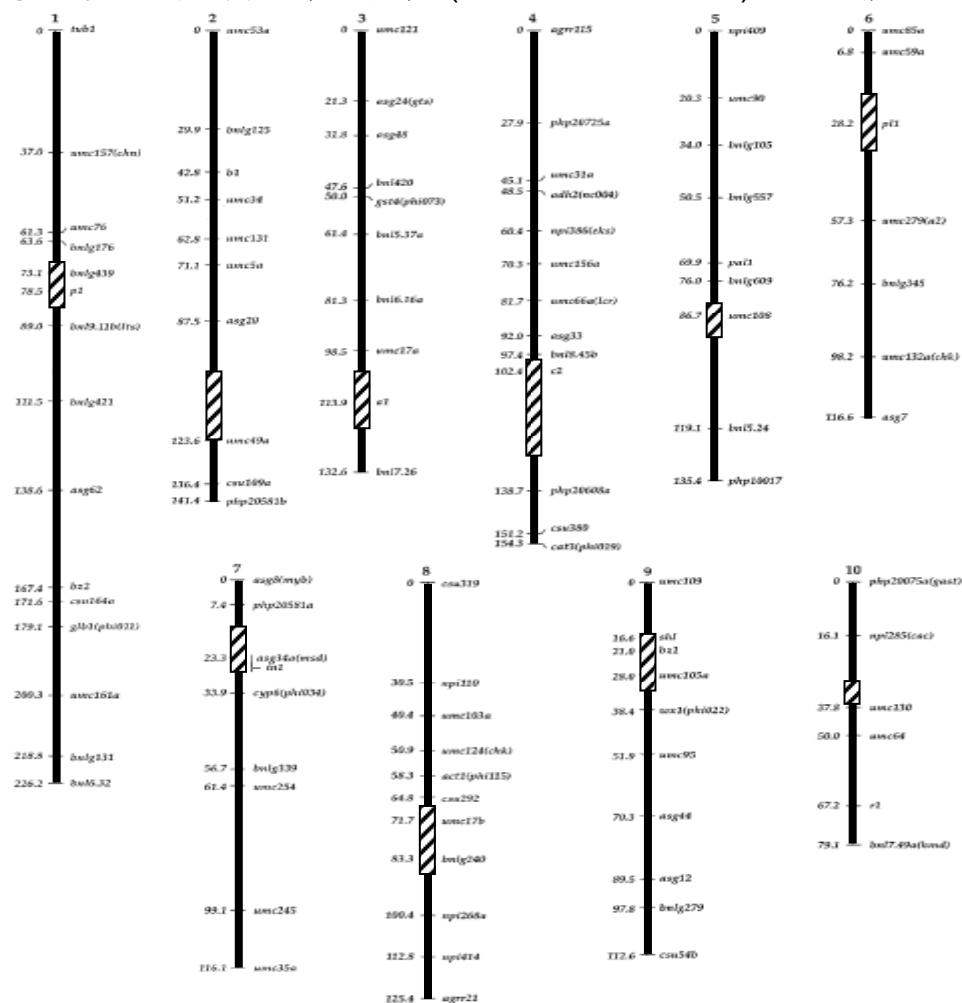


圖 3.玉米基因連鎖圖，斜線區域為與 C-glycosyl flavone 合成有關之基因座。
Fig 3. Genetic linkage map for the maize. The cross-hatched regions are the correlative loci for C-glycosyl flavone synthesis.

(modified from McMullen *et al.*, 2001)

二、幼蟲餵食：

絲狀花柱中的maysin是抗蟲主要成分，實驗室中可利用絲狀花柱直接餵食的方式，調查幼蟲體重、身長、齡期及蛹期變化。選拔出對幼蟲生長抑制最大的品系或品種。Carpenter及Wiseman (2001)⁽⁴⁾ 分別以感蟲及抗蟲玉米品種的絲狀花柱乾燥後，依不同比例製成人工飼料餵食玉米穗蟲幼蟲，結果發現，餵食抗蟲品種絲狀花柱的幼蟲體重顯著較輕，餵食高比例抗性品種絲狀花柱之處理其幼蟲體重更加受抑制。且化蛹的時間也隨之延後。

三、分子標誌：

由於目前所知控制 maysin 表現的基因都為 QTL，且功能不甚完整，但是仍可由指標性的基因座如 *p1*，將其 DNA 序列利用為分子標誌，應用 PCR 的偵測技術，可以在植株生育初期即進行篩選，節省大量田間選拔的時間與勞力，有利於縮短品種育成時間。但是，玉米對玉米穗蟲的抗性由許多的基因所共同組成，目前被發現與抗性有關的基因數比例仍未知。所以分子標誌目前僅被建議作為協助選拔的角色，並建議使用於早期世代，後裔數量多的時候使用。以避免遺失實際上有抗性的種原，卻因分子資料不完整而被淘汰。

四、田間選拔：

實驗室篩選後仍須進行田間選拔以驗證實驗室選拔指標的正確性及代表性。一般田間選拔以自然感染及人工施放兩種方式進行，由於自然感染會因為種植的位置而影響到昆蟲產卵和取食不均勻，造成評估時的誤差，相關的育種計畫仍被建議以人工施放方式進行。人工施放則可利用施放蟲卵或幼蟲，接蟲時必須配合最佳的植株生育期、適當的施放蟲卵或幼蟲數量、重複數、接蟲日數，同時要考慮以卵或幼蟲接種，以及昆蟲材料的來源。最後，調查玉米穗的被害率及產量，作為選拔依據⁽¹¹⁾。Xu等人(2003)⁽¹⁵⁾從田間調查發現，玉米抗蟲程度或受危害程度在不同基因型的表現具有極顯著的差異性(表 4)，抗蟲性越強的品種，果穗上幼蟲的食痕越短。藉由田間的調查也可以驗證前述實驗室篩選指標的可靠性。

結論

玉米抗玉米穗蟲的機制屬於較明確而單純的抗性，主要以本身所分泌的化合物造成抗蟲的效果。在抗性選拔上有清楚而明確指標可依循，但此一抗性由多個基因所控制，且這些基因座分散於不同的染色體中，對於其遺傳機制及各基因間的交互作用仍有許多地方需更進一步瞭解，如此對於抗蟲品種的育成會有更大幫助。另外，對於其他作物或害蟲的抗性研究也可利用這些研究作為基礎模式。

表 4. 玉米穗蟲危害率、穗長、取食比率及穗黴病之變方分析均方值(1999 及 2000 年)

Table 4. Mean squares from the analysis of variance for CEW penetration, ear length, feeding ratio of CEW penetration to ear length (Ratio), and grain mold (Mold, %) at Lubock, Texas in 1999 and 2000

Source of variation	df	Penetration	Ear length	Ratio	Mold
Year	1	9.98	21.45	722.58	186.89
Rep (year)	4	1.82	9.35**	188.02	39.24**
Genotype	75	9.49**	8.51**	16.28**	20.05
Genotype × year	75	3.20	1.85*	90.71	7.69
Pooled error	300	2.74	1.25	95.68	6.73

* Significant at 0.05 level of probability.

** Significant at 0.01 level of probability.

(Xu et al., 2003)

參考文獻

1. 陳文雄、張煥英. 2005. 玉米害蟲. P.286-295. 刊於：台灣農家要覽 農作篇(三). 增修訂三版. 豐年社. 台北.
2. Byrne, P. F., M. D. McMullen, B. R. Wiseman, M. E. Snook, T. A. Musket, J. M. Theuri, N. W. Widstrom, and E. H. Coe. 1998. Maize silk maysin concentration and corn antibiosis: QTLs and genetic mechanism. *Crop Sci.* 38:461-471.
3. Byrne, P. F., M. D. McMullen, M. E. Snook, T. A. Musket, J. M. Theuri, N. W. Widstrom, B. R. Wiseman, and E. H. Coe. 1996. Quantitative trait loci and metabolic pathways: Genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8820-8825.
4. Carpenter, J. E. and B. R. Wiseman. 1999. Comparisons of laboratory and feral strains of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory and field bioassays. *Fla. Entomol.* 82(2): 237-247.
5. Cook, K. A. and R. Weinzierl 2004. Corn Earworm. University of Illinois Extension, Champaign. 1 May 2005. <http://www.ipm.uiuc.edu/fieldcrops/insects/corn_earworm/>
6. Cortés-Cruz, M., M. Snook, and M. D. McMullen. 2003. The genetic

- basis of C-glycosyl flavone B-ring modification in maize (*Zea mays* L.) silks. *Genome* 46:182-194.
7. Guo, B. Z., Z. J. Zhang, N. W. Widstrom, M. E. Snook, R. E. Lynch, and D. Plaisted. 2001. Restriction fragment length polymorphism markers associated with silk maysin, antibiosis to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae), larvae, in a dent and sweet corn cross. *J. Econ. Entomol.* 95(6):1303-1307.
 8. Lee, E. A., P. F. Byrne, M. D. McMullen, M. E. Snook, B. R. Wiseman, N. W. Widstrom, and E. H. Coe. 1998. Genetic mechanism underlying apimaysin and maysin synthesis and corn earworm antibiosis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 149: 1997-2006.
 9. McMullen, M. D., M. Snook, E. A. Lee, P. F. Byrne, H. Kross, T. A. Musket, K. Houchins, and E. H. Coe. 2001. The biological basis of epistasis between quantitative trait loci for flavone and 3-deoxyanthocyanin synthesis in maize (*Zea mays* L.). *Genome* 44:667-676.
 10. McMullen, M. D., P. F. Byrne, M. E. Snook, B. R. Wiseman, E. A. Lee, and N. W. Widstrom. 1998. Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1996-2000.
 11. Ortega, A., S. K. Vasal, J. Mihm, and C. Hershey. 1980. Breeding for Insect Resistance in Maize. p.371-419. In: *Breeding Plants Resistant to Insects*. Press, John Wiley & Sons, Inc.
 12. Rector, B. G., M. E. Snook, and N. W. Widstrom. 2002. Effect of husk characters on resistance to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in high-maysin maize populations. *J. Econ. Entomol.* 95(6):1303-1307.
 13. Szalma, S. J., E. S. Buckler IV, M. E. Snook, and M. D. McMullen. 2005. Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. *Theor. Appl. Genet.* 110:1324-1333.
 14. Widstrom, N. W., A. Butron, B. Z. Guo, D. M. Wilson, M. E. Snook, T. E. Cleveland, and R. E. Lynch. 2003. Control of preharvest aflatoxin contamination in maize by pyramiding QTL involved in resistance to ear-feeding insects and invasion by *Aspergillus* spp. *Europ. J. Agronomy* 19:563-572.
 15. Xu, W., L. Pollak, and E. D. Bynum. 2003. Tropical × temperate germplasm resistant to corn earworm (Lepidopter: Noctuidae). *Crop Prot.* 22:859-864.

無機鹽對藥用植物欒梔試管苗生長之影響

黃柄龍¹

摘 要

本研究目的為探討不同比例無機鹽類之 MS 培養基及不同濃度 NaCl 對欒梔實生苗試管內之生長及發育之影響。結果顯示，發芽後的實生苗培養於不含任何植物生長調節劑的 1/4MS 培養基，相對生長量明顯高於其它處理，培養 3 個月共增加 5.63 cm，且過高(Full MS)或過低比例(1/16MS)的無機鹽類對實生苗試管內的生長均有不良的影響。而試管內模擬之高鹽逆境對植株的長度增加量、葉片數、葉面積及新生根數等，均隨逆境程度的增高而降低，植物的生長與發育顯著受到抑制，顯示欒梔雖屬鹽性植物，但其苗株對鹽的耐受性仍有一定的限度。

關鍵語：藥用植物、鹽逆境、欒梔

前 言

欒梔(*Pluchea indica* (L.) Less.)是臺灣原生的多年生灌木型菊科植物，又名冬青菊、鯽魚膽等，其根部具有極佳的抗氧化活性，為一種藥用植物。將根部與樹幹煎水服用，可治風濕骨痛、腰痛及具有解熱與發汗的效果，並可幫助消化^(2, 27)；根部萃取物亦具有抗發炎⁽²⁸⁾及保護肝臟的功效⁽²⁶⁾。

欒梔主要分布在臺灣西部、西南部等海濱、紅樹林、鹽性沼澤和泥岩等鹽性區域，其部分表皮細胞特化成鹽腺，可藉此排出體內多餘的鹽分，屬鹽性植物(halophyte)。然而，自然界中植物對鹽分反應表現出極大的差異，一般可適應的鹽分濃度約在 20-500 mM之間，主要為NaCl鹽類，且隨株齡及環境而改變(朱, 1984)。鹽害被認為是減低植物生長的主要因素之一⁽⁷⁾，雖然許多植物已發展出發達的儲水組織或排鹽、耐鹽等生理機制，以避免吸收過多鹽分的毒性及大量流失水分，但要實際測定植物在鹽分下生存的鹽分界限則相當困難。因此，測量葉及根等生長參數避免傷害植物本身，則不失為一種有用的量測工具⁽⁹⁾。

天然植物的藥用成分已普遍受到重視，但許多製藥工業仍須大量採摘野生中草藥作為其原料來源，導致原生地遭受嚴重的破壞，正逐漸面臨滅種的

¹高雄區農業改良場副研究員

危機。利用植物組織培養技術，或許可提供商業上中草藥原料之大量需求，也可能是解決藥用植物生態保育問題的重要方法之一⁽²⁰⁾。然而，國內外於樂樺組織培養方面的相關研究不多，僅Srivastava等人⁽³¹⁾由*P. lanceolata*葉片誘得質地緻密的綠色癒合組織並再生植株，或誘導*P. indica*的葉、節及莖頂等培植體形成癒合組織⁽²²⁾。因此，本研究將先以樂樺*P. indica*種子為材料，利用試管培養以觀察鹽分因子的變化對植株生長的影响，以明瞭樂樺實生苗對鹽分逆境的反應及其合適的生長環境條件，以作為種苗繁殖之依據，或可作為中草藥研究之參考。

材料與方法

一、植物材料與滅菌處理

本研究所使用之材料係採集自郊外之樂樺 *P. indica* 種子。首先，將種子以無菌水浸泡過夜以軟化種皮；利用 70%酒精浸泡 2 分鐘後，並以 2% NaOCl (Clorox; Clorox Co, Oakland, CA)溶液，每 100 ml 並加入 2 滴介面活性劑 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)，以超音波振盪消毒 15 分鐘，再以無菌水沖洗 3 次，每次 3 分鐘。

二、培養基與培養條件

基礎培養基組成以含Full、1/2、1/4、1/8 及 1/16 等不同濃度的無機鹽類之MS培養基⁽¹⁹⁾為主，其他添加有機物包括 1.0 mg/l thiamine HCl、1.0 mg/l pyridoxine HCl、10.0 mg/l nicotinic acid及 100 mg/l myo-inositol，另添加 3% sucrose，並以 0.8% agar作為固體凝膠劑，滅菌前pH值調至 5.7 ± 0.02 ，並經高溫高壓滅菌釜以 121°C ，加熱 20 分鐘。培養環境溫度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。照光培養採 16 小時光週明期(光強度 2,800 Lux，日光燈管 FL-30 D/29, 40W，東亞，中國電器股份有限公司)，暗期為 8 小時。

三、不同比例 MS 無機鹽類對試管內實生苗生長之影響

消毒後的種子以濾紙吸乾多餘的水分後，無菌播種於含 Full MS 之培養基。待發芽後，將實生小苗逢機培養於含不同比例無機鹽類(Full、1/2、1/4、1/8 及1/16)之 MS 試驗培養基中，探討實生苗試管內生長之情形。每單位容器內之培養基定量成 10 ml。每一處理 10 個重複，每重複培養 1 株試驗實生苗。每個月測量實生苗之相對生長量(relative growth)，共測量 3 個月。無菌苗之相對生長量以參試實生苗每個月的平均株高增加量(cm)表示。

四、不同濃度鹽分處理對試管內實生苗生育之影響

將實生小苗逢機培養於添加不同濃度(0、50、100、150、200、250 及 300 mM)之氯化鈉(NaCl; Merck, Darmstadt, Germany)的 1/4MS 基礎培養基

中，每一處理 10 個重複，每重複 1 株試驗實生苗。第 20 天起，每隔 10 天測量不同濃度鹽分環境中之實生苗的長度增加量，共測量至第 60 天；並於第 30 天起，每隔 10 天調查參試實生苗之葉片數、葉面積近似值(為葉面積率，不計算參照係數)及新生根系增加之數目等生長情形，調查至第 60 天。葉片數、葉面積近似值及新生根系增加數目為分別計算單位實生苗之葉片數、葉片長寬乘積及新生根數等之平均值。

五、統計分析

測得各處理所得數值後，計算重複平均值並算出標準差；或使用 SAS 軟體(SAS Institute, Cary, NC)進行 GLM 變異數分析($\alpha=0.05$)，並以 LSD (Least significant difference)方法進行個別顯著性測驗。

結果與討論

一、不同比例 MS 無機鹽類對試管內實生苗生長之影響

雖然礦物元素在植物形態發生上扮演重要的角色，但組織培養過程的無機鹽類的選擇端視是為器官發生(organ initiation)階段，或是隨後的生長發育階段而異⁽²³⁾。圖 1 及圖 2 顯示，發芽後的實生苗培養於含不同比例無機鹽類之 MS 試驗培養基，初期以培養於 1/8 MS 之生長速度較快，但第 2 個月起，1/4 MS 試驗培養基的相對生長量則明顯高於其它比例的培養基，至培養 3 個月時，實生苗的相對生長量已達 5.63 cm。然而，過高(Full MS)或過低比例(1/16 MS)的無機鹽類對樂輝實生苗試管內的生長則有不良的影響，培養 3 個月的相對生長量僅分別為 1.56 和 1.89 cm。不同比例鹽類會產生不同生體外(in vitro)培養的反應，進而影響組培植株或根的生長^(8, 30)，Baque 等人⁽⁸⁾也認為，1/4 MS 培養基較適合誘導茜草科 *Morinda citrifolia* 之生物量(biomass)和二次代謝物的產生，本研究，利用 1/4 MS 培養基培養之實生苗，亦均呈現正常之植株性狀。

二、不同濃度鹽分處理對試管內實生苗長度增加量之影響

表 1 結果顯示，不同濃度 NaCl 處理 20 天後，各處理對試管內實生苗的長度增加量即呈顯著的影響，均隨 NaCl 濃度的增加而減少。處理 60 天時，未添加 NaCl 的培養基，其平均長度增加量為 5.72 cm；反之，高濃度的 NaCl 明顯抑制植株的生長，添加 300 mM NaCl 的處理組僅 0.12 cm 的增加量，且植株容易褐化，甚至死亡。經 60 天處理，實生苗的 NaCl 適應差異性為 150 mM。Zhang 等人⁽³²⁾也認為，150 mM 和 250 mM 的 NaCl 即能抑制楊柳科 *Populus euphratica* 癒合組織及再生植株的生長速率，並影響其存活率。在鹽分土壤中，植物生長與發育顯著受到抑制，鹽分濃度愈大，抑制作

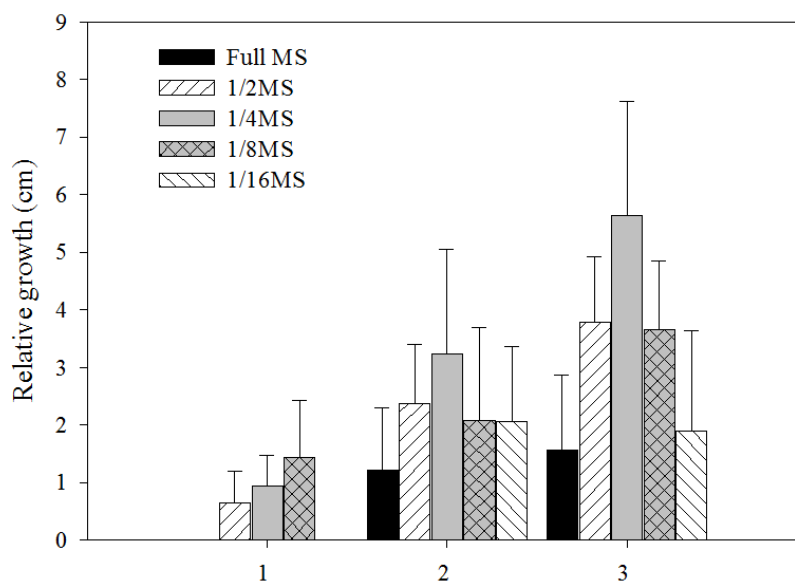


圖 1. 不同比例 MS 無機鹽類對樂樺 *P. indica* 試管內實生苗生長之影響

Fig. 1. Effects of different strength of MS inorganic salts on *in vitro* growth from seedlings of *P. indica*.



圖 2. 樂樺 *P. indica* 試管內實生苗培養於不同比例無機鹽類之 MS 培養基 3 個月之生長情形 (A) Full MS (B) 1/2MS (C) 1/4MS (D) 1/8MS (E) 1/16MS (bar = 15 mm)

Fig. 2. *In vitro* growth of *P. indica* seedlings cultured on different strength of MS inorganic salts for 3 months. (A) Full MS (B) 1/2MS (C) 1/4MS (D) 1/8MS (E) 1/16MS (bar = 15 mm).

表 1. 不同濃度 NaCl 對樂樺 *P. indica* 試管內實生苗長度增加量之影響
Table 1. Effects of different concentrations of NaCl on shoot length increased from *P. indica* seedlings *in vitro* culture.

NaCl conc. (mM)	Increased value of seedling length (cm)				
	Culture period (days)				
	20	30	40	50	60
0	1.30 a	2.52 a	3.48 a	4.59 a	5.72 a
50	1.03 ab	1.40 b	1.96 b	2.20 b	2.91 b
100	0.65 bc	0.97 bc	1.55 b	1.85 bc	2.03 c
150	0.45 c	0.66 cd	0.88 c	1.16 cd	1.30 d
200	0.33 c	0.39 cd	0.52 c	0.50 de	0.47 e
250	0.29 c	0.42 cd	0.39 c	0.43 de	0.46 e
300	0.24 c	0.23 d	0.22 c	0.13 e	0.12 e

Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, least significant difference (LSD) test).

用也愈大。高鹽分對植物生長的限制，主要是因為無機離子的吸收受影響，致使生長所需的能量耗盡，以及膨壓的喪失所致⁽⁷⁾；並且，高濃度的 Na^+ 除了產生直接毒害外，亦可能間接降低介質中的 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等之含量，進而導致營養元素缺乏^(4, 16)，或是加重如硼(B)等微量元素的毒害效應⁽⁶⁾。

三、不同濃度鹽分處理對試管內實生苗葉片發育之影響

樂樺試管內實生苗的葉片數量會隨添加NaCl濃度的增加而有減少的趨勢(圖 3A)。培養 60 天後，未添加NaCl的處理，其平均葉片數為 17.7 片葉；添加 50-250 mM NaCl的處理約為 4.6-10.1 片葉；而添加 300 mM NaCl的培養基，平均葉片數則僅為 1.3 片。Debez等人⁽¹²⁾認為，鹽分會影響新生葉片的發生，進而影響葉片數及整株植物的生物量。在高鹽濃度下，葉的生長區可能受自身大量製造累積的離層酸(Abscisic acid; ABA)影響⁽¹¹⁾，或是因為植物體內的水分大量由葉片散失，使得葉的相對含水量及水勢下降，葉溫上升，葉綠素分解，光合效率降低等^(17, 29)，致使葉的形成受抑制。

添加不同濃度的NaCl，亦會影響植物葉面積的生長(圖 3B)。本研究，未添加NaCl的處理，於培養 60 天的平均葉面積為 1.59 cm^2 ，均較其它添加NaCl的處理組大，而添加 50、100、150、200、250 及 300 的mM NaCl，其葉面積分別為 1.51、1.13、0.69、0.30、0.16 和 0.04 cm^2 ，顯示樂樺實生苗葉的生長確實隨鹽濃度的增加而明顯下降。而葉面積經常與植物的生長、光截獲、光合效率、蒸發作用及肥料和灌溉效應等生理變化有關⁽⁹⁾。當植

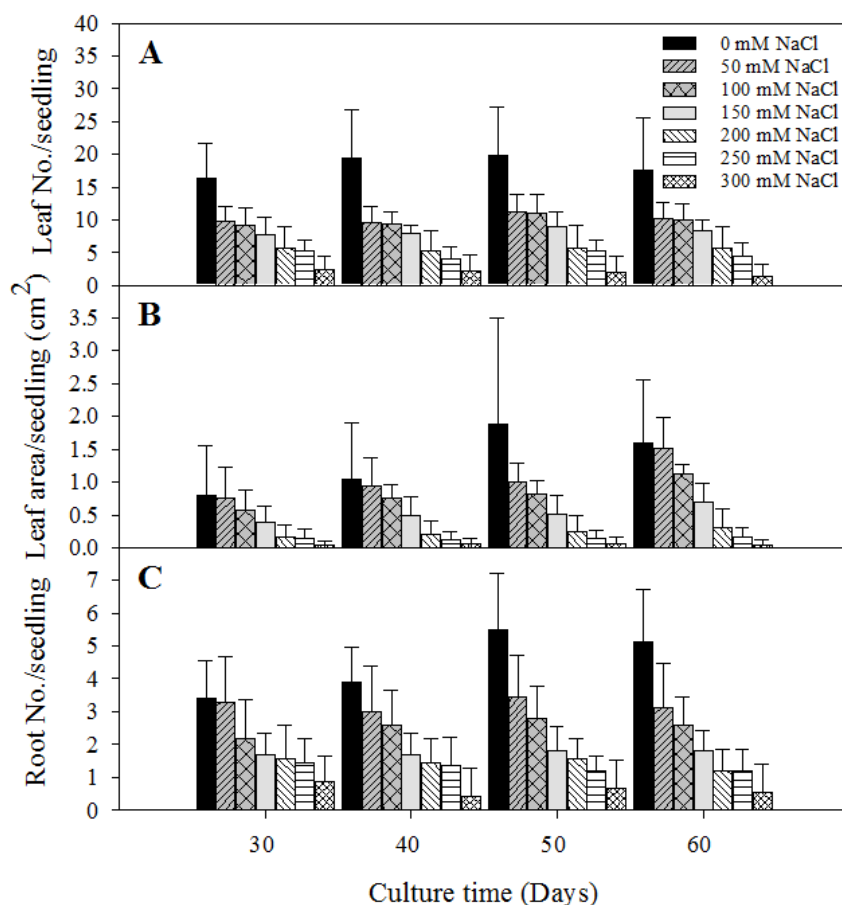


圖 3. 不同濃度 NaCl 對欖梔 *P. indica* 試管內實生苗葉片及根系發育之影響
 Fig. 3. Effects of different concentrations of NaCl on leaf and root development from *P. indica* seedlings *in vitro* culture.

物生長於含鹽環境時，過量的鹽分改變細胞壁的代謝活動，致使許多內容物質沈澱，因而降低了細胞壁的彈性⁽⁵⁾，限制葉的擴展⁽¹⁰⁾，並進而減低植物的吸水能力、抑制光合成及引發葉片老化等⁽³⁾，而影響植物的生長。因此，本研究於超過 250 mM NaCl 的試驗培養基中培養，即經常伴隨發生葉片捲曲及植株褐化死亡等不正常的現象。

四、不同濃度鹽分處理對試管內實生苗新生根系發育之影響

培養基中添加的 NaCl 濃度不同，亦會影響根的形成(圖 3C)。未添加 NaCl 的處理於培養 60 天後，實生苗的平均根數為 5.11 條，約為添加 300 mM NaCl 之處理組的 9.13 倍(0.56 條)，根系形成數目亦隨 NaCl 添加濃度的增加而下降；且在高濃度的 NaCl 條件下，根尖部分亦容易出現褐化及停止生長等現

象。Alshammary等人⁽⁷⁾也指出，鹽分會破壞根部的皮層細胞結構，阻礙水分子於根系中的放射線狀運移，因而限制水分的吸收，及促使離子的大量流出^(4, 25)，導致 K^+ 和 Ca^{2+} 的累積受抑制⁽²¹⁾，對根長及根數等生物量呈現不良的影響^(13, 15)，顯示鹽分確實能抑制根的生長及分化。

一般鹽性植物最適當生長的鹽分濃度在 20-500 mM，且對鹽分適應性的表現差異相當顯著⁽¹⁾。高鹽對植物的主要影響有二：其一是導致植物吸收過多的離子，造成直接的傷害，或是因為競爭作用而間接阻礙其它離子的吸收⁽²⁴⁾；其二是鹽分會降低環境的滲透潛勢，使植物根部吸水困難，造成養水分獲得不易⁽¹⁸⁾，而使植物製造及累積大量的ABA⁽¹¹⁾。與藜科和沼澤草類在 250-500 mM之NaCl濃度仍可生長⁽¹⁴⁾相較，欒梔雖屬鹽性植物，但其實生苗在無菌培養下對鹽的耐受性仍僅有一定的限度。

參考文獻

1. 朱德民. 1984. 植物與環境逆境. 國立編譯館. 臺北.
2. 李甯漢、劉啟文. 1986. 欒梔 *Pluchea indica* (L.) Less. 常見中草藥第五冊 pp. 180-181.
3. Albacete, A., C. Martínez-andújar, M. E. Ghanem, M. Acosta, J. Sánchez-Bravo, M. J. Asins, J. Cuartero, S. Lutts, I. C. Dodd, and F. Pérez-Alfocea. 2009. Rootstock-mediated changes in xylem ionic and hormonal status are correlated with delayed leaf senescence, and increased leaf area and crop productivity in salinized tomato. *Plant Cell Environ.* 32: 928–938.
4. Alian, A., A. Altman, and B. Heuer. 2000. Genotypic difference in salinity and water stress tolerance of fresh market tomato cultivars. *Plant Sci.* 152: 59-65.
5. Ali, Y., Z. Aslam, M. Y. Ashraf, and G. R. Tahir. 2004. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 1: 221-225.
6. Alpaslan, M. and A. Gunes. 2001. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant Soil* 236: 123–128.
7. Alshammary, S. F., Y. L. Qian, and S. J. Wallner. 2004. Growth response of four turfgrass species to salinity. *Agric. Water Manage.* 66:

- 97–111.
8. Baque, M. A., E. –J. Lee, and K. –Y. Paek. 2010. Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: the role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. *Plant Cell Rep.* 29: 685–694.
 9. Blanco, F. F. and M. V. Folegatti. 2005. Estimation of leaf area for greenhouse cucumber by linear measurements under salinity and grafting. *Sci. Agric.* 62: 305-309.
 10. Chartzoulakis, K. and G. Klapaki. 2000. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.* 86: 247-260.
 11. Cramer, G. R. and S. A. Quarrie. 2002. Absciscic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Functional Plant Biol.* 29: 111-115.
 12. Debez, A., K. B. Hamed, C. Grignon, and C. Abdely. 2004. Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Soil* 262: 179-189.
 13. Djibril, S., O. K. Mohamed, D. Diaga, D. Diégane, B. F. Abaye, S. Maurice, and B. Alain. 2005. Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 968-972.
 14. Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190.
 15. Khan, A. A., S. A. Rao, and T. McNeilly. 2003. Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 131: 81-89.
 16. Khan, M. A., I. A. Ungar, and A. M. Showalter. 2000. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Ann. Bot.* 85: 225-232.
 17. Mitsuya, S., M. Kawasaki, M. Taniguchi, and H. Miyake. 2003. Light dependency of salinity-induced chloroplast degradation. *Plant Prod. Sci.* 6: 219-223.

18. Mofteh, A. E. and B. E. Michel. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* 83: 238-240.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
20. Nalawade, S. M., A. P. Sagare, C. -Y. Lee, C. -L. Kao, and H. -S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 79-98.
21. Netondo, G. W., J. C. Onyango, and E. Beck. 2004. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. *Crop Sci.* 44: 797-805.
22. Pramanik, K. C., R. Biswas, A. Mitra, D. Bandyopadhyay, M. Mishra, and T. K. Chatterjee. 2007. Tissue culture of the plant *Pluchea indica* (L.) Less. and evaluation of the diuretic potential of its leaves. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 7: 197-204.
23. Ramage, C. M. and R. R. Williams. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 116-124.
24. Rengel, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15: 625-632.
25. Rubinigg, M., F. Posthumus, M. Ferschke, J. T. M. Elzenga, and I. Stulen. 2003. Effects of NaCl salinity on ¹⁵N-nitrate fluxes and specific root length in the halophyte *Plantago maritima* L. *Plant Soil* 250: 201-213.
26. Sen, T., A. Basu, R. N. Ray, and A. K. Nag Chaudhuri . 1993. Hepato-protective effect of *Pluchea indica* (Less) extract in experimental acute liver damage in rodents. *Phytother. Res.* 7: 352-355.
27. Sen, T., A. K. Dhara, S. Bhattacharjee, S. Pal, and A. K. Nag Chaudhuri. 2002. Antioxidant activity of the methanol fraction of *Pluchea indica* root extract. *Phytother. Res.* 164: 331-335.
28. Sen, T. and A. K. Nag Chaudhuri. 1991. Antiinflammatory evaluation of a *Plunchea indica* root extract. *J. Ethnopharmacol.* 33: 135-141.
29. Siddique, M. R. B., A. Hamid, and M. S. Islam. 2000. Drought stress effects on water relations of wheat. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 35-39.

30. Sivakumar, G., S. J. Kim, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2005. Optimizing environmental factors for large-scale multiplication of Chrysanthemum (*Chrysanthemum grandiflorum*) in balloon-type bioreactor culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41: 822–825.
31. Srivastava, P. S., S. Kumar, A. Narula, and M. P. Sharma. 2004. In vitro propagation of *Pluchea lanceolata*, a medicinal plant, and effect of heavy metals and different aminopurines on quercetin content. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40: 171-176.
32. Zhang, F., Y. L. Yang, W. L. He, X. Zhao, and L. X. Zhang. 2004. Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40: 491–494.

行政院農業委員會高雄區農業改良場
研究彙報

第 22 卷 第 1 期

發行人：黃德昌
總編輯：蔡承良
執行編輯：邱祝櫻
編輯委員：何素珍、戴順發
吳志文、陳昱初
楊文振、賴榮茂
施純堅
助理編輯：鄭文吉

本研究彙報採外審制

投稿稿約請參閱高雄區農業改良場全球資訊網
<http://kdais.coa.gov.tw/view.php?catid=410>

出版者：
行政院農業委員會高雄區農業改良場

網址：<http://www.kdais.gov.tw>
地址：屏東縣長治鄉德和村德和路 2-6 號

電話：08-7389158

出版日期：民國 101 年 12 月
定價：零售每本 200 元
印刷廠：振億印刷所

展售處(Distribution Stores)：

國家書店松江門市 臺北市松江路 209 號 1 樓 TEL：+886-2-25180207
Sungjiang Store, National Bookstore, 1F, 209, Sungjiang Rd., Taipei
五南文化廣場 臺中市中山路 6 號 TEL：+886-4-22260330
Wunang Culture Plaza, 6, Chungshan Rd., Taichung

GPN :2007700056
ISSN:1015-5864

版權聲明：本著作採「創用 CC」之授權模式，僅限於非營利、禁止改作且標示著作人姓名之條件下，得利用本著作。

Declaration of Copyright: Contents of published paper may be authorized to use under the Creative Commons conditions.

Research Bulletin
of
Kaohsiung District Agricultural Research
and Extension Station

Volume 22 , Number 1

Publisher : Tze-Chung Huang
Chief Editor : Cherng-Liang Tsai
Executive Editor : Chu-Ying Chiou
Editors : Su-Chen Ho, Shun-Fa Tai
Chih-Wen Wu, Yu-Chu Chen
Wen-Cheng Yang, Rong-Mao Lai
Chun-Chein Shih
Assistant Editor: Wen-Chi Cheng

Manuscript will be peer reviewed by
external experts.

For guidelines of submitting manuscript, please
visit <http://kdais.coa.gov.tw/view.php?catid=410>
for detail.

Published by :
Kaohsiung District Agricultural Research and
Extension Station
Website: <http://www.kdais.gov.tw>
Address: 2-6, Dehe Rd., Dehe Village, Changjhih
Township, Pingtung County 90846,
Taiwan, ROC
TEL: +886-8-7389158

Published Date: November, 2012
Price: 200 NTD per copy
Printed by: Jen-Yi Printing Co.Ltd.