

# 台灣原生植物普刺特草放射線照射誘導變異之研究<sup>1</sup>

陳季呈<sup>2</sup>

## 摘要

普刺特草培植體在不含植物生長調節劑之 MS 培養基下生長良好，可正常發根展葉。BA 具促進其芽體增殖之效果，以 5 ppm BA 繼代二次可獲得優質之叢生芽體。本試驗以照射劑量 0、20、40、60、80 Gy 處理上述之叢生芽體，結果顯示 80 Gy 未達半致死劑量，但培植體生長顯著受到抑制而影響其恢復，當繼代培養 3 個月後其發根率僅為 0.9%，展葉率為 7.2%，放射線照射劑量間具顯著差異。生長受到抑制之培植體外觀多呈珊瑚狀、無根，部分培植體基部呈紫紅色。本試驗結果共有 15 個變異枝條，變異率以 40 Gy 為 2.3% 為最高，20 Gy 處理變異率為 1.4% 次之，且培植體生育無顯著受到抑制，故 20 至 40 Gy 之照射劑量為最適照射劑量。變異情形有葉片出現不規則之白色斑點、葉緣鑲有白邊或部分葉面呈現白色斑塊等，其中以後者變異較為穩定且最具觀賞價值，但其生長勢弱且生育緩慢。

( 關鍵詞：普刺特草、組織培養、放射線、誘變 )

## 前言

利用放射線照射或化學誘變劑處理使作物變異，以提高產量、品質、抗逆境或抗病蟲害等為目的，而育成新品種的方法稱為誘變育種。以此方法來改良品種已廣泛使用於小麥、水稻、大麥、棉花、落花生及大豆等以種子繁殖之作物。另外利用無性繁殖之作物，以放射線照射其插穗、切離葉片或休眠植株亦成功獲得新品種，其中以花卉佔多數，果樹較少。主要花卉作物種類有菊花、百合水仙、新幾內亞鳳仙、大理花、好望角苦苣苔、九重葛、秋海棠、康乃馨、杜鵑花、玫瑰等 ( Ahloowalia and Maluszynski, 2001 )。據國際原子能總署統計，過去 70 餘年來，利用誘變技術所產生之植物品種超過 2252 個，其中作物佔 75%，觀賞植物佔 25% ( Maluszynski et al., 2000 )。以誘變技術來促使觀賞植物產生變異之效果明顯且容易，例如改變其花色、花形、花大小等，再經選拔獲得穩定且具觀賞價值之變異者，進而產生具新穎性之新品種，因此誘變技術已成為觀賞植物常見之育種方法 ( Ahloowalia et al., 2004 ; Maluszynski et al., 1995 )。為了更有效地縮短誘變育種所需要的時間，近年來育種材料更由田間縮小至實驗室，以放射線照射處理組培苗、不定芽、莖頂、癒傷組織、花藥、體胚等，配合分子生物技術來選育成新品種，達到快速提升作物之產量與品質等目的 ( Ahloowalia and Maluszynski, 2001 )。

---

1. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場研究彙報第 204 號。

2. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場蘭陽分場助理研究員。

宜蘭地區冬季氣候潮濕多雨，日照不足，在此氣候條件下，適宜生產高品質之觀葉植物，又宜蘭山區多，具觀賞價值之原生植物資源豐富。近年來本場已成功研發多種原生觀賞植物並推廣至民間獲得迴響（張，2005），其中桔梗科之普刺特草於無果實期翠綠的心形葉片小巧雅緻，結實期深紫紅色的漿果結實累累，搭配翠綠葉片相當秀麗亮眼、清新宜人，深具觀賞價值，可供作小品盆栽、盆花等用途（林和張，1999）。組織培養技術為近年來作為生產健康種苗繁殖及輔助傳統園藝繁殖及育種之不足之技術。本研究以組織培養技術與放射線照射處理，來誘導原生觀賞植物普刺特草產生突變枝條，經選拔穩定且具觀賞價值之變異者，期能育成具商業價值之品種，而對宜蘭地區觀葉植物產業有所助益。

## 材料與方法

### 一、建立普刺特草組織培養再生體系

試驗材料為宜蘭山區採集獲得之台灣原生植物普刺特草 (*Lobelia nummularia* Lam.) (圖一)。本試驗無菌培植體之建立是取普刺特草之枝條 1 cm，經 70% 酒精 30 sec 及 1% 次氯酸鈉 15 min 配合消毒後進行培養。培養程序依序為：1. 建立無菌培養體系及誘導不定芽。2. 誘導產生叢生芽體。3. 促使不定芽發根展葉成完整植體。培養基以 MS (Murashige and Skoog, 1962) 配方為基礎，30 g/L 蔗糖，10 g/L 洋菜 (Difco)，pH 值為 5.7，另外再依需求加入植物生長調節劑。上述之第 1 程序是先以 MS 培養基培養，當獲得無菌培植體後，再以 Benzyl aminopurine (BA) 0.5 mg/L 誘導不定芽；第 2 程序添加 Benzyl aminopurine 0-5 mg/L 及  $\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid (NAA) 0-1 mg/L 來誘導叢生芽體，以 Benzyl aminopurine 5 mg/L 處理效果最好；第 3 程序則為 MS 培養基培養即可正常發根展葉。本試驗以長 6.7 cm、寬 6.7 cm、高 9.7 cm 之方形盒內裝培養基 80 mL 培養。初代培養每盒 9 個培植體，4 重複，本試驗在培養室中進行，室內溫度為  $25 \pm 2$ ，以日光燈為照明光源，光度約為 3000 lux，每日光照為 12 小時。記錄培植體之芽數、根數、地上部氣根發生之節位與根部膨大情形等項目。

### 二、放射線誘變處理

以上述方法培養獲得之普刺特草叢生芽體作為放射線照射處理之材料，以鈷-60 伽瑪射線( $\gamma$ )照射，處理劑量為 20、40、60、80 格雷 (Gray ; Gy)，照射劑量率為 20.99 Gy/min，並以未照射 (0 Gy) 為對照組，每盒 4 個培植體，4 重複，試驗採完全隨機設計。經不同  $\gamma$  射線照射劑量處理後之叢生芽體隨即送回組織培養室中進行培養，繼代培養於 MS 培養基下，每月繼代培養一次，經 2 及 3 個月後調查其死亡率及恢復性，觀察培植體是否有葉色、葉形等變異情形發生。

### 三、組培苗馴化及變異芽體之選拔

將發根展葉之組培苗移出瓶外馴化種植，以種植於馴化盒及直接種植於盆中 (不經馴化盒) 二種處理，栽培介質為珍珠石：蛭石 = 1 : 1，種植完成後放置於網室中栽培，試驗採完全隨機設計，每處理 30 株，4 重複，經 30 天後調查其出瓶存活率。本試驗採用之馴化盒為塑膠材質，具盒蓋可維持盒內濕度達 100%。將已馴化存活之普刺特草組織培養苗定植於 3 吋盆中栽培並觀察其變異率，將發生變異之芽條，編號之，觀察其穩定性及進行變異株選拔與繁殖。

## 結果與討論

### 一、普刺特草組織培養再生體系之建立

具一葉一芽的普刺特草培植體經表面消毒後接種於 MS 培養基上，其存活率達 90% 以上。當施以植物生長調節劑 BA 0-5ppm 及 NAA 0-1ppm，對促進芽體增殖結果顯示，普刺特草在不含植物生長調節劑之 MS 培養基下生育情形良好，其地上部莖節處長有氣根，地下部根數達 11.25 枝，顯示 MS 之鹽分濃度適合其生長，並可正常發根展葉(圖二)。當 0.5 ppm BA 處理時，地下部根外觀出現變化而呈現肥大，地上部莖節之氣根外觀表現較為粗短，且自培植體頂端計算 2 至 3 節起開始長氣根，葉片小，節間縮短，芽體增殖倍率 9.25 倍為最多。但優良的叢生芽體地上部莖節上應無氣根產生，故將 BA 處理濃度提高，結果芽體增殖倍率有減少之趨勢，葉片更小，節間更短，氣根出現比例降低，根部肥大情形更為顯著。當 BA 處理濃度達 5 ppm 時，培植體莖節處幾乎無氣根出現、無褐化及玻璃質化情形發生，芽體增殖倍率為 5.5 倍。而普刺特草培植體在含 NAA 的培養下會促進莖節處之氣根形成與根部肥大，隨著 NAA 及 BA 處理濃度提高根部膨大情形越顯著。因此 5 ppm BA 處理為普刺特草叢生芽體之最適培養條件(表一)。當以 5 ppm BA 繼代普刺特草一葉一芽之培植體二次後即可獲得優質之叢生芽體，做為放射線誘變處理之材料(圖三)。

表一、BA 及 NAA 處理對普刺特草芽體及根形成之影響

Table 1. Effects of BA and NAA treatments on shoot and root formation of *Lobelia nummularia* Lam explants.

Plant growth regulator combination		No. of shoots	No. of roots	No. of nodes with aerial roots <sup>1</sup>	Degree of root swelling
NAA (ppm)	BA (ppm)				
0	0	3.5±1.00	11.3±2.06	2.4±0.74	- <sup>2</sup>
	0.1	5.8±0.96	6.3±0.50	2.5±0.54	+
	0.5	9.3±2.06	7.3±0.96	2.5±0.54	+
	2.5	4.5±2.42	3.8±1.70	4.0±0.76	+
	5	5.5±1.29	3.5±1.29	4.3±1.11	++
0.5	0	3.3±1.26	9.3±2.63	2.3±0.71	+
	0.1	2.5±0.58	12.3±0.96	2.6±0.54	++
	0.5	2.0±0.10	3.0±1.41	2.5±0.71	++
	2.5	4.8±1.71	2.8±1.50	2.2±0.44	+++
	5	4.8±1.50	2.5±1.29	2.4±0.92	+++
1	0	1.3±0.50	10.3±1.71	2.6±0.79	+
	0.1	2.5±1.29	8.8±3.09	2.5±0.76	++
	0.5	5.0±1.83	5.3±1.71	2.4±0.52	+++
	2.5	5.7±1.50	2.0±1.41	3.3±1.11	+++
	5	5±0.82	1.3±0.50	2.8±0.5	+++

1. Number of nodes grow aerial roots are count from top to base of explant.

2. “-” means no swelling; “+” means swelling.

## 二、放射線照射處理對普刺特草叢生芽體誘導變異之效果

最適放射線照射劑量來誘導試驗材料產生變異為誘變育種之重要課題。因此不同材料所需之照射劑量並不相同，例如水稻、小麥、玉米等種子誘變之照射劑量為 60 至 700 Gy 間，而組織培養苗、癒傷組織或細胞懸浮培養等對放射線較為敏感，相對所需的照射劑量則更低（Ahloowalia and Maluszynski, 2001）。本試驗材料為普刺特草叢生芽體，經 0、20、40、60、80 Gy 的  $\gamma$  射線處理，照射劑量率為 20.99 Gy/min。經於 MS 培養 2 個月後觀察，當照射劑量為 80 Gy 時，普刺特草叢生芽體並無死亡，顯示 80 Gy 未達半致死劑量，但顯著抑制叢生芽體生長而影響其恢復。在 IAEA (1997) 報告中指出 8 至 10 Gy 處理大蒜之癒傷組織會抑制其增殖與再生能力；在甘藷方面 10 Gy 為癒傷組織培養之致死劑量；而甘蔗癒傷組織培養之最適照射劑量為 5 至 10 Gy；傅 (1998) 指出聖誕紅插穗最適照射劑量為 25 至 35 Gy；林和蔡 (2005) 以 75 Gy 照射鳳梨組織培養之芽原體可獲得較高比例之變異。生長受到抑制之普刺特草培植體外觀大多呈珊瑚狀、無根，部分培植體基部呈紫紅色 (圖四)。在培植體恢復性之試驗結果顯示，隨著處理劑量的提高，培植體發根展葉的恢復性隨之受到顯著抑制，處理劑量間具顯著差異。當處理劑量為 20 Gy 時，培植體發根略受抑制，可正常展葉，生育略受抑制，與對照組無顯著差異，在 MS 培養基下繼代培養 3 個月後，發根率可達 100%。處理劑量提高至 40 Gy 時，普刺特草發根及展葉均明顯受到抑制，與對照組具顯著差異，繼代培養 2 及 3 個月後，調查其發根率由 70.5% 增加至 83.2%，展葉率亦由 76.6% 提昇至 92.4%；處理劑量至 60 Gy 時，培植體生長顯著受到抑制，呈珊瑚狀之無根培植體比例增加，當繼代培養 3 個月後，其發根及展葉率分別為 39.2% 及 63.9%。處理劑量至 80 Gy 時，經繼代培養 3 個月後其發根率僅為 0.9%，展葉率為 7.2% (表二)。顯示較高劑量的  $\gamma$  射線處理會顯著抑制培植體的再生能力，而影響其生育，因此初步判定過高劑量之  $\gamma$  射線處理並不是普刺特草叢生芽體之適宜照射劑量。觀察各處理瓶內培植體變異情形，僅少數培植體枝條可見到葉片發生變異，將其發根展葉之組培苗進行出瓶馴化及變異率調查等工作。

表二、普刺特草經不同劑量之  $\gamma$  射線處理後對日後發根展葉之影響

Table 2. Effects of  $\gamma$ -ray dosage treatments on subsequent rooting and expanded leaves of *Lobelia nummularia* Lam.

Dosage (Gray)	Rooting (%)		Expanded leaves (%)	
	Two months after sub-culture	Three months after sub-culture	Two months after sub-culture	Three months after sub-culture
0	100.0a <sup>1</sup>	100.0a	100.0a	100.0a
20	98.4a	100.0a	100.0a	100.0a
40	70.5b	83.2b	76.6b	92.4b
60	20.2c	39.2c	30.1c	63.9c
80	0.9d	0.9d	5.6d	7.2d

1. The same letters are not significantly different 5% by LSD.

將已發根展葉之普刺特草組培苗種植於珍珠石：蛭石 = 1:1 的介質中，以馴化盒及直接種於盆中 (不經馴化盒，種植完成後盆栽直接放置於溫室中) 二種處理來尋求較理想的馴化流程，試驗結果顯示普刺特草組培苗生命力旺盛，使用馴化盒或盆栽直接放置於溫室中的處理，出瓶存活率均超過 90% 以上，以不經馴化盒處理的對照組為最高 95.8%，經馴化盒處理的 60Gy 及 80Gy 為最低 90.8%，各處理間無顯著差異，其中不經馴化盒處理而直接將盆栽放置於溫室中的出瓶存活率平均值較經馴化盒處理高 3.5% (表

三)。故普刺特草組培苗可不經馴化盒處理而直接種於盆中放置於溫室中即可獲得高達 90% 以上的存活率，且可節省換盆的工資及馴化盒的使用而達到降低生產成本的目的。

表三、利用馴化盒與無馴化盒處理對  $\gamma$  射線照射之普刺特草組織培養苗出瓶存活率之影響

Table 3. The survival ratio of different  $\gamma$ -ray dosage treatments of *Lobelia nummularia* Lam. tissue culture seedlings following cultured in acclimation box and without-cultured in acclimation box.

Dosage (Gray)	Cultured in acclimation box	Without-cultured in acclimation box
0	93.3a <sup>1</sup>	95.8a
20	91.7a	94.2a
40	91.7a	94.2a
60	90.8a	93.3a
80	90.8a	93.3a
Average	91.7	94.2

1. The same letters are not significantly different 5% by LSD.

經過放射線處理之普刺特草叢生芽體共獲得 1546 盆誘變植株，經觀察發現 15 個變異枝條，變異率以 40Gy 處理為 2.3% 為最高，20Gy 處理變異率為 1.4% 次之，60Gy 處理則為 0.6%，而 80Gy 處理則並未發現變異發生，其中 6 個枝條變異穩定，9 個發生變異枝條回復與母本相同（表四），由上述結果顯示 20 至 40Gy 處理劑量，普刺特草叢生芽體後續生育並無顯著受到抑制，且變異率較高，因此普刺特草叢生芽體之最適照射劑量應為 20 至 40Gy。觀察其發生變異之部位以葉片為主，變異情形以葉片出現不規則之白色斑點或葉緣鑲有白邊為最多，經過馴化種植於溫室中 3 個月後，其新葉長出後大多會恢復為綠色，因此其變異並不穩定（圖五）；另有枝條發生部分葉面呈現白色塊斑之變異，此種變異較具觀賞價值且變異穩定，但其生長勢弱且生長緩慢，尤其在夏季悶熱的環境下，其生育情形不佳（圖六）。而在開花之花形及花色與結果之果形及果色的表現上並無結果顯示變異情形發生。本試驗共產生 6 個變異穩定枝條，經於溫室中種植超過半年後其變異仍趨穩定。

表四、不同劑量之  $\gamma$  射線照射處理對普刺特草培植體產生變異之效果

Table 4. Effects of  $\gamma$ -ray dosage on mutation of *Lobelia nummularia* Lam. tissue culture seedlings.

Dosage (Gray)	Mutated shoots		Three months after acclimated and planted in pots		
	Number	Percentage (%)	No. of mutants	No. of mutants died	No. of mutants' leaves turned into green
0	0	0	-	-	-
20	5	1.4	2	0	3
40	8	2.3	3	0	5
60	2	0.6	1	0	2
80	0	0	-	-	-

一般而言，經放射線處理後初期生長之枝條常發生暫時性的變異，隨著枝條成長而變異逐漸消失，終至恢復母本的外觀。朱等（2000）報告指出 28 個彩葉芋品種的塊莖經  $\gamma$  射線照射處理後，新生之葉片形狀呈現不規則狀，但後續長出的葉片則恢復正常；在葉色發生白色變異的紅葉品種，同樣地後續長出的葉片亦回復為紅色。林等（2005）將鳳梨芽原體以  $\gamma$  射線照射處理後，獲得葉片具嵌紋變異性狀之鳳梨枝條，其變異情形亦在後續生長過程中逐漸消失而回復為原來之葉色，其回復率達到 80% 以上，本試

驗亦有相似之結果。

綜合以上試驗結果，普利特草為台灣原生植物，其生命力旺盛，在組織培養體系之建立過程中發現，培植體在不含任何生長調節劑處理之 MS 培養基培養下，生育情形良好，並可正常發根展葉，在 BA 5ppm 的培養下可獲得質優之叢生芽體，進而可快速生產優良之組培苗，提供種苗之需求。在  $\gamma$  射線處理誘變試驗中，普利特草叢生芽體表現對  $\gamma$  射線照射之耐受力強，80Gy 之照射劑量並未有培植體發生死亡，相較其他作物之芽體組織耐受力為高。普利特草在野外自然環境芽變的發生非常少見，本試驗結果顯示以  $\gamma$  射線照射處理所誘導發生變異之枝條比例不高，且僅 6 個枝條之變異穩定，發生變異情形均為葉色表現，然而過多葉面積發生白色塊斑之變異其生長勢較弱且生育較緩慢。



圖一、紫紅漿果的普刺特草植株外觀。  
Fig. 1. The appearance of *Lobelia nummularia* Lam.



圖二、在 MS 培養基下生育良好之普刺特草培植體  
Fig. 2. The explants of *Lobelia nummularia* Lam. grow well in MS medium.



圖三、普刺特草在 0ppm NAA、5ppm BA 繼代培養二次之生育情形。  
Fig. 3. *Lobelia nummularia* Lam. explants from two sub-cultures in 5ppm BA medium.



圖四、普刺特草叢生芽體經 80Gy 之  $\gamma$  射線照射處理於 MS 培養基下培養 2 個月後之培植體外觀。  
Fig. 4. *Lobelia nummularia* Lam. explants with 80 Gy dosage treatment followed by culture for in MS medium 2 months later.



圖五、普刺特草經 20Gy 照射處理之變異情形。  
Fig. 5. Mutations of *Lobelia nummularia* Lam. with 20Gy dosage of  $\gamma$ -ray irradiation treatment.



圖六、普刺特草經 40Gy 照射處理之變異穩定植株。  
Fig. 6. A mutant of *Lobelia nummularia* Lam. with 40Gy dosage of  $\gamma$ -ray irradiation treatment.

## 誌 謝

本試驗研究之放射線處理作業承蒙行政院原子能委員會核能研究所胡燦博士協助，謹此誌謝。

## 參考文獻

- 1.朱玉、胡燦、蔡瑜卿、陳駿季 2000  $\gamma$ -射線照射及葉片培養對彩葉芋變異之影響 中國園藝 46:381-388。
- 2.林純瑛、張建生 1999 台灣原生植物之美、蘭陽園藝花卉之麗 花蓮區農業改良場編印 p.1-9。
- 3.林學詩、蔡月夏 2005 結合組織培養與放射線照射誘導鳳梨變異之研究 中國園藝 51:241-247。
- 4.朱玉、趙秀芳 1998  $\gamma$  射線對彩葉芋抑制株高及誘導變異之影響中國園藝 44:536。
- 5.張聖顯 2005 台灣原生觀賞植物種原蒐集與利用之探討 台灣原生植物資源多樣性發展研討會專刊 p.201-218。
- 6.傅仰人、張元聰、胡燦 1998 聖誕紅加馬射線誘變最適劑量之探討 中國園藝 44:537。
- 7.傅仰人、胡燦、朱建鏞、黃敏展 2003 改善加馬射線對聖誕紅誘變之效應 中國園藝 49(4):459。
- 8.Ahloowalia, B. S. and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118:167-173.
- 9.Ahloowalia, B. S., M. Maluszynski and K. Nichterlein. 2004. Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica 135:187-204.
- 10.IAEA, 1997. Report 2nd FAO/IAEA Research Co-ordination Meeting on *in vitro* techniques for selection of radiation induced mutants adapted to adverse environmental conditions. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 11.Maluszynski, M., B. S. Ahloowalia and B. Sigurbjornsson. 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica 85:303-315.
- 12.Maluszynski, M., K. Nichterlein, L. van Zanten & B.S. Ahloowalia. 2000. Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA Database. Mut. Breed. Rev. 12:1-84.
- 13.Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.