

無機鹽對藥用植物欒樺試管苗生長之影響

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 對欒樺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，顯示欒樺雖屬鹽性植物，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、欒樺

前 言

欒樺(*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⁾。

欒樺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響，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，本研究中，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

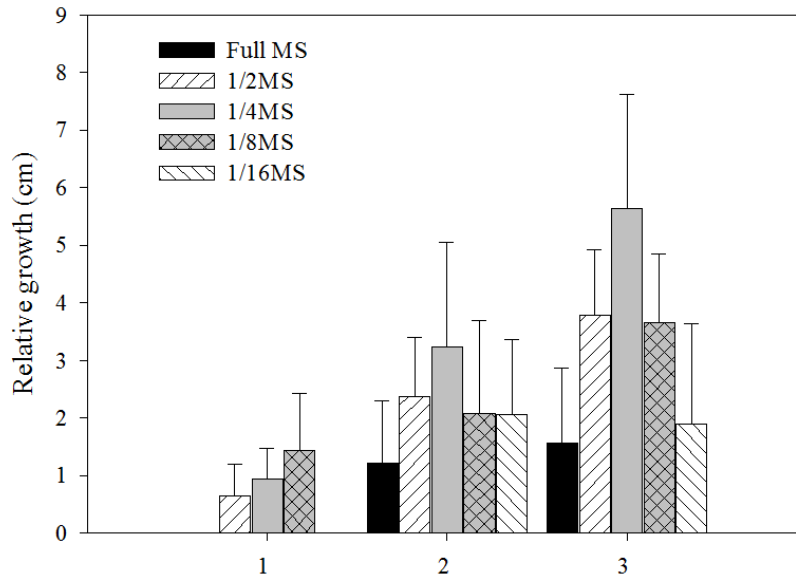


圖 1. 不同比例 MS 無機鹽類對樂樺 *P. indica* 試管內實生苗生長之影響
 Fig. 1. Effects of different strength of MS inorganic salts on *in vitro* growth from seedlings of *P. indica*.

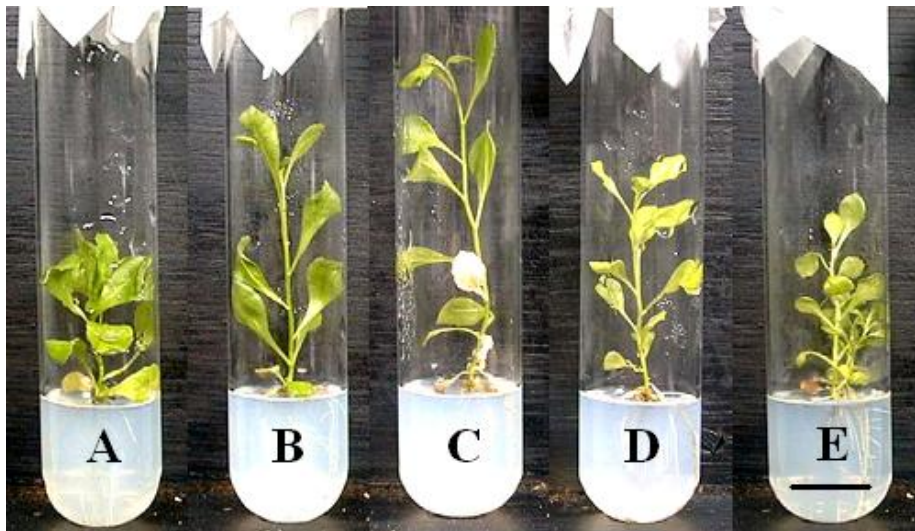


圖 2. 樂樺 *P. indica* 試管內實生苗培養於不同比例無機鹽類之 MS 培養基 3 個月之生長情形 (A) Full MS (B) 1/2MS (C) 1/4MS (D) 1/8MS (E) 1/16MS (bar = 15 mm)
 Fig. 2. *In vitro* growth of *P. indica* seedlings cultured on different strength of MS inorganic salts for 3 months. (A) Full MS (B) 1/2MS (C) 1/4MS (D) 1/8MS (E) 1/16MS (bar = 15 mm).

表 1. 不同濃度 NaCl 對欖櫚 *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

欖櫚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(Abscissic 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)。本研究中，未添加NaCl的處理，於培養 60 天的平均葉面積為 1.59 cm²，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 cm²，顯示欖櫚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、光合成效率、蒸發作用及肥料和灌溉效應等生理變化有關⁽⁹⁾。當植

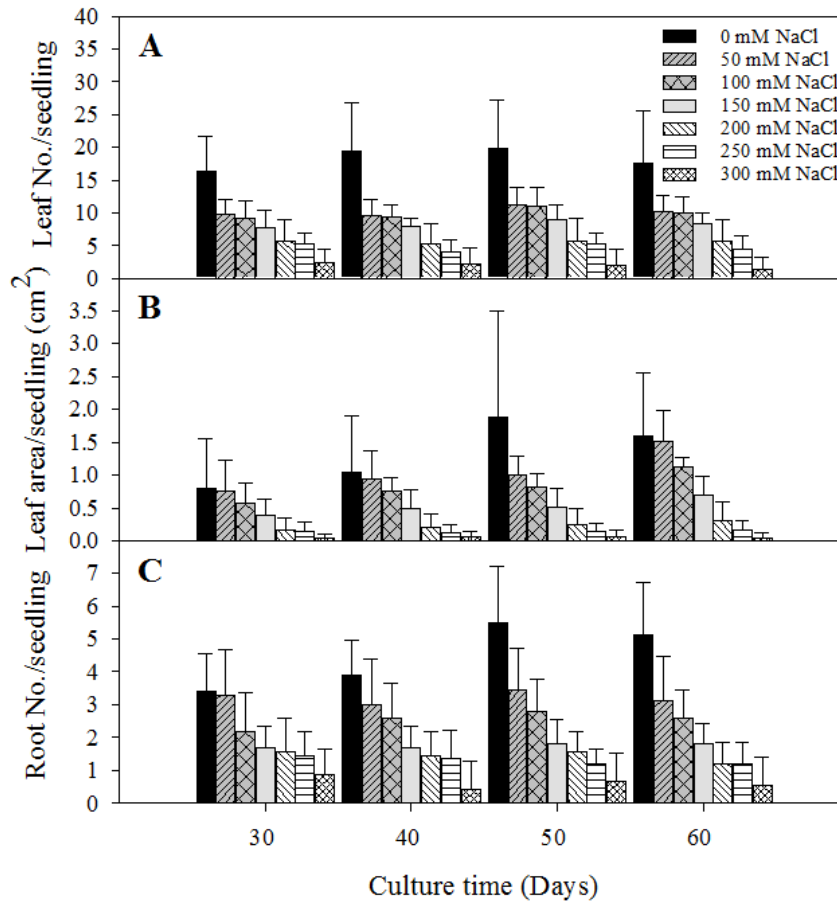


圖 3. 不同濃度 NaCl 對欖櫚 *P. indica* 試管內實生苗葉片及根系發育之影響
 Fig. 3. Effects of different concentrations of NaCl on leaf and root development from *P. indica* seedlings *in vitro* culture.

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，欖欏雖屬鹽性植物，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. 欖欏 *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. Abscisic 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. Moffah, 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 *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 *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 *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 491–494.