蘆筍組織培養應用於微體繁殖研究之進展

Recent Developments in Micro-propagation of Asparagus (Asparagus officinalis L.)

許 圳 塗

by

Chou-tou Shii

摘 要

蘆筍循經採種建立優良品種之營養系或全雄系，爲發展臺灣蘆筍產業之要務，其先決條件爲研究一有效而可行之加速繁殖方法。植物組織培養由基礎研究進而發展到農業上多方面之應用，其中以微體繁殖爲最成功。本文特介紹蘆筍莖頂培養及側芽培養，以供蘆筍選種及加速繁殖之參考，並對影響蘆筍不定根及多數芽體誘發因子，決定育苗成活率等有關問題逐一加以討論。至如推廣應用，對育成的植株在田間之生長勢，產量及品質仍待作進一步觀察與評價。

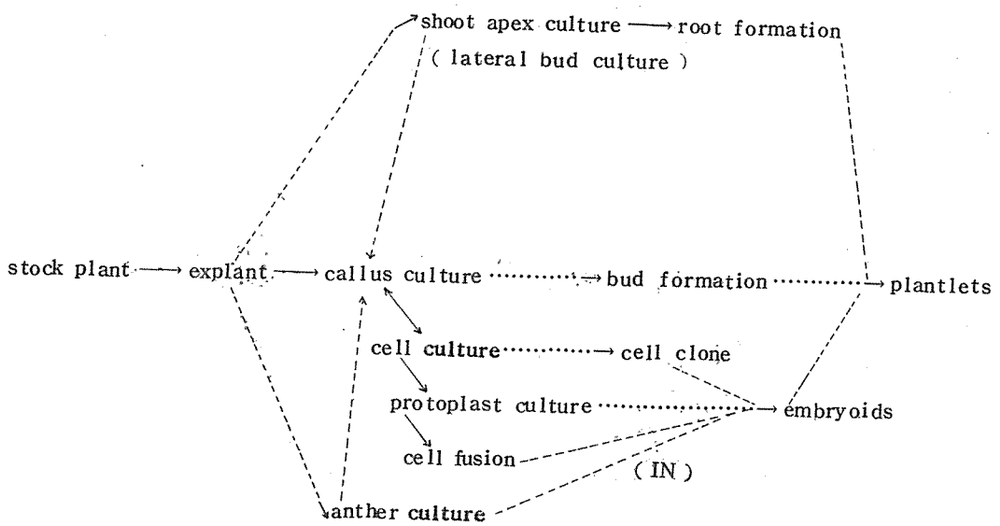
蘆筍組織培養應用研究之目的

蘆筍爲雌雄異株多年生宿根性作物，Currence（1938） 指出蘆筍雄株嫩莖產量比雌株爲高，此產量與性別遺傳間之關係已被確認。同一品種性別內植株間生產力變異亦甚大（Ellison 及 Scheer 1959；Takatori et al 1968 ），爲達增產及改進品質之目的，淘汰低產量之個體，選拔優良品系成爲蘆筍採種之一重要步驟（洪 1970）。配合選種及栽培之推廣，乃有待建立一有效之無性繁殖法。優良品系之增殖及性別控制雖可採用分株法，唯其增殖速率有限。Tincker（1938）曾進行蘆筍扦插繁殖試驗，以生長素 IAA，NAA 處理，發現並不能促進發根，其結論說蘆筍莖內並無任何適合的組織對該等生長素發生反應。近年組織培養之研究，無論在基礎學術上或農業應用的發展，皆具有突破性的成就，例如有些傳統繁殖法所未能克服的困難，採用組織培養之微體繁殖法（micropropagation）則可獲得解決。

蘆筍組織培養應用於微體繁殖之方法，依高等植物再生的生理（馬 1973 ）可分爲兩種；一、不定根的誘發——利用莖梢莖頂當培植體（ explants），於人爲調配的培養基上誘發不定根。蘆筍原被認爲難發根之作物，現於控制的環境下可促使發根育成獨立之個體（表一） 二、不定芽的誘發——利用有限的植物材料誘長不定芽或擬胚（ embryoids）之形成（圖一），大量增殖以建立營養系及全雄系。其途徑有下列數種：㈠癒合組織培養（ callus culture）：切取蘆筍幼嫩組織或器官當培植體，促使逆分化（ dedifferentiation）爲薄壁細胞羣 體之癒合組織，然後再分化（ redifferentiation）形成許多不定芽（ Takatori, Murashige and Stillman 1968, Yakuma 1971）。㈡細胞培養（ cell culture）：癒合組織在液體培養基下經振盪分離爲游離的細胞懸着液，單細胞再分裂分化爲擬胚，發育成小植株（ Wilmar and Hellendoorn 1968, Steward and Mapes 1971, Duc1973）。細胞培養進一步可利用酵素解離細胞壁成爲原生質體（ protoplast），兩裸體細胞相互融合，再分化長成雜交個體，此體細胞雜交（ Somatic hybridization）方法將成爲作物育種之新途徑。㈢花藥培養（ anther culture）：植物細胞之全

本文原載於中國園藝第二十卷第五期

能性（ totipotency ）除了體細胞外，性細胞（ sex cell）亦具有此本能。取適當發育期的花粉在培養基上能直接發育爲單倍體的擬胚，或轉化爲單倍體之癒合組織再分化長出小植株。藉此人爲孤雄生殖（ androgenesis）研究應用於蘆筍全雄株之育成已特別受重視（ Yakuwa et al 1972， Hondelmann and Wilberg 1973， Melle 1973）。



圖一 蘆筍組織培養應用於微體繁殖之步驟

Fig. 1. Micropropagation procedures for *Asparagus officinalis* L.

莖頂培養與加速繁殖之利用

植物之莖頂（ shoot apex ）爲種胚之延伸，其具有發育自主性（ autonomy），由此衍生芽葉及花等器官原體而構成莖梢系統。切取枝梢頂部進行體外培養，除供生長分化發根及開花等基礎研究外，在栽培上則應用於無病毒植株（ virus-free ）之育成及加速繁殖（ rapid propagation）等。病毒在植物體內分佈濃度並不均一，依報告未特化的分生組織感染病毒的機會較少，故從莖頂培養可獲得無病株，此在園藝作物實用的例子可說不勝枚舉（ Jones and Vine 1968， Adams 1972，王1973）。植物組織培養再生作用與組織之分生能力有關，莖頂爲初級分生組織之器官，Morel（1964）發現蘭花莖頂培養可誘長大量的小植株，莖頂培養因而被應用於作物之加速繁殖。

莖頂培養之再生作用或無病株獲得之可靠性往往取決於培植體（ explants）之性質，一般報告對莖頂培養稱法不一， Baker and Smith（1967）依培植體大小爲標準將之區分爲；㈠頂梢扦插培養（ tip cutting culture）：培植體長 2.25 至 0.63cm。㈡生長點培養（ growing point culture ）：培植體爲 0.63 至 0.05cm。㈢頂分生組織培養（ meristem tip culture ）：莖頂小於 0.05cm 。純以大小來衡量，不同種植物材料或發育時期在該等級內培植體性質常會差異很大，若從解剖形態（ Cutter 1965 ）觀點來區分應較爲明確；(1)頂分生組織培養（ apical meristem culture ）：培植體爲取自莖最尖端，而至葉原體上方圓錐體（ apical dome）之分生組織。(2)莖頂培養（ shoot apex culture）：培植體包含頂分生組織，次頂分生組織（ subapical meristem）及葉原體等部分。(3)莖梢培養（ shoot tip culture）：比莖頂爲大附有特化的輸導組織及成熟莖部。

由一分生組織培養增殖育成的族羣稱之分生營養系（ mericlone ）。取頂分生組織培養其獲得無病株

的機會較大，唯培植體愈小操作愈不容易，培養條件要求愈嚴格。加速繁殖適於採用莖頂或莖梢培養，其再生作用分爲兩種方式：培植體逆分化爲癒合組織，再分化長出許多不定芽，如菊花（ Ben-Jaucov and Langhans 1972）蘭花（ Morel 1964）等。另一類爲莖頂直接發生多數的芽，從葉原體的葉腋間形成芽原體，同時發育長出芽羣，如蘆筍（ Murashige, et at 1972 ）、菊花（王 1974 ），及非洲菊（ Murashige, Serpa and Jones 1974）。

植物組織培養用於加速繁殖培植體之選擇，幼嫩之莖節亦爲理想材料，尤其是單子葉植物靠節之位置含有節間生長組織（ intercalary meristem ），再生作用強，適於誘發不定芽。例如香蕉幼莖去頂（ decapitation ），從小於一公分的培植體由葉腋間長出不定芽羣，平均可育成27個小植株（馬及許 1972 ,1974 ）。Yang 及 Clore（ 1973 ,1974a）進行蘆筍單節莖（ one bud segment ）培養，亦可有效地達到加速繁殖之目的。百合單節莖培養可誘長許多之珠芽（ bulbil），其和蘆筍不同之處爲原未具芽體（作者等未發表之研究資料 ）。

影響蘆筍發根因子之探討

以前蘆筍被認爲難發根作物，實因試驗取材不當及對不定根誘發條件尚未充分瞭解使然。蘆筍組織培養依作者（ 1970）觀察，從不定根源生的組織性質將之分成不同類型，(1)培植體不定根；由培植體如莖梢莖頂之基部直接形成不定根，欲育成獨立個體則有待此種不定根之形成。(2)癒合組織不定根；爲培植體逆分化轉爲癒合組織，由該組織長出不定根，其數目往往可達數百，但是與植株間並沒有直接連繫。(3)由擬胚直接長出的胚根，或誘發不定芽後由小植株基部長出不定根。蘆筍莖梢基部易大量產生癒合組織不定根，對育成完整的植株却無作用，如何促使培植體直接長出不定根，可說是蘆筍組織培養發展最高藝術之表現。

一、auxin 與蘆筍不定根誘發之關係：

Loo（1945）切取幼苗頂梢 5-10mm 培養於簡單無機鹽及蔗糖培養液內，發現頂梢可繼代培養（ subculture），但在連續切取移植培養過程中很少出現不定根。Galston（1948）在同一種培養基內添加 IAA 促進不定根形成，移植到不含生長素培養基有利於不定根及芽的生長。NAA及 IBA促進不定根分化效果比 IAA 爲佳，同時於照光條件下亦能誘發不定根（ Gorter 1965）。蘆筍不定根之分化顯然須要生長素，由不定根的分化到生長具有程階效應（ sequential effect ），添加於培養基內之生長素，誘發不定根最有效濃度對不定根伸長却發生抑制作用，欲使不定根正常生長須繼代培養，除去生長素或降低其濃度。

二、培植體性質對 auxin 之感應：

蘆筍組織培養取自嫩莖的側芽，單節芽或新梢等當培植體以誘發不定根，Gorter （1965）指出幼苗之頂梢培養，較小之培植體易形成癒合組織及不定根，較長的培植體，雖提高生長素濃度，亦無效果。培植體的成熟度及大小對生長素反應差異很大，愈長的莖梢則要求較高濃度生長素，如 4cm長的莖梢培養 NAA適當濃度爲 5ppm（Andreassen and Ellison 1967）。而 0.15mm左右的莖頂培養在 0.3 ppm NAA 便可促使不定根的形成（ Hasegawa, Murashige and Takatori 1973）。較高濃度生長素（ 2-5ppm ）對培植體易產生副作用，如大量形成癒合組織，癒合組織不定根及頂芽壞死等現象，此說明了莖梢培養不易獲得成功之一原因。Yang 及 Clore（1973）採用側芽培養所長出的新梢長約 15cm ，帶有 10-20個芽、分成頂端中段及基部，分別切取單芽莖節當培植體，發現從基段採集的培植體，發根能力及長出新梢數目最爲良好，其生長素適當濃度爲 0.1ppm。欲使不定根形成正常，須使用低濃度之生長素，而培植體選擇以莖頂或新梢之側芽爲理想材料。

三、有機物質對不定根形成下之影響：

植物生長調節物質 Kinetin 對不定根誘發並沒促進作用（ Andreassen 1967 ），Yang及 Clore（ 1974）報告 Kinetin 在 0.1ppm對不定根形成便有抑制作用。低濃度 Kinetin 可提高根的生長，可能由於促進莖梢生長而有利於不定根之形成。Thiamine, Pyridoxin, Nicotinic acid 及 malt extract 等在適當濃度下有助於不定根分化，增加不定根數目，而其效果必須與生長素共同作用下才能表現。蔗糖爲重要碳源，缺少時不定根不能形成。半固體培養基要比液體培養基爲優，洋菜量多時會減少不定根數目，量太低又不足承當支持作用，適當之濃度爲 0.6%（Murashige et al 1972 ）。此與香蕉幼莖切頂培養之結果相似，當降低洋菜濃度至 0.5 %不定芽迅速萌長並長出許多不定根。蘆筍由莖梢培養演進爲莖頂培養，培養基之配方亦隨之改進，以利由培植體形成不定根及發育爲健全之植株（表一）。

表一 蘆筍組織培養採用於誘發不定根之培養基。

Table 1. The media that have been used in growing shoot tip culture of *Asparagus officinalis* L.

Chemical compound	Loo (1945)	Galston (1948)	Gorter (1965)	Andreassen (1967)	Murashige (1972)	Yang (1974)
salts	L.[1]	L.	L.	MS[2]	MS	MS
thiamine(mg/ℓ)	0.1	—	—	0.1	1.0	0.1
pyridoxin	0.1	—	—	0.5	5:0	0.5
nicotinic acid	—	—	—	0.5	5.0	0.5
inositol	—	—	—	100	100	100
glycine	—	—	—	2	—	2
malt extract	—	—	—	—	500	—
IAA	—	1r/cc	(2.0)	—	—	—
IBA	—	—	1.0-5	(10)	—	—
NAA	—	—	0.1-2	5	0.3	0.1
kinetin	—	—	—	0.1 -1.0	0.1	0.1
adenine sulfate	—	—	—	—	40	—
sucrose(g/ℓ)	20	20	20	30	25	30
agar(g/ℓ)	—	10	20	10	6	7

1）L : Loo medium 1945.

2）MS : Murashige and Skoog medium 1962.

四、培養環境與不定根形成之關係：

光線：Galston（1948）及 Gorter（1965） 均報告蘆筍幼苗頂梢培養形成不定根只限於暗處處理，但白化或綠化頂梢在暗處連續繼代培養則會失去發根能力。 IAA 在照光下對不定根形成無效，依分析，照光與暗處下，組織之吸收量無大差異。成年植株莖梢培養 IBA 處理，暗處或照光下皆能長不定根，暗處比照光稍爲良好（ Andreassen and Ellison 1967）。莖頂培養（ Hasegawa , Murashige and Takatori 1973)照光及黑暗處理同樣可誘發不定根，但照光可提高新梢數目與發育，並增加不定根數目。理想的光

度爲1、000lux，強光10,000lux則抑制不定根形成。以上兩種光線效應，各方面研究結果未臻一致，不過莖梢培養與莖頂培養不定根形成的性質不相同。光線能抑制培植體產生癒合組織是爲事實。

溫度：溫度高低影響及不定根分化，Gorter(1965)指出蘆筍莖梢培養溫度低於15° C，則沒有癒合組織形成及不定根分化，20°C 時有20%培植體長不定根，提高至25°C則有45%發根率。變溫對不定根分化之關係是一件很有趣問題，一般言之變溫有利蘆筍生長，但Hasegawa 等氏(1973)發現莖頂培養以27°C 恒溫最適宜，變溫反而不利於不定根之分化，若日夜溫差以5°C上則會減少不定根數目。

小植株健化處理與移植成活率

組織培養固可應用於加速繁殖，但完成了再生作用未必就算達到實用之目的，小植株同時具有正常的根芽器官，移植到室外栽培成活率爲一重要問題。從許多莖梢培養共同遭遇到的困擾，爲育成的小植株由無菌環境改變爲田間栽培不易成活，植株本身不夠健全加上環境之變化更難以適應。Muller 等氏(1973)指出分生組織培養育成的小植株，移植到土壤很少獲得成活，經解剖觀察顯示組織結構不正常。

前文指出不定根與莖之分化，生長具有程階效應，在固定的單一培養條件(包括培養基及環境條件)很難滿足器官發育的程階需要，以生長素而言，是爲不定根分化必要物質，但該濃度對根芽生長却反而不利。莖梢培養難獲得很高之成活率，由癒合組織形成不定根爲主要原因，同時癒合組織產生的器官易引起染色體多倍體化(Malassy 及Ellison 1970)，成爲無性繁殖一大困擾。欲避免此等問題產生，應從培植體的選擇，以及培養基及培養環境之改進着手，例如新近研究之莖頂培養及單節莖芽培養方法已促使蘆筍組織培養趨於實用境界。Hasegawa 等氏(1973)莖頂培養解剖觀察發現莖頂葉原體長成鱗葉並形成腋芽，不定根長自基部組織內，由腋芽產生多數嫩莖，確保染色體的穩定性且提高成活率，同時加速增殖個體效率，依其保守估計，從一植株的莖頂培養，以六星期的繼代培養週期，在一年內可育成三十萬株之幼苗。

不定根完成分化後，植株給予健化處理會提高成活率，其方法爲除去培養基中生長素，增強照光，植株健化效果隨着光量而提高，Hasegawa 等氏報告誘發不定根後移植到不含生長素之培養基，光線從1000 lux 增加到3000lux，嫩莖易長出擬葉，不定根之發育良好，並抑制癒合組織發生，光線若增強至10,000 lux，非常有利於小植株之生長，移植到土壤，成活率可達95-100%。Yang 及Clore(1974b)指出蘆筍單節莖培養於低濃度生長素(0.1ppm)培養基誘發不定根後，直接移植到Jiff 7型泥碳盆及噴霧裝置下育苗，成活率可達90%。此不經繼代培養可節省操作手續，唯在根系未發育完全之前要注意濕度控制，以防悅水枯萎或過濕而腐爛。

參考文獻

1. 王淑娥，1974. 組織培養應用於菊花營養繁殖之研究。臺灣大學園藝研究所碩士論文。
2. 王博仁，1973. 染病馬鈴薯組織培養治療法。生物科學2(1)：19-24.
3. 洪 立，1970. 臺灣蘆筍採種。中國園藝16(1)：1-6.
4. 馬溯軒，1973. 高等植物再生的生理及解剖。生物中心 生長與分化專題研究會稿集，pp. 173-190.
5. 馬溯軒、許圳塗，1972. 香蕉幼莖切頂組織培養應用於不定芽誘發之研究。中國園藝18(3)：135-142.
6. 馬溯軒、許圳塗，1974. 香蕉不定芽之組織培養育成幼株之研究。中國園藝20(1)：6-12.
7. 許圳塗，1970. 蘆筍組織培養影響發根發芽等因子之研究。臺灣大學園藝研究所碩士論文。
8. Adams, A.N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. J. hort. Sci. 47:263-264.
9. Andreasson, D.C. and J. H. Ellison. 1967. Root initiation of stem tip culture from mature plants. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 90:158-162.

10. Baker, K. F. and S. H. Smith. 1967. Modern methods of disease control in florist and nursery crops. Calif. Agri. 21:10-12.
11. Ben-Jaacov J. and R. W. Langhans. 1972. Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. HortScience 7:289-290.
12. Currence, T.M. and A. L. Richardson. 1938. Asparagus breeding. P.A.S.H.S. 35:554-557.
13. Cutter, R.G. 1965. Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. Bot. Rev. 31:7-13.
14. Duc, Bui-Dang-Ha. 1973. Shoot, root and embryoid formation in *Asparagus officinalis* callus derived from protoplasts. 4 eme REunion Sur La SeLection De LAsperge.
15. Ellison, J.H. and D. Scheer. 1959. Yield related to brush vigor in asparagus. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 73:339-344.
16. Galston, A.W. 1948. On the physiology of root initiation in excised asparagus stem tip. Amer. J. Bot. 35:281-237.
17. Gorter, C. J. 1965. Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cuttings. J. hort. Sci. 32: 13-17.
18. Hasegawa, P. M., T. Murashige, and F. H. Takatori. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture Ⅱ. light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98(2):143-148.
19. Hondelmann, W. and B. Wilberg. 1973. Breeding All male-varieties of Asparagus by utilization of anther and tissue culture. I. Pflanzeuziichtg 69:19-24.
20. Jones, O. P., and S.J. Vine 1968. The culture of goose-berry shoot tips for eliminating virus. J. hort. Sci. 43:289-292
21. Loo. S. W. 1945. Cultivation of excised stem tips of asparagus in vitro. Amer. J. Bot. 32:13-17.
22. Malnassy, P. and J. H. Ellison. 1970. Asparagus tetraploid from callus tissue. HortScience 5:444-445.
23. Melle Dore C. 1973. In vitro androgenesis by anther culture of *Asparagus officinalis* 1. new progresses. 4 eme REunion Sur La SeLection De LAsperge.
24. Morel, G.M. 1964. Tissue culture—A new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orch. Soc. Bull. June 473-482.
25. Muller, J. F., Bourgin, J.P. and G. Morel. 1973. Asparagus meristem culture. 4 eme REunion Sur La SeLection De LAsperge. p. 133-142.
26. Murashige, P. and F. skoog. 1962. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-997.
27. Murashige, T., M. N. Shabde., P. M. Hasegawa., F. H. Takatori and J. B. Jones. 1972. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. I. nutrient medium for formation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 158-161.
28. Murashige T., M Serpa, and J. B. Jones. 1974. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. HortScience 9:175-180.
29. Steward. F. C. and M. O. Mapes 1971. Morphogenesis and plant propagation in aseptic culture of asparagus. Bot. Gaz. 132(1):70-79.

30. Takatori, F. H., T. Murashige and J. I. Stillman 1968. Vegetative propagation of Asparagus through tissue culture. HortScience 3:20-22.
31. Takatori, F. H., F. D. Souther and P. D. Legg 1968. Plant variation in asparagus lines Calf. Agri. 22: 7-8.
32. Tincker, A. H. 1938. Further experiments with growth substances of the rooting of cutting. Jour. Roy. Hort. Sci. XIII. 210-229.
33. Wilmar, J. C. and M. Hellendoorn. 1968. Growth and morphogenesis of Asparagus cells cultured in vitro. Nature 217:306-7.
34. Yakuma, T., T. Harada., K. Saga and Y. Shiga 1971. Studies on the morphogenesis of asparagus Ⅱ. Effect of auxin and 6-benzyladenine on callus and organ formation of stem pieces culture in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 40:347-353.
35. Yakuwa, T., T. Harada., N. Inagaki and Y. Shiga 1972. Studies on the anther culture of horticultural crops I. Callus and organ formation in anther culture of asparagus. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 41:272-280.
36. Yang H. J. and W. J. Clore 1973. Rapid vegetative propagation of Asparagus throught lateral bud culture. HortScience 8:141-143.
37. Yang. H. J. and W. J. Clore 1974a. Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots of stock plants of asparagus in vitro. HortScience 9:138-140.
38. Yang, H. J. and W. J. Clore 1974b. Improving the survival of aseptically-cultured asparagus plants in transplanting. Hortscience 9(3):235-236.

summary

This paper introduces the recent developments in the practical methods of rapid propagation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). through tissue cultures. By micro-propagation—shoot apex and one bud stem culture, tested clone and all-male clone of asparagus could be easily established. The procedures of micro-propagation and the factors that influence the formation of adventitious roots have also been discussed. More works have to be conducted to observe and evaluate the vigor and yield of these test-tube produced plants in the field.