

光源對喜樹組織培養培植體生長的影响

張本懋¹⁾ 林瑞松²⁾

關鍵字：喜樹、組織培養、發光二極體(LED)

摘要：喜樹(*Camptotheca acuminata* Decne.)內的喜樹鹼(camptothecin, CPT)被使用做為抗癌藥物，為了原料採集，進行高產量品系的無性繁殖是能夠確保產量穩定之途徑之一。光可調控植物光合作用與光型態發生等現象，為組織培養過程中關鍵條件之一。本試驗使用不同色光的發光二極體(Light-Emitting Diode, LED)作為光源供應來源，進行現象觀察與結果探討。光源試驗使用不同色光的發光二極體(LED)分別為白光(W)、紅光(R)、藍光(B)和混合光(P)光源下進行試驗，葉長與葉寬為白光下生長最佳，分別為 1.367cm 與 0.575cm，藍光下葉型偏狹長型，葉長較長，而混合光葉面積稍大於紅光下生長之喜樹葉面積。在葉綠素 a、b 與葉綠素總量上白光與混合光多於紅光及藍光下生長的喜樹組培苗，元素分析發現藍光下生長的喜樹組培苗除 Ca、Mg 之外，營養元素含量皆明顯高於其他色光下生長的喜樹組培苗。

前言

喜樹為喜樹科(Nyssaceae)喜樹屬(*Camptotheca acuminata* Decne.)，落葉喬木植物，原產於中國大陸長江流域及南方各省區。最早於 1966 年由 Wall 等人在喜樹的木材分離出喜樹鹼(camptothecin, 簡稱 CPT)(張等, 2006)。

該樹種因具有抗癌和抗逆轉錄病毒的生物鹼：喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼等(王, 2008)，因此植物學界和醫藥學界開始重視其發展與重要性。有別於大多數已在臨床上所使用的抗癌藥物均是以 Topoisomerase II 為作用標的物，喜樹鹼具有獨特性質，是以 Topoisomerase I 為作用標的物(楊等, 2009)。近年來其相關研究著重於在產地差異(張, 2002; 王等, 2005)、

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

實生苗繁殖(陳等, 2004)、組織培養(張等, 2006)、細胞懸浮培養(高等, 2003)、結構剖析(Monacelli et al., 2005)、喜樹鹼含量測定(黃等, 2008; 閻等, 2002)等。

光品質對外觀和生產力有重要的作用(Massa et al., 2008)。光原使用發光二極體(LED)控制光譜(Morrow, 2008)。可與作物極度接近, 耗電量小、衰減少且使用壽命通常為螢光燈管的 10 倍以上。可做為組培苗人工光源的另一選擇(饒等, 2003)。

材料與方法

一、植物材料與培養環境

本研究培植體材料(*Camptotheca acuminata* Decne.)取自康拜爾公司提供之喜樹插穗, 扦插於台灣國立中興大學園藝試驗場。成活之扦插苗木, 取 4±1 公分之芽梢作為培植體進行組織培養繁殖(圖一), 組織培養試驗地點在台灣國立中興大學作物科學大樓園藝學系 7 樓組織培養室

初代培養創始取自枝條腋芽, 首先誘導培植體分化多芽, 將單一芽體切下繼代培養於黑暗環境下一個月, 再移至各光源環境進行光照處理一個月後記錄結果。本試驗使用 WPM 培養基添加 IBA (0.5 mg/L)和 BA (0.5 mg/L)。培養基定量後使用 KOH 與 HCl 調整 pH 至 5.5, 再添加 Difco Bacto-Agar $6\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, 加熱至培養基澄清無懸浮, 分裝於蘭花瓶中, 每瓶填充 100ml 培養基, 以 121°C 高壓滅菌 20 分鐘, 滅菌完冷凝靜置 3~5 天使用。

光源條件: 培養於冷白光 W(型號: NBL-T84-K, 50W, 色溫: 5000~5500L, 17W/110V, 400-700nm)、紅光 R(型號: NBL-T84-R, 50W, 9R/12W/110V, 650nm)、藍光 B(型號: NBL-T84-B, 9B/17W/110V, 450nm)與混和光 P(紅+藍)(型號: NBL-T84-6R3B, 6R3B/14W/110V), 光度 700-1000 lux($8.54\text{-}12.2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)光週期設定明暗期為 12/12 小時(光茵生物科技股份有限公司)。每次試驗各色光一蘭花瓶, 每瓶內 4 株, 共四重複。

二、植株調查與分析方法

(一) 葉片葉綠素含量之分析

將瓶苗葉片秤重 0.025g 後切成細碎, 浸泡於 10ml 的混合液(80%丙酮及 20%甲醇), 於室溫下黑暗處理 24 小時候完全萃取葉綠素, 再以分光光度計(Hitachi U-2001, Hitachi Co. Japan)測定在 645、652 及 663nm 波長下之吸光值, 並利用下列公式計算單位葉種之葉綠素 a、b 及總葉綠素含量。

$$\text{Chl a. (mg/g)} = (12.7 \times \text{O.D.}_{A_{663}} - 2.69 \times \text{O.D.}_{A_{645}}) \times V / 1000W$$

$$\text{Chl b. (mg/g)} = (22.9 \times \text{O.D.}_{A_{645}} - 4.68 \times \text{O.D.}_{A_{663}}) \times V / 1000W$$

$$\text{Total Chl. (mg/g)} = (12.7 \times \text{O.D.}_{A_{652}} \times 1000 / 34.5) \times V / 1000W$$

V: 萃取液之總體積(ml)

W: 葉片鮮重(g)

(二) 灰份成分分析樣品前處理

試驗材料於採樣後 1 分鐘內洗滌，先以自來水洗除附著於葉面上之塵土污物，再以 1% HCl 涮洗，最後以去離子水快速沖洗三次，洗畢後放入牛皮紙袋。將牛皮紙袋置於可通風之烘箱中以 100°C 烘 1 小時以上殺菁，停止其生化作用；後置於 70°C 烘 48 小時以上，以減少自身之分解作用。之後以磨粉機磨碎，樣品以 20~40 mesh 過篩。將粉碎的樣品裝入硫酸紙袋中保存於乾冷處。

乾灰化法：將磨成粉之樣品置入 70°C 烘箱中烘乾 12 小時，稱取 0.5 g 樣品置於坩鍋中，放入灰化爐內。先以 200°C 加溫兩小時，繼以 400°C 一小時，最後以 550°C 烘兩小時使之完全灰化，等樣品取出冷卻後，加入 5 ml 2N HCl (Merck) 將灰分溶解，以去離子水將坩鍋內之樣品完全洗下，經 Whatman #42 濾紙過濾並定量至 25 ml，裝入 PE 瓶(AA 瓶)內保存。

(三) 元素分析 - AA 測定金屬元素

儀器使用 Varian Spectra AA - 10/20 System，銅、錳、鋅、鐵、鎘、鉬可直接用灰化所得之濾液(50x)，鉀、鎂取 0.1 ml 濾液，加 4.9 ml 去離子水稀釋 50 倍後測定。鈣取 0.1 ml 濾液，加 3.9 ml 去離子水及 1 ml 之 5% 氧化釷混合後測定(此間之稀釋倍率為 50 倍)。

(四) 氮元素分析

將磨碎之樣品於 70°C oven 烘乾一夜，精稱 0.2g 樣品包於 Toyo NO.1 濾紙，置入分解管中。加入 1 g 之催化劑(K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se = 100 : 10 : 1, w/v)。加入 4.5 ml 之濃硫酸，放至分解爐中以 410°C 加熱分解。至管中液體呈澄清之綠色後，繼續直至沒有白煙冒出(約 30 mins - 1 hr)。取出冷卻約 10 分鐘後加入 15 ml 蒸餾水，如為澄清淺藍，表示分解完全。完全分解之樣品移至 micro - Kjeldahl 裝置，加入 20 ml 之 12 N NaOH，通蒸氣使氮化，丙用含指示劑之 2% Boric acid 20 ml 接收氮氣及氨水，至總體積達 50 ml 時為止。

結果

試驗使用繼代所得新芽，挑選生長情形相似之植株，進行培養試驗一個月後測量數據。結果顯示，喜樹組織培養苗培養在白光下葉長 1.3 cm，葉寬 0.5 cm，培養在紅光下葉長 0.9 cm，葉寬 0.4 cm，在白光下生長之喜樹其葉較在紅光下為大，在藍光下生長的喜樹組培苗其葉長 1.1 cm，葉寬 0.4 cm，葉形比白光及紅光下生長之喜樹組培苗為細長；混合光下生長之喜樹組培苗其葉長 1.0 cm，葉寬 0.4 cm，葉部形態與白光相較之下無明顯差異，平均葉長與葉寬介於白光與紅光下生長之喜樹組培苗之間(表 1、圖 1)。

在白光下其總葉綠素含量為 255.8 mg/g，葉綠素 a 含量為 2.0 mg/g，葉綠素 b 含量為 7.7 mg/g；在紅光下生長之組培苗葉綠素較少，其總葉綠素含量為 132.4 mg/g，葉綠素 a 含量為 1.2 mg/g，葉綠素 b 含量為 4.4 mg/g；而在藍光下其總葉綠素含量為 204.3 mg/g，

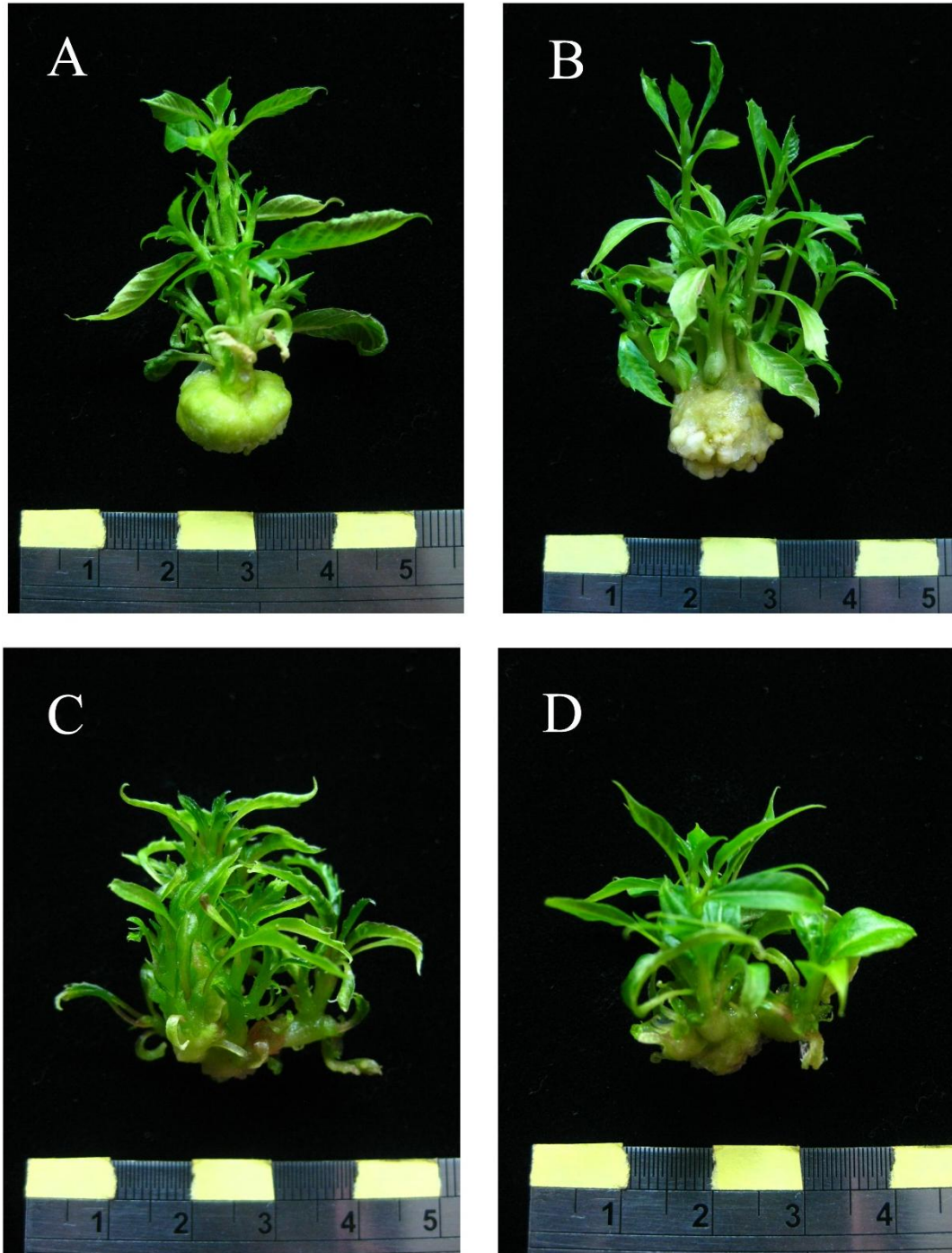


圖 1. 不同色光(A)白光(B)紅光(C)藍光(D)混合光下喜樹組培苗的生長比較

Fig.1. The effect of (A) white light, (B) red light, (C) blue light, and (D) P(6R3B) on the plant growth *in vitro* *Camptotheca acuminata* Decne.

葉綠素 a 含量為 1.6 mg/g，葉綠素 b 含量為 6.2 mg/g；在混合光下與葉長寬結果相似，與紅、藍光下培養的結果相比，混合光與白光下培養的結果較為接近，其總葉綠素含量為 222.8 mg/g，葉綠素 a 含量為 2.1 mg/g，葉綠素 b 含量為 7.3 mg/g(表 1)。

四個不同光質下進行營養元素分析，N 含量在單色光紅、藍光下相較於白光與混合光含量較高，分別為 4.1%與 4.5%。藍光下營養元素 P、K、Fe 相較於其他色光下數值較高，尤其是 K 含量尤為明顯達 5.0 ppm，其他色光下元素則較為接近(表 2)。

表 1. 不同色光下喜樹培植體葉長寬與葉綠素含量

Table1. The effect of light source on *Camptotheca acuminata* Decne. leaf length, leaf width and chlorophyll content.

Light source ^z	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Chl. a (mg/g)	Chl. b (mg/g)	Total Chl (mg/g)
W	1.3a ^y	0.5a	2.0a	7.7a	255.8a
R	0.9a	0.4b	1.2a	4.4b	132.4b
B	1.1a	0.4b	1.6ab	6.2a	204.3a
P(6R3B)	1.0a	0.4b	2.1a	7.3a	222.8a

^z : W=White light ; R=Red light ; B=Blue light ; P=6R3B mixed

^y : mean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$

表 2. 不同色光下喜樹培植體營養元素分析

Table2. The effect of light source on *Camptotheca acuminata* Decne. nutrient elements analysis.

Light source ^z	N(%)	P(ppm)	K(ppm)	Ca(ppm)	Mg(ppm)	Fe(ppm)	Mn(ppm)	Zn(ppm)	Cu(ppm)
W	2.7	16.9	0.9	0.3	0.1	1.0	2.0	1.9	0.1
R	4.1	15.8	0.8	0.2	0.0	1.1	1.9	2.0	0.1
B	4.5	18.1	5.0	0.2	0.0	1.6	2.0	2.2	0.1
P(6R3B)	3.0	16.6	0.3	0.2	0.0	1.0	1.9	1.9	0.1

^z : W=White light ; R=Red light ; B=Blue light ; P=6R3B mixed

討論

葉綠素含量會直接影響其光合作用的能力，當光波長在吸收峰值範圍內時，光質能被吸收並提高活性態光敏色素的量，從而引起酶活性、激素水準的變化，進一步影響植物形態形成(劉等, 2009)。邢等人(2012)的試驗中，也同樣是在白光下不論葉綠素a、b或總量皆高於單色光，但在於紅光與藍光之間的比較則與本試驗結果相反，是紅光葉綠素含量數倍於藍光，可是岳等人(2013)在木本植物杜鵑花上的試驗指出，葉綠素a含量藍光最高，葉綠素b含量則是紅光下生長之杜鵑花較高，因此考慮單色光造成的葉綠素含量差異，容易因不同植物如草本、木本甚至樹種差異而有變化。單色光下之葉綠素含量低於複合光的現象，在早期Kennedy太空中心試驗過小麥幼苗給予 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 紅色LED光，卻未能產生葉綠素，直到補充 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的藍色LED光或是將紅色LED光降低至 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 才有葉綠素產生(Massa et al., 2008)，而且光合作用速率則隨著藍光量上升而增加。白光有利於葉綠素的合成，而且與單色光相比，複合光在葉綠素的生成上明顯較為突出，所以仍然以適當的複合光培養才能達到最佳的葉綠素合成與作用。

本試驗進行LED白光、紅光、藍光與混合光對喜樹組織培養苗的影響，在培養一個月後可以看到從葉部的外表型態已有差異。生長量與型態上以白光最佳，混合光其次，與單色光的紅光與藍光相比，複合型光在喜樹的組織培養中作為培養優良瓶苗會比單色光來的合適，但其生長速度與白光相比仍遲緩且矮小；紅光下生長之喜樹有些微徒長，雖然不適合做為後期馴化發根的色光選擇，但紅光較其他光質更有利於試管苗的增殖(劉等, 2009)，作為優質瓶苗而言其馴化過程中容易死亡；而藍光下生長之喜樹其葉形變為狹長，相較之下紅光下的葉長寬比例與白光相比沒有明顯變化，只是葉長寬稍微縮減；此結果與蘇等人(2012)結果相似，造成此結果的原因可能是紅光促進伸長生長，藍光抑制縱向生長，IAA氧化酶的活性接受藍光而提高，進而降低植物體內的IAA，因此抑制了植物伸長生長(劉等, 2009)。

營養元素方面，N含量在單色光紅、藍光下相較於白光與混合光含量較高，而且在藍光下生長之喜樹組培苗，除了Ca、Mg元素之外，其他營養元素吸收量明顯大於其他試驗組，其原因據俞(2009)的報告中指出，利用擬南芥在藍光受體隱花色素的缺失，觀察到元素吸收出現明顯的差異。

整體狀況評估仍然以白光下生長之喜樹組培苗較佳，其在生長量，外表健壯程度，葉綠素含量都有優於其他光質下生長之喜樹組培苗數據。

參考文獻

王自芬、劉文哲。2005。不同產地喜樹果實中喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼的差異。中草藥 Chinese Traditional and Herbal Drugs。36(5):762-764。

- 王玲麗。2008。喜樹的研究進展。安徽農學通報。4(1):156-157。
- 邢澤南、張丹、李薇、張歡、章麗麗、崔瑾。2012。光質對油葵芽苗菜生長和品質的影響。南京農業大學學報。35(3):47-51。
- 岳靜、潘遠智、鮮小林、陳睿。2013。光質和 B9 對杜鵑花觀賞性狀及生理特性的影響。林業科學。49(1):77-84。
- 俞竟。2009。隱花色素對礦質元素吸收的影響。湖南大學碩士論文。65pp。
- 高桂珍、周吉源。2003。喜樹細胞懸浮培養中生理生化指標的測定。武漢植物學研究。21(3):259-261。
- 陳舜英、黃玲瓏、簡慶德、許原瑞。2004。層積濕藏對喜樹果皮構造及種子發芽儲藏的影響。台灣林業科學。19(4):287-295。
- 張玉紅。2002。喜樹果實中喜樹鹼含量的產地差異及季節變化。東北林業大學學報。30(6):44-46。
- 張淑華、蔡錦瑩、何政坤、黃芷雲。2006。喜樹癒合組織之培養與喜樹鹼含量分析。台灣林業科學。21(4):513-521。
- 黃寶美、姚程煒、邊清泉、王秀峰、莫金垣。2008。喜樹果中喜樹鹼含量的高效毛細管電泳培養法測定。分析測試學報。27(3):319-321。
- 楊士平、李慶國。2009。喜樹鹼及其衍生物的歷史回顧及展望。化學。67(1):45-60。
- 閻秀峰、王洋、于濤、張玉紅、殷麗君。2002。喜樹葉中喜樹鹼含量的高效液相色譜分析。分析測試學報。21(2): 15-17。
- 劉媛、李勝、馬紹英、張真、張青松、羅麗媛、薛沖、裴曉利。2009。不同光質對葡萄試管苗離體培養生長發育的影響。園藝學報。36(8):1105-1112。
- 饒瑞佶、方煒、蔡田龍。2003。超高亮度紅、藍光 LED 應用於蝴蝶蘭組培苗栽培之研究。農業機械學刊。12(4):93-100。
- 蘇建榮、臧傳富、劉萬德、李帥鋒、張志鈞。2012。光質對雲南紅豆杉生長及紫杉烷含量影響的研究。林業科學研究。25(4):419-424。
- Massa G. D., H. H. Kim, R. M. Wheeler, and C. A. Mitchell. 2008. Plant Productivity in Response to LED Lighting. Hort. Sci. 43(7):1951-1956.
- Monacelli B., A. Valletta, N. Rascio, I. Moro, and G. Pasqua. 2005. Laticifers in *Camptotheca acuminata* Decne: distribution and structure. Protoplasma 226:155-161.
- Morrow R. C. 2008. LED Lighting in Horticulture. Hort. Sci. 43(7):1947-1950.

The Effect of Light Source on the *in vitro* Plant Growth of *Camptotheca acuminata* Decne.

Pen-Mao Chang¹⁾ Ruey-Song Lin²⁾

Key word: *Camptotheca acuminata* Decne., *in vitro*, Light-Emitting Diode(LED)

Summary

In present year, extract of camptothecin from *Camptotheca acuminata* Decne have been used as anticancer medicine. The important way were used clone to product *Camptotheca acuminata* Decne. In primary knowledge light not only participate photosynthesis but also affect photomorphogenesis, and it's a key factor for tissue culture. The aim of this study were investigated Light-Emitting Diode(LED), on *Camptotheca acuminata* Decne plantlet growth and development in vitro. Result indicated that under the white light had better length and width of leaf, it is 1.3 cm and 0.5 cm respectively. The leaf morphogenesis made more long and narrow under the blue light, It had better leaf area under combination light than under red light. In terms of chlorophyll a, b and total chlorophyll content of plantlets which under the white and combination light showed more chlorophyll content than others light source on *Camptotheca acuminata* Decne plantlet. In terms of nutrient elements analysis that under the blue light showed higher content than others light source, excluded calcium and magnesium of *Camptotheca acuminata* Decne plantlet.

1) Graduate Student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.