

行政院農業委員會林務局補助研究計畫系列

104-林管-1.1-保-18

建立大型樹蕨筆筒樹 *Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel.

組織培養繁殖系統 (II)

Establishment of *in vitro* propagation method  
for tree fern *Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel. (II)



(成果報告)

委託機關：行政院農業委員會 林務局

執行機關：國立嘉義大學

中華民國 104 年 12 月

## 摘要

本研究接續前一年之研究，通過誘導筆筒樹(*Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel.)形成綠球體(green globular body, GGB)進行幼孢子體(sporophyte)的再生。綠球體再生孢子體分為三個階段培養(前、中、後期共 24 wk)。在前期培養時，將綠球體分解成四分體顆粒(QEP GGB)，並依前一年測試之條件將接種量從每一培養皿 0.5 g 減低到 0.1 g，在不添加植物生長調節劑(plant growth regulator, PGR)的 1/2 MS 培養基中培養，12 wk 後可獲得約 851 個再生孢子體，再經由中期及後期培養篩選，將成苗進行 9 wk 馴化(acclimatization)，期間以水苔(sphagnum moss)介質有最佳存活率(80%)。本研究亦證實於前期培養添加活性碳(activated charcoal, AC)改善褐化(browning)情形，可使長期(約 4 yr)繼代的綠球體仍保有很高的孢子體再生能力。整合此繁殖流程各條件，由初始每培養皿接種 0.1 g GGB，約 33 wk 後獲得 284 棵筆筒樹盆苗。

關鍵詞：筆筒樹、綠球體、樹蕨

## Abstract

In the present study following the previous research conclusion the green globular body (GGB) of *Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel was induced to regenerate the juvenile sporophytes. The sporophyte regeneration was classified into three culture stages (early, intermediate and late stages; with a total period of 24 wk). In early stage, GGBs were manipulated and cut into quarterly excised pellet (QEP GGB). Their inoculation on plant growth regulator-free 1/2 MS medium followed the previous method but reduced the amount from 0.5 to 0.1 g per petri dish. After 12-wk incubation, an approximate production of 851 regenerated sporophytes was obtained. These regenerated sporophytes went through intermediate and late stage of culture for further development and selection. The qualified plantlets with suitable size were thereafter ready for acclimatization. During the 9-wk acclimatization, sphagnum moss was determined to be the best medium that performed 80% plantlet survival rate. This study also demonstrated that the addition of activated charcoal (AC) into the regeneration medium in early stage significantly reduced browning problems and maintained high regeneration potential from long-term (~ 4 yr) cultured GGB. Based on the optimal culture conditions applied to this study, this *in vitro* propagation system obtained 284 potted plantlets of *C. lepifera* via initial culturing of 0.1 g GGB for 33 wk.

Key words: *Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel., green globular body (GGB), tree fern

## I、前言

桫欏科(Cyatheaceae)植物主要生長於熱帶或亞熱帶溫暖潮濕的森林中，其中筆筒樹(*Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel.)為台灣原生樹蕨類(tree fern)植物中最大型的物種，葉上佈滿金黃色的鱗片(scale)，葉片脫落後所留下之葉痕有如蛇皮花紋為其最大特徵，英文俗名稱之為 Flying spider-monkey tree fern。此物種屬於非耐陰性植物(Chiu et al., 2015)，分布於琉球群島、中國大陸南部、菲律賓等地，並以台灣為分布中心(郭城孟，2001)。

早期台灣與琉球居民曾有取食筆筒樹拳捲幼葉枝的紀載，其根莖(rhizome)維管束紋路特殊，可製成筆筒等工藝品。而台灣的布農族人也曾以其根莖作為搭建房屋、倉庫、臨時工寮等建築所需之樑柱(林仁漢，2005)。筆筒樹之實用價值包括將主幹加工製成蛇木板、蛇木盆、蛇木塊等，或將外圍包附之氣生根打碎製成蛇木屑，作為栽植蘭花、盆花或觀葉植物之良好介質。另外其亦為園藝造景常用之樹種，可塑造熱帶雨林景觀。但以筆筒樹加工製造栽培介質時，須大量砍伐野外植株，嚴重違反目前在世界各國普遍推廣之保育概念，因此當限制伐採使得產量減少時，此類園藝資材的價格隨之上揚，讓企圖謀取不當利益之業者有違法濫採之機會。又以作為觀賞植物而言，因為利用撒

播孢子繁殖筆筒樹者寡，常見之做法是直接從山林中掘取小苗培養。亦有業者不待苗木成長，直接從原生育地掘取成熟植株，移植於熱帶景觀造景，而移植後往往因栽植地環境適應不良導致死亡，再周而復始的進行補植，這些原因皆使生長於野外之筆筒樹族群有生存繁衍上之壓力。

台灣近年來，在新竹以北地區出現筆筒樹疫病致使大量個體死亡。學者們對於筆筒樹棲地特性、植群調查分析、種原保存以及植物病理學等進行全面性之研究。Fu et al. (2013) 確認引起此病害之菌種為杪羅長喙間座殼菌(*Ophiodiaporthe cyatheae* gen. et sp. nov.)。此外，中國大陸也將筆筒樹列為國家重點保護之蕨類，同時進行復育與相關研究(馬洪娜等，2010)。

本研究沿用 Higuchi et al. (1987) 在腎蕨(*Nephrolepis cordifolia* (L.) K. Prsel) 所發展出來的方法，誘導筆筒樹培植體產生綠球體(green globular body, GGB)，接續以增殖及移除植物生長調劑(plant growth regulators, PGRs) 二個培養階段大量產生幼孢子體，縮短筆筒樹繁殖週期，期望未來能將育成之苗木供應庭園造景與觀賞盆栽等商業市場所需，減緩野外筆筒樹族群因人為濫採而造成之生存壓力，讓筆筒樹於森林中能持續繁衍下一代。

## II、材料與方法

本研究接續前一年之計畫，在整個以誘導 GGB 為起始的繁殖過程中，著重改進筆筒樹再生孢子體階段的處理，本年度從降低 GGB 的接種量著手，提供較充裕的發育空間以提高孢子體增殖效率，以達成計畫預定目標。

### (I) GGB 再生孢子體

本研究於前一年之計劃中，追蹤筆筒樹 GGB 再生孢子體之生長過程(器官分化、生長時間與大小)，依孢子體發育的情形，可將此過程分成 3 個培養階段描述：前期(12 wk)、中期(6 wk)、後期(6 wk)，並在各培養階段訂定再生孢子體發育須達到的篩選標準。

#### 1.前期培養

##### (1) GGB 分解強度對再生孢子體數量之影響(試驗 1)

本試驗所謂之分解強度，係依照去年度研究計畫中之相同操作，將誘導且增殖後的 GGB，分解成 3 種不同程度進行接種：第一種是從增殖培養基中將繼代的完整 GGB 團塊 (GGB lump)，不經任何處理，直接移往芽體再生培養基上，第二種則取 GGB lump 以金屬鑷子將其分解成數個長×寬約 3 × 2 mm 之顆粒(GGB pellet)，移置於相同培養基，第三種將每個 GGB pellet 再以解剖刀切成約四等分的小顆粒(quarterly

excised pellet)，以下稱之為 QEP GGB，也移置於相同培養基。3 種處理雖然將 GGB 以不同的分解強度切成不同大小，但於每個培養皿中初始接種鮮重皆從前一年的 0.5 g 降低為 0.1 g，每個處理各 10 盤，試驗重複進行 2 次。此階段培養週期為 12 wk，每 4 wk 將不同處理之 GGB 以其在培養基中之生長狀態(最小干擾)，搬移至新配製的再生培養基進行繼代培養，12 wk 後每一處理中各培養皿均取其 1/2 面積上之再生孢子體於解剖顯微鏡下進行計數，再推算(乘以 2)初始接種鮮重 0.1 g GGB 後，每培養皿中再生幼孢子體數以進行統計分析。再生幼孢子體的篩選標準，以頂芽周圍至少有 2 片羽葉且頂芽尖端含有 1 個持續生長未伸展之幼葉為依據，壞死芽體不列入計算。試驗結束，將最佳處理產生的再生孢子體作為中期及後期培養之培植體。

## (2) 活性碳對長期培養之 GGB 再生孢子體的影響(試驗 2)

本試驗除取用(試驗 1)筆筒樹新誘導所得之 GGB 進行試驗，亦嘗試採用長期繼代(約 4 yr)所保存的 GGB 為材料，測試其再生孢子體能力。此 GGB 於前期培養 9-12 wk 期間，有嚴重褐化(browning)情形出現，導致分化中的孢子體持續死亡，降低再生效率。因此在前期培養中添加活性碳(activated charcoal, AC)改善褐化情形。將長期培養之 GGB 依試驗 1 之結果，以能產生最大量孢子體之方法(QEP GGB 分解

強度)處理，處理之後分別培養於芽體再生培養基中添加 0.25% AC(試驗組)或不添加(對照組)以做為比較。各處理每個培養皿中初始接種鮮重亦控制為 0.1 g，每個處理各 10 盤，試驗重複進行 2 次。試驗週期、繼代培養、芽體判定與計算方式，同試驗 1。試驗結束，最佳處理所產生的再生孢子體接續中期及後期培養。

## 2. 中期培養

從前期培養中選定能產生最大量孢子體之處理，取其中各培養皿 1/4 面積上達篩選標準之再生孢子體(為一樣本)，繼代培養至添加 0.25% AC 之芽體再生培養基中，以蘭花培養盒(100 × 90 mm)(蘭花育苗培養盒，清科企業，台灣)盛裝。每次試驗選取 10 個樣本(繼代至 10 個培養盒)，試驗重複進行 2 次。培養 6 wk 後以頂芽周圍至少有 3 片羽葉且頂芽尖端含有 1 個持續生長之幼葉為合乎計數標準之孢子體，計算其於培養盒中生長 6 wk 後之平均數量，並換算培養至本試驗(中期)完成時之孢子體達生長標準之比率。計算公式如下：

篩選比率(%) = [(培養盒中符合標準之孢子體數 × 4) / (0.1 g 綠球體於前期培養再生孢子體數)] × 100%

## 3. 後期培養



將中期培養所篩選達標準的孢子體以盒為單位各別分株繼代至玻璃試管中(規格為 120 × 20 mm)，每根試管培養 1 株孢子體)，沿用中期培養之培養基進行後期培養試驗。每次試驗從 10 個培養盒中，逢機選取 3 盒進行此繼代操作，試驗重複進行 2 次。待培養 6 wk 後挑選至少有 3 片羽葉(其中 2 片長度達 1.5 cm)且含有 2 條長度達 0.5 cm 根段的植株作為成苗馴化試驗材料，並計算由培養盒中期繼代至試管(後期)的成苗率，成苗率公式如下。

$$\text{成苗率(\%)} = (\text{試管成苗棵數} / \text{培養盒繼代至試管總棵數}) \times 100\%$$

## (II) 馴化試驗

以源自試驗 1 之成苗植株進行馴化，孢子體剪去過長羽葉只保留其中約 3-4 片，採用水苔、介質 A [泥炭土(peat moss, Kekkilä Garden, Finland)、蛭石(vermiculite 4 號, 南海園藝, 台灣)、珍珠石(perlite 4 號, 南海園藝, 台灣)；體積比為 1:1:4] 及介質 B (前述蛭石、珍珠石體積比為 1:1) 為 3 種馴化用介質，本階段使用之塑膠盆(直徑 7.5 cm)側面鑽取 3 個直徑約為 1 cm 的圓形孔增加其透氣性，每種介質種植 40 棵，試驗重複進行 3 次。

馴化週期為 9 wk (於馴化室培養 3 wk 後移至半遮蔭的溫室培養 6 wk)。馴化初期以玻璃燒杯(50 ml)為頂罩覆蓋小苗，第 4 wk 結束時將

燒杯微開增加通氣，6-7 wk 之間將頂罩完全移除，8-9 wk 將不同介質中存活的植株定植於泥炭土、蛭石、珍珠石體積比為 1:1:2 的定植用介質中。馴化試驗分別在 5, 7, 9 wk 後計算不同介質中植株的存活率，並進行統計分析，比較各階段不同馴化介質中小苗存活率差異，存活率公式如下。

$$\text{存活率(\%)} = (\text{幼苗存活數}/40) \times 100\%$$

### (III) 培養條件

本研究除已述及之培養容器之外，另使用無菌培養皿之規格分別為 15×90 mm (用於 GGB 誘導及增殖試驗) 及 20×90 mm (用於再生孢子體前期培養)。生長室溫度設定為 24±1°C，並以冷白螢光燈(cold white fluorescent light)混合白熾燈泡(incandescent light)提供 68 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 光源及每日光期 16 hr，暗期 8 hr 之光週期。馴化室溫度則設定為 26±2°C，並以冷白螢光燈提供光源，每日光照時間 16 hr，暗期 8 hr。半遮蔭溫室之溫度維持在 28±4°C。

### (IV) 統計分析

試驗 1 採用完全逢機設計(completely randomized design, CRD)，檢測 3 種分解強度於綠球體再生孢子體數量之影響。馴化試驗也以相同

試驗設計方式，檢測 3 種馴化介質之植株存活率差異，各階段(5, 7, 9 wk)之存活百分率數據，經角度轉換(angular transformation)後進行單因子變方分析(one-way ANOVA)。以上之資料分析以 SPSS 統計軟體進行，處理均值達顯著水準時( $p < 0.05$ )，再以最小顯著差異測驗法(Fisher's protected least significant difference test, LSD test)比較各處理間之效應。

試驗 2 以成對樣本 t 檢定(paired t-test)進行分析，再經由 t 分布(t-distribution)查表，檢測前期培養時添加或不添加 AC 處理，影響長期培養的 GGB 再生孢子體之效果，資料以 SPSS 統計軟體進行分析。

### III、結果

#### (I)前期培養

##### 1.GGB 分解強度對再生孢子體數量之影響

GGB 在不含 PGR 的培養基初培養 4 wk 時仍保持其增殖之狀態，3 種分解處理之培植體體積皆有增加，12 wk 時 GGB 表面可見叢生之再生孢子體(圖 1)。以 ANOVA 探討三種分解強度(GGB lump, GGB pellet and QEP GGB)對於再生孢子體產量之效應，結果顯示不同分解強度對孢子體再生的數量有顯著影響( $p < 0.05$ )。在 12 wk 之培養後，單一培養皿接種 0.1 g GGB 後，分別可以產生  $78.1 \pm 4.1$  (GGB lump)、 $311.2 \pm 11.3$

(GB pellet)及  $851.4 \pm 14.4$  (QEP GGB)個孢子體。試驗證明，在降低接種量之後，分解強度高者，其孢子體再生效率仍隨之提升，也以 QEP GGB 為最佳的處理方式(圖 2)，此結果經過連續二年之試驗驗證，故選定此方式為本研究之標準處理，並將培養所得之材料進行中期培養及後期培養。

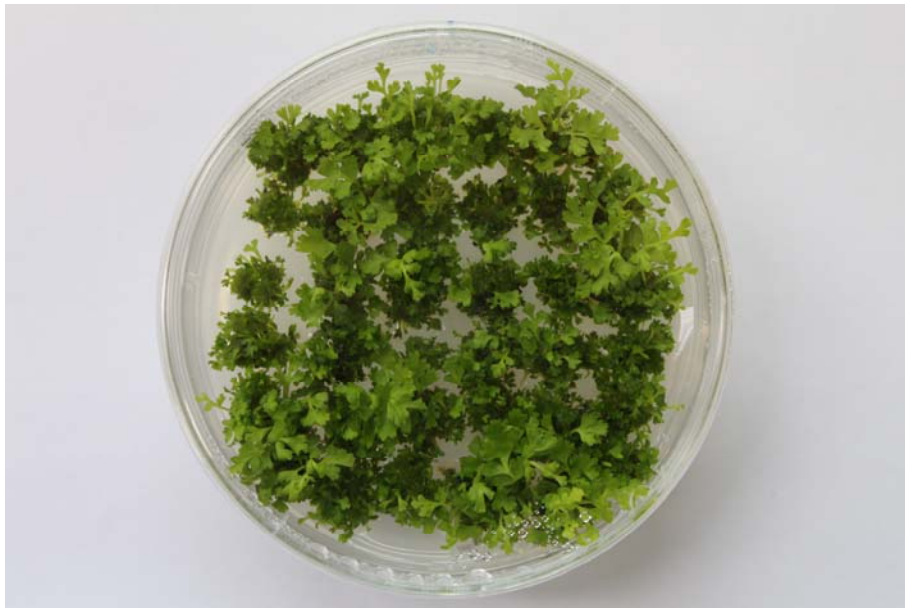


圖 1 以 QEP 分解強度處理之筆筒樹 GGB，於前期培養 12 wk 後形成孢子體的情形。

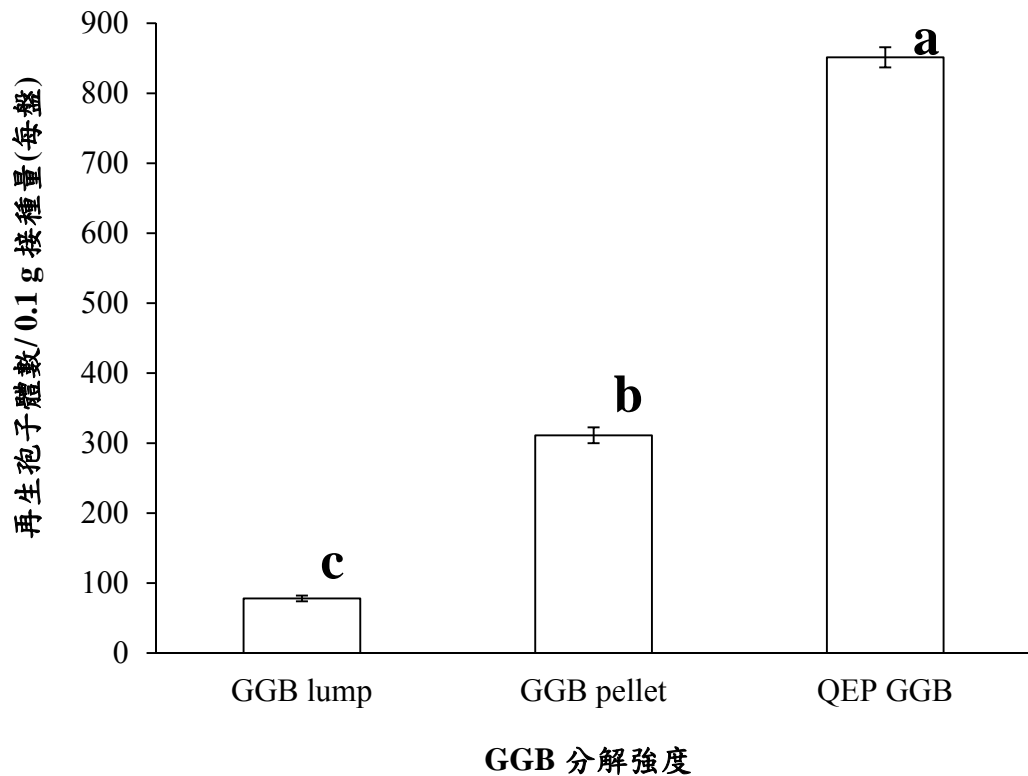


圖 2 不同分解強度對筆筒樹 GGB 再生孢子體比較，各處理均值之誤差線為該數值之標準誤差，另註記不同英文字母者，為經 LSD test 檢定達顯著差異( $p < 0.05$ )。

## 2. 活性碳對長期培養之 GGB 再生孢子體的影響

本試驗之對照組如前述，於孢子體再生過程中，發生嚴重褐化與組織壞死之現象，此情形影響部分已分化之孢子體，造成芽體死亡(圖 3A)。而添加 AC(試驗組)之 GGB 培養 12 wk 後，大多數均能正常生長且孢子體叢生於 GGB 表面(圖 3B)。以成對樣本 t 檢定分析在此培養階段添加 AC，是否能使長期培養之 GGB 保持孢子體再生能力，表 1 顯示添加 AC 與否影響孢子體再生之效果呈顯著差異，以添加者有較佳

之孢子體再生能力，對照組僅能由 0.1 g GGB 獲得  $345.0 \pm 22.2$  棵孢子體，試驗組則從相同接種量中獲得  $709.7 \pm 22.3$  棵孢子體。

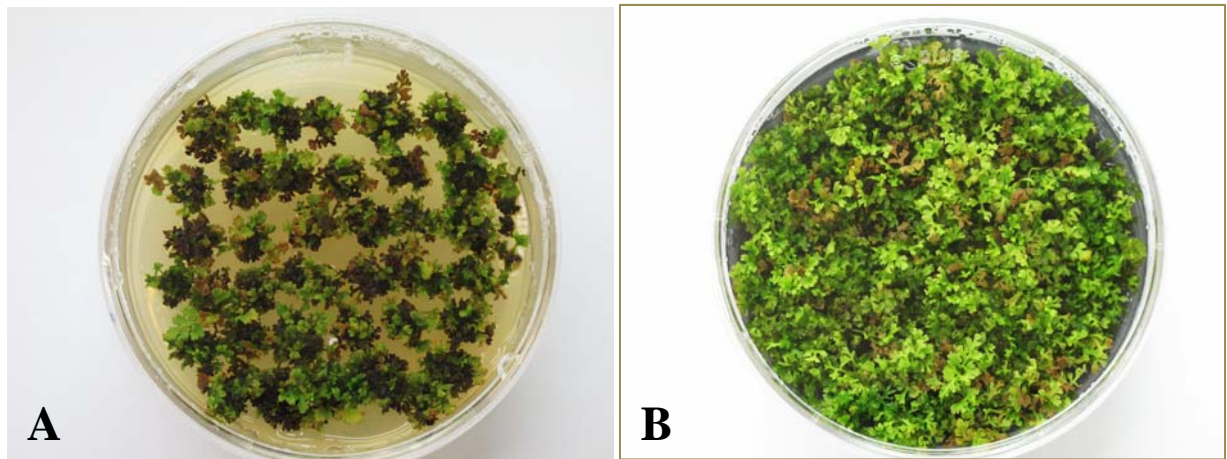


圖 3 長期繼代之 GGB 於前期培養在(A)無添加或(B)添加活性碳(AC)的孢子體再生培養基 12 wk 後生長情形。培養皿直徑 9.0 cm。

表 1 比較前期培養添加或不添加活性碳(AC)對長期繼代之綠球體(GGB)再生孢子體能力之影響

培養基 <sup>1)</sup>	孢子體(數量/0.1 g GGB/每盤)
對照組(-AC)	$345.0 \pm 22.2$
試驗組(+AC)	$709.7 \pm 22.3$
t-value <sup>2)</sup>	12.182

<sup>1)</sup>對照組為孢子體再生培養基，試驗組為該培養基添加 0.25% AC

<sup>2)</sup>根據  $t$  分布查表  $t_{(0.05/2, 19)} = 2.093 < 12.182$ ，兩處理間呈顯著差異

從前期培養的二個試驗中可知，於相同培養條件下，新誘導的 GGB 與長期繼代者相較，平均接種 0.1 g 的材料可產生之孢子體數從 851 棵降至 345 棵(減少 59.5%)，但藉由添加 AC 改善後者於再生過程中出現的褐化作用，可使其恢復到新誘導 GGB 再生孢子體 83.4%的效率。

## (II)中期培養

將試驗 1 中經 QEP GGB 處理所得孢子體材料移至培養盒中以疏減生長密度並進行繼代，培養 6 wk 時進行孢子體生長情形之計數，平均 1 個培養盒(材料來自原先之 1/4 培養皿)可得  $131.7 \pm 4.2$  棵達計數標準之孢子體，經計算後從前期培養試驗 1 中計數所得之孢子體，至此一階段時之達標率為  $62 \pm 2\%$ 。

將試驗 2 添加 AC 處理之再生孢子體，依相同方式疏減生長密度後進行 6 wk 繼代培養，則平均可從 1 個培養盒獲得  $132.5 \pm 6$  棵孢子體。其達標率為  $74.5 \pm 2.5\%$ 。將前期培養之再生孢子體移至培養盒進行中期培養 6 wk 之生長情形如圖 4。

## (III)後期培養

將前一階段培養所得之孢子體各別分株後，繼代至玻璃試管中培養 6 wk，計算達馴化標準之植株成苗率，得結果為  $63.7 \pm 4.7\%$ 。因此可



圖 4 於前期培養中選出合於標準的孢子體，在中期培養於培養盒中 6 wk 之生長情形。

藉由本研究各培養階段所得之參數估算，以 QEP GGB 處理 0.1 g 新誘導之綠球體，培養 24 wk 產生約 336 棵( $851 \times 0.62 \times 0.637$ )可馴化之植株。試驗 2 所得之孢子體依相同繼代方式及培養時間於玻璃試管中生長，其成苗率為  $67 \pm 5\%$ 。依相同方法估算，將 QEP GGB 處理長期繼代保存之綠球體 0.1 g，並在接種於添加 0.25% AC 之培養基中，則 24 wk 後可產生約 354 棵( $710 \times 0.745 \times 0.67$ )可馴化之植株。經中期培養所篩選之孢子體再繼代至玻璃試管進行後期培養 6 wk 後之生長情形如圖 5。





圖 5 於中期培養中選出合於篩選標準的孢子體，在後期培養於試管中 6 wk 之生長情形。均有自然發根現象。



圖 6 來自於後期培養並達到選擇標準的筆筒樹小苗，個別在三種介質中馴化情形。分別為水苔(上)、介質 A(下左)及介質 B(下右)。

## (V) 馴化試驗

將達到材料方法(I)之 3 中所描述之標準的筆筒樹小苗以 3 種不同介質進行馴化試驗(圖 6)，在 5 wk 結束(仍使用頂罩)時計算存活率，分別為水苔  $87\pm 2\%$ 、介質 A  $98\pm 1.5\%$ 、介質 B  $14\pm 3.5\%$ ，經統計分析，不同介質中筆筒樹小苗存活率呈顯著差異( $p < 0.05$ )，以介質 A 於此階段有最佳存活率，介質 B 保水力最不佳導致小苗存活率最低。馴化至 7 wk 結束時(於 6 wk 開始去除頂罩)存活率為水苔  $81\pm 5\%$ 、介質 A  $67\pm 11\%$ 、介質 B 之小苗則全數死亡。介質 A 中的小苗將頂罩移除後存活率開始下降，水苔則可維持小苗約 81% 的存活率。最後將仍存活於 2 種介質(水苔及介質 A)中之小苗移往定植用介質，2 wk 後記錄到經水苔馴化之小苗生存活率可維持在  $80\pm 5\%$ ，介質 A 馴化小苗的存活率則下降至  $45\pm 11\%$ ，此兩種介質對維持筆筒樹小苗存活的效益呈顯著差異( $p < 0.05$ )。雖然之後在換盆定植時，筆筒樹植株的根系會與水苔纏繞，而在去除部分水苔之過程中根系會因拉扯而斷裂，但仍以在水苔中馴化者可保持較高(80%)之存活率(圖 7A)。

經由 GGB 繁殖系統產生的馴化筆筒樹在溫室中能持續正常生長茁壯(圖 7B)，羽葉茂密且頂芽佈滿金黃色鱗片。將本研究建立之流程依各階段生長及篩選結果換算，並再納入馴化成活率之後，試驗 1 藉由



圖 7 筆筒樹組織培養苗馴化情形。(A)於水苔中馴化之小苗定植後存活生長，bar = 1.0 cm。(B)完成馴化及定植後在溫室中生長 16 wk 之筆筒樹苗木。後

QEP GGB 分解並接種 0.1 g 新誘導之 GGB，33 wk 後可獲得約 268 棵筆筒樹馴化的幼苗( $851 \times 0.62 \times 0.637 \times 0.8$ )。若以長期繼代的 GGB 為材料(相同分解強度)，並以添加 AC 為手段改善褐化現象，則可從 0.1 g GGB 中獲得約 284 棵馴化植株( $710 \times 0.745 \times 0.67 \times 0.8$ )。

#### IV、討論

蕨類以孢子為繁殖途徑時，其優點在於孢子的產量高，單一羽葉上可能含有數十億顆孢子而沒有數量上的限制，但孢子成熟度與季節

性有相當大的關聯，不同生育地的物候不一致也會影響孕性葉生長與孢子成熟之時機，使採集時間的決定發生困擾。一般杪欏屬的植株高大，採集時無法以肉眼直接觀察羽葉上孢子囊群的生長情形，而孢子成熟度之判斷需要相當之經驗，因此採集時若無深入了解該地區物種特性，於成熟季採集時，也可能得到未成熟之孢子以致影響繁殖效率，若採集孢子是要建立孢子庫作為種原，更需注意以上這些因子。

在繁殖效率的考量上，以孢子方法進行繁殖，若想提高繁殖數量，從學者在筆筒樹或是其他杪欏屬物種之研究中顯示，需藉由人為方式控制生長的環境以及利用其他手段，幫助孢子發芽、配子體發育及授精，才能提高孢子體形成的比率，其中部分研究也包含以組織培養方式輔助進行(馬洪娜等，2010；Finnie and Staden, 1987; Goller and Rybczyński, 1995; Kuriyama et al., 2004)。而多數孢子繁殖研究常以概略敘述的方式，顯示繁殖方法的可行性，或是描述繁殖時所表現的形態發生過程，較少直接以產量數據呈現其結果。

本研究以筆筒樹 GGB 作為再生孢子體的材料進行組織培養繁殖，與一般以孢子繁殖的方式互相比較，用孢子繁殖時，12 wk 後有第 1 個孢子體出現，其幼孢子體陸續產生直至 24 wk 時結束(Chiou et al., 2003)。以 GGB 系統繁殖，從 GGB 建立起算，培養 4-5 wk 後即有孢子體幼葉

產生，並於前、中、後期三個階段培養結束(共須 24 wk)即可生產大小一致的植株進行馴化，依孢子體發育所需的時間來比對，確實能縮短繁殖的週期。而依此法來產生孢子體植株相對於孢子繁殖需要授精作用則更加容易控制且穩定，能在固定之繁殖週期中，不受季節的影響於溫室產生大量健康植株，且綠球體之使用可藉由繼代培養進行增殖並保持材料來源，十分便利。因此利用組織培養方式，將本研究研發之系統應用於筆筒樹的繁殖是可行的，應該能產生足夠的商品苗木填補市場需要，遏止山採行為。

本研究在前一年的研究結果中，以每一盤培養皿接種 0.5 g GGB 在前期培養可獲得 2297 株幼孢子體。然因數量過多導致培養空間及養分不足，孢子體大都褐化死亡。本年度在調整接種量至 0.1 g 之後，可獲得 851 株幼孢子體，且褐化死亡情形大幅改善。若將其數值乘以 5 倍使其等同 0.5 g 之接種量，則孢子體數量可達 4255 株，遠超過前一年之成果，由此可知適當的減少接種量可以大幅提高增殖效率，從而使本方法更具競爭性。

高分解強度的 GGB 可促成孢子體大量出現的觀念來自於 GGB 均質化之研究，Bertrand et al. (1999)以 1 g 鮮重的 *Polypodium cambricum* L. 根莖或羽葉(皆經 BAP 預處理產生 GGB)均質培養在 PGR-free 培養基，

40 wk 後產生 980 棵孢子體。在馬來鹿角蕨(*Platynerium ridleyi* Christ) 的研究中, 接種 0.05 g 均質化 GGB 於含有 0.25% AC 之 PGR-free 1/2MS 培養基中生長 8 wk, 可獲得約 360 棵再生孢子體(盧學甫, 2014)。上述研究顯示出綠球體均質化的優異性, 藉由簡單的物理切割方式, 將含有分生組織的綠球體切成細小的細胞團塊, 以提高分生組織與培養基的接觸面積。而細碎之分生組織於培養基中, 經由細胞分裂可形成更多分生組織, 在細胞分化後達到大量繁殖的目的。

在前期培養階段測試利用長期繼代(約 4 yr)的 GGB 進行繁殖, 意味著可以將繁殖材料長期儲存, 進而免除經常性誘導 GGB 的不便, 亦是商業生產上減少操作過程以節省成本的重要步驟。然而在芽體再生過程中產生褐化現象並降低了培植體再生能力, 此情況在其他蕨類植物 GGB 繁殖研究則尚未被描述, 但在同樣以長期繼代培養之癒傷組織中則有相似情形發生。Padhya (1987)誘導 *Pteris vittata* L. 所得之癒傷組織會隨著繼代次數增加, 降低其形態發生的潛力。Liu et al. (2009)在日本結縷草(*Zoysia japonica* Steud.)的繁殖研究中也觀察到, 此種植物的癒傷組織往往因長期繼代使其再生植株的能力下降, 尤以材料繼代至 144 wk 時, 癒傷組織分化成芽體的能力完全喪失。

伴隨培植體再生能力下降的褐化現象為植物組織培養常見的問題

(特別在木本植物上)，植物體若富含酚類化合物(phenolic compounds)，則會因為細胞和組織受到外力傷害(如培養時的切割操作)造成破損，或因衰老或細胞膜結構破壞等情形，使得這類物質於細胞內的分隔儲存狀態被打破，與酶接觸後即被催化並在氧化作用下產生褐化物質(Mayer and Harel, 1979; Ahmad et al., 2013)。除了酚類物質影響褐化外，Tang and Newton (2004)在維吉尼亞松(*Pinus virginiana* Mill.)癒傷組織褐化的研究則認為，癒傷組織培養時間增長，會因為多酚氧化酶(polyphenol oxidase)濃度累積而使褐化更明顯，而抑制癒傷組織生長及再生能力。

本研究在利用長期繼代的 GGB 作為繁殖材料時，有將綠球體切分成小塊，因此認為長期培養與這個切分動作(外力傷害)均有可能是褐化形成的原因。然切分動作亦施行於幼嫩的 GGB 卻無明顯的褐化現象發生。因此長期培養應該還是褐化的主要原因。此現象的改善可藉由添加抗氧化劑或是吸附劑等方式，或藉由培植體選擇、調整繼代週期以及其他環境的因子(光、溫度、培養基成分)來改善。Waes (1987)在西歐地區的蘭花(12 屬 18 個種)培養報告中說明，添加 AC 至培養基可吸附釋出的酚類物質，有效降低壞死情形。李旭等(2012)在大花蕙蘭(*Cymbidium* sp.)的研究中表示，在生物反應器添加適當濃度的 AC 可以



改善原球莖的褐化率，並提高增殖率。盧學甫(2014)在馬來鹿角蕨綠球體繁殖研究中測試幾種不同吸附劑來改善褐化作用及提高孢子體再生情形，以添加 0.25% AC 吸附褐化物質後有最佳效果。

本研究驗證以 GGB 方式大量繁殖筆筒樹植株極具潛力，只要有少量綠球體被誘導形成，即可以穩定的增殖培養而呈現多倍數增加，相較於其他組織培養方式，本法使用簡單的操作不需添加任何 PGR 誘導不定芽，即能使孢子體再生，最後可由初始接種 0.1 g 綠球體，約 33 wk 後可獲得 284 棵植株，可望藉由此系統繁殖之植株充分提供商業市場需求。

## V、致謝

本研究承蒙農業委員會林務局保育組補助經費執行，特此申謝。

## VI、參考文獻

- 李旭、朴炫春、邵春繪、廉美蘭 (2012) 接種密度、培養基中蔗糖和活性碳濃度對於生物反應器內大花蕙蘭原球莖增殖的影響。廣東農業科學 5: 1-3。
- 林仁漢 (2005) 南投縣布農族卡社群植物利用之研究。國立屏東科技大學森林研究所碩士論文，75頁。
- 馬洪娜、李楊、檀龍顏、劉保東 (2010) 筆筒樹的孢子繁殖及復壯研究。園藝學報 37: 1679-1684。



- 郭城孟 (2001) 蕨類圖鑑。遠流出版事業，台北市。423頁。
- 盧學甫 (2014) 吸附劑對馬來鹿角蕨均質化綠球體再生孢子體之影響。國立嘉義大學森林暨自然資源研究所，68頁。
- Ahmad, I., T. Hussain, I. Ashraf, M. Nafees, Maryam, M. Rafay and M. Iqbal (2013) Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 13: 539-547.
- Bertrand, A. M., M. A. Albuerne, H. Fernández, A. González, and R. Sánchez-Tamés (1999) *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 65-69.
- Chiou, W. L., Y. M. Huang and P. H. Lee (2003) Mating systems of Cyatheaceae native to Taiwan. pp.485-489. In S. Chandra and M. Srivastava, eds. *Pteridology in the New Millennium*. Springer, Netherlands. 520pp.
- Chiu, T. Y., H. H. Wang, Y. L. Kuo, K. Tomonori, W. L. Chiou and Y. M. Huang (2015) Ecophysiological characteristics of three *Cyathea* species in northeastern Taiwan. *Taiwan Journal of Forest Science* 30: 147-155.
- Finnie, J. F. and J. V. Staden (1987) Multiplication of tree fern *Cyathea dregei*. *HortScience* 22: 665.
- Fu, C. H., H. M. Hsieh, C. Y. Chen, T. T. Chang, Y. M. Huang and Y. M. Ju (2013) *Ophiodiaporthe cyatheae* gen. et sp. nov., a diaporthalean pathogen causing a devastating wilt disease of *Cyathea lepifera* in Taiwan. *Mycologia* 105: 861-872.
- Goller, K. and J. J. Rybczyński (1995) *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br.) Domin vegetative propagation. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64: 13-17.
- Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki (1987) *In vitro* propagation of *Nephrolepis*

- cordifolia* Prsel. Scientia Horticulturae 32: 105-133.
- Kuriyama, A., T. Kobayashi and M. Maeda (2004) Production of sporophytic plants of *Cyathea lepifera*, a tree fern, from *in vitro* cultured gametophyte. Journal of the Japan Society for Horticultural Science 73: 140-142.
- Liu, L., X. Fan, J. Zhang, M. Yan and M. Bao (2009) Long-term cultured callus and the effect factor of high-frequency plantlet regeneration and somatic embryogenesis maintenance in *Zoysia japonica*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 45: 673-680.
- Mayer, A. M. and E. Harel (1979) Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- Padhya, M. A. (1987) Mass propagation of ferns through tissue culture. *Acta Horticulturae* 212: 645-649.
- Tang, W. and R. J. Newton (2004) Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167: 621-628.
- Waes, J. V. (1987) Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European orchids. *Acta Horticulturae* 212: 131-138.

## VII、研究團隊

---

姓 名	工作屬性	所屬機關	職稱
廖宇賡	主持人	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	教授
王基成	計畫助理	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
殷端謙	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
洪丞慧	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
林冠里	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
黃江海	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
葉佩雯	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
賴巧欣	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	大學生

---