

論述

蘭嶼產瀕危植物腰果楠之微體繁殖

胡維新^{1,2,5} 廖松淵^{2,5} 張正^{3,4}

【摘要】腰果楠為產於蘭嶼的瀕危植物，本研究利用一年生種子苗的頂芽及含節莖段在 1/2 MS 添加 2.5 mg/L BA 及 0.5 mg/L NAA 兩星期可誘導芽體產生，產生芽體的莖段先在添加 0.5 mg/L BA 及 0.15 mg/L NAA 的 WPM 基礎培養基四至六週，再加入添加 0.5 mg/L BA 及 0.3 mg/L NAA 液體培養基雙層培養六週，可促進芽體抽長，再移至添加 0.5 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 的 WPM 基礎培養基可促進發根，最終移入不含生長調節劑的 WPM 培養基一年，植株長至 5-8 cm 移至瓶外可正常生長，本研究利用微體繁殖作為腰果楠物種保育的途徑之一。

【關鍵詞】微體繁殖、腰果楠、瀕危植物、保育

ReviewIn Vitro Micropropagation of *Dehaasia incrassate* (Jacks) Kosterm. - an Endangered Woody Plant of Orchid IslandWei-Hsin Hu^{1,2,5} Song-Iuan Liaw^{2,5} Chen Chang^{3,4}

【Abstract】*Dehaasia incrassate* (Jacks) Kosterm. (Lauraceae) is an endangered tree species of the Orchid Island, located in the southeast of Taiwan. The shoot tips and nodal segments derived from 1-yr-old seedling were induced for bud sprouting in MS semi-solid medium with macroelements at half strength and supplemented 2.5 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA for 2wk. To shoot elongation explant was cultured for 4-6wk in WPM solid medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.15 mg/L NAA, followed by 6wk in double phase conditions (solid medium with a layer of liquid medium on the top) using the WPM supplemented with 0.5 mg/L BA 及 0.3 mg/L NAA in the liquid phase. Shoot was transfer to WPM solid medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA for rooting. Seedlings followed transfer to plant growth regular free WPM solid medium for 1yr and grew up to 5-8

1.國立自然科學博物館植物學組

Division of Botany, National Museum of Natural Science.

2.國立中興大學生命科學系

Department of Life Sciences, National Chung Hsing University.

3.國立中興大學園藝系

Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

4.通訊作者

Corresponding author, ccyc2002@yahoo.com.tw.

5.作者對本文的貢獻度一致

These authors contributed equally to this work.

cm, then transplant to the greenhouse. The aim of the study was to development micropropagation procedures for this endangered species to facilitate conservation.

【Key words】micropropagation, *Dehaasia incrassata*, endangered plant, conservation.

一、前言

腰果楠 (*Dehaasia incrassata* (Jacks) Kosterm.) 屬於樟科 (Lauraceae) 腰果楠屬的常綠中喬木，天然分佈於台灣、菲律賓、馬來西亞、印尼等地區，在臺灣僅分佈於蘭嶼 (Orchid Is.) 天池附近潮濕的原始森林中 (Liao, 1996)，依據 IUCN 物種保育等級評估標準，在台灣本種植物屬於嚴重瀕臨滅絕 (critically endangered) 物種，族群小而持續下降且狹隘分佈，據估計能繁殖之成熟個體少於 250 株 (呂勝由, 1996)，國外研究報導其葉片富含數種天然生物鹼 (alkaloids) (Said *et al.*, 1991)，果實、樹皮、葉片、根等部位的粹取物具有抑制免疫反應 (immunosuppressive) 和抗炎 (anti-inflammatory) 的效果 (Tanaka *et al.*, 2001)，國內的藥學界曾分離出 8 種生物鹼，12 種雙苄基異奎啉生物鹼 (bisbenzylisoquinoline alkaloids)，引起藥理學領域高度興趣 (Lu *et al.*, 1989；Lee *et al.*, 1996；Sun *et al.*, 1998)，蘭嶼是本種植物的邊際分佈，地理分佈有學術價值，保存此一稀有物種的遺傳資源非常重要。

樟科植物為本省闊葉林重要的組成樹種，但台灣樟科樹種的組織培養研究報導不多，彭 (2005) 利用人工林中樟樹 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl) 不同季節頂梢為材料，試驗取材時間和後續的栽培條件，Huang 等 (1998) 及 Babu 等 (2003) 分別以樟樹兩年生及十二年生芽體和含節莖段建立微體繁殖體系，張淑華等 (2002) 以牛樟 (*Cinnamomum kanehirae* Hay.) 成熟胚、未成熟胚和 8 年生母樹萌蘖之頂芽與側芽建立胚培養和微體繁殖技術；其他的屬如 Mao 等 (2000) 以山胡椒 (*Litsea cubeba* (Lour.) Persoon) 六年生植株為材料，進行組織培養的研究，Chen 與 Wang

(1985) 取台灣檫樹 (*Sassafras randaiense* (Hay.) Rehder) 種子內的胚誘導體胚及植株再生；腰果楠屬在全世界仍未曾見到組織培養相關的研究。

二、材料方法

試驗材料於 2002 年 9 月自蘭嶼天池原始林下，採集母樹成熟後自然落下的種子或剛發芽的幼苗，播植於 5 吋塑膠盆中，栽培於國立自然科學博物館植物園苗圃網室，待其發芽整齊後備用。實驗前先將苗木移入有空調且溼度較低的室內 2-3 天，再取頂芽和 4-5 個含節莖段約 5-7 cm 的幼嫩枝條作為試驗材料，先除去葉片，僅保留一小段葉柄，再以 75%酒精噴灑並擦拭表面，放置 30 秒之後，置入含有 1.2% 次氯酸鈉 250 ml 的三角瓶中，加入 1 滴 Tween 20，於超音波震盪器中消毒 10 分鐘，移入無菌操作台，用無菌水清洗 3 次，以解剖刀切取頂芽及包含一小段葉柄的含節莖段。

本實驗包括 2 種基礎培養基，分別為含 1/2 大量元素和全量微量元素的 MS 培養基 (1/2 MS) (Murashige and Skoog, 1962) 及 WPM 培養基 (Lloyd and McCown, 1981)，均添加 100 mg/L *myo*-inositol 及 20 g/L 的蔗糖，依不同生長階段及目的添加不同種類與濃度的生長調節劑，以 NaOH 和 HCl 調整 pH 值為 5.2 後，1/2 MS 加入 2.8 g/L gelrite (Sigma Co., St. Louis, MO)，WPM 則加入 6 g/L agar (Sigma Co., St. Louis, MO)，再置入 121°C、1 kg/m² 高溫高壓滅菌釜中滅菌 15 分鐘；所有試驗培養條件為 25°C，每日照光/黑暗週期為 16h/8h，人工光源光度 1500 lux。

初代培養將莖節培植體培養在含 1/2 MS 基礎培養基中，添加 2.5 mg/L BA (benzyladenine) 及 0.5 mg/L NAA (α -

naphthaleneacetic acid) ，每試管中分注 9 ml 培養基，含一個培植體，培養兩星期為宜，培養期超過兩星期以上，會產生大量癒合組織，影響芽體誘導的速度，因此初代培養時間不宜過長。

將培養兩星期的培植體移入含 WPM 基礎培養基，並添加 0.5 mg/L BA、0.15 mg/L NAA 和 1 g/L 活性炭 (activated charcoal) ，約 4-6 週芽體開始發育時 (圖 1a) ，再加入 2-3 ml WPM 添加 0.5 mg/L BA、0.3 mg/L NAA 和 1 g/L 活性炭的液體培養基於原培養基上方，形成雙層培養，液體培養基的液面則低於芽體，雙層培養有助於莖抽長。

經雙層培養後的培植體，則移入 WPM 添加 0.5 mg/L BA、0.1 mg/L NAA 和 1 g/L 活性炭

的固體培養基，經兩次繼代，每次繼代間隔約 12 週，部分培植體會開始發根，再將培植體移入 WPM 培養基中，約在 2-4 個月之後可陸續發根，之後將幼苗移入 8 x 16 cm (直徑 x 高) 的廣口瓶中，每半年繼代一次 (圖 1b) 。

約一年後待植株長至 5-8 cm 再移出瓶外，用蛭石：珍珠石：泥碳土 (v:v:v=1:1:1) 為栽培介質，置於光度 800 lux 螢光燈管之人工光源，高溼度噴霧室中 60 天後，再移至 70% 遮光的網室中培養。存活率可達 80%，但是生長非常緩慢 (圖 1c) ，苗高經過一個生長季 (2005 年 5 月至 11 月) ，與出瓶時比較增加不到 1 cm，縱使是種子苗同樣呈現生長緩慢的特性。

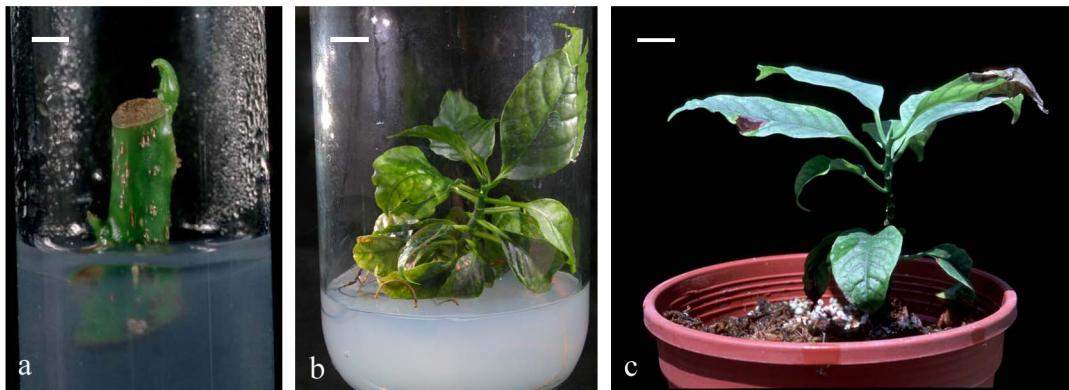


圖 1. 腰果楠的組織培養

Fig. 1. Tissue culture of *Dehaasia incrassata*.

- 抽出新的側芽(bar = 3 mm)
a: Emerging axillary shoot.
- 長根的培植體(bar = 23 mm)
b: Rooting plantlet.
- 在網室中馴化的植株(bar = 19 mm)
c: Acclimated plantlet in greenhouse.

三、結果與討論

腰果楠初代培養莖段切口不平整，會出現培植體褐化及產生癒合組織，這和許多樟科植

物進行微體繁殖初期的情形是一致的 (Chang *et al.*, 2002 ; Kowalski *et al.*, 2001) ，當新芽長出後，如培植體切口癒合良好，不誘導莖抽長，

直接放入 WPM 基礎培養基中，可以維持相當長的時間，培植體在形態上沒有改變，但是如果放置在初代培養基超過兩個星期，癒合組織會大量增殖，速度遠超過新生成芽體的抽長速度，最終芽體被癒合組織包覆，形成只長癒合組織的培植體，當培植體移入相同條件的莖抽長培養基，含有活性碳比不含活性碳減少癒合組織的產生，當 BA 濃度提高到 2-4 mg/L 則產生大量癒合組織，加入液體莖抽長培養基形成雙層培養有助莖抽長，而且葉片會變得較為翠綠，經過此處理的培植體發根率為 84%，Barceló-Muñoz 和 Pliego-Alfara (2003) 指出，加入低濃度的 BA，以固液雙層的方法培養酪梨 (*Persea americana* Mill.) 幼嫩培植體，確實有助於莖的抽長，但時間不宜過長以避免培植體玻璃化 (hyperhydricity)，本研究顯示，雙層培養合適的時間為 6 週，時間過長培植體基部常伴隨產生大量癒合組織。移入發根培養基後可明顯降低癒合組織的產生，但莖的抽長速度明顯降低，再將培植體移入未添加任何生長調節劑的 WPM 培養基，已發根培植體地上及地下部均可正常發育，未發根培植體莖抽長速度較先前繼代培養基快，組培苗出瓶後，置於高濕、低光照的環境下 2 個月，再移到遮光陰棚存活率可達 80% 以上，在蘭嶼天池原生地鬱閉原始林下，腰果楠幼苗必須忍受低光、高濕的環境，等待孔隙出現得以進行更新，因此組織培養苗生長極為緩慢，喜歡高濕、低光的特性幾乎與種子苗一致。

組織培養技術是物種保育非常重要的工具，尤其種子屬於異儲型 (recalcitrant) 的物種 (Martín *et al.*, 1998)，生長非常緩慢的稀有瀕危植物，不需要耗費大量的繼代成本，又可以在無菌、安全的環境下保存這些植物的遺傳資源，腰果楠符合這個特性，由於材料的限制，有關多芽體的誘導，加速生長速率，癒合組織增殖在天然物及藥學研究的應用，仍有待進一步的研究。

四、謝誌

本研究承國立自然科學博物館經費支持，特予致謝。

五、參考文獻

- 呂勝由 (1996) 台灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑 (I)。行政院農業委員會印行。163 頁。
- 彭東輝 (2005) 腦樟組織培養技術研究。福建林學院學報 25:313-317。
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩 (2002) 牛樟之組織培養。台灣林業科學 17:491-501。
- Babu K.N., S. Sajina, D. Minoo, C. Z. John, P. M. Mini, K. V. Tushar, J. Rema and P. N. Ravindran (2003) Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell Tissue Org Cult* 74:179-183.
- Barceló-Muñoz A. And F. Pliego-Alfara (2003) Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). In: Jain S.M. and K. Ishii, editors. Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Academic Pub. p. 519-542.
- Chen M. H. and P. J. Wang (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration on *Sassafras randaiense* (Hay.) Rehder. *Bot Bull Acad Sin* 26: 1-12.
- Huang L. C., B. L. Huang and T. Murashige (1998) A micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:141-146.
- Kowalski B. and J. van Staden (2001) *In vitro* culture of two threatened South African medicinal tree-*Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. *Plant Growth Reg* 34:223-228.
- Lee S. S., C. K. Chen, I. S. Chen and C. H. Chen (1996) Chemical constituents from *Dehaasia triandra*. 1. Three new alkaloids, isocorydione, norisocorydione, and

- dehatriphine, from the leaves. *J Nat Prod* 59:55-58.
- Liao J. C. (1996) Lauraceae. *In* Editorial Committee. *Flora of Taiwan* 2nd ed., vol 2. Taipei: National Taiwan Univ. p. 433-499.
- Lloyd G. B. and B. H. McCown (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proc Internation Plant Propagators Soc* 30: 421-437.
- Lu S. T., I. L. Tsai and S. P. Leou (1989) Alkaloids of *Dehaasia triandra*. *Phytochemistry* 28: 615-620.
- Mao A. A., A. Wetten, M. F. Fay and P. D. S. Caligari (2000) *In vitro* propagation of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon., a multipurpose tree. *Plant Cell Rep* 19:263-267.
- Martín C., J. M. Iriondo, E. González-Benito and C. Pérez (1998) The use of tissue culture techniques in the conservation of plant biodiversity. *Agro-Food Industry Hi-Tech* 9:37-40.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-479.
- Said I. M., A. Latiff, S. L. Partridge and J. D. Phillipson (1991) Alkaloids from *Dehaasia incrassata*. *Planta Medica* 57:389.
- Sun S. W., S. S. Lee, A. C. Wu and C. K. Chen (1998) Determination of bisbenzylisoquinoline alkaloids by high-performance liquid chromatography. *J of Chromatogr A* 799:337-342.
- Tanaka S., S. Yoichi, L. Ao, M. Matumoto, K. Morimoto, N. Akimoto, G. Honda, M. Tabata, T. Oshima, T. Masuda, M. Z. Asmawi, Z. Ismail, S. M. Yusof, L. B. Din and I. M. Said (2001) Potential immunosuppressive and antiinflammatory activities of Malaysian medicinal plants characterized by reduced cell surface expression of cell adhesion molecules. *Phytother Res* 15:681-686.

