

研究報告

巴克素促進轉基因赤桉花芽分化

鍾振德^{1,3)} 陳振榮¹⁾ 蔡佳彬²⁾ 謝淳如¹⁾ 李玉珍¹⁾

摘 要

本研究施用巴克素於6個月生基因轉殖赤桉嫁接苗，檢測巴克素處理後提早開花之效果，對苗木生長之影響以及內生激勃素、離層酸與吲哚乙酸含量之變化與巴克素於葉部之殘留分析。巴克素100%使6個月生基因轉殖赤桉提早開花，莖部注射與土壤施灌的效果延續兩年，巴克素處理後造成節間縮短，且葉部顏色變淡，苗木基部產生氣根現象。種子沒有受到藥劑影響可以正常發育與發芽。巴克素阻斷激勃素早期合成，試驗結果顯示赤桉花芽分化期間巴克素無法抑制激勃素GA₁, GA₃, GA₄, GA₈, GA₂₀, GA₂₄以及GA₅₃等形式合成。但巴克素卻使內生離層酸與吲哚乙酸含量下降約1/3。利用熱裂解儀與氣相層析質譜儀分析巴克素殘留，在花芽分化時檢測三年含量每克乾重分別為34.7, 0.31, 0 μg。

關鍵詞：巴克素、赤桉、開花誘導、激勃素、離層酸。

鍾振德、陳振榮、蔡佳彬、謝淳如、李玉珍。2007。巴克素促進轉基因赤桉花芽分化。台灣林業科學 22(4):455-67。

Research paper

Promotion of Flower Induction in Transgenic *Eucalyptus camadulensis* Trees by Paclobutrazol

Jeng-Der Chung,^{1,3)} Zenn-Zong Chen,¹⁾ Jia-Bin Tsai,²⁾
Chun-Ju Hsieh,¹⁾ Yu-Jen Li¹⁾

【 Summary 】

This paper reports a series of experiments in which paclobutrazol was applied to 6-mo-old transgenic *Eucalyptus camadulensis* grafts to examine its relative effects on precocious flowering, growth, and levels of gibberellin (GA), abscisic acid (ABA), indoleacetic acid (IAA), and paclobutrazol residues in the shoot apex. Paclobutrazol was effective in promoting precocious flowering in *E. camadulensis*. Responses to a trunk injection and soil drenching persisted for up to 2 yr, but growth responses were not expressed for another year. Paclobutrazol reduced internode length,

¹⁾ 行政院農業委員會林業試驗所育林組，10066台北市南海路53號 Division of Silviculture, Taiwan Forestry Research Institute, 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

²⁾ 行政院農業委員會林業試驗所六龜研究中心，84443高雄縣六龜鄉中興村198號 Liukuei Research Center, Taiwan Forestry Research Institute, 198 Chunghsin Village, Liukuei, Kaohsiung 84443, Taiwan.

³⁾ 通訊作者 Corresponding author, e-mail: chung@tfri.gov.tw

2007年7月送審 2007年9月通過 Received July 2007, Accepted September 2007.

and leaves appear less green. Paclobutrazol induced aerial roots at the basal portion of the grafts. Assessment of seed yield per capsule and subsequent germination tests showed no deleterious effects on seed development or quality. Paclobutrazol is known to block gibberellin production early in the biosynthesis pathway, but it cannot inhibit endogenous gibberellin biosynthesis, including GA₁, GA₃, GA₄, GA₈, GA₂₀, GA₂₄, and GA₅₃ during flower bud initiation. Paclobutrazol treatment reduced endogenous ABA and IAA levels by about 1/3. During flower bud initiation, paclobutrazol residues in the shoot apex as determined by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry were 34.7, 0.31, and 0 µg·g⁻¹ dry weight in the 1st to 3rd yr after treatment, respectively.

Key words: paclobutrazol, *Eucalyptus camadulensis*, flower induction, gibberellin, ABA.

Chung JD, Chen ZZ, Tsai JB, Hsieh CJ, Li YJ. 2007. Promotion of flower induction in transgenic *Eucalyptus camadulensis* trees by paclobutrazol. *Taiwan J For Sci* 22(4):455-67.

緒言

巴克素(paclobutrazol)亦名Bonzi、Clipper、Cultar以及P333等等，化學名稱((2RS,3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl-pentan-3-ol)。巴克素於1976年被發現，屬於Triazol系統的矮化劑，純品為白色晶體，熔點在165~166°C，不溶於水，可溶於環己酮、丙酮、甲醇、二氯甲烷等有機溶劑(農委會2000年公告資料)。巴克素破壞內在激勃素(gibberellin)之合成，主要是抑制了*ent*-kaurene oxidase與Cyt P-450 oxidase之活性，破壞*ent*-kaurene生合成*ent*-kaurenoic acid之過程(Goldsmith et al. 1983, Dalziel and Lawrence 1984)。巴克素的生化作用包括從葉部轉化同化物到根部，增加葉部之葉綠素含量、可溶性蛋白質以及微量元素，增加根部呼吸作用以及減少水分的利用(Wang and Steffens 1985, Wang et al. 1985)。

巴克素對激勃素生合成具有破壞作用，但對激勃素本身不發生拮抗作用，亦即外加激勃素後之生化作用不會受到抑制(Sterrett 1985)。巴克素與其它生長抑制劑最大的不同點在於其抑制地上部的伸長，但對根部卻有促進生長的作用。巴克素透過木質部往上運送，一般增加根的粗細，卻使根長度減短，增加root/shoot比，影響同化物分配(assimilate partitioning)(Symons et al. 1990)。

桉樹類(*Eucalyptus* spp.)可經巴克素誘導開花之樹種，包括*E. nitens* (Griffin et al.

1993, Moncur et al. 1994, Williams et al. 2003, Gardner and Bertling 2005)，*E. grandis* x *urophylla*、*E. grandis* x *gunnii*、*E. dalrympleana* x *gunnii* (Cauvin 1992)，以及*E. globules* (Hetherington et al. 1992, Chambers et al. 1997)。赤桉為引進台灣的桉樹類中最具潛力的樹種，惟尚未有以巴克素誘導開花相關研究文獻。另外，桉樹原生南半球，時序與台灣相反，需求得巴克素最適當的處理時機。

巴克素誘導開花之機制為破壞內生激勃素後期合成，減少cellulose含量，使頂梢伸長受到抑制(Wang et al. 1986)。頂梢受到抑制使花芽形成率高，導因於頂梢GA₁含量下降，為有效提高花芽分化，抑制激勃素合成被認為是個關鍵因子(Moncur and Hasan 1994)。

赤桉基因轉殖體系已經在林試所研究室建立，也成功培育基因轉殖苗木(Ho et al. 1998, Chen et al. 2001)。根據農委會2007頒佈之「基因轉殖植物遺傳特性調查及生物安全評估原則」明訂基因轉殖苗木釋放到田間需進行相關研究，尤其與近緣植物或同種雜交之可能性評估。基因轉殖植物透過開花與花粉的傳播，具有失去控制之風險，進而對環境造成影響(Eastham and Sweet 2002)。花粉的散播是基因流動的重要策略，花粉為仲介將基因予以傳遞是很難掌控的遺傳流動，以蜜蜂為媒介來傳播花粉，距離常超過1000 m以上(Saeglitz and Bartsch 2001)。自然情況下，赤桉達到開花之

年齡需2~3年以上，為了使基因轉殖赤桉未釋放到田間前，能預先瞭解轉殖基因如何透過花粉傳佈，因此建立誘導開花方法將可以使我們進行評估。本研究探討基因轉殖赤桉以巴克素處理誘導開花之方法、處理時機、處理後芽體激勃素、離層酸與吲哚乙酸濃度之改變以及巴克素在芽體殘留之時間等等。

材料與方法

一、試驗苗木

試驗苗木赤桉為利用農桿菌將顛楊(*Populus tremuloides*)之4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL)基因，轉殖到經過傳統選育之優良赤桉品系no. 48，取得基因轉殖之細胞團，經癒合組織再誘導芽體而長成之苗木(Chen et al. 2001, 2006)。基因轉殖赤桉組織培養之苗木，以扦插進行苗木增殖時，根系發育不佳(陳振榮，未發表資料)。為了獲得足夠苗木供本試驗之需，乃將基因轉殖赤桉組織培養苗木於1年生時，取其接穗嫁接到6個月生苗高25~30 cm赤桉砧木上，成活後移植至內徑30×底徑25×高34 cm，容積為20 L之分離盆，培育介質為泥炭土與蛭石(體積比1:1)，繼續培育6個月，當苗木高約1.5 m時，進行試驗處理。

二、巴克素劑量與施用方法比較

2004年6月將基因轉殖赤桉分別以5種不同巴克素劑量，以莖部注射或土壤施灌，檢測促進花芽分化。土壤施灌採用23%巴克素乳劑(Cultar，台灣商品名好采頭)，處理劑量分別為0、1、2、4及8 mL等5種，每種藥劑重複處理4株，共計處理20株。莖部注射取純度99.9%之巴克素藥劑(Wako, Japan)溶解在無水酒精(100%乙醇)，濃度為25 mg/mL，共處理3種劑量分別為每株0、5及25 mg等3種，每種藥劑重複處理4株，共計處理12株；莖部注射時先以電鑽於樹幹鑽孔，並以注射針取前述藥劑注射進入樹體。

三、處理時機之效果

因上述赤桉施用巴克素之劑量與方法，於

2005年6月已經獲知23%巴克素乳劑在1~8 mL皆可100%誘導開花。而桉樹促進開花結實之研究大都集中在其原產地澳洲以及南非兩地，由於南北半球時序相反，在台灣處理的最佳時機為何？為了明瞭在接近生長停滯時期處理之效果，因此在2005年10月中旬(Fig. 1)進行本試驗，藥劑全部採用23%巴克素乳劑8 mL進行土壤施灌，處理材料與上述赤桉相同為嫁接之基因轉殖苗木，培育的條件亦與上述赤桉相同。並於2006年8月調查其繖狀花序數量，調查分析方法與上述赤桉相同。

四、花芽分化數量調查

桉樹為繖狀花序(umbel)，每一個繖狀花序有1~7枚不等的花苞，但常見為5~7枚。在2005年6月裸眼可見花苞出現，同年8月繖狀花序發育到花苞清楚可見之際，調查繖狀花序的數量，以及每朵繖狀花序有多少枚花苞。2006年7月繼續調查處理後第二年之開花表現。所有調查各參數(parameters)資料，以(SAS 1991)的GLM進行統計分析，並以Tukey's test測定平均值之差異。

五、激勃素萃取分析

為比較經巴克素與沒有處理之芽體內生激勃素之變化，在2005年5月底裸眼尚未見花芽之前，取Fig. 2頂端分生組織(apical shoot tissue)(包括meristematic apices及unexpanded leaf)分析激勃素含量。分析樣品僅自土壤施灌4與8 mL兩種劑量之處理予以採收，未處理的苗木為對照。激勃素分析方法由Chung et al. (2003)簡化流程：秤取上述樣品鮮重約1.0 g，以液態氮快速研磨粉碎，加入80% MeOH，添加內標標準品(17,17-d2-standards)包括12種激勃素(GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₇, GA₈, GA₉, GA₂₀, GA₂₄, GA₂₉, GA₄₄及GA₅₃)、離層酸(²H₆(+)cis,4-trans-ABA)以及IAA(phenyl-13C₆Indole-3-acetic acid)後，予以萃取、過濾、分離與置換經快速冷凍真空濃縮乾燥，樣品再經高壓液相層析儀RP-C₁₈分離管柱分離並經由fraction collector收集，收集的分離過樣品再經快速冷凍真空濃

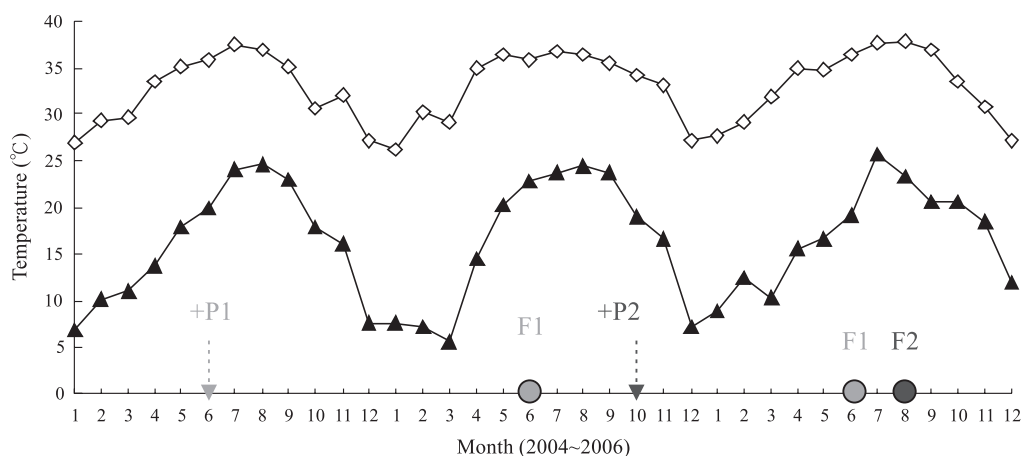


Fig. 1. Monthly mean maximum and minimum temperatures in Taipei, Taiwan. ◇, maximum temperature; ▲, minimum temperature; +P1 and +P2, times when paclobutrazol was applied in 2004 and 2005; F1 and F2 indicates flower bud observations.



Fig. 2. Effects of paclobutrazol. Paclobutrazol reduced the internode length, and the leaves appeared less green in the graft of transgenic *Eucalyptus camadulensis* trees.

縮乾燥，以ethereal diazomethane進行甲基化處理，再以氮氣吹乾後用pyridine加入內含1% TMCS之BSTFA進行矽化處理，樣品處理過後以氣相層析質譜儀GC-MS (GC為HP6890N型，MS為HP5975 MSD型) DB-1毛細管柱(0.25 μ m film，內徑0.25 mm×長30 m)，以selected ion monitoring (SIM)進行定量分析(Chung et al. 2003)。

六、芽體巴克素分析

比較經巴克素處理與對照組之植株，經1~3年後，其芽體巴克素殘留分析。分析材料取植株頂梢下第二、三節之芽體，芽體取下後經冷凍乾燥(LABCONCO，型號FREZZONE6)後研磨成粉狀。萃取依照Wang et al. (1986)，先以80%甲醇萃取，經減壓濃縮機乾燥至僅存水態，調整pH值到11.0，與二氯甲烷進行置換，再把二氯甲烷經減壓濃縮機乾燥，後取少量二氯甲烷溶解，進入熱裂解儀(Frontier Lab, single-shot pyrolyzer PY 2020 iS)氣化，熱裂解儀分析條件：熱裂解儀自動進樣器(Frontier Lab, Auto-shot sampler AS-1020E)推進樣品，推進過程打開進樣口，會使空氣進入，乃以氮氣進行purge 120秒，將空氣趕出進樣口。樣品隨即進入熱裂解儀(Frontier Lab, single-shot pyrolyzer PY 2020 iS)加熱區，以300°C進行加熱氣化樣品30秒，氣化樣品由carried gas氮氣推進入氣相層析質譜儀之進樣口，隨即進入層析管柱進行分離。樣品經熱裂解儀氣化後，進入氣相層析質譜儀GC-MS (GC為HP6890型，MS為HP5973 MSD型) DB-1毛細管柱(0.25 μ m film，內徑0.25 mm×長30 m)進行分離鑑定分析。氣相層析質譜儀注射溫度300°C，採分流(split)，

分流比(split ratio)為10:1。分析管柱在60°C維持2分鐘，然後以每分鐘20°C，上升到220°C，再以每分鐘4°C，上升到300°C維持5分鐘，完成一個樣品所需時間共計為37分鐘。GC與MS間的interface溫度設定300°C。離子化電壓(electron energy) 70 eV。樣品用scan ion monitoring於50~300質量範圍進行分析，以NIST05資料庫比對確認為巴克素後再進行定量分析。定量計算分析以不同濃度巴克素標準品經GC-MS分析SIM選取ions 236、167及125之波峰定量所得之檢量線進行計算。

結果

一、巴克素施用方法與劑量之比較

(一)開花比率

2004年6月土壤施灌巴克素及莖部注射巴克素二處理方法之植株，2005年6月花芽分化，二種處理方法處理之盆鉢植株全部100%開花，而對照組並沒有任何花芽分化(Table 1)。處理巴克素後，藥效可以延續二年，2006年6月花芽分化後，土壤施灌4 mL的23%巴克素的植

株100%開花，而其它三個處理則僅50~75%開花；莖部注射處理植株第二年仍可以延續100%開花(Table 1)。

(二)花序數量與結實

兩種處理方法間花芽分化數量並沒有顯著的差異(Table 1)。土壤施灌23%巴克素乳劑，第一年花芽分化數量以處理8 mL最多，每株平均有105.8個繖狀花序，最少者是處理1 mL僅有41個繖狀花序。處理濃度間沒有顯著差異，導因於處理濃度內花芽分化數量彼此差異很大，Table 1處理濃度8 mL其標準偏差即達95.8。藥效延續到第二年，平均每株的花序數量以土壤施灌23%巴克素乳劑2 mL最多，有108.5個花序，最少仍為1 mL之8.5個(Table 1)，不同濃度處理間繖狀花序數量差距達一倍以上。類似情形也在莖部注射處理呈現，5或25 mg注射的平均花序數量是沒有差異的，第一年平均每株在21.7~30.3個，第二年平均每株18~49.7個花序。

兩種處理方法對於花芽分化數量，顯見巴克素對於赤椴花的誘導，兩種處理方法皆可達成，但若考量處理藥效是否可以延續到下一年，則以莖部注射較佳。

Table 1. Effects of paclobutrazol treatment on umbels production and growth of grafts of transgenic *Eucalyptus camadulensis* growing in Taipei, Taiwan

Treatment	Percent (%) of pots with umbels		No. of umbels per tree (mean ± SD)		Second-year growth (mean ± SD)	
	Year 1	Year 2	Year 1	Year 2	Height (cm)	Basal diameter (cm)
Control	0	0	0 ^{b1)}	0 ^b	274.3 ± 51.7 ^a	3.2 ± 0.8 ^a
Paclobutrazol						
23%: soil drenching						
1 mL	100	50	41.0 ± 51.2 ^a	8.5 ± 10.1 ^a	271.3 ± 38.4 ^a	3.3 ± 1.3 ^a
2 mL	100	75	80.0 ± 31.7 ^a	108.5 ± 157.4 ^a	260.8 ± 48.1 ^a	3.7 ± 0.5 ^a
4 mL	100	100	74.8 ± 41.7 ^a	73.8 ± 64.8 ^a	297.5 ± 44.4 ^a	3.6 ± 0.3 ^a
8 mL	100	50	105.8 ± 95.8 ^a	59.8 ± 84.4 ^a	282.5 ± 38.0 ^a	3.8 ± 0.7 ^a
98%: stem injection						
5 mg	100	100	30.3 ± 18.5 ^a	18.0 ± 22.5 ^a	286.0 ± 5.3 ^a	3.8 ± 0.5 ^a
25 mg	100	100	21.7 ± 4.0 ^a	49.7 ± 38.0 ^a	280.0 ± 37.7 ^a	4.1 ± 0.5 ^a

¹⁾ Values within columns followed by the same letter do not significantly differ at the $P < 0.05$ level.

(三)生長之差異與結實

巴克素處理過後對於第二年之高生長與基徑沒有顯著的差異(Table 1)，處理植株高生長為260.8~297.5 cm，基徑為3.3~4.1 cm，對照組高生長與基徑分別為274.3及3.2 cm。但巴克素對於節間差異極顯著效應，對照組為 4.3 ± 0.7 cm，但經巴克素處理者卻僅 2.8 ± 0.8 cm。Figure 2為經過巴克素處理植株，除了節間明顯的較短之外，其新葉呈現出灰白色與對照組的翠綠色明顯的不同。巴克素處理過後，另於樹幹基部產生氣根現象(Fig. 3)，對照組並沒有此現象發生。經過巴克素處理後，採收之果實100%具飽滿種子，所有飽滿種子欲進行後續實驗，因此播種在無菌MS培養基，結果100%具發芽能力。

二、處理時間之差異

Figure 1為台北於2004到2006年三年間台



Fig. 3. Effects of paclobutrazol. Paclobutrazol induced aerial roots at the basal portion of grafts of transgenic *Eucalyptus camadulensis* trees.

北各月的平均高低溫圖(中央氣象局資料)，由各月的平均低溫資料顯示，每年的七、八月其平均最低溫為所有各月中最高，都在 20°C 以上，2004年6月處理後於翌年(2005年)與次二年(2006年)6月開花(Table 1, Fig. 1)。為比較不同處理時間是否影響開花，因此於2005年10月再處理仍為經嫁接相同基因轉殖之赤桉苗木，處理方法僅以土壤施灌23%巴克素乳劑8 mL，結果造成其開花時間延緩2個月，至2006年8月才見花芽分化，且開花比率較低，共計處理34株僅15株具有花芽，比率為44.1%，花芽數量為 62.8 ± 77.4 個花序。

三、花芽分化時芽體的激勃素、吲哚乙酸與離層酸之含量

比較土壤澆灌23%巴克素乳劑0、4及8 mL於花芽分化前芽體的激勃素含量，結果可以看出經過巴克素處理者，在花芽接近分化之際，其芽體的激勃素含量，與未處理的對照組沒有差異，其中 GA_1 含量為 $0.3\sim 0.4 \text{ ng g}^{-1}$ fresh weight (FW)， GA_3 含量為 1.7 ng g^{-1} FW， GA_4 含量為 $0\sim 1.1 \text{ ng g}^{-1}$ FW， GA_8 含量為 $1.2\sim 1.4 \text{ ng g}^{-1}$ FW， GA_{20} 含量為 $32\sim 33.3 \text{ ng g}^{-1}$ FW。但是 GA_{24} 卻為對照組高於巴克素處理，其含量對照組、巴克素4與8 mL分別為2.1、1.6及 1.3 ng g^{-1} FW。 GA_5 、 GA_7 、 GA_9 、 GA_{29} 及 GA_{44} 對照組或巴克素處理之含量都為0。

離層酸(abscisic acid, ABA)與吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)經巴克素處理明顯低於未處理的對照組，處理23%巴克素8 mL之芽體離層酸為 807.5 ng g^{-1} FW，4 mL則為 1176.5 ng g^{-1} FW，而對照組更高為 1271.1 ng g^{-1} FW。隨著處理巴克素劑量越高芽體離層酸亦隨之下降(Table 2)，此現象亦在IAA呈現，巴克素處理8與4 mL芽體之IAA含量分別為28.1與 38.4 ng g^{-1} FW，而對照組芽體的IAA含量則為 47.5 ng g^{-1} FW。

四、芽體巴克素鑑定與殘留量分析

(一)巴克素鑑定

為證實芽體含有巴克素殘留，使用GC-

Table 2. Effects of paclobutrazol treatment on endogenous gibberellin concentrations (ng g⁻¹ fresh weight (FW)) in apical tissue of 6-mo-old grafts of transgenic *Eucalyptus camadulensis* growing in Taipei, Taiwan

Treatment	Endogenous GA concentrations (ng g ⁻¹ FW)									
	GA ₁	GA ₃	GA ₄	GA ₈	GA ₂₀	GA ₂₄	GA ₅₃	GA _{5,7,9,29,44}	ABA	IAA
Control	0.4	1.7	1.1	1.4	33.3	2.1	0.7	0	1271.1	47.5
23% Paclobutrazol										
4 mL	0.4	1.7	1.0	1.4	32.0	1.6	1.4	0	1176.5	38.4
8 mL	0.3	1.7	0	1.2	33.1	1.3	0	0	807.5	28.1

MS進行分析鑑定，層析圖於Fig. 4，結果芽體的巴克素與標準品的巴克素，波峰滯留時間 (retention time)，同為12.2 min。標準品與分析的芽體，其巴克素之質譜圖於Fig. 5，兩者具有相同的質譜，並經NIST05資料庫比對結果，鑑定證實為巴克素。

(二)殘留量

鑑定證實芽體具有巴克素殘留之後，即檢測芽體的巴克素殘留含量，以SIM模式檢測，結果對照組芽體沒有任何巴克素，而經巴克素處理後到隔年開花前，芽體的巴克素殘留量為 $34.7 \pm 14.4 \mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (DW)，處理後第二年芽體的巴克素殘留量下降至為 $0.31 \pm 0.36 \mu\text{g g}^{-1}$ DW，到第三年後芽體已經無法偵測到巴克素殘留量。

討論

一、巴克素施用方法與劑量

(一)施用方法

巴克素的處理方法包括土壤施灌(soil drenching)、莖部注射(trunk injection)與葉部噴灑(foliar spraying)等三種方式，但什麼方法最佳，則沒有定論。本試驗結果顯示，土壤施灌與莖部注射兩者都可以誘導赤桉花芽分化，若為了使處理效應維持至第二年，莖部注射則是較佳的選擇(Table 1)。Williams and Edgerton (1983)認為土壤施灌可以使處理較均一旦生長控制較持久，而Shearing and Jones (1986)提

出若短時間就要看到處理植株有反應，土壤施灌則遠比葉部噴灑緩慢，但Hetherington et al. (1991)認為莖部注射是最正確的方法，尤其苗木超過4 m時，葉部噴灑很難以操控。Griffin et al. (1993)認為土壤施灌與莖部注射為最有效的方法，本試驗結果並沒有比較葉部噴灑方法，但土壤施灌可以施用到各類苗木，而莖部注射則需考量到植株直徑的大小，操作上以土壤施灌最方便，但對於施用藥劑造成土壤的殘留與環境的污染，則需考量用莖部注射方式。

(二)施用劑量

土壤施灌劑量對於赤桉花芽分化的數量連續兩年沒有顯著差異，其最低劑量為23%巴克素乳劑1 mL，換算每1 mL乳劑中含有巴克素0.23 g (Table 1)。Hetherington and Jones (1990)認為土壤施灌分四次施用0.5 g/L比直接一次就施加2 g/L有效(William and Edgerton 1983, Quinlan and Richardson 1984)，尤其幼年期桉樹生長快速，幾乎一整年都在生長，因此以規律性的施用巴克素，比單獨處理一次更有效(Tukey 1983, Quinlan and Richardson 1984)。本試驗僅處理一次即可誘導花芽分化，而且巴克素處理過後，殘留在土壤與樹體一段時間，因此並不需要分次予以處理。環境的狀況會改變巴克素處理的效果，尤其是施用到土壤的處理，更容易受到環境所左右(Leaver et al. 1982, Moncur et al. 1994, Swain and Chiappero 1998)。

莖部注射劑量對於赤桉花芽分化的數量亦是連續兩年沒有顯著差異，低劑量5 mg即可達

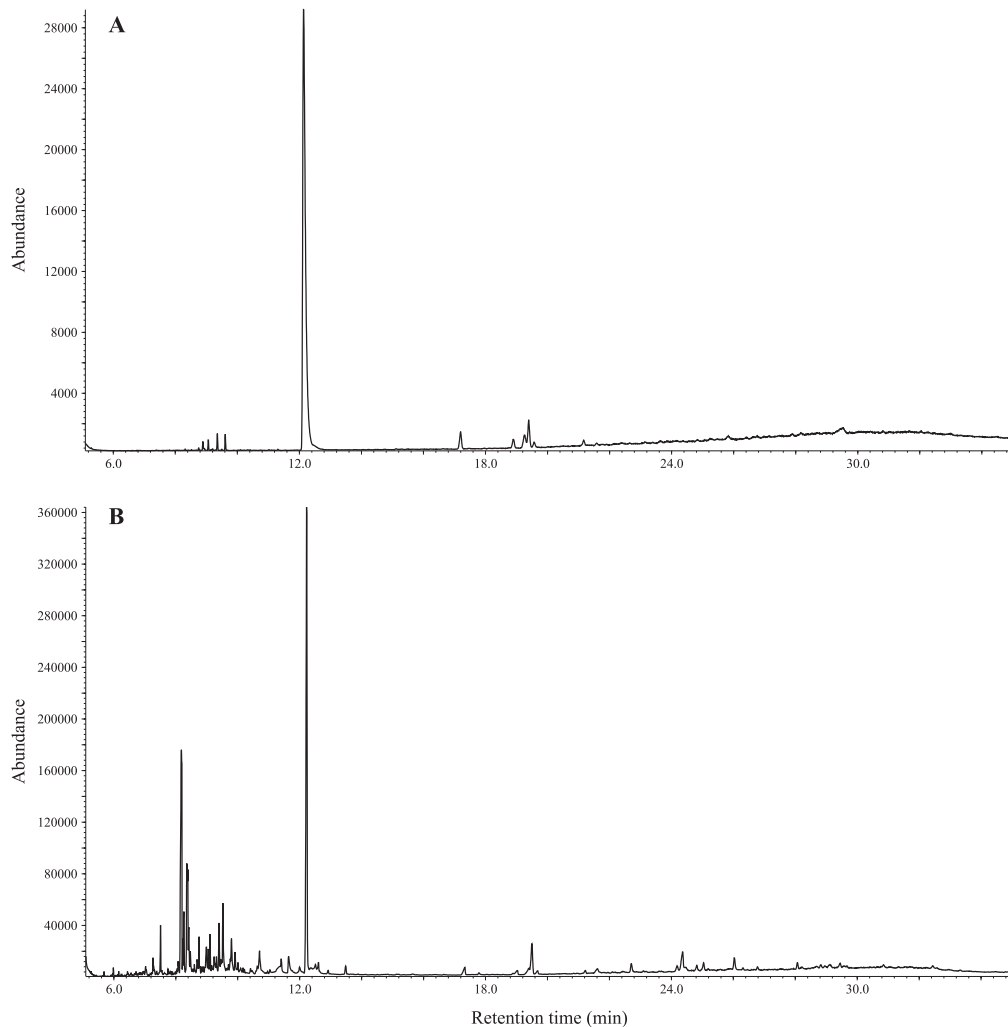


Fig. 4. Gas chromatogram. (A) Paclbutrazol standard; (B) samples of *Eucalyptus camadulensis*.

到誘導效果(Table 1)。Williams et al. (2003)認為以每公分直徑施用0.3 g巴克素劑量，對於*E. nitens*花芽分化數量以及生長控制最佳，他以未成熟與成熟的植株進行比較試驗，發現未成熟的植株如果巴克素組合施加氮素肥料處理，可以顯著的提高開花，但如果是成熟植株，單純以施用巴克素就可以提高開花。本試驗處理時赤桉基徑平均為0.94 cm，處理5 mg即可誘導花芽分化(Table 1)，施用劑量較低。Arron et al. (1997)施用莖部注射的施用劑量為以胸徑大小決定，每英吋胸徑施用0.5、1.0以及1.5 g進行試

驗，發現大部分施用巴克素並沒有顯著的抑制生長，也觀察到幾乎沒有劑量的差異。Symons et al. (1990)用樹冠層面積大小來決定巴克素施用劑量，每 m^2 樹冠層面積施用巴克素0.31、0.625及1.25 g，經盆鉢試驗清楚的證實巴克素很有效率的壓制營養生長，提高澱粉含量且對形態上改變有明顯的反應。

(三)生長反應與結實

經過巴克素處理過後的赤桉，明顯的看出氣根(Fig. 3)，相同現象亦在尾葉桉×玫瑰桉

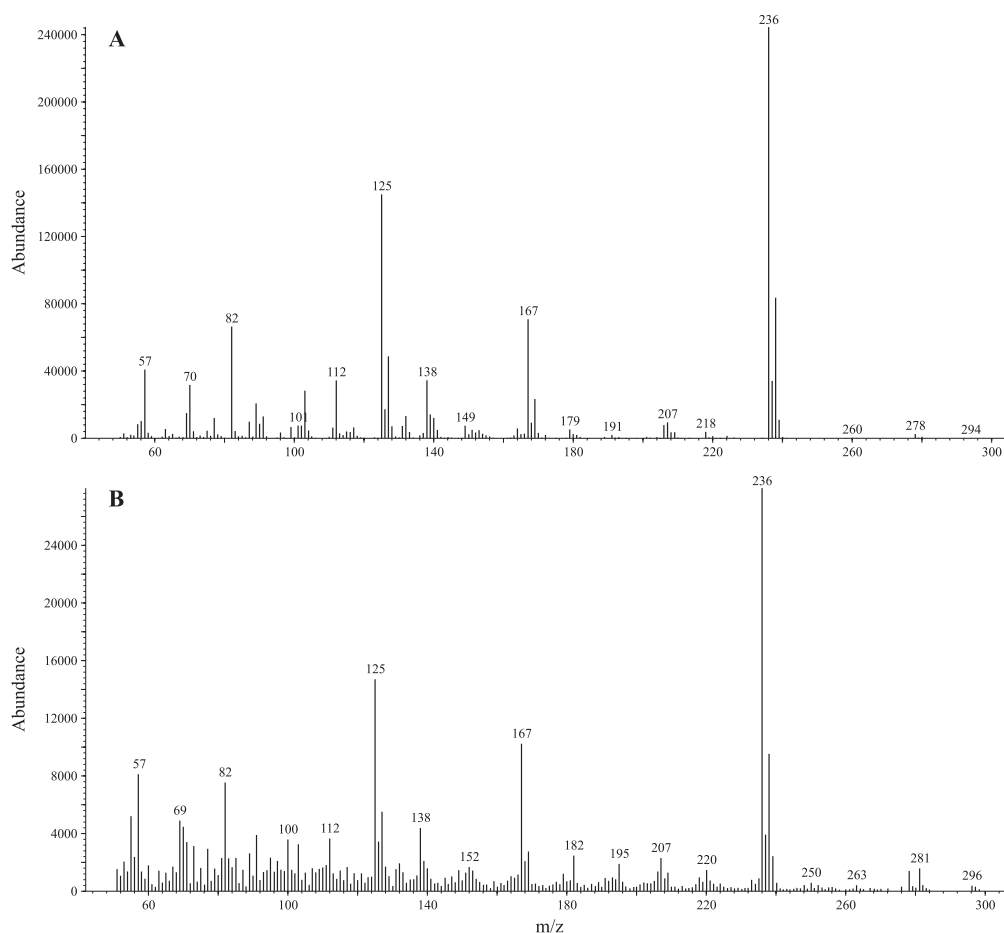


Fig. 5. Mass spectrum. (A) Pacllobutrazol standard; (B) samples of *Eucalyptus camadulensis*.

中看到(鍾振德 未發表資料)。巴克素會改變根莖比(Williamson and Coston 1988)，在果樹橘子常常以限制根的方式來誘導開花(Salomon 1978)，但Williamson and Coston (1988)則以限制根系來減低其生長可以使桉樹的生長更加的有活力。Hetherington and Jones (1990)在*E. globules*以巴克素處理過後，減少植株高度，節間縮短葉片大小減少，且葉的顏色改變。巴克素是一種生長抑制劑，目前被認為可以降低側芽生長(terminal growth) (Miller 1982, Sterrett 1985, Wheeler 1987)，增加根的生物量(Atkinson et al. 1983)，增加果實產量(McPharlin 1987)以及增加芽的分化數量(Hetherington et al. 1991)。

Hasan and Reid (1995)用葉面噴灑巴克素到*E. globulus*，在幼年的種子苗可以誘導花芽產生，而成熟的植株則可以提高其花芽分化活力，巴克素沒有任何的負面效應，包括生殖發育、新成種子的發芽以及種子發芽後苗木的早期生長等等，但卻對其開花的促進卻有正面的效應，本試驗結果亦然。

二、處理時機

Hasan and Reid (1995)提到在澳洲*E. globulus*，開始開花的時間至少要5年生時，且在自然條件下所需的時間更長。本試驗在2004年6月以巴克素予以處理，在2005與2006年6月皆可看到花芽分化，但在2005年10月處理者，花

芽分化延遲2個月，即延到2006年8月才見花芽分化(Fig. 1)。Moncur and Hasan (1994)在四月於澳洲Canberra試驗*E. nitens*處理巴克素，於同年十二月見到花芽分化。Canberra的平均每天最低溫從一月的13°C開始下降，至四月時已至6.7°C，此時桉樹生長已將減緩，此時處理巴克素花芽仍可以如期分化。但本試驗結果卻不然，Fig. 1台北平均每天最低溫為七、八兩月約25°C，此後開始下降，至十月時已至18°C，此時處理巴克素，造成赤桉花芽分化延遲2個月(Fig. 1)，但第三年開花卻如期於6月分化。Moncur et al. (1994)在澳洲Tasmania處理*E. nitens*，於八月處理巴克素，但於後年一月才見花芽分化，相隔18個月。Gardner and Bertling (2005)在南非年平均氣溫16.7°C地方，於1998年4月處理巴克素，結果11月即可看到花芽。澳洲與南非同屬南半球，誘導桉樹開花的時序也有些差異。

澳洲Victoria (38°S)最熱的月份為一月19°C，最冷的為七月8.5°C，桉樹的生長期為十月到隔年的四月。但巴克素處理都選擇在四月生長季結束之際，本試驗以此想法在生長季結束時處理巴克素，卻造成開花延遲，因此南北半球處理時機是不相同。

三、巴克素處理後生長調節物質之變化

(一) 激勃素(GA)

本試驗結果顯示赤桉以巴克素處理過後，在花芽分化之際除了GA₂₄略低之外，其它型式激勃素並沒有受到抑制(Table 2)。Moncur and Hasan (1994)研究*E. nitens*的花芽分化，調查經巴克素處理後，花芽分化之前兩個月之內生激勃素的含量，發現未處理對照組的GA₁含量1.71 pg g⁻¹ FW為巴克素處理者的4倍，GA₂₀在未處理對照組量為0.58 pg g⁻¹ FW，則為巴克素處理者的1倍。Williams et al. (1999)亦是以前以*E. nitens*為研究材料，取樣時間亦為花芽分化之前兩個月，分析內生激勃素的含量，發現未處理對照組的GA₁量1.3 ng g⁻¹ FW亦為巴克素處理者的4倍，GA₂₀在未處理對照組量為0.5 ng g⁻¹ FW，

則為巴克素處理者的5倍。兩者分析相同樹種，含量為何差距達1000倍？Moncur and Hasan (1994)分析材料為分生組織及發育中的葉子，但Williams et al. (1999)所分析的材料為頂端分生組織及未開展的葉子，Williams et al. (1999)分析材料屬於快速生長之組織部位，且未開展的葉子又遠比已發育之葉子重量輕，兩相比較使其含量遠高於前者甚多。本試驗材料比較接近Williams et al. (1999)之材料，但本試驗取材的時間卻在花苞裸眼可見之前一個星期，除了本試驗樹種為赤桉與其不同之外，取材時間的不同也使得本試驗的分析結果高於Williams et al. (1999)之分析結果。

(二) 吲哚乙酸(IAA)

本試驗經巴克素處理者，節間為2.8 ± 0.8 cm，為未處理對照組之65% (Fig. 2)，而分析結果顯示處理23%巴克素乳劑8 mL，葉部含的IAA含量亦僅為未處理對照組之59.2% (Table 2)。Zhu et al. (2003)指出巴克素會促進IAA oxidase activity，而Koukourikou-Petridou (1996)以巴克素處理杏仁顯示頂端生長枝葉的IAA隨著處理時間逐漸下降。IAA扮演節間伸長主要角色(Yang et al. 1996)，同時與cytokinin共同在調節根的發育(Aloni et al. 2006)。自Fig. 3可看到赤桉經巴克素處理過後，莖基部長出氣根，可能與IAA及cytokinin濃度的下降有關。

(三) 離層酸(ABA)

本試驗分析結果顯示赤桉經巴克素處理，劑量越高其葉部的ABA含量越低(Table 2)。Wang et al. (1987)發現巴克素處理可以減少蘋果遭逢水分逆境所引起之ABA濃度上升，減少的量達2/3。巴克素也阻斷*Cercospora rosicola*的ABA合成過程中farnesyl pyrophosphate之後之路徑(Norman et al. 1986)。Wang et al. (1987)亦認為巴克素處理之所以會使ABA含量下降，導因於ABA合成步驟裡的oxidation步驟受到阻礙所致。但Murti and Upreti (2005)卻得到相反的結果，芒果樹處理以巴克素後，其葉部的ABA濃度是上升的。Buta and Spaulding (1991)以土

壤施灌巴克素法處理小麥，處理過後2天ABA下降50~60%，但處理第七天後到第21天，下降幅度就縮減維持在15~20%。

四、巴克素殘留鑑定分析

Wang et al. (1986)研究巴克素處理後在蘋果之運轉，巴克素經由根部吸收後，由木質部運送累積到葉部，當巴克素僅施用在蘋果上層葉部，就只有上層的生長受到抑制，巴克素並不會運送到下層。本試驗結果巴克素處理過後翌年開花前檢測芽體巴克素殘留為 $34.7 \pm 14.4 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ，第二年殘留僅為前一年之1%，再相隔一年已經無法偵測到巴克素。Mauk et al. (1990)檢測經巴克素處理在蘋果生長土壤之殘留，結果調查三年顯示其以每年減少殘留量50%的速度下降。本試驗結果顯示在芽體的減少速度比土壤更加迅速。

謝誌

本研究過程感謝林業試驗所育林組許足、郭淑嬪小姐協助調查謹此致謝。

引用文獻

Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Botany* 97:883-93.

Arron GP, Becker SD, Stubbs HA, Szeto EW. 1997. An evaluation of the efficacy of tree growth regulators paclobutrazol, flurprimidol, dikegulac, and uniconazole for utility line clearance. *J Arboricult* 23(1):8-16.

Atkinson D, Crisp CM, Asamoah TEO, Chauhan JS. 1983. Effects of plant growth regulators on root growth. *Rep East Malling Res Stn Maidstone Engl* 1982: 39.

Buta JG, Spaulding DW. 1991. Effect of paclobutrazol on abscisic acid levels in wheat

seedlings. *J Plant Growth Regul* 10:59-61.

Cauvin B. 1992. Effect of paclobutrazol on flowering and growth of young *Eucalyptus* clones. First results. *Ann Recherches sylvicoles AFOCEL* 71-88.

Chambers PGS, Potts BM, Tilyard PA. 1997. The genetic control of flowering precocity in *Eucalyptus globulus* spp. *globulus*. *Silvae Genet* 46(4):207-14.

Chen ZZ, Chang SH, Ho CK, Chen YC, Tsai JB, Chiang VL. 2001. Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4-hydroxylase gene. *Taiwan J For Sci* 16(4):249-58.

Chen ZZ, Chen YC, Chou YH, Lin Y. 2006. cDNA cloning and molecular characterization of 4-coumarate: coenzyme A ligase in *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 21(1):87-100.

Chung JD, Kuo SR, Chien CT. 2003. Identification and quantification of gibberellin transformation and dosage changes in good and poor flowering clones of *Calocedrus formosana* grafts. *Taiwan J For Sci* 18(4):387-400.

Dalziel J, Lawrence DK. 1984. Biochemical and biological effects of kaurene oxidase inhibitors, such as paclobutrazol. In: Menhenett R, Lawrence DK, editors. *Biochemical aspects of synthetic and naturally occurring plant growth regulators*, monograph 11. Wantage, UK: British Plant Growth Regulation Group. p 43-57.

Eastham K, Sweet J. 2002. Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. Copenhagen, Denmark: European Environment Agency, Environment Issue Report no. 28.

Gardner RAW, Bertling I. 2005. Effect of winter chilling and paclobutrazol on floral bud production in *Eucalyptus nitens*. *S Afr J Bot* 71(2):238-49.

Goldsmith IR, Hood KA, MacMillan J. 1983. Inhibition of gibberellin biosynthesis in

- Gibberella fujikuroi* by PP333. Paper presented at an SCI symposium on ergosterol biosynthesis inhibitors, Reading, UK, 20~24 March.
- Griffin AR, Whiteman P, Rudge T, Burgess IP, Moncur M. 1993.** Effect of paclobutrazol on flower-bud production and vegetative growth in two species of *Eucalyptus*. *Can J For Res* 23:640-7.
- Hasan O, Reid JB. 1995.** Reduction of generation time in *Eucalyptus globulus*. *Plant Growth Regula* 17:53-60.
- Hetherington S, Jones KM. 1990.** Effectiveness of paclobutrazol in retarding height growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Can J For Res* 20:1811-3.
- Hetherington S, Jones KM, Koen TB. 1991.** Stimulation of bud production in *Eucalyptus globulus* by paclobutrazol application. In: APG Schonau IUFRO, editor. Intensive forestry: the role of Eucalyptus. Durban, South Africa: APG Schonau IUFRO. p 104-9.
- Hetherington S, Jones KM, Koen TB. 1992.** Stimulation of bud production in *Eucalyptus globulus* by paclobutrazol application. *S Afr For J* 160:39-41.
- Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VL, Chen ZZ. 1998.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camadulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17:675-80.
- Koukourikou-Petridou MA. 1996.** Paclobutrazol affects the extension growth and the levels of endogenous IAA of almond seedlings. *Plant Growth Regulat* 18(3):187-90.
- Leaver BG, Shearing SJ, Batch JJ. 1982.** PP333 - a new broad spectrum growth retardant. In: Proceedings 1982 British Crop Protection Conference - Weeds, 22~25 November 1982; Brighton, UK Vol 1. Croydon, UK: BCPC Publications. p 3-10.
- Mauk CS, Unrath CR, Blankenship SM, Lehman LJ. 1990.** Influence of method of application of paclobutrazol on soil residues and growth retardation in a 'Starkrimson-Delicious' apple orchard. *Plant Growth Regulat* 9(1):27-35.
- McPharlin IR. 1987.** Avocado research in Israel. *Aust Hort* 85:66-70.
- Miller SS. 1982.** Growth and branching of apple seedlings as influenced by pressure injected plant growth regulators. *Hort Sci* 17:775-6.
- Moncur MW, Hasan O. 1994.** Floral induction in *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol* 14:1303-12.
- Moncur MW, Rasmussen GF, Hasan O. 1994.** Effect of paclobutrazol on flower-bud production in *Eucalyptus nitens* espalier seed orchards. *Can J For Res* 24:46-9.
- Murti GSR, Upreti KK. 2005.** Paclobutrazol induced growth retardation of mango seedlings. *Indian J Plant Physiol* 10(1):9-13.
- Norman SM, Bennett RD, Poling SM, Maier VP, Nelson MD. 1986.** Paclobutrazol inhibits abscisic acid biosynthesis in *Cercospora rosicola*. *Plant Physiol* 80:122-5.
- Quinlan JD, Richardson PJ. 1984.** Effect of paclobutrazol (PP333) on apple shoot growth. *Acta Hort* 146:105-11.
- Saeglitz C, Bartsch D. 2001.** Transgenic pollen escape-- need for consequence assessment instead of containment. *Inform Syst Biotech News Report* June: 3-4.
- Salomon E. 1978.** Induction of dwarfing and early cropping through root treatments in citrus. *Acta Hort* 65:147.
- Shearing SJ, Jones T. 1986.** Fruit tree growth control with CULTAR-- which method of application? *Acta Hort* 179:505-12.
- Sterrett JP. 1985.** Paclobutrazol: a promising growth inhibitor for injection into woody plants. *J Am Soc Hort Sci* 110:4-8.
- Swain T, Chiappero C. 1998.** Collecting of improved *E. nitens* seed from ICFR seed orchards. *ICFR Newslett* 1998(May):7-10.
- Symons PRR, Hofman PJ, Wolstenholme BN. 1990.** Responses to paclobutrazol of

potted 'HASS' avocado trees. *Acta Hort* 275:193-8.

Tukey LD. 1983. Vegetative control and fruiting on mature apple trees treated with PP333. *Acta Hort* 137:103-9.

Wang SY, Byun JK, Steffens GL. 1985. Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. II. Biochemical and physiological alterations in apple seedlings. *Physiol Plant* 63:169-75.

Wang SY, Steffens GL. 1985. Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in apple seedling leaves. *Phytochemistry* 24:2185-90.

Wang SY, Steffens GL, Faust M. 1986. Effect of paclobutrazol on cell wall polysaccharide composition of apple tree. *Phytochemistry* 25(11):2493-6.

Wang SY, Sun T, Faust M. 1986. Translocation of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, in apple seedlings. *Plant Physiol* 82:11-4.

Wang SY, Sun T, Zuo LJ, Faust M. 1987. Effect of paclobutrazol on water stress-induced abscisic acid in apple seedling leaves. *Plant Physiol* 84:1051-4.

Wheeler NC. 1987. Effect of paclobutrazol on Douglas-fir and loblolly Pine. *J Hort Sci* 62:101-6.

Williams DR, Potts BM, Smethurst PJ. 2003. Promotion of flowering in *Eucalyptus nitens* by paclobutrazol was enhanced by nitrogen fertilizer. *Can J For Res* 33:74-81.

Williams DR, Ross JJ, Reid JB, Potts BM. 1999. Response of *Eucalyptus nitens* seedlings to gibberellin biosynthesis inhibitors. *Plant Growth Regulat* 27:125-9.

Williams MW, Edgerton LJ. 1983. Vegetative growth control of apple and pear trees with ICI PP333 (paclobutrazol), a chemical analogue of Bayleton. *Acta Hort* 137:111-6.

Williamson JG, Coston DC. 1988. The influence of root restriction on developmental characteristics of peach shoots. *Hort Sci* 23:740.

Yang T, Davies PJ, Reid JB. 1996. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. *Plant Physiol* 110(3):1029-34.

Zhu JW, Hong YH, Xiao LT, Tan ZF. 2003. Effects of plant growth retardants on the growth of *Michelia alba*. *J Hunan Agric Univ* 29(6):482-4.

