

異葉銀合歡之組織培養

潘富俊 張淑華

摘 要

取四倍體及三倍體異葉銀合歡(K 156及K 409×K 156)無菌播種苗的下胚軸，子葉及節作為試驗材料，MS培養基作為基本培養基。由實驗結果顯示，在下胚軸及子葉的培養之中，不論四倍體或三倍體，誘導癒傷組織能力，以2ppm的2,4-D誘導效果最佳。BA的添加，反而會抑制癒傷組織的產生，而在NAA 0.1 ppm+BA 1 ppm時，可促進三倍體異葉銀合歡(K 409×K 156)子葉，不經由癒傷組織而直接形成多芽體。2 ppm的BA最利於四倍體異葉銀合歡(K 156)癒傷組織不定芽的誘導；而三倍體異葉銀合歡(K 409×K 156)，則以BA 3 ppm最有效。NAA的參與，可促進癒傷組織的生長，但抑制器官發生。節段之培養，在BA單獨處理及NAA之參與，都會有癒傷組織的形成，而以NAA的參與，對不定芽的誘導較佳。最適合之組合，在四倍體及三倍體異葉銀合歡均為NAA 0.01 ppm+BA 0.5~1 ppm。

將形成之莖芽，切下移入含0~3 ppm的NAA培養基，都可促進培植體發根，但最適合發根的生長濃度，四倍體及三倍體異葉銀合歡各不相同，NAA濃度分別為2及0.5 ppm。

關鍵詞：異葉銀合歡 (*Leucaena diversifolia*)；四倍體銀合歡；三倍體銀合歡；多芽體；器官形成；小苗 (plantlet)。

潘富俊，張淑華 1987，異葉銀合歡之組織培養，林業試驗所研究報告季刊，2(3)：217—225。

In vitro culture of *Leucaena diversifolia*

Fuh-Jiunn Pan and Shu-Hwa Chang

[SUMMARY]

Callus was induced and plantlets were regenerated by culturing hypocotyls and cotyledons of *Leucaena diversifolia*, both tetraploid (K156) and triploid (K409×K156), on Murashige and Skoog's (MS) media con-

1987年3月送審
1987年7月接受

主審委員：楊政川
王繼洋

taining 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or α -naphthaleneacetic acid (NAA) with 6-benzyladenine (BA). The callus formation was obtained in every explant on MS media with 2 ppm 2,4-D, but inhibited when with BA. Adventitious buds from the cotyledons of triploid (K409×K156) were induced on MS media with 0.1 ppm NAA+1 ppm BA. Organogenesis via calli was also induced with 2 ppm BA for tetraploid (K156) and 3 ppm BA for triploid (K409×K156). The best combination of BA+NAA concentration for organogenesis from callus of nodes was 0.5-1 ppm BA and 0.1 ppm NAA for both tetraploid and triploid *Leucaena diversifolia*.

Media with 0-3 ppm NAA were observed to promote rooting of shoot cuttings. Tetraploids (K156) and triploids (K409×K156) rooted best on the media with 2 ppm and 0.5 ppm, respectively.

Key words: *Leucaena diversifolia*; tetraploid leucaena; triploid leucaena; multishoot; organogenesis; plantlet.

Pan, F.J. and S.H. Chang 1987. In vitro culture of *Leucaena diversifolia*.

Bull Taiwan For. Res. Inst. New Series, 2(3): 217-225.

一、緒 言：

異葉銀合歡學名 *Leucaena diversifolia* (Schlecht.) Benth. 有四倍體 ($n = 52$) 及二倍體 ($n = 26$) 之分 (Pan, 1985)。四倍體之異葉銀合歡，分佈局限於墨西哥東部之 Veracruz 省，1,000 到 2,500 m 海拔之間，為該地區之速生樹種，喬木狀，樹幹通直，樹高可達 15 m 以上。由於原產地是冷涼的氣候，早有專家認為其可能取代巨型銀合歡 (*L. leucocephala*) 而成為日後造林的主要樹種 (Brewbaker and Hutton, 1979)。施文君等 (1986) 的研究結果亦顯示異葉銀合歡在高地及酸性土壤的生長表現遠比銀合歡為佳；非但如此，異葉銀合歡對銀合歡木蝨的耐蟲力，亦遠大於銀合歡 (Sorensson and Brewbaker, 1986；Pan, 1987)，是值得重視的樹種。

二倍體異葉銀合歡，生長緩慢，是屬於灌木型的樹種，但以二倍體異葉銀合歡為母本，四倍體異葉銀合歡為父本的雜交後代 (F_1)，為不孕之三倍

體，植株卻為喬木狀。可能由於無法結實的緣故，生長極為快速 (Brewbaker, 1986, unpublished)。銀合歡在本省造林的重要問題之一，即為該樹種初期生長快速，但花期及結實期亦提早到來而致生長停滯，嚴重地影響木材產量。因此，三倍體銀合歡的推出，可避免嚴重的開花結實問題，亦為解決引進樹種在林地任意蔓延的“引進種污染”問題的重要措施。

一般銀合歡類，包括四倍體異葉銀合歡，雖可以以種子達到大量繁殖的目的，但組織培養之方法，可培育大量遺傳質相同、生長勢旺、耐酸、抗病抗蟲的優良品系或單株，並解決以種子育苗，品質參差不齊的缺失。四倍體異葉銀合歡之生長，單株間差異極大 (施文君等, 1986)；其耐木蝨性狀，也株株不相同。故性狀優良的單株，以無性繁殖方式大量培育，乃值得研究探討。另外，三倍體異葉銀合歡在將來的造林，亦可能扮演重要角色，但其不孕之性質，必須以組織培養或其他無性繁殖技術來繁衍後代。

基於上述原因，本研究在探討藉組織培養法來培育優良性狀之四倍體異葉銀合歡單株及大量繁殖三倍體異葉銀合歡之可行性。

二、前人研究：

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 組織培養的研究，最早始於 Venkateswara 與 Ghandi (1979)，而後陸續有 Peasley 與 Collins (1980)，探討最利於銀合歡癒傷組織生長的培養基。Nagmani 及 Venketeswaran (1983) 培養 K 500 (堪寧漢型銀合歡)，K8 (薩爾瓦多型銀合歡) 可由下胚軸及子葉癒傷組織長出莖芽。直至 Ravishankar 等 (1983)，才首先由 K8 (薩爾瓦多型銀合歡) 的頂芽培養誘導出完整植株。至於異葉銀合歡 (*L. diversifolia*) 的組織培養，則由 Nagmani 及 Venketeswaran (1983)，首先利用四倍體異葉銀合歡 (K 156)，於下胚軸及子葉癒傷組織培養出莖芽。目前尚尚未有三倍體銀合歡類之組織培養報告問世。

三、材料與方法：

(一)材料：將四倍體異葉銀合歡以生產最佳的種源之一，K156為材料，此種源係從夏威夷引進，原產墨西哥 Veracruz 省 1,250m。三倍體異葉銀合歡，則以第一作者在夏威夷大學所作之 K 409 × K 156 雜交後代為材料，母本 K 409 係原產瓜地馬拉靠墨西哥邊境 La Democracia 地區之二倍體異葉銀合歡。兩種異葉銀合歡的種子以 0.5% 的次氯酸鈉在超音波震盪中消毒十分鐘，以無菌水洗三次後，播於修正過的 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基中 (表 1)，取十天大的子葉，下胚軸、根為材料，子葉切成 0.5 × 0.5 cm 大小，下胚軸、根切成每段 0.5 cm 大小；並取一個月大的頂芽，節來培養。培養後，將兩種銀合歡在各種培養形成之莖芽帶兩個節切下，置於發根培養基中誘導發根。

(二)培養基：培養基分為三種，三種均以上述之 MS

表 1：異葉銀合歡組織培養所採用之修正的 MS (Murashige & Skoog, 1962) 培養基

<i>Macroelements</i> : (mg / l)		<i>Organic compounds</i> : (mg / l)	
KNO ₃	1900	Myo-inositol	100
NH ₄ NO ₃	1650	Glycine	2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Nicotinic Acid	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Pyridoxine-HCL	0.5
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine-HCL	0.1
<i>Microelements</i> : (mg / l)		<i>Sucrose</i> : 2 % ,	
Na ₂ · EDTA	37.3	pH value = 5.8	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	w / or w / o 8.5 g / l Bacto-Agar.	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6		
HBO ₃	6.2		
KI	0.83		
AlCl ₃	0.3		
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.3		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025		

培養基作為基本培養基。第一種培養基用於癒傷組織之誘導，採用之生長素，有 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) NAA (α -naphthaleneacetic acid)，濃度為 0.1, 0.5, 1, 2mg / ℓ ，及 NAA 0.1mg / ℓ 組合 BA (6-benzeladenine) 0.1, 0.5, 1, 2mg / ℓ 。第二種器官分化及芽培養之培養基為 NAA 0.1mg / ℓ 與上述濃度之 BA 組合或 BA 0.1, 1, 2, 5, 10mg / ℓ 的單獨處理，第三種誘導發根之生長素為 NAA，濃度為 0.1, 1, 2, 3, 5 mg / ℓ 。

(三) 培養環境：所有的試驗均培養於溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照 8 小時，3,500 LUX 光強的環境中。

四、結果和討論：

表 2：四倍體及三倍體異葉銀合歡 (K156 及 K409 \times 156) 的根，下胚軸、子葉在 MS 培養基添加不同生長素下生長分化情形。

植物生長素	培植體	生長分化情形
NAA (0.1~2mg / ℓ)	根，下胚軸，子葉	根及側根的形成
2,4-D (0.1~2mg / ℓ)	"	癒傷組織的產生
NAA 0.1ppm + BA (0.1 ~ 2 mg / ℓ)	根	無任何生長，分化現象
	下胚軸	BA 1ppm，可同時有莖芽及根產生，其它組合則有少許癒傷組織形成。
	子葉	K409 \times 156，在 BA 1ppm，可由切口直接產生不定芽外，子葉都無任何生長分化。

而在 NAA 0.1mg / ℓ 組合與不同 BA 濃度的情形下培養，對根癒傷組織的誘導不但沒有助益，反而會使根褐死。對下胚軸培養在 NAA 0.1ppm 與 BA 低濃度下，下胚軸會有少許發根現象。在 BA 1ppm 時，下胚軸有同時發根及莖芽的形成 (圖一)；當 BA 為 2ppm 時，則有褐化現象。至於子葉的培養，BA 的參與卻不利於癒傷組織的生長，除了在 NAA 0.1mg / ℓ + BA 1mg / ℓ 可促三倍體異葉銀合歡 (K409 \times 156) 的子葉在切口上直接產生

(一) 種子發芽：

異葉銀合歡種子播種後 2 天即陸續開始發芽。發芽過程中種子會有褐化的現象，褐化後的種子很少會發芽。此情形可由發芽培養基中加入活性炭 (0.3 %) 來改善。四倍體異葉銀合歡 K156 種子褐化率為 2 %，褐化的種子都不發芽，在加入活性炭後褐化情形大為降低均為 0.5 % 左右；而三倍體異葉銀合歡 K409 \times 156 卻無褐化現象，種子 100 % 發芽。

(二) 根、下胚軸、子葉培養：

四倍體和三倍體異葉銀合歡在根，下胚軸及子葉的癒傷組織誘導上的結果相似 (表 2)。在含 NAA 培養基中，兩者根的培養均為側根發生。而在 2,4-D 下培養則所有濃度都可誘導癒傷組織的產生，其中以 2ppm 的 2,4-D 誘導效果最佳。

不定芽外，其他的 NAA 及 BA 組合在四倍體及三倍體異葉銀合歡的子葉，培養二個月後子葉都有褐死現象。初形成之根段癒傷組織為棕色團狀，但繼續培養三個月後，則有緻密的綠色癒傷組織產生。在一個半月後，將棕色之癒傷組織移入分化培養基中培養，不見任何器官發生，至於綠色之癒傷組織是否具分化能力則有待進一步實驗證實。根部培養時的各種變化見圖二。下胚軸培養後培養體會膨大，尤其是兩切口，下胚軸膨大後，先由切口長出

癒傷組織，進而整個培植體都有癒傷組織的產生，但仍以切口為多。下胚軸之癒傷組織為白色具絨毛狀，將之移入分化培養基，在BA 2~3 ppm時會有不定芽的形成(圖3)，下胚軸培養的各種分化型式見圖3。子葉的癒傷組織則為綠色緻密狀，於切口處產生。把癒傷組織移入分化培養基中，只可觀察到癒傷組織的生長而沒有器官的分化，各種子葉培養情形見圖4。

Nagmani 與 Venketeswaran (1983) 對銀合歡 K500、K8 及 K156 下胚軸及子葉的培養，顯示 NAA 及 2,4-D (0.5 - 10mg/l) 都可促進癒傷組織生長，但本試驗結果卻是 2,4-D 促癒傷組織生長效果遠大於 NAA。而癒傷組織培養於 2 ppm

BA 下可誘 K500 及 K8 癒傷組織的分化，對 K156 癒傷組織分化情形卻無作用，此與我們培養 K409 × 156 (三倍體異葉銀合歡) 及 K156 癒傷組織時情形相似。這兩個實驗結果有不同的地方，可能是所用的基本培養基不同所致。

(三) 頂芽及節培養：

四倍體異葉銀合歡 (K156) 的頂芽及節培養的結果見表3及圖6。一個節所平均產生的芽數以 NAA 0.1 ppm + BA 0.5 ~ 1 所產生的 1.2 ~ 1.1 個芽較多，而 BA 2 ~ 5 ppm 單獨處理形成之 1.0 ~ 0.8 個次之。芽的發生型式在含有 NAA 下培養，不定芽由癒傷組織分化而來圖5，而 BA 單獨處理則多由腋芽上誘導出多芽體，並不經由癒傷組織(圖7)，在

表 3：不同生長素組合對四倍體異葉銀合歡 (K156) 頂芽及節培養之影響

濃度 (mg/l)		培養節數	產生總芽數	平均每節產生芽體數	褐化芽數	芽體分化型式 (%)	
NAA	BA					經由癒傷組織	直接產生多芽體
0.1	0.5	26	31	1.2	5	100	0
0.1	1	24	23	1.1	3	92	8
0.1	2	27	8	0.3	3	93	7
0	1	25	25	1.0	2	38	62
0	2	25	23	0.9	3	80	20
0	5	26	21	0.8	2	81	19
0	10	23	10	0.4	10	91	9

表 4：不同生長素組合，對三倍體異葉銀合歡 (K409 × 156) 頂芽及節培養的影響

濃度(mg/l)		培養節數	產生總芽數	平均每節產生芽數	褐化芽數	芽分化型式 (%)	
NAA	BA					經由癒傷組織	直接形成多芽體
0.1	0.5	20	26	1.3	1	95	5
0.1	1	21	33	1.6	1	90	10
0.1	2	23	50	2.2	0	91	9
0	1	17	7	0.4	1	53	47
0	2	27	40	1.5	3	33	66
0	5	20	14	0.7	1	30	70
0	10	20	12	0.6	1	15	85

BA2ppm 下，一個節最多可見有 5 個芽體形成。

三倍體異葉銀合歡 (K409 × K156) 頂芽及節培養情形與四倍體都差不多 (表 4)，其每個芽體形成在高濃度 BA (2ppm ~ 10ppm) 單獨處理多為多芽體發生型式，其餘生長素組合則為經由癒傷組織再產生不定芽。節所產生之多芽數以含有 NAA 的較多，其中又以 NAA0.1ppm + BA2ppm 所產生之多芽體較多。

培植體褐化而導致成活率降低，在木本植物的組織培養，如咖啡 (Monaco *et al.* 1977)，柚木 (Gupta *et al.* 1980)，海棗 (Sharma *et al.* 1980) 常可見到。本研究所用之三倍體 (K409 × K156) 和四倍體 (K156) 異葉銀合歡之節培養中，雖然只有少數之節，芽會褐化死亡，大多數褐化之節，芽仍能繼續生長分化出莖芽，但褐化程度愈高，莖芽數及莖芽生長情形愈差。今後應加強研究以降低褐化率，如培養基中添加 PVP (Loomis, Battaile 1966)，Polyclar AT (Gupta *et al.* 1980)，活性炭、ABA (Ravishankar, *et al.* 1983) 或改變培養型式，以液體培養代替固體培養來降低節褐化情形，提高成活率 (Sharma *et al.* 1980)。

除了三倍體異葉銀合歡由於無法以種子來繁殖，而期利用組織培養達繁殖外，其它銀合歡多半以培育具特殊優良性狀單株為主。所以在銀合歡組織培養研究上，對於頂芽及腋芽培養，以直接誘導多芽體的形成，而避免經由癒傷組織之研究，相當重要，乃因經由癒傷組織來誘導不定芽產生較易導致染色體的變異 (Shimada, 1971; Heinz & Mee, 1971)，依此頂芽及節的培養雖可在 BA 2 ppm 培養下，直接產生 5 個芽，但此濃度下仍有 20 % 的節會有癒傷組織的產生，而且形成的芽數依平均產生 1.0 個芽而言，結果仍不甚令人滿意，以後宜改進培養方式，以液體方式 (Sharma *et al.* 1980) 或培養基中添加 PG (Jones, 1976) 及調整生長素濃度來增加多芽數。

(四) 根的誘導：

由癒傷組織培養之結果，得知 2, 4-D 可誘導培植體 (根，下胚軸，子葉及節) 形成癒傷組織，而 NAA 則可促培植體發根。所以以 NAA 作為誘導發根之培養基。將兩種銀合歡由癒傷組織或形成之莖芽切下移入發根培養基，培養 10 天後，在 NAA 濃度由 0 ~ 3ppm 都可促進培植體發根。但最適合發根的 NAA 濃度，四倍體及三倍體異葉銀合歡 (K156 及 K409 × 156) 分別為 2 及 0.5 ppm (圖 8)。

本試驗以組織培養方法可使四倍體異葉銀合歡 (K156) 經由下胚軸、頂芽及節產生完整植株；而使三倍體異葉銀合歡 (K409 × K156) 經由下胚軸、子葉、頂芽及節誘導出完整植株。經由此項研究，可建立銀合歡組織培養之模式，以作為日後優良成熟植株微體繁殖之基礎。

引用文獻：

施文君，胡大維，潘富俊 1986. 耐寒及抗酸性銀合歡種類五年之生長比較，林試所研究報告季刊，1(1)：9-14.

Brewbaker, J.L. and E.M. Hutton. 1979. *Leucaena: versatile tropical tree legume*. In "New Agricultural Crops". Westview Press, Boulder, Colo. pp. 207-259.

Glovak, L. and W. Greatbatch. 1982. Successful tissue culture of *Leucaena*. *Leucaena Res. Rept.* 3: 81.

Gupta, P.K., A.L. Nadgir, A.F. Mascarenhas and V. Jagannathan. 1980. Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 17: 259-268.

Jones, O.P. 1976. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature* 262: 392-393.

Heinz, D.J.G. and W.P. Mee. 1971. Morpho-

- logic, cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones, derived from callus tissue. *Am. J. Botany*. 58 : 257-262.
- Loomis, W.D. and J. Battaile. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.* 5 : 423-438.
- Monaco, L.C., M.R. Sondahl, A. Carvalho, O. J. Crocomo and W.R. Sharp. 1977. Application of tissue culture in the improvement of coffee. In J. Reinert and Y.P.S. Bajaj eds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag. pp. 108-129.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Nagmani, R. and S. Venketeswaran. 1983. In vitro culture of Hypocotyl and cotyledon segments of *Leucaena*. *Leucaena Res. Rept.* 4 : 88-89.
- Pan, F.J. 1985. Polyploidy in *Leucaena diversifolia*. *Leucaena Res. Rept.* 5 : 88-90.
- Pan, F.J. 1987. Psyllid resistance of *Leucaena* species in Taiwan. In "Proceedings of a Workshop on Biological and Genetic Control Strategies for the *Leucaena* Psyllid". A special ed. of "Leucaena Res. Rept." Vol. 7(2): 35-38.
- Peasley, E.L. and G.B. Collins. 1980. Development of an *in vitro* culture system for *Leucaena*. *Leucaena Newsletter*. 1 : 54.
- Ravishankar, G.A., A. Wali and S. Grewal. 1983. Plantlet formation through tissue culture of *Leucaena leucocephala*. *Leucaena Res. Rept.* 4 : 37.
- Sharma, D.R., R. Kumari and J.B. Chowdhury. 1980. In vitro culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissue. *Euphytica*. 29 : 169-174.
- Shimada, T. 1971. Chromosome constitution of tobacco and wheat callus cells. *J. Genet.* 46 : 235-241.
- Sorensson, C.T. and J.L. Brewbaker. 1986. Resistance of *Leucaena* species and hybrids. *Leucaena Res. Rept.* 7 : 13-15.
- Venkateswaran, S. and V. Ghandi. 1979. Mass propagation of two selected tree genera for biomass production *in vitro*. *Proceedings of 32nd meeting Tissue Culture Association, Washington D.C.* p. 118.

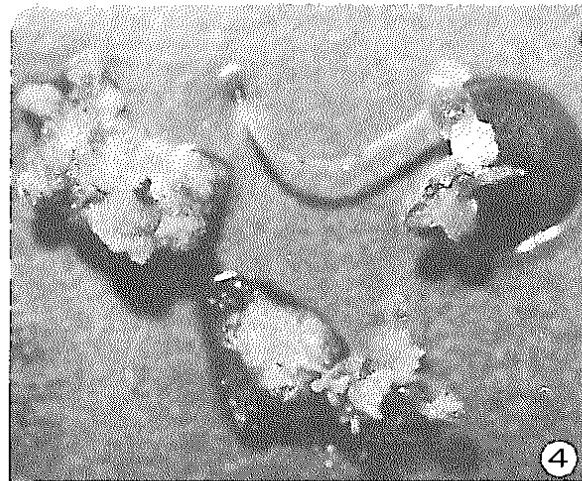
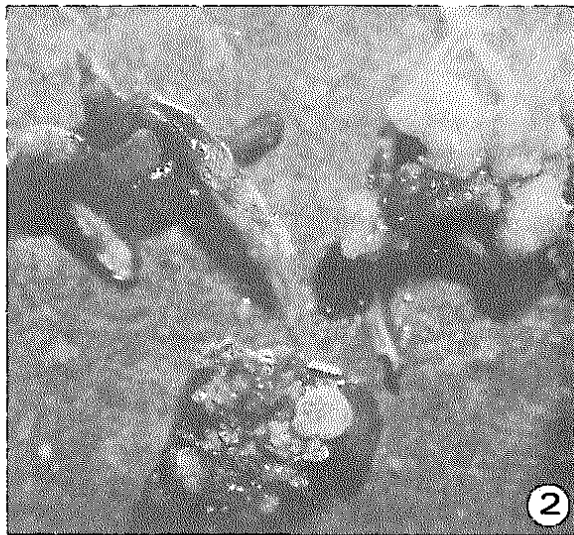
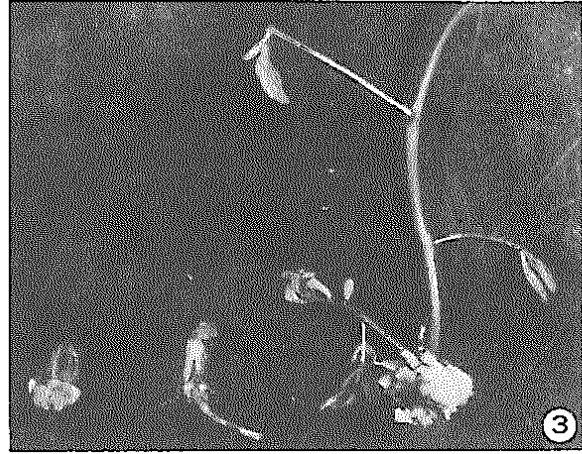
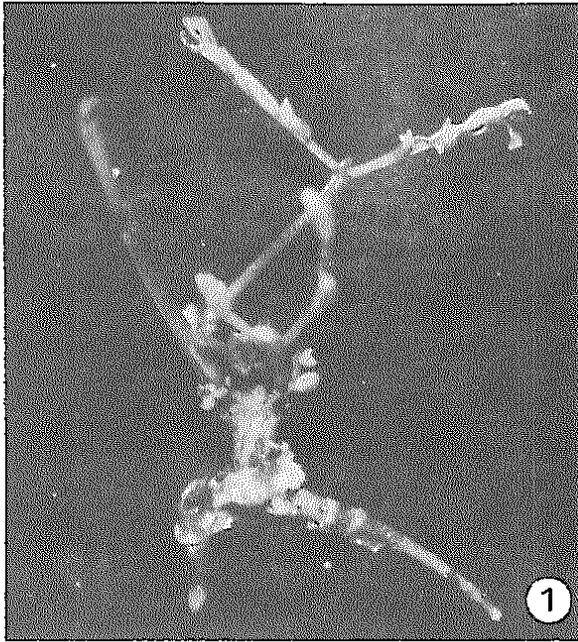


圖 1 異葉銀合歡下胚軸培養於NAA 0.1 ppm + BA1 ppm 的MS 培養基下，同時有不定芽及根的產生。

圖 2 異葉銀合歡根培養的各種形態發生

圖 3 異葉銀合歡下胚軸培養的各種形態發生

圖 4 異葉銀合歡子葉培養的各種形態發生

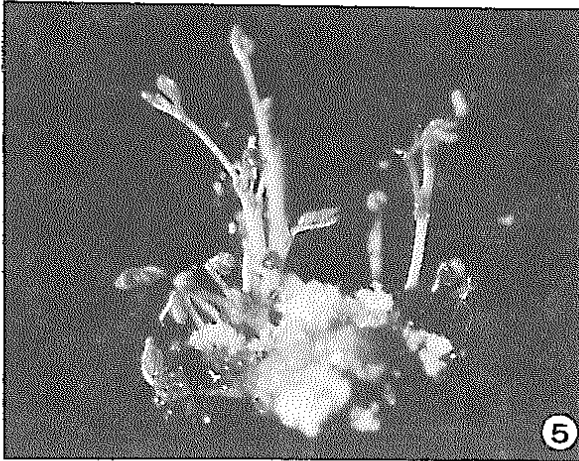


圖5 異葉銀合歡的節培養，經由癒傷組織產生不定芽。

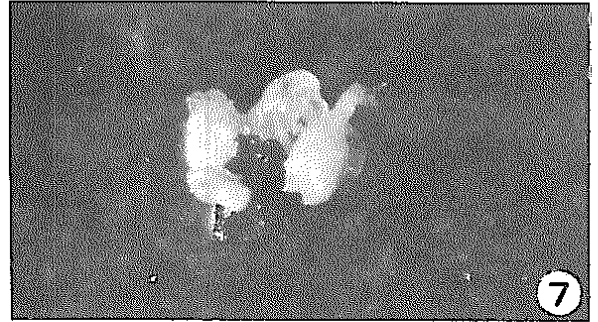


圖7 異葉銀合歡的節培養在BA2 ppm 的MS 培養基中，誘導出5個多芽體情形。

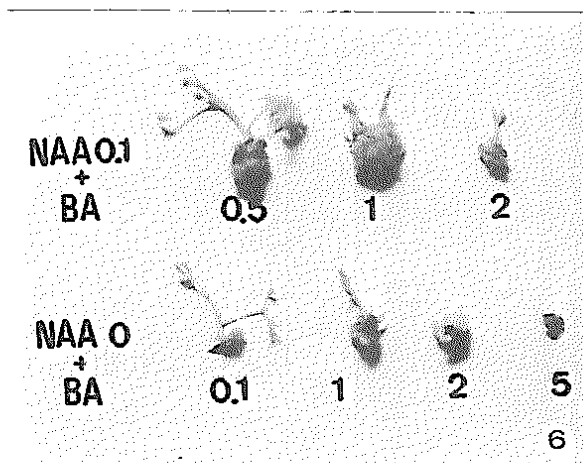


圖6 異葉銀合歡K156 在不同生長素濃度組合下，生長分化情形。



圖8 由組織培養，育出之完整之四倍體異葉銀合歡小苗。