

觀賞榕樹成年枝條莖頂組織培養之研究¹

林學詩² 全中和³

摘要

金門榕及廣東榕成年枝條之莖頂，在以 MS 培養基成份減去半量氮素的修正 MS 配方為基本，另添加 Benzyl Adenine(BA)濃度為 0.5-10.0mg/l 的半固體洋菜培養基上培養，之後莖頂有一段時間呈現生長停滯現象，莖頂外包的苞片逐漸由綠色轉為黑褐色，其間約為 4 個月，部份莖頂褐化死亡，部份莖頂則苞片脫離，成功的長出叢生狀不定芽體。BA 濃度愈高，則莖頂保持高存活率的時間愈久，培植成功率亦隨著 BA 濃度的增高而升高，當 BA 為 10.0mg/l 時，金門榕的培植成功率為 95.0%，廣東榕則為 93.3%；但當 BA 為 0.5mg/l 時，金門榕的培植成功率為 22.2%，廣東榕為 25.0%。

(關鍵字：榕樹、成年枝條、莖頂培養)

¹花蓮區農業改良場研究報告第 95 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：81 中基 - 農 - 14)，謹致謝意。

²花蓮區農業改良場作物改良課助理研究員。

³花蓮區農業改良場作物改良課約聘技師。

前言

桑科(Moraceae)榕屬植物(Ficus)為重要之觀賞植物，傳統上採用枝條扦插、嫁接、高壓法來繁殖種苗，法簡易行為其優點，但是有些病害會隨枝條傳播下去，影響種苗品質，而採枝母樹需要維持相當大數量，較浪費空間，枝條採收時期又有季節性限制，枝條來源有限，影響種苗的整齊度，凡此均不利於企業化生產(何 1989)。利用組織培養技術繁殖榕屬植物種苗已經證明頗有潛力，Farthing 經過二年研究，比較高壓法、頂芽扦插法、葉節扦插法、及組織培養法等對於印度橡膠樹繁殖效率之優劣，計算能源消耗、空間、苗之整齊度等因素，證明組織培養法優於其他繁殖法(Farthing, 1988)；在垂榕方面的研究結果亦相同(Kristiansen, 1992)。此外組織培養苗還有分枝性較強的特性(Kristiansen, 1991)，頗符合於盆栽植物緊密矮化特性的需求。帶有生長點的莖頂是最常被用於做組織培養繁殖的起始材料，其優點是生長勢較強，後代植株的變異率低，例如垂榕(Kristiansen, 1991, 1992)、印度橡膠樹(Donnanetal., 1979; Farthing, 1988)、無花果(Muriithietal. 1982)等；但亦有用葉片為起始材料，產生癒傷組織再分化不定芽而獲得植株者，例如琴葉榕(黃、馬 1986; Deberghetal., 1977; Jonaetal. 1988)、菩提樹(Jaiswaletal., 1985)等。本省有許多榕樹類植物，值得開發為具觀賞價值的盆栽植物，由於種子繁殖有變異問題存在，為保持母樹優良園藝特性，須採營養繁殖法，本文報告利用組織培養法培養成年榕樹莖頂之結果。

材料與方法

首先將蒐集來的盆栽榕屬植物（含金門榕、廣東榕等），種植於玻璃溫室內，反覆摘心促使側芽萌發成許多幼嫩枝條，並定期噴施農藥以減少病蟲危害。採取 1-2 公分長之嫩枝，去除葉片僅留莖頂外包之幼葉，然後以 70% 酒精浸漬約 10 秒鐘後，再以 2% 次氯酸鈉加數滴展著劑消毒 15-20 分鐘後，取出置無菌水中，移入無菌箱中剝去外包的一層苞片，再以 1% 次氯酸鈉消毒 10 分鐘，之後再以無菌水沖洗 3 次，每次 1 分鐘。經過上述程序處理之後，切取約 5mm 長的莖頂，直接放在半固體培養基上培養。

培養基採用 MS (Murashige and Skoog, 1962) 基本鹽類配方，但氮的含量分 1/2 量及 1/4 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 20g/l 為主，並以 30g/l 作比較，Agar 為 8g/l，pH 值為 5.7。為比較 BA 濃度對於莖頂培養之影響，BA 添加的濃度為 0.5-10.0mg/l 之間。另為觀察鹽類濃度對於莖頂培養之影響，亦進行 WPM(Lloyd et al.,1980) 配方培養之比較。本試驗所採用之基本培養基主要組成元素的濃度列如表一所示，MS 培養基的特色是氮素含量非常高，而木本植物培養基(WPM)內所含的氮源濃度極低，僅含硝酸銨(NH₄NO₃)400mg/l 及硝酸鈣(Ca(NO₃)₂·4H₂O)556mg/l，另一重要不同點為 WPM 採用硫酸鉀(K₂SO₄)為鉀源，且氯化鈣的含量較低，至於其他元素的含量則兩者相同。

表一、基本培養基主要元素組成份比較

Table 1. Major element composition of basal medium.

Major element	MS	1/2MS	1/4MS	WPM
=====mg/l=====				
KNO ₃	1900	950	475	-
NH ₄ NO ₃	1650	825	412.5	400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	96
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	556
K ₂ SO ₄	-	-	-	990
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	170	170	170	170

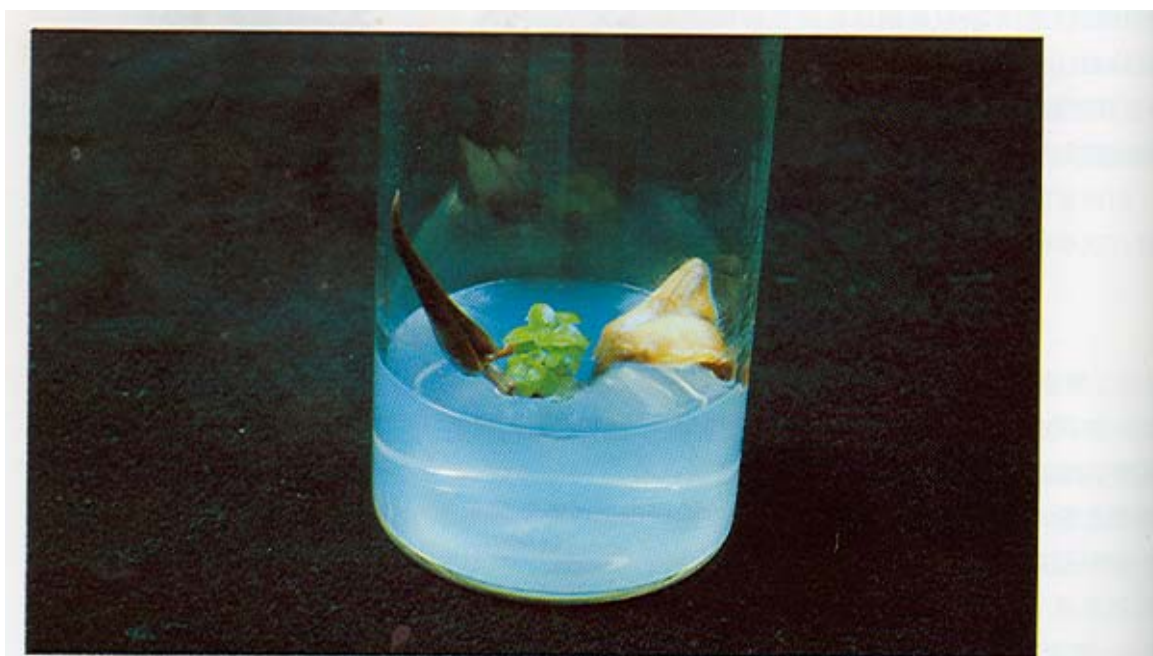
試驗中所用的培養容器為直徑 2.8 公分，高 9 公分之透明玻璃平底試管，內裝培養基 8ml，每一種處理接種 10-40 支試管，培養室採日光燈照明，每日光照 16 小時，光度約 2500lux，溫度控制於 25±2。

榕樹莖頂切離體培養後可能出現雜菌污染情形，此時計算污染率，去除受雜菌污染者，其餘培植體每月調查其生長情形，若莖頂外包的苞片及接觸培養基的莖部轉為黑褐色，且無生長現象，則判定為死亡，若保持綠色，且有生長現象，則判定為存活，計算其存活率及萌芽數。莖頂最終存活率則為培養之成功率。

結果

由露地種植植株上所採取的成年榕樹枝條之莖頂，經表面消毒後培養於無菌培養基上，其污染率高達 90% 以上，結果造成試驗上很大的困擾。將植株移入玻璃溫室內，澆水時水直接灌注根部土壤，而不採用噴灌法，以避免水直接接觸植株枝條及葉片，並且定時噴布殺菌、殺蟲劑，一段時間後再取莖頂來培養，結果污染率降低到 33% 以下（表二、表三），此法已有效的控制住污染源。

金門榕及廣東榕成年枝條莖頂切離體培養有一段時間呈現生長停滯現象，這段時間大約為 4 個月，莖頂外包的苞片由綠色逐漸轉變為黑褐色，有些莖頂也隨之褐化而死亡；但有些莖頂卻仍具有生長現象，莖頂持續成長的結果，將黑褐色外包的苞片向外推離莖頂，露出多芽叢生的狀態（圖一）。



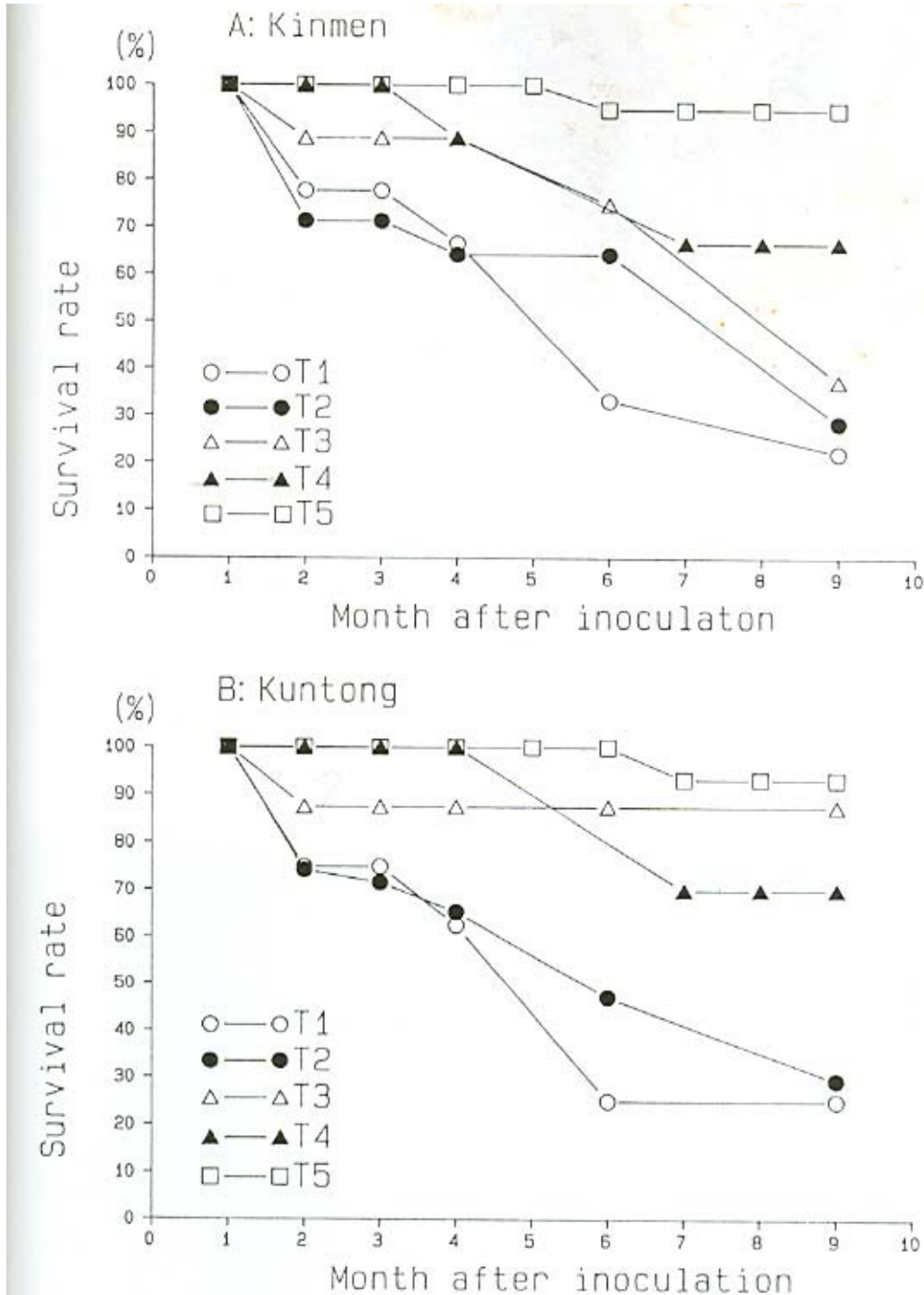
圖一．廣東榕成年枝條莖頂培養後產生叢生狀不定芽並將黑褐色苞片推離莖頂

Fig. 1. Multiple adventitious buds were induced in vitro from adult shoot tip of *Ficus retusa* cv. 'Kuntong', and the surrounding bracts were push away.

培養基中所含 BA 濃度的高低與榕樹莖頂存活率有很大的關係，以金門榕來說，如圖二 A 所示，BA 的濃度愈高，則莖頂存活率也愈高，在連續 9 個月的調查中，BA 濃度為 10mg/l 時，前 5 個月莖頂存活率維持 100%，之後下降為 95%。BA 濃度為 5mg/l 時，莖頂存活率僅在前 3 個月維持 100%，之後即下降，最後為 66.7%。至於 BA 濃度低於 5mg/l 以下時，莖頂培養 4 個月後存活率即迅速下降，最後均低於 40% 以下。

廣東榕莖頂培養於不同 BA 濃度的培養基後，其存活率變化的情形如圖二 B 所示，與金門榕的情形相似，亦即 BA 濃度愈高，莖頂存活率愈高，且維持高存活率的時間也愈久。唯其中 BA 濃度為 1.5mg/l 時例外，莖頂培養 2 個後其莖頂存活率即維持 87.5% 至終，反較

BA 為 5mg/l 時為高，以 1/2N 之修正 MS 為培養基本成份，BA 的濃度由 0.5 提高至 10.0mg/l 時，培植成功率隨著 BA 濃度的提高而升高，此在金門榕及廣東榕的反應均頗為類似，而且培植體平均產生的芽體數亦隨著 BA 濃度的升高而有增多的趨勢（表二、表三）。



圖二. BA濃度對於金門榕(A)及廣東榕(B)成年枝條莖頂培養後存活率之影響

Fig. 2. Effect of BA concentrations on survival rate of adult *Ficus* shoot tips cultured in vitro.

Two cultivars, *F. retusa* cv. 'Kinmen' and 'Kuntong', were tested. T1, T2, T3, T4, T5 represent concentration of BA, which were 0.5, 1.0, 1.5, 5.0, 10.0 mg/l, respectively.

固定培養基裡 BA 的濃度為 5mg/l, 再將 MS 中氮素減低至 1/4 量使其接近 WPM 培養基, 再互相作培養比較, 結果二者的表現均不佳, 培植的成功率甚低, 金門榕方面分別為 22.2% 及 35.0%, 廣東榕則分別為 0% 及 26.3%。提高培養基中蔗糖的含量為 30g/l, 其結果仍不佳, 成功率在金門榕僅 20.0%, 廣東榕則為 0% (表二、表三)。

本試驗結果顯示含有 5.0mg/l 以上高濃度 BA 的 1/2MS 培養基, 對於金門榕及廣東榕成年枝條莖頂培養為有利, 莖頂培植體經繼代培養後均能產生叢生狀芽條 (圖三), , 可達大量繁殖之目的。

表二、培養基組成份對於金門榕成年植株莖頂培養之影響

Table 2. Effect of medium composition on establishment of adult shoot tips culture of *Ficus retusa* cv. 'Kuntong'.

Medium component			接 (種) 數 (支) No. of explant	污染率 (%) Percentage of contamination	培植成功率 (%) Successful rate	平均芽體數* (Buds/explant) (%)
Basal	BA (mg/l)	Sucrose (g/l)				
1/2MS	0.5	20	11	18.2	22.2	1.0
1/2MS	1.0	20	20	30.0	28.6	1.0
1/2MS	1.5	20	11	27.3	37.5	3.0
1/2MS	5.0	20	10	10.0	66.7	3.7
1/2MS	10.0	20	20	0	95.0	3.5
1/4MS	5.0	20	10	10.0	22.2	1.0
1/4MS	5.0	30	10	0	20.0	1.0
WPM	5.0	20	20	0	35.0	1.7

* Data were calculated at the 9th month after inoculation.

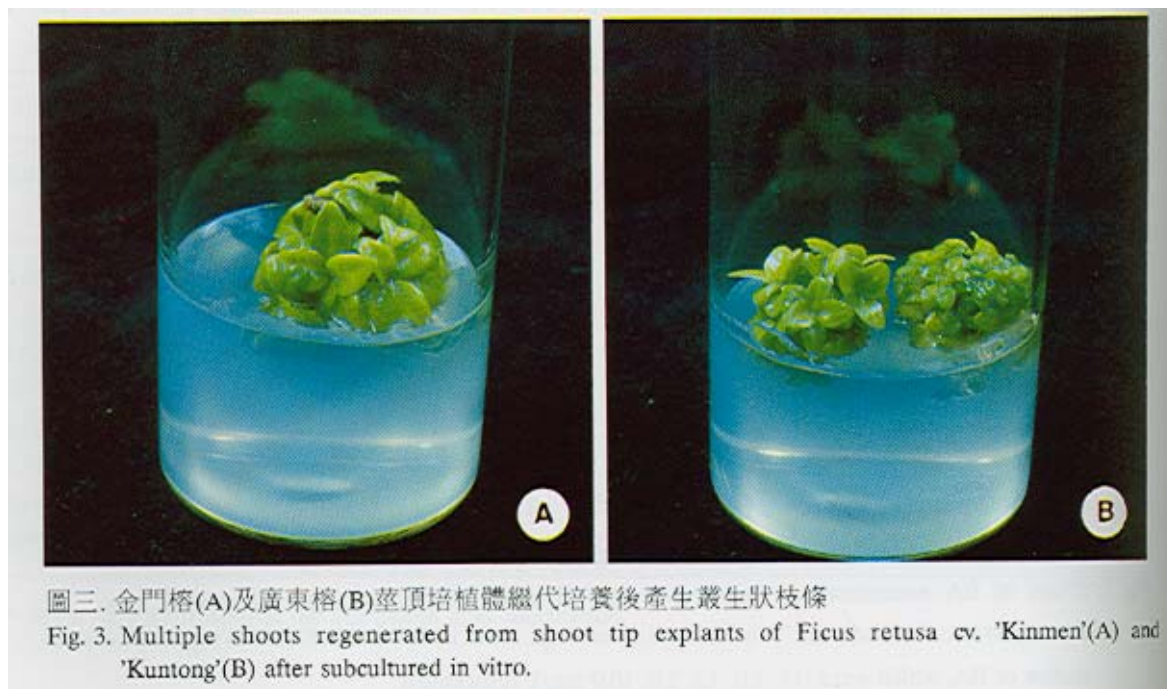
表三、培養基組成份對於廣東榕成年植株莖頂培養之影響

Table 3. Effect of medium composition on establishment of adult shoot tips culture of *Ficus retusa* cv. 'Kuntong'.

Medium component			接 (種) 數 (支) No. of explant	污染率 (%) Percentage of contamination	培植成功率 (%) Successful rate	平均芽體數* Buds/explant (%)
Basal	BA (mg/l)	Sucrose (g/l)				
1/2MS	0.5	20	12	33.3	25.0	1.0
1/2MS	1.0	20	42	18.2	29.4	1.5
1/2MS	1.5	20	11	19.0	87.5	3.6

1/2MS	5.0	20	10	0	70.0	5.0
1/2MS	10.0	20	20	10.0	93.3	2.4
1/4MS	5.0	20	10	20.0	0	-
1/4MS	5.0	30	10	20.0	0	-
WPM	5.0	20	20	5.0	26.3	2.0

* Data were calculated at the 9th month after inoculation.



討論

觀賞植物應用組織培養法大量繁殖種苗時，必須有一套完整的工作步驟，才能達到事半功倍的效率，Debergh 對於這個步驟曾提出一個頗為周延的程序，現廣為種苗繁殖業者所採行。其內容第一步為將母株培養在清潔的環境中以減低污染源，第二步為無菌培養體系的建立，第三步為誘導產生芽體與快速增殖，第四步為芽體伸長與均一芽條的培育，第五步為植株發根與出瓶後生長(Debergh, 1981)。本試驗初期由室外取材，結果培植體的污染率超過 90% 以上，然後金門榕、廣東榕母株移入控制環境的玻璃溫室中，一段時間後再取其莖頂培養，結果證明可以降低培植體受雜菌污染的比率（表二、表三），成功的建立無菌培養體系，完成組織培養程序的第一及第二步。

木本植物組織培養較草本植物為難，其主要原因有：木本植物再生力較弱、誘導成年枝條回春化的技術較難、培植體具有休眠生、培植體長期暴露在外不易消毒等 (Pierik,1987)。由於幼年性枝條的再生能力較強，所以採行無性繁殖種苗時，常需要誘導成年性植株回復其幼年特性，以加速繁殖速率，其方法甚多，例如將成年枝條生長點嫁接於幼年植株上，或反

復修剪促使萌發新枝條，或取生長點培養等（楊等 1993；Pierik,1987）。本試驗採取成年榕樹的莖頂為培植體，期望能克服上述之缺點，結果顯示，金門榕及廣東榕成年枝條的莖頂，具有與其他木本植物一樣的特性，離體莖頂培養後呈生長停滯狀態，期間約為 4 個月，之後才開始萌發，培養過程當中部份莖頂逐漸褐化而死亡。莖頂存活率與培養基中 BA 濃度有關，BA 濃度愈低則其存活率愈低，BA 濃度愈高則不但存活率愈高，且莖頂維持綠色的時間也愈久（圖二），所以培養的成功率也就愈高，每一莖頂產生的不定芽數亦較多（表二、表三）。有些木本植物莖頂培養會受培養基內所含鹽類濃度所左右，例如杜鵑莖頂培養在全量 MS 鹽類下，長側芽的比率為零，1/2 量 MS 時則提昇為 20%，1/3 量 MS 時則提昇為 40%（馬 1984），甚至減至 1/6 量時效果更佳（邱、王 1984）。本試驗慮及鹽類濃度之影響，以初時即以氮素減半量做為基礎配方，比較 1/2、1/4 氮量 MS 及 WPM 對於榕樹莖頂培養之影響，結果在後二種培養基的表現皆不佳，培養成功率均不及以 1/2 氮量 MS 為基本配方者（表二、表三），此表示榕樹莖頂仍以 1/2 氮量 MS 做基礎配方為宜。

榕樹成年枝條莖頂的培養，本試驗已經成功的做到組織培養程序第三步的前半段，以含 BA 濃度 5mg/l 以上的 1/2MS 培養基，可以誘導莖頂產生叢生的不定芽體，這些培植體繼代培養時，能再生多數不定芽。

參考文獻

- 1.何偉真 1989 觀賞植物組織培養種苗生產之展望 p.97 105. 花卉研究與產銷研討會專集 台中區農改場專刊第 18 號。
- 2.邱金春 王傳仁 1984 經濟作物組織培養 - 14 年來在中研究植物所組織培養研究室所做的工作 科學農業 32:185 204.
- 3.馬溯軒 1984 杜鵑之組織培養繁殖 p.191 194 台灣花卉之生產改進 台灣省農試所特刊 14 號。
- 4.黃怡菁 馬溯軒 1986 琴葉榕之組織培養繁殖 中國園藝 32:171 180.
- 5.楊政川 陳振榮 鍾振德 蔡錦瑩 1993 雜交桉(玫瑰桉×尾葉桉)組織培養苗之生長表現及藉農桿菌傳遞之基因轉殖 p.27 361993 植物組織及細胞培養研討會專刊 台灣省農業試驗所。
6. Debergh, P. and J. De Wael. 1977. Mass propagation of *Ficus lyrata*. *Acta Hort.* 78:361 364.
7. Debergh, P. 1981. A Scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Acta Hort.* 14:335 345.
8. Donnan, A. Jr., A. E. Davidson, and C. L. Williams. 1979. Establishment of tissue cultured grown plants in the green house environment. *Proc. Flo. Sta. Hort. Soc.* 91:235 237.
9. Farthing, J. G. 1988. Propagation techniques for *Ficus robusta*. *Acta Hort.* 226:489 498.
10. Jaiswal, V.S. and P. Narayan. 1985 Regeneration of plantlets form the callus of stem segments of adult plants of *Ficus religiosa* L. *Plant Cell Rept.* 4:256 258.

11. Jona, R. and I. Gribaudo. 1988. Intensive propagation procedure of *Ficus lyrata* by in vitro culture, *Acta Hort.* 227:390 392.
12. Kristiansen, K. 1991. Post-propagation growth of cuttings from in vitro and in vivo propagation stock of *Ficus benjamina*. *Scientia Hortic.* 46:315 322.
13. Kristiansen, K. 1992. Micropropagation of *Ficus benjamina* clones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:53 58.
14. Lloyd, G. and B. Mccown. 1980. Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by tissue culture. *Proc. Inter. Plant Prop Soc.* 30:421 427.
15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473 497.
16. Muriithi, L. M., T. S. Rangan, and B. H. Waite. 1982. In vitro propagation of fig through shoot tip culture. *HortScience* 17:86 87.
17. Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. *Martinus Nijhoff, Dordrecht*, 344pp.