

台灣山蘇花葉原體組織培養之研究¹

全中和²

摘要

台灣山蘇花葉原體培養在不含生長素的 MS 半固體培養基上培養，三個月後可清楚看見由培植體表面長出類似癒合組織之凸起物，將這些凸起物分切數塊放入 1/2MS 液體培養基內懸浮培養二週，可形成兩倍的癒合組織，取這些癒合組織放入添加 Benzyl adenine (BA)0.2 5mg/l 的 MS 半固體培養基上培養，可形成大量芽體和癒合組織。若將葉原體直接培養在添加 BA 5mg/l 的 MS 半固體培養基上，則三個月後可清楚的看見由培植體表面形成多個芽原體，經過分切之後再放入 1/2MS 液體培養基內懸浮培養二週後，可形成更多類似芽原體和癒合組織，將這些組織繼代至含 BA 0.2 5mg/l 的 MS 或 1/2 MS 半固體培養基上培養則會形成叢生芽體和多數癒合組織。芽體的形成以 1/2MS 培養基較全量 MS 培養基為佳，而芽體的生長以全量 MS 培養基較好；芽體形成的數量以添加 5mg/l BA 的培養基為最多，此外，添加 300mg/l 酪素水解物(casein hydrolysate)有助於芽體的生長。

(關鍵字：台灣山蘇花、葉原體)

¹花蓮區農業改良場研究報告第 150 號，本研究經費承中正農業科技社會公益基金會補助(計畫編號：86 中基-農-48)，謹致謝意。

²花蓮區農業改良場作物改良課助理研究員。

前言

臺灣山蘇花(*Asplenium nidus* L.)屬於鐵角蕨科(Aspleniaceae)，鐵角蕨屬，別稱烏巢蕨、巢蕨，為大型的著生或岩生蕨類，原產於臺灣、琉球、中國大陸南部等地，是切葉及盆花的好材料，近年來更出現大規模葉菜用企業化栽培，種苗大多由山採而來，由於需求量相當大，已使得原生地的自然生態受到嚴重的破壞，因此，要如何大量繁殖種苗以減少山採的發生，實有其必要性。

傳統蕨類的繁殖方法有二種，其一是利用孢子繁殖，其二是無性的分株法(賴等 1984)，利用孢子繁殖時，其孢子發芽率不穩定，需時甚久，不易控制其生產量(葉 李 1989, 陳 1996)；利用分株法繁殖，則數量相當有限，二者皆無法於短時間內達到大量繁殖的目的，因此若能找出經由生長點，葉或氣根等進行組織培養的大量繁殖法，將使本土野生蕨類之開發利用，更向前邁進一大步。

蕨類植物利用組織培養繁殖早在 1960 年代早期即已開始，在鐵線蕨科(Adiantaceae)、鳳尾蕨科(Pteridordeae)、烏毛蕨科(Blechnaceae)等多種蕨類都曾利用假莖尖端(Rhizome tip)和走莖尖端(Runner tip)誘導產生不定芽(Adventitious shoots)(Torres 1988, Fern'andez et al. 1996)；賴等(1984)以腎蕨氣根誘導產生之葉再誘導產生擬芽體，可加速芽體的產生；波斯頓腎蕨已

是目前利用組織培養進行商業生產種苗很好的例子(葉 1987、陳 1996)；在鹿角蕨利用幼葉的葉割體(leaf explants)以組織培養法亦可大量生產(賴等 1984, Camloha et al. 1994), 賴等(1994)並指出在 6~8 個月的短時間內，可自一個葉割體繁殖近百萬株的植物體。台灣山蘇花目前在組織培養繁殖種苗上的探討以葉等(1989)利用孢子無菌播種所作的研究最詳細，雖然可以達到大量繁殖種苗的目的，惟其由孢子發芽至可以上盆的時間仍相當的長，因此本試驗的目的即在於探討利用葉原體來繁殖種苗並加速其繁殖速度。

材料與方法

一、材料：

原生於花蓮山區五年生以上之大型臺灣山蘇花短縮莖內的葉原體。

二、方法：

(一)消毒方法：

將臺灣山蘇花短縮莖上部黑褐色密生的鱗片去除之後，用刀片將短縮莖內部之葉原體部分取出，切成邊長約 0.5 到 1cm 的正方形，以 75% 酒精浸漬約 20 秒後再以 2% 次氯酸鈉(Sodium hypochlorite with active, chlorine 5% C1)加入 2 滴展著劑(Tween 20)消毒 20 分鐘之後再以 1% 次氯酸鈉消毒 20 分鐘，最後以無菌水沖洗 2 次。經過上述程序處理之後，切除培植體四週白化的部分，直接放在半固體培養基上培養。

(二)培養基配製：

培養基採用 MS(Murashige and Skoog 1962)基本鹽類配方，但氮的含量分全量及 1/2 量，其他添加物有 Inositol(100mg/l)，Nicotinic acid (0.5mg/l)，Pyridoxin (0.5mg/l)，Thiamine-HCL (0.1mg/l)，Glycine(2.0mg/l)等，Sucrose 以 30g/l 為主，並以 20g/l 作比較，Agar 為 8.5g/l，PH 值為 5.7，本試驗所採用的培養基主要組成元素的濃度列如表一。培養過程中為使癒合組織增加，使用懸浮培養之 1/2MS 液體培養基，成份與 1/2MS 半固體培養基相同，惟不加 agar。

(三)培養步驟與條件：

試驗開始分別以無生長素之 MS 培養基及添加 5 mg/l BA 的 MS 培養基(F₃)對葉原體的芽體誘導作比較；接著比較 BA 濃度對於由芽原體及癒合組織誘導產生芽體之影響，BA 添加的濃度為 0.2(F₁)、1(F₂)及 5mg/l。另外為促進芽體的生長，添加 250mg/l 酪素水解物(a₈)與未添加者作比較，每種比較每個處理 4 重複，每重複接種 5 支試管；為了解花寶一號葉肥是否適合用在山蘇的組織培養，嘗試應用蝴蝶蘭常用的花寶一號 3g/l(王和李 1992)作為基本鹽類配方(R₁)；

表一、培養基主要元素組成份與生長素含量

Table 1. Major element composition and growth regulator of medium

Code of medium	MS	1/2MS(1)	a ₈	F ₁	F ₂	F ₃	N ₁	R ₁
Major element								

-----mg/l-----								
KNO ₃	1900	950	950	1900	1900	1900	1900	—
NH ₄ NO ₃	1650	825	825	1650	1650	1650	1650	—
MSB-MSE	full	full	full	full	full	full	full	—
MSF	full	full	full	full	full	full	full	full
花寶 1 號	—	—	—	—	—	—	—	3000
BA	—	—	—	0.2	1	5	—	—
NAA	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1
sugar	30	30 ₍₂₀₎	30	30	30	30	30	30
Casein hydrolysate	—	—	250	—	—	—	—	—

試驗中所用的培養容器為直徑 2.8cm，高 9cm 之透明玻璃平底試管，內裝培養基 8ml；培養室採太陽燈管照明，每日照光 16 小時，光度約 2500lux，溫度控制於 25±3°C。

(四)調查方法：

山蘇花葉原體培養後，分別調查癒合組織及芽苞形成情形，不同流程培養基培養之後每個月分別調查芽體數、葉數、根數及癒合組織形成百分比，並以 Duncan's multiple range test 測定處理間之差異。

表二、MS 培養基誘導流程對山蘇葉原體培養之影響

Table 2. The effect of Induction process of MS culture medium on *Asplenium nidus* leaf primordia cultivation.

培養基 media **	培養支數 No. of explant	芽數 Buds/explant	葉數 leaves/explant	根數 roots/explant	癒合組織(%) Calli(%)
1/2MS	20	4.1 ^{a*}	14.5 ^b	0.7 ^a	10 ^b
MS	20	2.9 ^c	13.2 ^b	0.3 ^b	20 ^a
a8	20	3.5 ^b	20.7 ^a	0.9 ^a	0 ^c

*Means followed by the same letter of a column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

**Representation of cultivate process.(sus express suspension)

MS- N₁- 1/2MS (sus) - R₁- 1/2MS (MS, a8)

表三、含 BA 之 MS 培養基誘導流程對山蘇葉原體培養之影響

Table 3. The effect of induction process of MS culture medium with BA on *Asplenium nidus* leaf primordia cultivation.

培養基	培養支數	芽數	葉數	根數	癒合組織(%)
-----	------	----	----	----	---------

media **	No.of explant	Buds/explant	Leaves/explant	roots/explant	Calli(%)
1/2MS ₁	20	24.5 ^{a*}	94.9 ^a	0	10
1/2MS	20	18.6 ^b	70.3 ^b	0	10
MS	20	5.8 ^c	13.2 ^d	0	10
a 8	20	8.1 ^c	31.3 ^c	0	10

*Means followed by the same letter of a column are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

**Representation of cultivate process.(sus express suspension)

F₃-F₁-1/2MS(sus) - F₃-1/2MS₁ (1/2MS, MS, a8)



圖一、山蘇葉原體培養於 MS 培養基上三個月產生類似癒合組織之凸起物

Fig 1. The callus formed from the leaf primordia of Asplenium nidus in MS medium after three months.

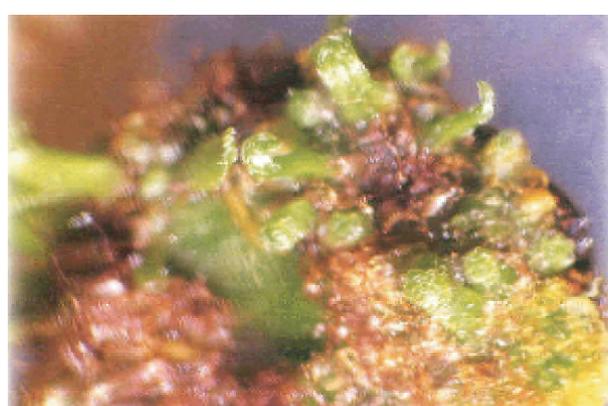


圖二、山蘇葉原體經 MS-N₁-MS 培養流程產生的癒合組織及芽原體

Fig 2. The calli and shoot primordia were formed from the leaf primordia of Asplenium nidus after a series of cultivating process with different media : MS,N₁ and MS one after another.



圖三 山蘇葉原體經 MS-N₁-MS 培養流程後芽



圖四、山蘇葉原體培養於含 BA 5mg/l 的 MS

體成長情形

Fig 3. The growing shoots of Asplenium nidus after a series of cultivating process with MS,N1and MS one after another.

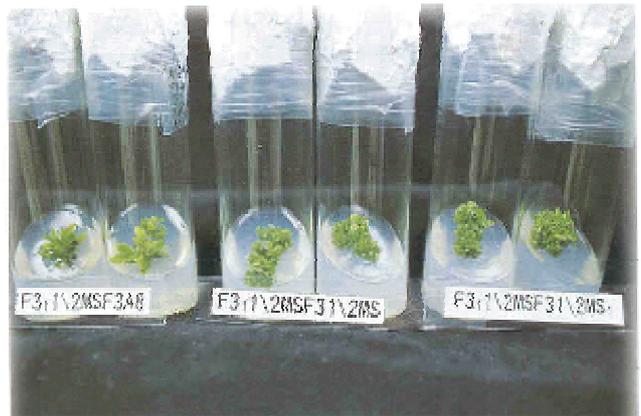


圖五、山蘇葉原體經 F₃-F₁-1/2MS(sus)-F₃ 培養流程產生的叢生不定芽

Fig 5. Clustered adventitious buds were induced from the leaf primordia of Asplenium nidus after a series of cultivating process with different media : F₃,F₁,1/2MS(sus) and F₃ one after another.

培養基上三個月直接由培植體表面產生芽原體

Fig 4. The shoot primordia initiated from the surface of explant in the MS medium with 5mg/l of BA after three-month cultivation.



圖六、山蘇葉原體經 F₃-F₁-1/2MS(sus)-F₃-a8 培養流程產生的小苗

Fig6. The plantlets of Asplenium nidus formed from a series of cultivating process with different media : F₃,F₁,1/2MS(sus),F₃ and a8 one after another.



圖七、不同蔗糖濃度(1/2MS, 1/2MS₁)及添加酪素水解物(a8)下芽體生長之比較

Fig 7. Comparison of different shoot growing conditions in the sucrose concentration

media(1/2MS , 1/2MS₁) and supplemented casein hydrolysate medium(a8).

結果

一、BA 直接誘導芽體的產生和植株形成

山蘇花去除包被葉原體的鱗片，經過較長時間的消毒之後，方可達到無菌化的目的，然而培植體表面的細胞一般都白化掉，培養二週後，將沒有發霉而表面白化的葉原體切成 1/4 或 1/2 塊後再放入含 BA 5mg/l 及不含 BA 的 MS 培養基上，三個月後可發現在 MS 培養基上的培植體表面會形成類似癒合組織的凸起物（圖一），繼代培養至含 0.1 mg/l NAA 的 MS 培養基(N₁)上，則形成明顯的芽原體及癒合組織，將這些凸起物和芽苞切塊放入 1/2 MS 液體培養基內懸浮培養二週之後，會形成二倍的癒合組織和芽原體(圖二)，將這些含有芽原體和癒合組織的部分再置於 MS 培養基上培養，芽體即可快速生長(圖三)，再經過 3 個月即可長出根，成一完整植株；直接將培植體培養在含 5 mg/l BA 的 MS 培養基上，則直接由培植體上形成明顯的芽苞(圖四)，將芽苞(含培植體)分切後放入 1/2 MS 液體培養基懸浮培養二週，同樣會形成加倍的芽原體及少量癒合組織，將芽苞和癒合組織放入含 BA 0.2~5 mg/l 的 MS 培養基上，則可看到多量芽體形成(圖五)，再將此芽原體組織移入 1/2 MS 培養基上培養，三週左右葉片即展開，部分粗糙癒合組織只形成微細根毛而不形成芽體，將這些芽體再移入 1/2 MS 培養基或添加酪素水解物(casein hydrolysate)的 1/2 MS 培養基上培養，2~3 個月即可長根成為完整植株(圖六)。在以 MS 開始培養流程的過程，添加 NAA 0.1mg/l 的 N₁ 培養基有助於根的形成(表二)，根據觀察，以花寶一號為基礎配方的 R₁ 培養基培養山蘇芽體有延遲芽體生長，並使得芽體黃化的現象。

二、鹽類濃度與添加酪素水解物對山蘇芽體形成及生長的影響

分別將 MS 培養基中的氮源減成一半(1/2 MS)，並在 1/2 MS 培養基中添加 250mg/l 的酪素水解物比較氮源濃度和酪素水解物對芽體形成及生長的影響，經過 5 次繼代培養之後，平均芽體形成數以 1/2 MS 培養基的 4.1 芽較 MS 培養基的 2.9 芽為佳(表二)，又以 5 mg/l BA 之 MS 培養誘導產生的芽體和癒合組織在 5 次繼代培養之後，平均芽體形成數同樣以 1/2 MS 培養基的 18.6 個較 MS 培養基的 5.8 個好許多(表三)。

三、蔗糖濃度對山蘇芽體形成及生長的影響

表三當中 1/2 MS₁ 所用蔗糖為 20g/l,其平均芽體形成數為 24.5 個，葉數為 94.9 葉,皆較蔗糖為 30g/l 的 1/2 MS 培養基上平均芽體形成數 18.6 個,葉數 70.3 葉為多;而芽體生長的情形則由葉片長度可以看出以含 30g/l 蔗糖的 1/2 MS 培養基為佳，又芽體生長情形以全量 MS 培養基表現最好；而添加酪素水解物則有利於芽體的生長，此可由葉片形成數量較多且較長上看得出來(圖七)。

討論

一、BA 直接誘導芽體的產生和植株形成

本試驗所用山蘇花葉原體材料直接培養在含 BA 5mg/l 的 MS 培養基上，二個月的時間可以直接由培植體的表層細胞誘導產生芽體，此與 Camloha *et al.* (1994) 以鹿角蕨(*Platyserium bifurcatum*) 幼葉為材料，培養在含 BA 5~10uM 的 MS 培養基上，20 天有不定芽在葉的上下兩面形成的情形相當類似；在烏毛蕨(*Blechnum spicant*) 和鳳尾蕨(*Pteris ensiformis*) 的試驗，Fern'andey *et al.* (1996) 用含 BA(0.44~4.4uM) 的 MS 培養基誘導走莖在一個月時間內由表皮及內層細胞組織(inner parenchyma) 產生分芽繁殖中心(proliferation centres)，再將之繼代培養於不含生長素的培養基則可形成大量的孢子體；本試驗由山蘇葉原體誘導產生的芽原體繼代培養到不含生長素的 MS 或 1/2 MS 培養基上，同樣可以使芽體快速形成及生長。

二、鹽類濃度及添加酪素水解物對山蘇芽體形成及生長的影響

蕨類植物介於鮮苔類植物與種子植物之間(楊 1984)，其莖頂與種子植物莖頂發育能力或所含化學成分有基本上的不同，在早期曾有學者以極小的鐵線蕨(*Adiantum pedatum*) 莖頂分生組織培養於僅含碳水化合物和極低濃度 auxin 的培養基上，即成功地使植株再生(許等 1991，葉 1987)，而這些培養基在高等維管束植物之莖頂培養是不容易再生成功的。

由表二及表三可知山蘇花芽體的形成深受鹽類濃度影響，本實驗發現 1/2 MS 培養基較 MS 培養基效果好，此與葉(1987) 所作山蘇花孢子無菌播種在孢子發芽及配子體發育初期以 1/2MS 培養基效果較好的情況類似，而芽體的生長以 MS 培養基優於 1/2MS 培養基的情形又與葉(1987) 的試驗所述配子體發育後期以 MS 培養基之效果優於 1/4 MS 培養基的情況類似，此點可看出，芽體的生長需較高的礦物營養。

酪素水解物(casein hydrolysate) 是種氨基酸的複合物，有類似還原性氮的作用，可促進大豆癒合組織及不定根形成的作用(吳 1974)；Lazzeri *et al.* (1987) 指出培養基中添加酪素水解物 0.5g/l 可刺激大豆根的生長；葉和全(1992) 在大豆未熟胚培養的試驗中發現添加 250mg/l 的酪素水解物對誘導未熟子葉之體胚形成和生長效果很好；何等(1988) 以木瓜莖頂誘導的小芽培養在含 BA 0.3mg/l, NAA 0.1mg/l 及酪素水解物 250mg/l 的 MS 培養基中誘導產生叢生芽體；林(1994) 指出培養基中添加 500mg/l 的酪素水解物有助於金線蓮幼苗的生長，本試驗為了解酪素水解物對山蘇花芽體形成和生長的效果，以 250 mg/l 的酪素水解物加入 1/2 MS 培養基(a8)，結果同樣顯示對芽體的生長有明顯的促進效果(圖七)。

三、蔗糖濃度對山蘇芽體形成及生長的影響

蔗糖濃度對芽體形成能力之影響，可由表三看出，較低蔗糖濃度(2%)之 1/2 MS₁ 培養基上之平均芽體數遠高於其他蔗糖濃度(3%)的培養基，在葉(1987) 所作之山蘇孢子無菌播種試驗指出：1% 蔗糖的處理孢子發芽率及初期原葉體發育效果較佳，並認為 3% 或 4% 蔗糖因滲透壓太高，不利其孢子發芽及配子體之生長；周(1994) 以鐵線蕨屬兩個品種 *Adiantum trapeziforme* L. 及 *A. raddianum* 的孢子無菌播種亦指出蔗糖濃度太高(4%) 可使原葉體急速膨大，但也急速褐化衰敗，結果是相似的。

參考文獻

- 1.王珍韶 李晔 1992 蝴蝶蘭的組織培養 財團法人豐年社(編)園藝作物組織培養實用技術 PP33~36 臺灣 台北。
- 2.吳美玉 1974 不同培養基對大豆組織培養之反應 國立中興大學糧食作物研究所碩士論文。
- 3.何偉真 趙元才 趙弘彥 1988 木瓜之微體繁殖 國立臺灣大學農學院園藝學系(編)園藝作物組織培養之應用研討會專集 pp73~79 臺灣 台北。
- 4.林學詩 1994 珍貴草藥金線連的栽培方法 花蓮區農技報導。
- 5.周明燕 1994 本土野生蕨類繁殖技術之研究 八十三年度(花卉組)試驗研究計畫執行成果。
- 6.陳進分 1996 蕨類繁殖技術 農藥世界 157 : 61~64。
- 7.葉德銘 1987 波士頓腎蕨與臺灣山蘇花之生長習性及溫度、無機養份和栽培介質對生長之影響 pp3 5 國立臺灣大學園藝研究所碩士論文。
- 8.葉德銘 李晔 1989 臺灣山蘇花孢子發芽與配子體發育之研究 中國園藝 36(1) : 43-53。
- 9.葉茂生 全中和 1992 大豆未熟胚培養之研究 V.瓊脂或凝膠及酪素水解物對大豆未熟胚軸及子葉之體胚及器官形成的影響 農林學報 41(1) : 13~22。
- 10.楊恭毅 1984 蕨類植物 楊氏園藝植物大名典 中國花卉雜誌社 台灣台北。
- 11.賴本智 陳良築 莊孟晉 蔡新聲 1984 蕨類植物的組織培養 中央研究院植物研究所專刊第四號 pp53 56。
- 12.許玉妹 溫佳思 林金和(譯) (Bopp,M. 1988 著) 1991 低等植物之植物荷爾蒙 科學農業 39(3,4) : 93~98。
- 13.Camloha,M.,N.Gogala and J.Rode. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum* in vitro.Scientia Hort.56 : 257~266.
- 14.Fern'andez, H.,A.M. Bertrand, and R. S'achez-Tame's 1996. Micropropagation and phase change in *Blechnum spicant* and *Pteris ensiformis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44 : 261~265.
- 15.Lazzeri, P.A., F. F. Hildebrand, and G. B. Collins. 1987. Soybean somatic embryogenesis : Effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 10 : 209~220.
- 16.Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473~497.
- 17.Torres,K.C. 1988. Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture. In : K.C.Torres (ed), Tissue culture Techniques for Horticultural Crops. pp106 110 Published by Van Nostrand Reinhold, New York.