

山葵組織培養技術之研究

Research on *in vitro* micropropagation of *Wasabia japonica* Matsum.

張珈錡¹、紀綢如²、文紀鑾³、邱燕欣⁴

一、前言

山葵 (*Wasabia japonica* Matsum.) 爲十字花科山蔞菜屬多年生草本植物，自然分布範圍北自俄羅斯薩哈林島到日本南部的九州島 (Chadwick *et al.*, 1993)。由於其獨特的香、辛、和甘之風味，加上喜陰濕環境，生育最適溫度約在 8~13℃，需有乾淨水質等特殊的栽培環境要求，在日本爲一種歷史悠久且珍貴稀有的蔬菜和香料作物。而臺灣約自 1914 年由日本引進於阿里山地區種植成功，該地生產之山葵根莖品質優良，栽培面積曾一度每年超過 500 公頃，然由於其栽培係採林下土壤栽培方式，衍生出濫墾、林地沖蝕及水質劣化之問題，近年來考量到林地水土保持已逐漸轉型於設施內進行栽培 (林等，2018；黃等 2007)。山葵種苗主要來源有種子、分株和根段育苗等方式，但存在品質不一、種苗退化及種苗帶病原菌之問題，因此優良種苗來源缺乏仍是產業面臨之瓶頸。國內有關山葵組

織培養技術之報告極少，本篇主要探討國外山葵組織培養技術之研究進展及分享一些初步的研究成果。

二、山葵之組織培養

(一) 培植體的選擇與消毒方法

山葵組織培養常用之培植體部位，包括：根莖休眠芽、側芽和頂端分生組織 (Kofráňková and Koudela, 2019)。回顧山葵組織培養文獻發現，以根莖作爲培植體，使用 70% 酒精浸泡 30~60 秒，再以 10% 次氯酸鈉溶液消毒 30 分鐘，其培植體污染率高達 60%(Hassan *et al.*, 2001)；Rodriguez(2007) 使用在良好環境下栽培 12-18 個月之實生苗植株側芽作爲培植體，以 0.5% 次氯酸鈉溶液消毒 15 分鐘，結果培植體成活率僅 36%，上述研究皆顯示山葵培植體消毒不易。筆者團隊亦曾嘗試以山葵之側芽和花梗芽 (圖 1A) 作爲培植體進行消毒處理，消毒處理方法爲將培植體浸泡於 1% 次氯酸鈉溶液震盪消毒 15~20

¹ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

² 種苗改良繁殖場繁殖技術課 臨時人員

³ 種苗改良繁殖場生物技術課 副研究員

⁴ 種苗改良繁殖場繁殖技術課 副研究員兼課長

分鐘，經滅菌水清洗 3~4 次後，培養於山葵芽體誘導培養基中。試驗顯示，側芽培植體經消毒處理後之汙染率極高，試驗取數十個側芽培植體進行消毒處理，結果僅 1 芽成功存活，與前人研究之高汙染率相符。另使用花梗芽作為培植體，經相同消毒方法處理後，有 71.4% 之培植體成功存活並形成芽體 (圖 1B) 且汙染率僅 7.1% (數據未呈現)。事實上，根據 1992 年日本山田員人和春木和久兩位學者之研究，以山葵花梗芽作為培植體之誘導新芽形成率較使用根莖莖頂培植體提高 3.5~10 倍，能大幅提高培植體消毒成功率，惟較可惜的是，花莖取得時間限制在春季 2~5 月份間，難以隨時取得培養材料。

(二) 基本鹽類培養基

關於山葵組織培養基本鹽類培養基之選用，Hung(2007) 曾比較 7 種基本鹽類培養基 (MS、1/2MS、B5、WPM、KC、N6 和 N&N) 對山葵莖頂培植體之存活率、誘導芽體株高和重量之影響，結果培植體存活率在 7 種鹽類下無明顯差異，也皆未出現褐化情形，而在誘導芽體之高度和重量，僅鹽類濃度較低之 WPM 和 KC 表現顯著較差，顯示山葵對於鹽類濃度之適應範圍甚廣。Park 等 (2007) 比較 4 個 MS 濃度 (1/4、1/2、全量和 2 倍量) 對山葵芽體增殖之影響，結果芽體增殖數在各處理濃度無顯著差異，但在芽長和鮮重則以全量 MS 之表現最佳，其指出過低的濃度主要影響鮮重，而過高的濃度則導致芽體出現褐化和畸形等生長不佳之情形。

Kofrankova and Koudela(2019) 指出過去山葵組培多採用 1/2MS 和 MS 作為基礎鹽類培養基。

(三) 植物生長調節劑

山葵組織培養對植物生長調節劑的使用，可分為增殖和發根培養兩階段。在增殖階段多單獨使用低濃度細胞分裂素 ($0.01\sim 2\text{ mg L}^{-1}$) 或搭配生長素 ($0.01\sim 0.1\text{ mg L}^{-1}$) 進行培養，細胞分裂素的種類以 BA 使用較多，研究指出當 BA 使用濃度超過 2 mg L^{-1} ，增殖之芽體出現株高變矮和莖較細弱之情形 (山田和春木，1992；林等，2008；Park *et al.*, 2007)。在發根培養階段不添加植物生長調節劑也可以形成根系，部分研究甚至顯示添加生長素使發根率降低 (Park *et al.*, 2007)，但亦有研究指出添加生長素可使根系形成加快，約培養 10 天左右開始形成根系 (山田和春木，1992)，使用低濃度生長素 (1.0 mg L^{-1} 以下)，形成之根系較細長；若加入高濃度生長素 (10 mg L^{-1} IBA 或 IAA)，所形成之根系短且粗，植株生長勢佳 (Hung *et al.*, 2006)。筆者團隊使用 0.5 mg L^{-1} BA 進行山葵芽體增殖培養，結果可形成平均株高為 2.9cm、葉數 15 片之芽體，繁殖倍率為每培植體平均分成 1.6 芽 (圖 1C)。另於發根培養時比較無生長素 (對照組) 及添加 0.1 mg L^{-1} NAA 處理對山葵組培苗根系誘導之影響，結果顯示添加 0.1 mg L^{-1} NAA 發根率達 100% 顯著優於對照組之發根率 85.7%，株高也以 0.1 mg L^{-1} NAA 處理 (7.5cm) 顯著高於對照組 (6.1cm)，但在葉

數及根長則兩處理間無顯著差異 (表一、圖 2)。

(四) 組織培養溫度條件

由於山葵適宜之生長溫度低於 18℃，因此常用之組織培養溫度環境 (25±1℃) 是否同樣適合山葵組織培養苗生長有待商榷。前人研究中有使用一般培養溫度 (25±1℃) 者 (Hung *et al.*, 2006; Hung, 2007)，也有使用較低溫度 (16~20℃) 進行培養者 (Eun *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2007)，皆能成功培養出山葵組培苗。然而山田和春木 (1992) 曾試驗在 10、15、20、25、30℃ 五種溫度下山葵組培苗之增殖和根系誘導情形，其試驗指出增殖培養於 20℃ 之溫度下有最高之葉柄增加數，但在發根培養時以 10℃ 之培養溫度可達 80% 之發根率，當溫度提高至 20 或 25℃，發根率下降至 55%，超過 30℃ 完全無根系形成。相似的結果在 Hoang 等 (2017) 以光自營培養

方式 (培養基中不添加維生素和糖類)，比較山葵組培於 9 種日 / 夜溫度培養條件下之相對生長率，結果顯示 18/14、18/18、22/18℃ 有較佳之培養結果。筆者團隊亦曾比較山葵組培苗於增殖培養階段，放置於 18 和 20℃ 之生長箱培養，植株地上部性狀之差異，結果顯示株高和葉寬以 18℃ 顯著高於 20℃，但對於葉數和葉長則無差異影響 (表二、圖 1D)。

三、結語

本篇回顧過去山葵組織培養文獻的技術內容，亦嘗試建立山葵組織培養量產技術，從培植體的選擇和消毒方法，到芽體增殖和發根階段之培養基開發，以及組織培養環境條件皆完成測試，目前該技術已成功量化繁殖國內主要山葵品種 - 綠梗種和紅梗種，且組培苗出瓶後生育良好 (圖 3)，未來期有助於山葵健康種苗之生產與應用。

表一、培養基添加 NAA 對山葵紅梗種組培苗發根培養之影響

處理	株高 (cm)	葉數 (No.)	發根率 (%)	根長 (cm)
對照組	6.1±0.3 b	10.8±0.9 a	85.7±11.7 b	3.0±0.7 a
0.1 mg L ⁻¹ NAA	7.5±0.3 a	11.1±0.5 a	100.0±0.0 a	2.5±0.5 a

* 數值以平均值 ± 標準差表示，各調查項目標示相異字母者，為 5% 水準下經 Fisher's protected LSD 測驗達顯著差異

表二、培養溫度對山葵紅梗種芽體增殖之地上部形態之影響

處理	株高 (cm)	葉數 (No.)	葉長 (cm)	葉寬 (cm)
18℃	2.5±0.5 b	7.5±3.1 a	0.7±0.1 b	0.7±0.2 a
20℃	3.3±0.7 a	9.3±3.4 a	1.7±2.9a	1.1±0.2a

* 數值以平均值 ± 標準差表示，各調查項目標示相異字母者，為 5% 水準下經 Fisher's protected LSD 測驗達顯著差異

研究成果

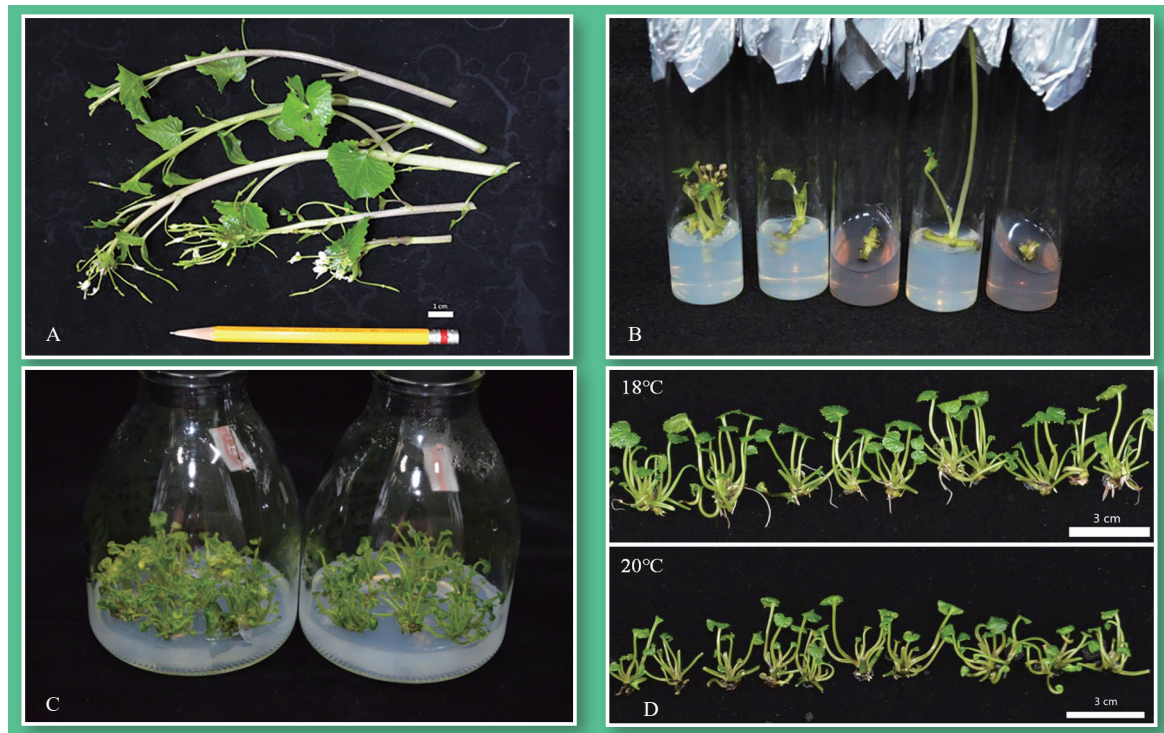


圖 1. 山葵紅梗種取花梗芽培植體消毒處理後誘導之芽體和後續組培苗繼代增殖之生長情形

- A. 採集之花梗芽培植體形態
- B. 花梗芽培植體培養 1 個月後形成之芽體
- C. 使用添加 0.5 mg L^{-1} BA 之增殖培養基之芽體增殖形態
- D. 於 2 種培養溫度下組培苗芽體增殖形態



圖 2. 山葵紅梗種經以無生長素 (左) 和添加 NAA (右) 之發根培養基培養 1.5 個月之根系誘導情形

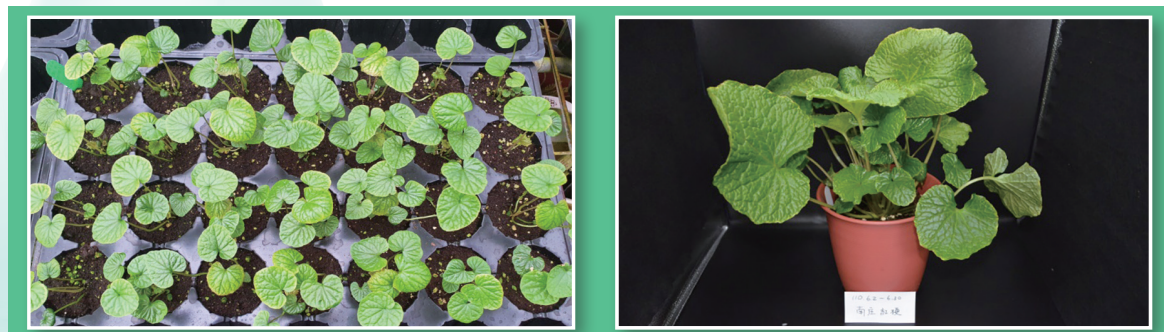


圖 3. 山葵紅梗種出瓶種植 20 天 (左) 和於盆栽種植 1 年 (右) 之生長情形