

行政院農業委員會林務局補助研究計畫系列

103-林管-1.1-保-31

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

組織培養繁殖系統

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



(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 103 年 12 月

## 摘要

本研究透過誘導筆筒樹(*Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel.) 培植體，在添加植物生長素(auxin)的培養基中形成綠球體(green globular body; GGB)，並於添加生長素及細胞分裂素(cytokinin)組合的 MS 培養基中，4 wk 後增量可達 4 倍。將完整的綠球體團塊分解成數個大小約為  $3 \times 2$  mm 的綠球體顆粒，再均等細分切成四份更小顆粒，於不添加生長調節劑(plant growth regulator; PGR)的 1/2 MS 培養基培養 12 wk，可從接種量 0.5 g 的綠球體獲得約 2200 個再生孢子體。此再生之孢子體經繼代培養 8-12 wk 後可自發性發根。以水苔(sphagnum)為介質，健化 4 wk 後成活率為 50%，將孢子體移盆定植於混合栽培介質(蛭石：泥炭土：珍珠石 1:1:2)，成活率達 70%，並可持續於溫室中良好生長。

關鍵詞：筆筒樹、綠球體、樹蕨

## Abstract

The green globular body (GGB) of tree fern *Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel. was induced from explants incubated on auxin-containing medium. The GGB proliferated rapidly obtaining a 4-fold increase during a 4-wk culture period in MS medium supplemented with auxin and cytokinin. When the intact GGB pieces, weighted 0.5 g, were separated into small pellets ( $3 \times 2$  mm) and then further excised into four equal parts, the whole inoculants could produce about 2200 regenerated sporophytes on PGR-free 1/2 MS medium. These sporophytes achieved spontaneous rooting during the follow-up 8-12 wk subcultures. During a 4-wk acclimatization using sphagnum as potting media, the sporophytes survived at a percentage of 50%. They were further transplanted into a mixed medium (vermiculite: peat: perlite=1:1:2) at a survival rate of 70%. All the plantlets performed normal growth in the greenhouse.

Keywords: *Cyathea lepifera*, green globular body (GGB), tree fern

## I、前言

樹蕨類植物在分類上涵蓋 7 個科 13 個屬，其中以杪欏科 (Cyatheaceae) 為核心的樹蕨類群，也就是一般人所稱廣義的樹蕨 (tree fern) (Korall *et al.*, 2006)。在國際上，瀕臨絕種野生動植物國際貿易公約 (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora; 簡稱華盛頓公約) 將所有杪欏屬 (*Cyathea* Sm.) 之樹蕨納入其附錄 II 受保護列表中，對其貿易行為是有條件的控管。

筆筒樹 (*Cyathea lepifera* (J. Sm.) Copel.) 分布於台灣、日本、中國大陸南部、菲律賓及馬來西亞等地，為前述大型的樹蕨類植物之一。台灣在近年來，由於該樹種在新竹以北地區出現萎凋病況，促使其大量死亡。學者們乃開始對筆筒樹棲地的特性、植群調查分析、種源保存以及植物病理學等進行全面性之研究。筆筒樹在坊間之利用，有食用、藥用、製作工藝品之價值。主幹加工為蛇木板，以及外圍包附之氣生根打碎製成蛇木屑，可作為栽植蘭花、盆花或觀葉植物之良好介質。不過因其具樹蕨類特有的外形，可營造熱帶叢林的氛圍，常被業者從原生育地以非法方式全株掘取，移植做為庭園造景之用。而移植後常因運輸途中看顧不良，或因新植庭園之環境不適導致死亡，就周而復始的進行補植，使其族群在染病之餘，更多了一層生存上的壓力。

本研究以誘導筆筒樹綠球體(green globular body, GGB)發生，建立再生孢子體的繁殖系統，提供樹蕨類植物新的無性繁殖方式。相較於傳統之孢子繁殖，本法之材料取得不再受季節或天候限制，能以穩定之數量繁殖出大量的孢子體植株。同時藉由此法可縮短繁殖週期，供應未來庭園造景與商業觀賞盆栽之市場，在滿足市場需求之後可減緩野外筆筒樹族群因人為濫採而造成之生存壓力，讓筆筒樹受違法採取之行為絕跡。

## II、材料與方法

### (I) 植物材料與培養環境

自野外採集筆筒樹具成熟孢子之羽片，將著生孢子囊之葉面朝下平展於濾紙上，陰乾 3-7 d 後使孢子完全釋出，將濾紙傾斜後輕敲擊，利用濾紙表面纖維對異物不同之阻隔及吸附強度，可將收集的孢子與雜質分離並純化，以低溫 4°C 黑暗冷藏保存孢子作為無菌播孢的材料。孢子表面殺菌之流程先以 20% (v/v) 漂白水消毒 3 min，再用 70% (v/v) 乙醇(ethanol)清洗 30 sec，以 0.3% (w/v) 氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)水溶液洗滌 2 min，最後使用經高溫高壓滅菌之二次蒸餾水(double distilled water, ddH<sub>2</sub>O)清洗 5 次，每次 3 min。殺菌完成之孢子與滅菌後之 ddH<sub>2</sub>O 混合均勻成懸浮液(0.25 mg/mL)，以微量吸管抽取 1 mL 的孢子懸浮液，播於直徑

9 cm 之培養皿中，內含 25 mL plant growth regulator (PGR)-free 的 1/2 MS 基礎培養基(Murashige and Skoog, 1962)，添加 1%蔗糖並以 0.8% Difco Bacto 洋菜固化(pH = 5.8)。培養 7 wk 後於每個培養皿加入 2 ml 滅菌之 ddH<sub>2</sub>O 提高孢子體形成率，12 wk 後有幼孢子體出現，而後 4-8 wk 內孢子體陸續出現。將產生之單株幼孢子體轉移至蔗糖濃度提升至 3%之基礎培養基中，再培養 12 wk 使其作為綠球體誘導的材料。本研究所有試驗均將生長室溫度設定為 24±1°C，並以冷白螢光燈(cool white fluorescent light)混合白熾燈泡(incandescent light)提供 55.6 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> 光度及每日光照時間 16 hr，暗期 8 hr 之光週期，培養綠球體之培養皿規格為 15 × 90 mm，培養幼孢子體之培養皿規格為 20 × 90 mm。

## (II) 綠球體誘導及增殖

將切除根及羽葉(frond)的幼孢子體培養於誘導培養基中，其為全量 MS 培養基(pH = 5.8)添加 3%蔗糖、1%洋菜及植物生長素(auxin)。每盤置培植體 3 個，各 10 盤，試驗進行 3 次。於生長室中培養 6-8 wk 後，將所誘導產生之綠球體繼代至增殖培養基，其為誘導培養基添加 auxin 及細胞分裂素(cytokinin)，觀察其增殖與生長情形，每 4 wk 繼代培養一次，8 wk 後確認誘導物為 GGB 之後，依據公式計算 GGB 誘導率：  
GGB 誘導率(%) = (誘導出 GGB 之培植體個數/培植體總數) × 100%。誘

導成功之綠球體則在增殖培養基中持續繼代培養，提供後續試驗之材料。

為了解 GGB 之增殖率，秤取鮮重 0.15 g 之 GGB 接種於單一培養皿中，於秤重後將該完整 GGB 團塊(intact lump, IL)分成數個長×寬約為 3 × 2 mm 之 GGB 顆粒(separated pellet, SP)培養，每次試驗各 10 盤，試驗進行 3 次，4 wk 後秤取每個培養皿中 GGB 之鮮重，並依據公式計算其增殖率：增殖率(%) = (最終鮮重-初始鮮重)/初始鮮重×100%。

### (III) 筆筒樹綠球體之石蠟切片構造觀察

筆筒樹GGB以石蠟切片法染色製成永久切片，其在添加3%蔗糖的基礎培養基培養2 wk後，以FAA(50% alcohol : glacial acetic acid : formalin, 18:1:1)固定液固定2 wk，以t-butylalcohol (TBA)系列濃度置換進行脫水、滲蠟及包埋等步驟，使用旋轉式切片機切取10 μm厚度之連續蠟帶，以黏著劑(gelatin)張貼切片後，連同載玻片一併經safranin-fast green染色製成永久切片進行觀察及攝影紀錄。

### (IV) GGB 再生孢子體試驗

本試驗將增殖後的 GGB，分為 3 種不同大小：第一種，從增殖培養基中將繼代的 IL GGB 不經處理，完整的培養在培養基上；第二種，

將 IL GGB 以金屬鑷子分解成數個 SP GGB，移置於培養基；第三種，將每個 SP GGB 再以解剖刀均等切成四分綠球體顆粒(quarterly excised pellet, QEP)，移置於培養基。各處理雖將 GGB 切分成不等大小，但於每個培養皿中初始接種鮮重皆控制為 0.5 g，培養於添加 3%蔗糖的基礎培養基，每個處理各 10 盤，試驗進行 3 次。培養 4 wk 後，將不同處理之 GGB 以其完整形態，搬移至相同培養基繼代。其中 QEP GGB 在因為有數量增殖之現象，為避免空間擁擠，繼代時將其再擴增培養於 4 個培養皿中，每盤培養之 QEP GGB 數目可達 70-80 顆。3 種處理在搬移後接續培養 8 wk，每一培養皿取 1/2 盤面積之培養物作為計數孢子體數量之用，將 3 種處理於初始接種量相同之基礎上比較其孢子體數量之差異，並以統計分析。再生孢子體芽體的判定，以頂芽周圍至少有 2 片羽葉且頂芽尖端含有 1 個持續生長但未伸展之幼葉為準。

#### (V) 再生孢子體之健化(acclimatization)

將利用 QEP 處理產生的幼孢子體，繼代至蘭花育苗培養盒中培養 8-12 wk，挑選至少有 3 片羽葉且含有 1 條 0.5 cm 根段的孢子體作為健化材料。孢子體只保留 3 片羽片剪去其餘者，以水苔為介質，於半遮蔭的水牆溫室中進行健化，初期以小玻璃燒杯(50 ml)為頂罩避免水分過度散失，第一片新的羽葉生長後(約 3-4 wk)將燒杯移開，健化 4 wk



後計算第一次存活率，孢子體穩定生長後，將其移盆定植於栽培介質中(蛭石：泥炭土：珍珠石=1:1:2)，定植後經 4 wk 後再計算成苗率，存活(成苗)率公式：存活(成苗)率(%)=幼苗存活(成苗)個體總數/幼苗健化總數×100%。

#### (VI) 資料處理與分析

GGB 再生孢子體試驗採用完全逢機設計(completely randomized design; CRD)，使用 SPSS 軟體進行單因子變異數分析(one-way ANOVA)統計，比較不同分解強度對於綠球體再生孢子體數量的影響，並以 Scheffe's 法分析處理均值間是否有顯著差異( $p < 0.05$ )。

### III、結果

#### (I) 綠球體誘導及增殖

筆筒樹培植體之 GGB 誘導率可達 52.4%，但仍有 28.6%的培植體呈現褐化而無反應。GGB 由孢子體頂芽周邊形成，呈圓球狀(圖 1)，表面或有透明細毛狀的鱗片(scale)。筆筒樹 GGB 在進入增殖階段培養 4 wk 後，總體積有明顯增加，以 SP GGB 為中心向周圍增殖球體，且增生的 GGB 最後將會聚積成鬆散的團狀顆粒(圖 2)，以鮮重計算平均增殖倍率可達  $415 \pm 20\%$ ，即培養 4 wk 後鮮重可增加 4 倍。

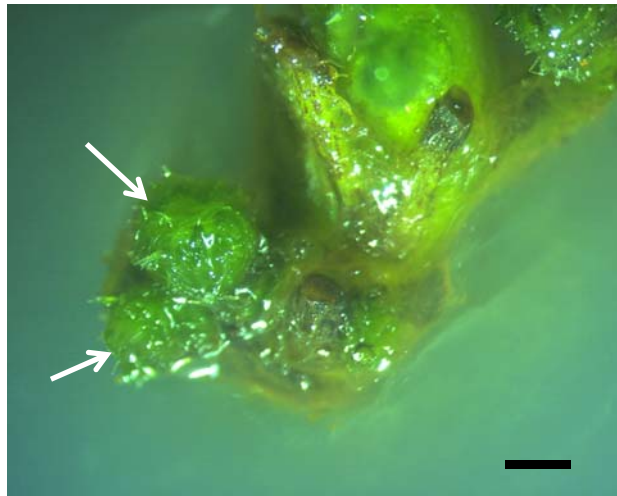


圖 1 誘導筆筒樹(*Cythea lepifera* (J. Sm.) Copel.)綠球體(箭頭)在培植體周邊形成。Bar = 1.0 mm

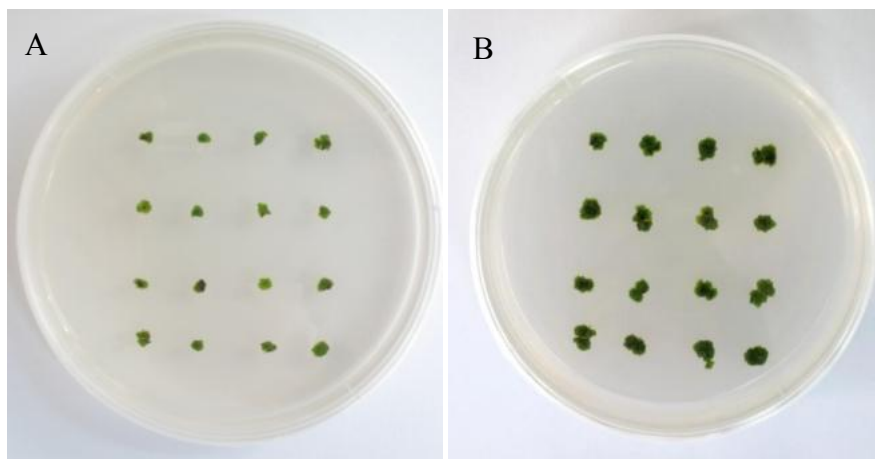


圖2 筆筒樹(*Cythea lepifera* (J. Sm.) Copel.)綠球體增殖試驗。(A)增殖培養基接種0.15 g綠球體培養；(B)綠球體增殖4 wk後情形。(培養皿直徑=9 cm)。

## (II) 筆筒樹綠球體之石蠟切片觀察

筆筒樹 GGB 樣本的石蠟染色切片，可驗證其確為 GGB 構造，在接近表皮層處形成分生組織，且同一個 GGB 上可同時存在多個分生組織，均為具有細胞分裂能力之細胞群，其細胞密集聚合且分裂方向各自不同，各個細胞的長軸方向呈不規則排列，並擁有較大的細胞核。此細胞群向外突出生長，即為之後形成孢子體之原始結構，持續培養後即觀察到孢子葉形成而產生新的植株(圖 3)。

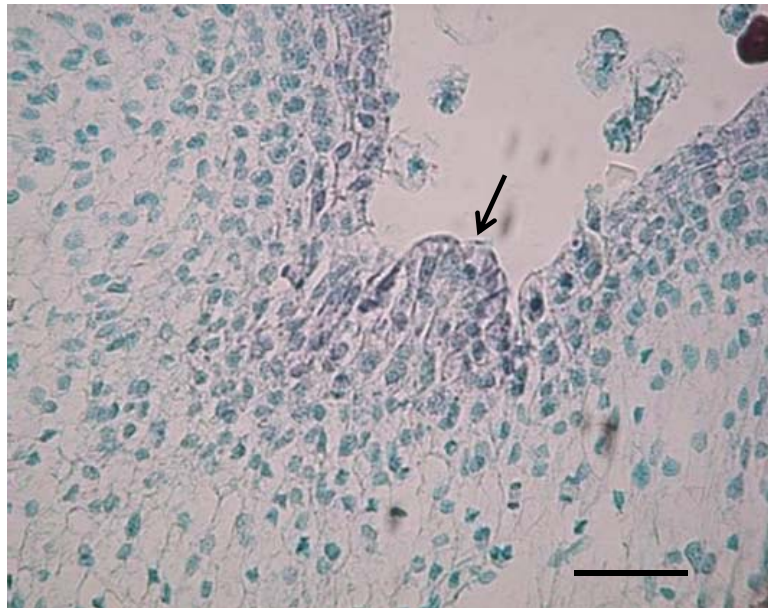


圖 3 綠球體表面分布多個分生組織(箭頭)，持續分化可成為新的植株。Bar = 0.05 mm

### (III) 綠球體再生孢子體試驗

以解剖顯微鏡觀察筆筒樹 *GGB* 發生孢子體的過程，在移除 PGR 的基礎培養基中 3 wk 後，即有綠球體表面開始分化產生孢子體幼葉(圖 4A)，6 wk 後可以看到孢子體幼葉明顯生長，葉尖端由捲曲狀開始伸

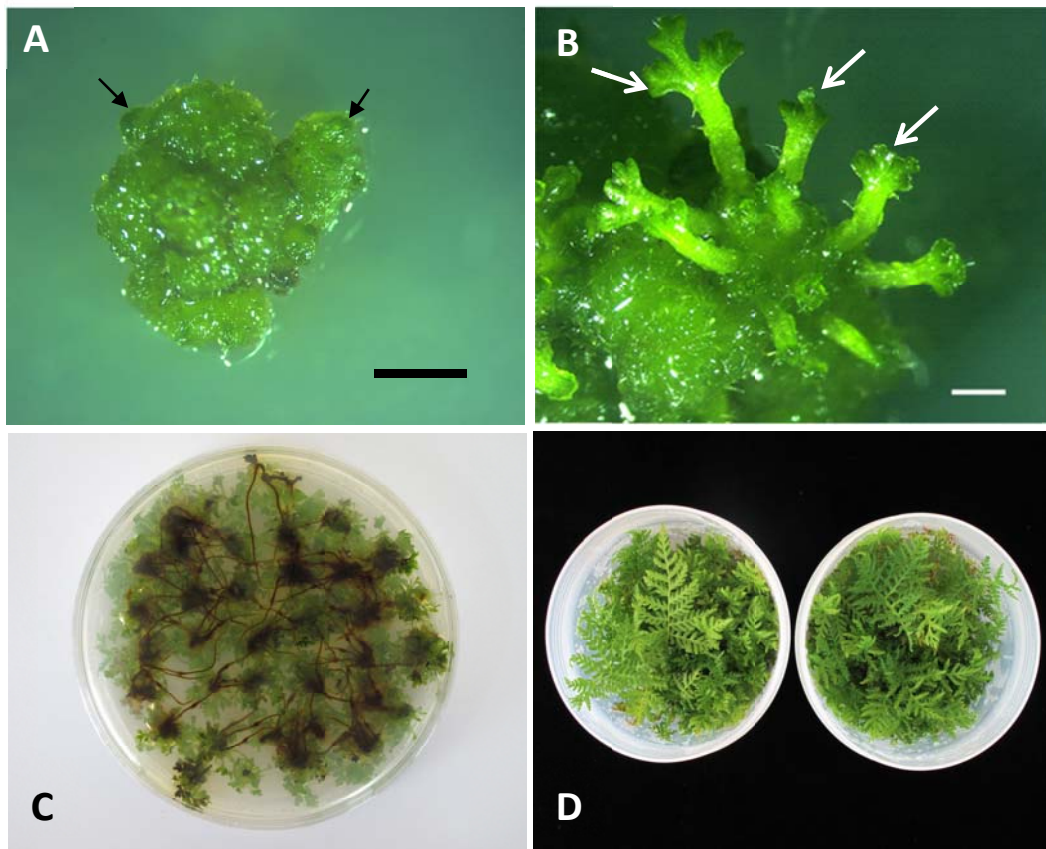


圖4 筆筒樹(*Cythea lepifera* (J. Sm.) Copel.)綠球體再生孢子體過程。(A)繼代培養增生的綠球體團塊開始分化產生孢子體(箭頭)(Bar = 2 mm)；(B)綠球體在基礎培養基生長6 wk後孢子體幼葉生長情形(箭頭) (Bar = 1 mm)；(C)再生的孢子體在添加3%蔗糖之基礎培養基自發性發根(培養皿直徑=9 cm)；(D)綠球體於蘭花育苗培養盒培養6-7個月生長情形(培養盒直徑=9 cm)。

展(圖 4B)。隨培養時間延長而逐漸分化的植物體，在第 3 片羽葉伸展而根莖長度達 0.5 cm 時，不需要進行發根誘導即出現自發性發根(圖 4C)，在本階段培養 6-7 個月時，孢子體即可進行植株健化步驟(圖 4D)。

以不同分解強度處理筆筒樹 GGB 再生孢子體的試驗，觀察到 GGB 在不含 PGR 的培養基中同時也有增殖的現象(圖 5)，經由 GGB 形成孢子體需 12 wk 的時間，但在培養 12 wk 後，因為培養皿中出現數量龐大的孢子體，空間及養分的限制，讓許多孢子體的葉面呈現黃或深褐色(圖 6)，生長情形不佳，小苗亦不適用於後續之健化操作。在未來的研究試驗中，將會以此結果進行接種量的調整，讓小苗的密度在本階段達最佳化，以提供充足且健康的小苗進行健化作業。

IL GGB、SP GGB、QEP GGB 三個處理，在培養 12 wk 後平均每一培養皿接種 0.5 g GGB 分別可產生  $410.1 \pm 12.8$ ,  $1011.1 \pm 38$  及  $2297 \pm 65.1$  個孢子體(圖 6)，QEP GGB 處理雖然在培養初期(接種之前 4 wk)有褐化壞死情形發生，但後續之細胞增生可彌補此一損失，又因為增生之細胞也都具分生組織(頂端生長點)之特性，因此產生最多孢子體。



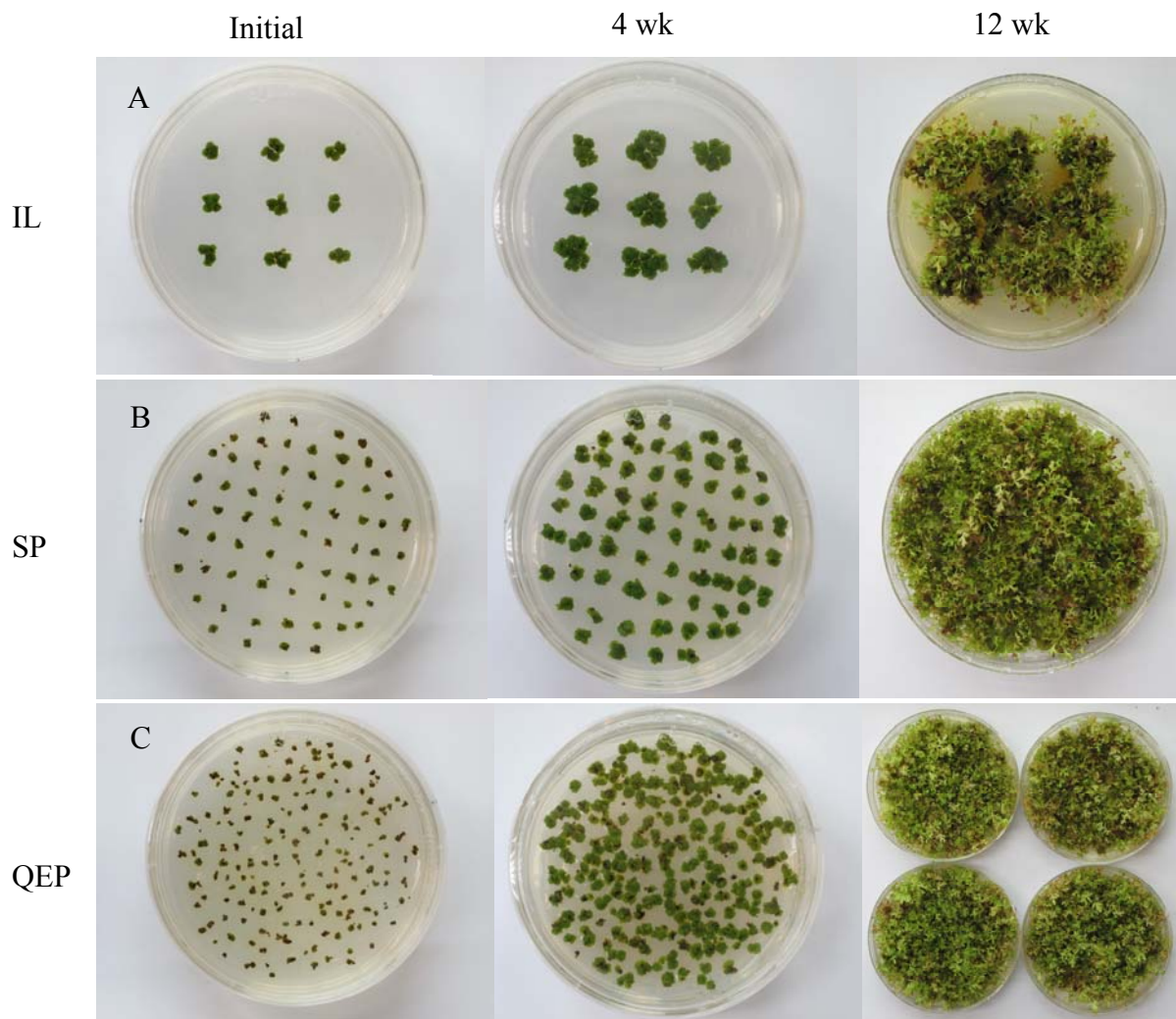


圖5 不同分解強度處理0.5 g接種量之筆筒樹(*Cythea lepifera* (J. Sm.) Copel.)綠球體再生孢子體情形。培養時間及綠球體分解強度：完整綠球體團塊(intact lump, IL)、綠球體顆粒(separated pellet, SP)及四分綠球體顆粒(quarterly excised pellet, QEP)，分別標記於X軸與Y軸(培養皿直徑=9 cm)。

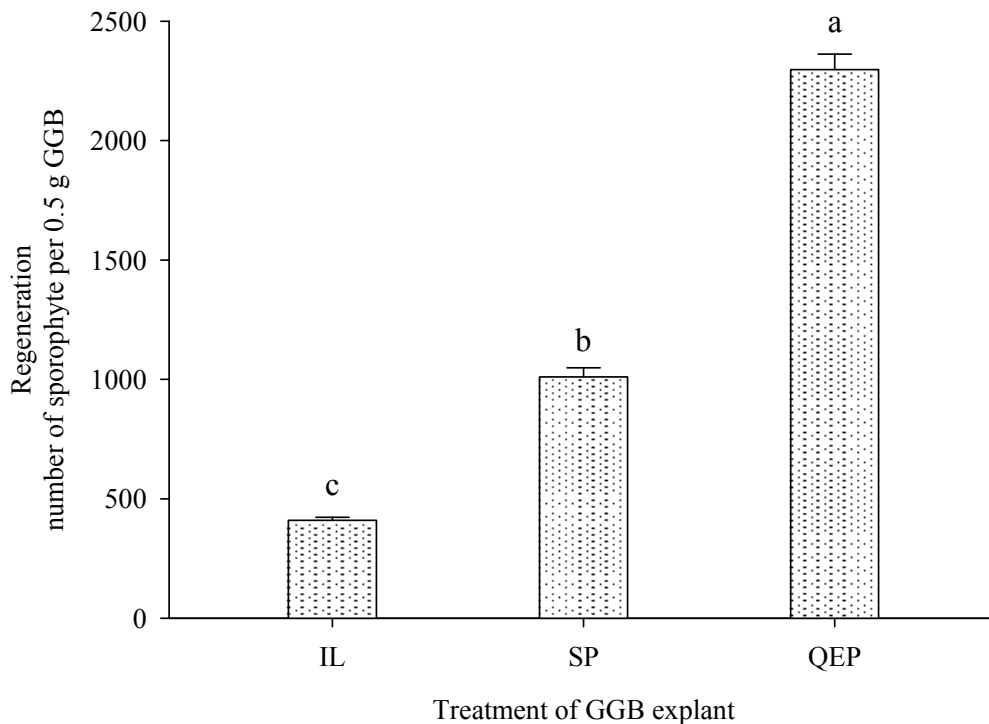


圖 6 不同分解強度處理 0.5 g 接種量之筆筒樹(*Cythea lepifera* (J. Sm.) Copel.) 綠球體再生孢子體。3 種分解強度為：完整綠球體團塊(intact lump, IL)、綠球體顆粒(separated pellet, SP)及四分綠球體顆粒(quarterly excised pellet, QEP)。誤差線為平均值之標準誤差，各平均值上示以不同字母者為經 Scheffe's S 法測驗達顯著差異( $p < 0.05$ )。

#### (IV) 再生孢子體之健化

利用 QEP GGB 處理產生的孢子體再培養 12 wk 後可進行健化，經水苔健化 4 wk 時，小苗的存活率約為 50%，而健化的小苗於混合介質中定植後存活率可達 70% (圖 7)。

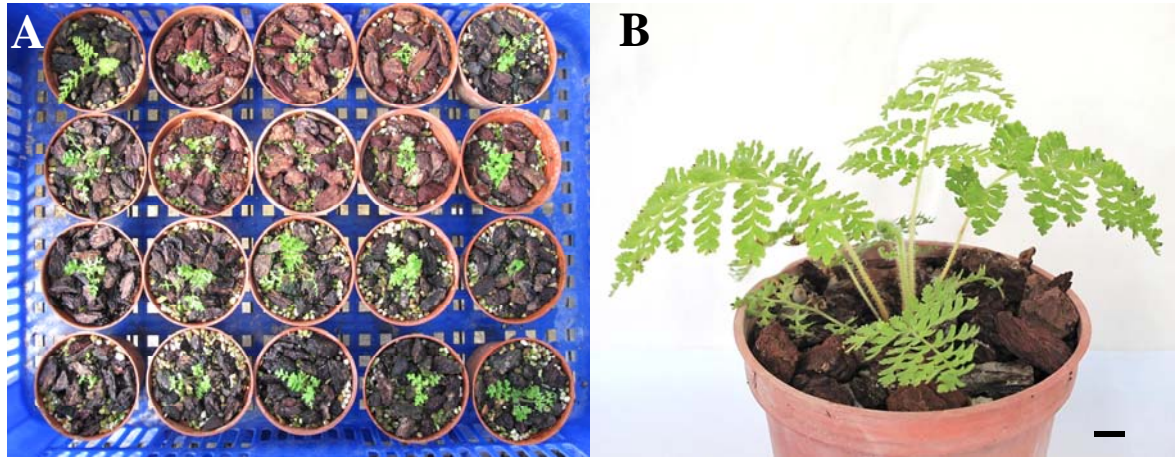


圖 7由綠球體繁殖並完成健化的筆筒樹(*Cyrtia lepifera* (J. Sm.) Copel.)小苗。  
(A)定植於混合介質(蛭石：泥炭土：珍珠石=1:1:2) 4 wk 後的生長情形；  
(B)筆筒樹小苗(出瓶 6 個月)(Bar=1 cm)。

## V、討論

筆筒樹利用 GGB 作為再生孢子體的材料與一般採用孢子的有性繁殖法互相比較，孢子繁殖時藏卵器(archegonium)約在孢子萌發 7 wk 後形成，12 wk 才有第 1 片孢子體幼葉出現(Huang *et al.*, 2000)。但經由已經建立的 GGB 組織再生孢子體，培養 4 wk 後即有孢子體幼葉產生。若以此法產生大量孢子體植株，只需移除培養基中的 PGR 即能達到目的，將 GGB 切碎減少其體積以擴大接觸培養基，是增加孢子體產量的進階手段，相對於孢子繁殖需要調整栽培環境及控制生長條件以達成



授精作用，是較簡便的方法，也確實能縮短繁殖的週期。且 GGB 材料在建立後，可長期繼代維持在隨取隨用之狀態，繁殖工作不受季節及天候影響，利用性也較高。

GGB 的誘導研究中，培植體的種類有多種選擇，須視物種不同而做適當調整，如鹿角蕨(*Platycerium* spp.)多以孢子體幼葉為材料。本研究證實在誘導筆筒樹 GGB 發生時，以切除根及羽葉之孢子體為較佳培植體，其原因可能是因為此培植體具有分生組織，不若羽葉或根系已經分化為特定器官而喪失分生能力，因此經由 PGR 誘導後較易分化而產生 GGB。

Liao and Wu (2011)在二歧鹿角蕨 GGB 繁殖系統中提到，尋求 GGB 增殖條件目的在於找出加速 GGB 組織細胞分裂最快速的 PGR 濃度，在此階段不須產生孢子體，且描述到當 GGB 的團塊若因孢子體再生而佔滿其表面時，此 GGB 會因發育階段的改變而無法再維持增殖狀態。此時 cytokinin 的添加成為關鍵性的條件，在加入 BAP 之後，GGB 持續維持較佳之增殖，且完全抑制孢子體產生。因此在長期繼代培養 GGB 的過程中，腎蕨(Higuchi *et al.*, 1987; Amaki and Higuchi, 1991)、臺灣山蘇花(*Asplenium nidus* L.)(Higuchi and Amaki, 1989)以及箭葉鳳尾蕨(*Pteris ensiformis* Burm. F.)、臺灣山蘇花、密葉鐵線蕨(*Adiantum*

*raddianum* C. Presl)及麗莎蕨(*Rumohra adiantiformis* (G. Forst.) Ching) (Amaki and Higuchi, 1991)等均以添加 BAP 為有效抑制孢子體再生之處理，本研究參照這些試驗基礎，獲得 GGB 長期保持增殖的良好培養條件。

以 3 種不同分解強度(IL GGB、SP GGB、QEP GGB)處理 GGB 的作法，係參考 Bertrand *et al.* (1999)將產生綠球體的 *Polypodium cambricum* 培植體，取 1 g 鮮重將其均質化(homogenization)之後培養，10 個月後，產生 980 棵植株。顯示 GGB 接受均質化的可行性，可承受這種簡單但屬於機械性傷害的處理後，擴大植株的產量。不過本研究嘗試過類似方法，但筆筒樹的 GGB 反應未若預期整反而形成褐化與死亡，因此選擇破壞性較少的切割方式(QEP GGB 處理)，達成大量繁殖的目的(每 0.5 g 鮮重細胞產生  $2297 \pm 65.1$  個孢子體)，證明以類似均質化的手段分解綠球體亦能提高筆筒樹孢子體產量，但是未來尚須測試將接種量最佳化，使接種後的繼代培養，不會在容器中發生擁擠及彼此競爭的現象。

本研究產生的筆筒樹組織培養苗，在健化第一階段使用水苔為培養介質，僅達成 50%的存活率，究其原因為濕度控制不當，導致培養物出現真菌感染死亡。另外健化小植株之根系易與水苔之纖維纏結，在

次一階段移植時形成阻礙，也要於後續試驗中改善，找尋更適合的培養介質。Goller and Rybczyński (1995)在澳大利亞桫欏的研究中，提及使用珍珠石加上 1/2 MS 培養液做為發根之介質，較單純以蒸餾水作為水分來源存活率更高，未來在自然發根與健化試驗上，可以此點為參考，找出提高健化率的方法，讓繁殖系統更加完備。

目前本研究已完成年度計畫目標，利用本文中所介紹之流程，成功繁殖出 50 株以上之筆筒樹幼苗，在溫室中培養(圖 8)。也正積極尋求機會將苗木推廣進入園藝種苗市場，以符合計畫原始目的。為了將繁殖成果供應市場需求，有意願承銷者可聯絡本研究團隊(電話 05-2717471)洽詢。



圖 8 於溫室中培養 6-12 個月之筆筒樹(*Cyrtosperma medeoloides* (J. Sm.) Copel.)組織培養繁殖苗。

## VI、致謝

本研究計畫承蒙農委會林務局保育組補助經費執行，特此申謝。

## VII、參考文獻

- Amaki, W. and H. Higuchi (1991) A possible propagation system of *Nephrolepis*, *Asplenium*, *Pteris*, *Adiantum* and *Rumohra* (Arachnioides) through tissue culture. *Acta Horticulturae* 300: 237-243.
- 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.
- Goller, K. and J. J. Rybczyński (1995) *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br) Domin vegetative propagation. *Acta Societatis Botanicorum Polonuae* 64:13-17.
- Higuchi, H. and W. Amaki (1989) Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. *Scientia Horticulturae* 37: 351-359.
- Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki (1987) *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel. *Scientia Horticulturae* 32: 105-133.
- Liao, Y. K. and Y. H. Wu (2011) *In vitro* propagation of *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. via green globular body initiation. *Botanical Studies* 52: 455-463.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

## VIII、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	副教授
莊琬婷	研究助理	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
盧學甫	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生
王基成	工讀生	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
洪承慧	工讀生	國立嘉義大學森林暨自然資源學系	研究生

---