

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

鐵線蕨孢子無菌播種與部分

組織培養繁殖體系之建立

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC90 - 2313 - B - 002 - 269 -

執行期間：90年8月1日至91年7月31日

計畫主持人：葉德銘

共同主持人：

計畫參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學園藝系

中華民國 91 年 9 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：鐵線蕨孢子無菌播種與部分
組織培養繁殖體系之建立

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-269

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：葉德銘 國立台灣大學園藝系

一、摘要

脆鐵線蕨(*Adiantum tenerum* ‘Scutum Roseum’)孢子播於無土介質及試管內，比較其原葉體生長及發育。孢子播於泥炭苔、蛭石與珍珠砂之無土混合介質下，原葉體長度約 1.2 mm、寬度約 1.3 mm 以上時，即有藏精器的分化；原葉體長度約 2.0 mm、寬度約 2.5 mm，方觀察到藏卵器之形成。將孢子播於試管內，經增殖而來的原葉體僅分裂數個細胞後即有藏精器的形成。且於無菌撒播 20 天後，自翼片下側近假根處，開始有原葉體的增殖與鮮重之增加。於 60 天後，原葉體的鮮重即無明顯增加，而葉綠素含量下降。適當的繼代時期為無菌撒播後 50-60 天，於第一次繼代 6-8 週後需再行第二次繼代，使原葉體大量增生。若將無菌撒播 60 天之原葉體團，以全量強生氏營養液浸泡 5 秒鐘後，再置於無土介質中，其孢子體形成速率，較前人所推薦之 $\frac{1}{2}$ MS 為佳。本研究建立以部分組織培養方式(partial tissue culture system)，可兼顧原葉體培育、增殖並可獲得更多的孢子體 此外由迴歸分析得知：撒播後每瓶原葉體鮮重增加至 8-10 g 時，瓶內乙烯含量亦近呈直線增加至 0.5-0.6 $\mu\text{L/L}$ 。於含 0.1-10 mg/L GA_3 之培養基中，原葉體發育階段在未形成頂端分生組織前，即有藏精器的分化。若培養基中添加 0.01-10 mg/L 之 GA_3 抑制脆鐵線蕨原葉體的生長；100 mg/L 之 GA_3 處理者抑制孢子發芽。

關鍵詞：脆鐵線蕨、孢子、原葉體、無

菌繁殖、乙烯、激勃素

Abstract

Comparative growth and development of gametophytes and sporophytes were determined in *Adiantum tenerum* ‘Scutum Roseum’ sown in soilless mix and *in vitro*. Prothallia in soilless mix were competent to initiate antheridia provided that these prothallia had reached a critical size at length > 1.2 mm and width > 1.3 mm, while archegonia were observed at prothallia with length > 2.0 mm and width > 2.5 mm. In contrast, antheridia were observed in the young adventitious prothallia cultured *in vitro*, with only a few cells. The young adventitious prothallia were differentiated from the lower region of the wing cells of the prothallia after spores were sown *in vitro* for 20 days. Within sowing for 60 days, the fresh weight of prothallia increased due to adventitious outgrowths. The fresh weight of prothallia increased little and the chlorophyll content started to decrease after sowing *in vitro* for 60 days. The first optimum *in vitro* transferring duration was approximately 50 to 60 days after sowing, and the second subculture was 6 to 8 weeks after the former transferring. Before transferring from *in vitro* to soilless mix, the prothallia soaked with Johnson’s solution for 5 seconds resulted in a faster sporophyte formation than those

soaked with 1/2 MS as recommended previously. The established partial tissue culture system could facilitate both mass-propagation of the prothallia and production of more sporophytes. Regression analysis revealed that the ethylene production increased almost linearly up to 0.5-0.6 $\mu\text{L/L}$ with increasing prothallial fresh weight up to 8-10g per vase. Supplementary GA_3 at 0.1-10 mg/L reduced the length and width of prothallia but promoted the formation of antheridia, which were observed in the young gametophytes prior to apical meristem initiation stage. Increasing GA_3 at 100 mg/L prevented spore germination.

Key words: *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum', spore, prothallium, *in vitro* propagation ethylene, GA_3

二、緣由與目的

蕨類植物株型優美可供切葉插花配材、盆植觀賞，亦可當地被植物，因此歐美、日本等國之市場需求量一直穩定成長。其中鐵線蕨屬為全世界最受消費者喜愛之蕨類(Jones 1993)，台灣雖有原生種(Chiou and Shieh 1984)，但鐵線蕨仍多自國外進口穴盤苗，業者經由 2-3 個月的栽培即以小品盆栽的形式出售。台灣氣候適合蕨類之生長與繁殖，原生蕨類至少有 667 種，族群密度與多樣性於世界上名列前茅，如充分應用本省優越氣候條件，生產鐵線蕨種苗應大有可為。

蕨類以孢子繁殖最能獲得大量族群，然而孢子在撒播時易與菌類、藻類或蘚苔類競爭養分而降低發芽率及生長速率；或因不耐強光或乾旱等逆境而死亡(Yeh and Lee 1990)。Knauss (1976)建立以部分組織培養繁殖蕨類模式以克服上述問題，即將

孢子無菌撒播於 MS (Murashige and Skoog 1962)培養基中，孢子發芽後進入原葉體階段，定期繼代於新培養基；或將原葉體團浸泡於 $\frac{1}{2}$ MS 溶液 5 秒鐘，倒入消毒過的介質上，經一段時間培養後，孢子體陸續形成。Wang et al. (1999) 指出，鐵線蕨試管內培養以全量 MS 並添加 2-4% 蔗糖培養基處理，其原葉體鮮重較重且較少褐化，但未進行原葉體出瓶至無土介質後之試驗。另外管內鐵線蕨原葉體之形態與生長分化情形，與培養於無土混合介質者不同，此是否因試管內乙烯或 GA 所致，有待探討。本研究以脆鐵線蕨 (*Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum') 為材料，比較孢子於無土介質及試管內之原葉體生長及發育，並探討試管內原葉體的繼代與出瓶適期，以建立孢子無菌撒播繁殖體系，期能取代進口蕨苗，減少業者生產成本。並添加高等植物乙烯前趨物 ACC (Adams and Yang 1979)、乙烯生合成抑制劑 AOA (aminooxy acetic acid)、乙烯作用抑制劑硝酸銀 (Goodwin and Mercer 1983)、活性炭等，探討這些藥劑是否會影響試管內乙烯濃度與脆鐵線蕨原葉體發育。另於試管內添加不同濃度之 GA_3 ，研究其是否影響脆鐵線蕨原葉體分化藏精器。

三、材料與方法

本計畫試驗材料為鐵線蕨 (*Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum') 之孢子，取自國立台灣大學園藝系花卉研究室栽培之鐵線蕨母株，將鮮重 0.03 g 孢子以 5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 稀釋 5 倍，加入 1 滴展著劑 Tween 20，消毒 10-15 分鐘後，以無菌水經濾紙過濾洗淨次氯酸鈉，此步驟重複 3 次以上。將消毒過的孢子以刮杓刮入 25 mL 的無菌水中，使孢子懸浮於無菌水中，製成孢子懸浮液 (Knauss, 1976; Rubin 和 Paolillo,

1983)。培養基為 MS 培養基 (Murashige 和 Skoog, 1962), 外加 2% 蔗糖 (Sigma)、agar (Sigma), 以 1.0 N NaOH 和 1.0 N HCl 調整 pH 為 6.0 ± 0.02 , 以 121 、 1.2 kg/m^2 高溫高壓濕熱法殺菌 20 分鐘 (王等人, 1999)。培養容器為 100 mL 之廣口瓶, 內盛 25 mL 培養基, 以鋁箔為封口物。每瓶廣口瓶滴入 20 滴孢子懸浮液, 每滴孢子懸浮液約 500 粒孢子。培養於溫度 25 ± 2 , 光強度 $40 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PAR, 400 ~ 700 nm) 光照 16 小時之育苗室中。光強度以氣孔蒸散測定器 (steady state porometer LI-1600, LI-COR Inc.) 之光度計 (LI-COR quantum sensor) 測定。進行下列試驗:

一、內乙烯含量對原葉體發育之影響:

1. ACC (1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid)、AOA (aminooxy acetic acid) 與 AgNO_3 對瓶內乙烯含量及原葉體發育之影響:

於培養基中分別添加 0、25、50 及 100 μM 共 4 種 ACC 濃度處理; 添加 0、0.5 及 5.0 μM 共 3 種 AOA 濃度處理; 添加 0、50、100 及 200 μM , 共 4 種 AgNO_3 濃度處理。培養容器為 250 mL 血清瓶, 培養基體積為 50 mL。每處理 3 個血清瓶為 3 重複, 試驗期間每 2、4、6 及 8 週, 分析各試驗處理間之瓶內乙烯含量, 並調查原葉體於播種後 2 ~ 8 週之發育階段、增殖情形及其鮮乾重。

2. 封口物質對瓶內乙烯含量及原葉體發育之影響:

分別以鋁箔 (aluminum foil)、白色矽膠塞 (white silicon cap) 及黑色橡膠塞 (black rubber cap) 為封口物, 共 3 種處理。培養容器為 100 mL 廣口瓶, 培養基體積為 25 mL。分析各試驗處理間之瓶內乙烯含量, 並調查原葉體於播種後 2 ~ 8 週之發育階段、增殖及其鮮乾重。

乙烯含量分別抽取瓶內氣體 1 mL 測量。以 Shimadzu 公司之 GC-14A 型氣相層析儀分析, 其偵測器為火焰離子式偵測器 (flame ionization detector; FID), 析離管 (column) 為 1.5 公尺長之不鏽鋼管, 內部填充活性氧化鋁 60/80 mesh。偵測器 (detector) 及注射口 (injector) 的溫度設定為 110 , 而析離管則為 70 , 以氮氣為載劑 (carrier gas), 標定乙烯濃度之標準氣體為 1 ppm。

二、 GA_3 及 ABA 對孢子發芽與原葉體發育之影響

於試管內分別加入 0、0.001、0.01、0.1、1、10 及 100 mg/L 共 7 種 GA_3 濃度處理, 試管內分別加入 0 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及 10^{-3} M 共 7 種 ABA 濃度處理。每處理 3 個試管為 3 重複, 試驗期間每 3、4、6 及 9 週, 調查原葉體發育階段、長寬度及其增殖的情形。每試管取 6 個原葉體, 每試管為 1 重複, 共 3 重複。

三、鐵線蕨部分組織培養之大量繁殖體系模式建立

依 Knauss (1976) 建立以部分組織培養 (partial tissue culture) 繁殖蕨類模式: 將蕨類植物之孢子, 無菌播種於培養基中, 孢子發芽後進入原葉體階段, 而後定期繼代於新培養基, 可增生原葉體; 或將原葉體團與 $\frac{1}{2}$ MS 溶液 (Murashige 和 Skoog, 1962) 經 5 秒鐘混合後, 倒入事先消毒過的介質上, 經一段時間的培養可見孢子體陸續形成, 完成蕨類植物的繁殖模式。然而, Knauss (1976) 並未明確指出適當的繼代時期、出瓶時期與原葉體出瓶時以適當之營養液種類浸泡處理, 對出瓶後原葉體的生長與孢子體形成之影響。因此本計畫擬進行下列處理, 以研究適當的繼代時期與出瓶後之栽培條件。

1. 播種後不同日數原葉體鮮重及葉綠素含

量之變化:

分別調查無菌播種後 50、60、80、90、100、110、120 及 130 天原葉體之鮮重，以及原葉體之葉綠素 a、b 及總葉綠素含量，以建立適當的繼代時期。每 1 廣口瓶逢機取樣 20 原葉體。葉綠素之萃取採修正 Hagar 和 Freeberg (1980) 之方法，取不同播種時期的原葉體，分別秤取鮮重 0.5 g，以 25 mL 80% 丙酮液研磨後，以濾紙過濾取其濾出液，即刻以光電比色計 (HITACH U-2000 spectro-photometer) 測定 663 nm 及 645 nm 之吸光值 (OD 值)。以原葉體鮮重及葉綠素含量配合前述乙烯含量之變化，以訂出適當的繼代時期。

2. 繼代時期對瓶內原葉體生育之影響:

取播種後 50、60、80、90、100、110、120 及 130 天鮮重 1g 之原葉體，將不同時期的原葉體組織，繼代於上述基本培養基中，培養容器為 100mL 廣口瓶，內盛 25 mL 培養基。於繼代後 2、4、6 及 8 週，分別調查每處理間之原葉體鮮乾重，每 1 廣口瓶為 1 重複，共 3 重複。

3. 營養液種類及濃度對原葉體發育及孢子體形成之影響:

取培養之原葉體鮮重 1g，分別浸泡自來水、全量 MS、 $\frac{1}{2}$ MS、全量 Johnson's solution 及 $\frac{1}{2}$ Johnson's solution，共 5 種營養液處理。原葉體經營養液浸泡 5 秒鐘後，移於無土介質中。試驗期間自第一片孢子葉長出起每 3 天記錄總孢子體數，逢機取樣記錄原葉體之長寬、當時之一片孢子葉羽片之長寬及葉柄長，每重複 8 個，共 6 重複。同時測量其介質之 pH 及 EC 值，每處理測 6 盆，為 6 重複。介質 pH 及 EC 值之測定依據 Warncke 和 Krauskopf (1983) 的 1:2 (介質:水) 萃取法，分別以 100 mL 之自來水 (pH=7.0, EC=0.1 mS/cm) 萃取表面深度約 2 cm 的介質，在攪拌均勻後，靜

置 3 小時以上，pH 以 Hach EC10 pH meter 及 EC 以 Hach EC/TDS meter 於 25 °C 下測定之。

4. 出瓶時期對孢子體形成之影響:

取無菌播種後 50、60、80、100、110、120 及 130 天原先以 100 mL 廣口瓶培養之原葉體鮮重 1 g，共 7 個出瓶時期處理，每一時期 6 重複。經全量 Johnson's solution 浸泡 5 秒鐘後，將浸泡過後的原葉體連同 35mL 的營養液分別均勻倒入直徑 8 cm、高度 6 cm 紅色塑膠盆表層，盆內盛泥炭苔 (Farfard, No.1, 100% Peatmoss) 蛭石 (#2, 南海蛭石工業股份有限公司): 珍珠砂 (#2, 南海蛭石工業股份有限公司) 以體積比 2:2:1 混合均勻，上覆一層保鮮膜。試驗期間自第一片孢子葉長出起每 3 天記錄總孢子體數，每 1 出瓶時期處理 6 重複，每盆視為 1 重複。

上述各試驗採完全逢機設計 (completely randomized design, CRD) 進行，並以鄧肯氏多變域分析 (Duncan's multiple range test) 檢查各處理間 $P = 0.05$ 之差異顯著性。

四、結果與討論

脆鐵線蕨之孢子撒播於無土介質後，以全量 Johnson's 完全營養液處理，撒播後約 6 週，於原葉體中褥腹側近假根形成的部位形成藏精器的構造；並於 10 週後，於原葉體中褥近頂端分生組織的部位開始分化藏卵器，此與前人形態觀察結果相似 (Masuyama 1972, Chiou and Shieh, 1984)。於本無土介質撒播試驗結果顯示，脆鐵線蕨原葉體長度約 1.2 mm、寬度約 1.3 mm 以上時，即有藏精器的分化；且原葉體長度約 2.0 mm、寬度約 2.5 mm，方形成藏卵器。此與 Masuyama (1972) 認為鐵線蕨 (*Adiantum capillus-veneris*) 之原葉體寬度平

均 1.3 mm，即有 80% 的原葉體形成藏精器；且原葉體寬度平均 2.3 mm，已有 90% 的原葉體分化藏卵器相呼應。除鐵線蕨外，海金沙(*Lygodium japonicum*) 撒播 3-4 週後，只要原葉體寬度大於 1.25 mm 即有形成藏卵器的能力，而較小的原葉體僅能形成藏精器(Takeno and Furuya 1980)。由此可顯示藏精器或藏卵器的分化與原葉體的大小密切相關。

在不外加植物生長調節劑情況下，脆鐵線蕨孢子無菌撒播 20 天後，自原葉體近假根生長部位開始有原葉體的增殖，可能是因培養基所含蔗糖及礦物元素適合原葉體發育所致(Camloh and Gogala 1992, Wang et al. 1999)。而原葉體在翼片下側近假根處，可增殖更多的原葉體，且原葉體在數個細胞大小即可分化藏精器之原因，可能是因在有限的容器空間下，增殖的原葉體密度高，分泌較高濃度之促精素(antheridiogens)，而造成試管內之原葉體分化藏精器(Albaum 1938)。因此推測脆鐵線蕨增殖之原葉體可受成熟原葉體分泌之促精素誘導，因此在未形成頂端分生組織前，即有藏精器的分化。目前亦有報告顯示促精素為已具頂端分生組織或藏卵器之蕨類原葉體所產生的植物賀爾蒙，可促進鄰近發育較慢且尚未形成頂端分生組織的原葉體形成藏精器(Banks 1997, Chiou and Farrar 1997)。唯在有利分化藏精器之情況下，可能因而抑制藏卵器之分化(Von Aderkas and Cutter 1983, Rubin et al. 1985)。本研究經 130 天的試管內培養觀察，結果顯示脆鐵線蕨原葉體僅有藏精器的構造，而無法分化藏卵器，此與 Knauss (1976) 觀察脆鐵線蕨(*Adiantum tenerum* 'Pink Lady') 之結果相同。

除此，Kao (2000) 曾觀察若脆鐵線蕨原葉體不經繼代培養 6 個月後，會有無配

生殖之孢子體(apogamous sporophytes)的形成，其第一片孢子葉通常具有 1-3 片的小羽片，與正常受精而來的孢子體第一片孢子體僅有 1 片小羽片不同；且其小羽片無法正常展開，若不進行繼代，則 8 個月後此孢子體會逐漸褐化死亡，此與 Wang et al. (1999) 觀察結果相似。有數位學者相信培養基外加蔗糖可促使無配生殖之孢子體的產生(Whittier and Steeves 1960, Whittier 1964, Fernandez et al. 1996)。Menon and Lal (1981) 亦提出「無配生殖因子」的假說，在蔗糖的存在下，此種生殖因子因而產生，且會隨培植體培養時間的增加而累積。據此推想脆鐵線蕨形成無配生殖之孢子體的原因，可能是培養基中添加 2% 蔗糖或因培養時間過久所致。高濃度之葡萄糖、蔗糖、果糖及乳糖所以可增加無配生殖的機率，可能歸因於這些碳水化合物提供呼吸作用所需基質。碳水化合物除了提供呼吸作用所需基質外，亦扮演者維持滲透勢的角色(Whittier and Steeves 1960)。

本試驗結果亦顯示，孢子經無菌撒播後，隨培養時間增加，其原葉體可繼續增殖，且原葉體鮮重亦可隨之增加(Fig. 1 A)。然經無菌撒播 60 天後，原葉體的鮮重則達飽和，原葉體之葉綠素含量顯然有下降的趨勢，且由外觀上亦可見位於培養基上方的原葉體已開始有褐化的現象。Biswal et al. (1983) 認為波斯頓腎蕨(*Nephrolepis exaltata* 'Bostoniensis') 葉片之老化，會伴隨著葉綠素 a 或葉綠素 b 含量的降低。因此原葉體葉綠素含量的降低(Fig. 1B)，甚至褐化，可視為原葉體老化之現象。因此為避免脆鐵線蕨原葉體繼續褐化，有必要進行繼代培養。Takeno and Furuya (1980) 認為低原葉體密度及新鮮培養基有利於原葉體的營養生長。由於試管內不易形成正常的孢子體，試驗結果顯示應於無菌撒播 50-60

天後，將脆鐵線蕨原葉體出瓶並移入無土介質，以便促使其孢子體較早形成，且可產生較多的孢子體(Fig. 2)。出瓶後原葉體團若以全量強生氏營養液處理者(Fig. 3)，其孢子體形成速率較 Knauss (1976)所推薦之 $\frac{1}{2}$ MS 為佳。脆鐵線蕨採無菌撒播方式，原葉體易於試管內增生並提早分化藏精器，但需定期繼代以免誘發生長不良的無配生殖之孢子體。本研究建立以部分組織培養之繁殖體系，可兼顧原葉體培育、增殖與正常孢子體之形成。

於高等植物中，可添加 ACC 而改變瓶內乙烯的濃度 (Adams and Yang 1979)。但以脆鐵線蕨原葉體為培植體，於培養基中無論添加高等植物之乙烯前趨物 ACC、乙烯抑制劑 AOA 或硝酸銀等(Goodwin and Mercer 1983)，並不會增加或減少瓶內乙烯的含量，且 25-100 μ M 之 ACC 或 5 μ M 之 AOA 或 100-200 μ M 硝酸銀處理者抑制原葉體的生長(Figs. 4-6)。南洋鹿角蕨以葉片及根莖為培植體，於培養基內添加 ACC 未造成乙烯生成量增加，且添加高等植物乙烯生合成抑制劑 AVG 亦不會減少乙烯含量(Kwa et al. 1995)。有些蕨類植物添加 ACC 並不會增加乙烯生成量，如瓶蕨屬 (*Trichomanes speciosum*) 蕨類植物、網脈瓶爾小草 (*Ophioglossum reticulatum*)、槐葉萍 (*Salvinia natans*)、卡洲滿江紅 (*Azolla caroliniana*) (Osborne et al. 1996)。可能脆鐵線蕨與上述之蕨類植物類似，其乙烯生合成途徑與高等植物不同，可能如微生物一般由 TCA 循環的中間產物或其他途徑而來 (Wang et al. 1962, Jacobsen and Wang 1968)。於培養基中添加 1-2g/L 活性炭雖可促進脆鐵線蕨原葉體的生長，但不能減少試管內乙烯的含量(Fig. 7)，活性炭可能吸附乙烯以外的生長抑制物質如酚類化合物等(Fridborg et al. 1978)。

試管內培養基中，不論添加 ACC、AOA、硝酸銀或活性炭，於撒播 6 週內，每瓶原葉體鮮重皆會增加，當每瓶原葉體鮮重達 8-10g 時，試管內乙烯含量亦近呈直線增加至 0.5-0.6 μ L/L。添加 1g/L 或 2 g/L 活性炭處理者於撒播後 8 週，原葉體已有褐化現象，乾重已不再增加(Fig. 7)且瓶內的乙烯含量亦降低。可見脆鐵線蕨原葉體本身會產生乙烯，其他蕨類植物之原葉體亦曾被報導會產生乙烯(Miller et al. 1970, Edwards and Miller 1972, Elmore and Whittier 1973)。無菌撒播約 7-8 週後為較適當的繼代時期，如不繼代則原葉體褐化或誘發生長不良的無配生殖之孢子體(Wang et al. 1999)。因為原葉體如褐化死亡，瓶內的乙烯含量亦降低，故測定瓶內的乙烯含量應可作為脆鐵線蕨繼代培養原葉體之指標。

GA₃ 與許多蕨類植物促精素之構造十分相似，GA₃ 可促進密穗蕨 (*Anemia phyllitidis*)、海金沙 (*Lygodium japonicum*) 等蕨類植物藏精器之形成(Schraudolf 1964, Yamane et al. 1979)。於含 0.1-10 mg/L GA₃ 之培養基中，原葉體發育階段在未形成頂端分生組織前，即有藏精器的分化(Figs. 8)，可能 GA₃ 與促精素結構相近，可促進分化藏精器有關，此 GA₃ 濃度範圍可促進海金沙(Swami and Raghavan 1980)與台灣山蘇花分化藏精器 (Yeh and Lee 1990)。若培養基中添加 0.01-10 mg/L 之 GA₃，會抑制脆鐵線蕨原葉體的生長；而 100 mg/L 高濃度之 GA₃ 甚至會抑制孢子的發芽。此與海金沙的原葉體培養於含 0.01-10 mg/L GA₃ 之培養基中，隨著 GA₃ 濃度的增加，原葉體的生長愈受到抑制之結果相似 (Swami and Raghavan 1980)。

五、參考文獻

- Adams DO, Yang SF. 1979. Ethylene biosynthesis: Identification of 1- aminocyclo propane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc Natl Acad Sci USA. 76:170-4.
- Albaum HG. 1938. Normal growth, regeneration, and adventitious outgrowth formation in fern prothallia. Amer J Bot 25:124-33.
- Banks JA. 1997. Sex determination in the fern *Ceratopteris*. Trends Plant Sci 2:175-80.
- Biswal BB, (Kao, 2000)Choudhury NK, Sahu P, Biswal NC. 1983. Senescence of detached fern leaves. Plant Cell Physiol 24:1203-8.
- Bramley PM. 1997. Isoprenoid metabolism. p.417-37. In: P. M. Dey and J. B. Harborne (eds.) Plant biochemistry. Academic Press, New York.
- Camloh M, Gogala N. 1992. *In vitro* culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. Sci Hort 51:343-6.
- Chiou WL, Farrar DR. 1997. Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species. Amer J Bot 84:633-40.
- Chiou WL, Shieh WC. 1984. The gametophytes of Adiantaceae in Taiwan. Yushania 1: 1-10.
- Edwards EM, Miller JH. 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. . Inhibition of cell division. Amer J Bot 59:450-7.
- Elmore H W, Whittier DP. 1973. The role of ethylene in the induction of apogamous buds in *Pteridium* gametophytes. Planta 111:85-90.
- Elmore H W, Whittier DP. 1975. The involvement of ethylene and sucrose in the inductive and developmental phases of apogamous bud formation in *Pteridium* gametophytes. Can J Bot 53:375-81.
- Fernandez H, Bertrand AM, Sanchez-Tames R. 1996. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45:93-7.
- Fridborg G, Pedersen M, Landstrom LE, Eriksson T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue culture: absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol Plant 43:104-6.
- Goodwin TW, Mercer EI. 1983. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press. NY. p.614-25.
- Hagar WG, Freeberg JA. 1980. Photosynthetic rates of sporophytes and gametophytes of the fern, *Todea barbara*. Plant Physiol 65:584-6.
- Hamilton RG, Lloyd RM. 1991. Antheridiogen in the wild: The development of fern gametophyte communities. Funct Ecol 5:804-9.
- Jacobsen DW, Wang CH. 1968. The biogenesis of ethylene in *Penicillium digitatum*. Plant Physiol 43:1959-66.
- Johnson CR, Stout PR, Broyer TC, Carlton AB. 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. Plant and Soil 8:337-53.
- Jones DL. 1993. Encyclopaedia of ferns. Timer Press, Inc. 433p.
- Kao HY. 2000. Studies on spore germination methods and spore formation of *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. MS thesis. National Taiwan University. 118p.
- Knauss JF. 1976. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. Proc Fla State Hort Soc 89:363-5.
- Kwa SH, Wee YC, Lim TM, Kumar PP. 1995. Role of ethylene in the production of sporophytes from *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. frond and rhizome pieces culture *in vitro*. J. Plant Growth Reg 14:183-9.
- Masuyama S. 1972. The sequence of sex expression in the prothallia of *Adiantum pedatum* L. and *A. capillus-veneris* L. J Jap Bot 47: 97-106.
- Menon MK, Lal CM. 1981. Problems of development in mosses and mossallies. Proc. Indian Nat Sci Acad 47:115-52.
- Miller PM, Sweet HC, Miller JH. 1970. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. . Effects on protonemal and rhizoidal growth and interaction with auxin. Amer J Bot 57:212-7.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-97.
- Näf U. 1979. Antheridiogens and antheridial development. p. 435-70. In: A.F. Dyer (ed.) The Experimental Biology of Ferns. Academic Press, London.
- Osborne DJ, Walters J, Milborrow BV, Norville A, Stange LMC. 1996. Evidence for non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants. Phytochem 42:51-60.
- Rubin G, Paolillo DJ. 1983. Sexual development of *Onoclea sensibilis* on agar and soil media without the addition of antheridiogen. Amer J Bot 70:811-5.
- Rubin GD, Robson S, Paolillo DJ. 1985. Effects of population density on sex expression in *Onoclea sensibilis* L. on agar and ashed soil. Ann Bot 55:205-15.

Schraudolf H. 1964. Relative activity of the gibberellins in the antheridium induction in *Anemia phyllitidis*. Nature 201:98-9.

Swami P, Raghavan V. 1980. Control of morphogenesis in the gametophyte of a fern by light and growth hormones. Can J Bot 58:1464-73.

Takeo K, Furuya M. 1980. Sexual differentiation in population of prothallia in *Lygodium japonicum*. Bot Mag Tokyo 93:67-76.

Teng WL. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcatum*. Plant Cell Rep 17:77-83.

Tittle FL. 1987. Auxin-stimulated ethylene production in fern gametophytes and sporophytes. Physiol Plant 70:499-502.

Von Aderkas PE, Cutter G. 1983. The role of the meristem in gametophyte development of the Osmundaceous fern *Todea barbara* (L.) Moore. Bot Gaz 144:519-24.

Wang CH, Persyn A, Krackov J. 1962. Role of the Krebs cycle in ethylene biosynthesis. Nature 195:1306-8.

Wang HM, Yeh DM, Lee N. 1999. Spore germination, prothallus growth and gametophyte development of *Adiantum capillus-veneris* under *in vitro* and soilless culture conditions. J Chinese Soc Hort Sci 45:353-60.

Wang HM, Yeh DM, Lee N. 1999. Spore germination, prothallus growth and gametophyte development of *Adiantum capillus-veneris* under *in vitro* and soilless culture conditions. J Chinese Soc Hort Sci 45:353-60.

Whittier DP, Pratt LH. 1971. The effect of light quality on the induction of apogamy in prothalli of *Pteridium aquilinum*. Planta 99:174-8.

Whittier DP, Steeves TA. 1960. The induction of apogamy in the bracken fern. Can J Bot 38:925-30.

Whittier DP. 1964. The influence of cultural conditions on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes. Amer J Bot 51:730-6.

Yamane H, Takahashi N, Takeo K, Furuya M. 1979. Identification of Gibberellin A₉ methyl ester as a natural substance regulation formation of reproductive organs in *Lygodium japonicum*. Planta 147:251-6.

Yeh DM, Lee N. 1990. Studies on spore germination and gametophyte development of *Asplenium nidus* L. J Chinese Soc Hort Sci 36:43-53.

台灣林業科學 2002

試管內乙烯與激勃素含量對脆鐵線蕨原葉體發育之影響

脆鐵線蕨孢子無菌撒播繁殖體系之建立

本計畫已被接受期刊報告 2 篇：

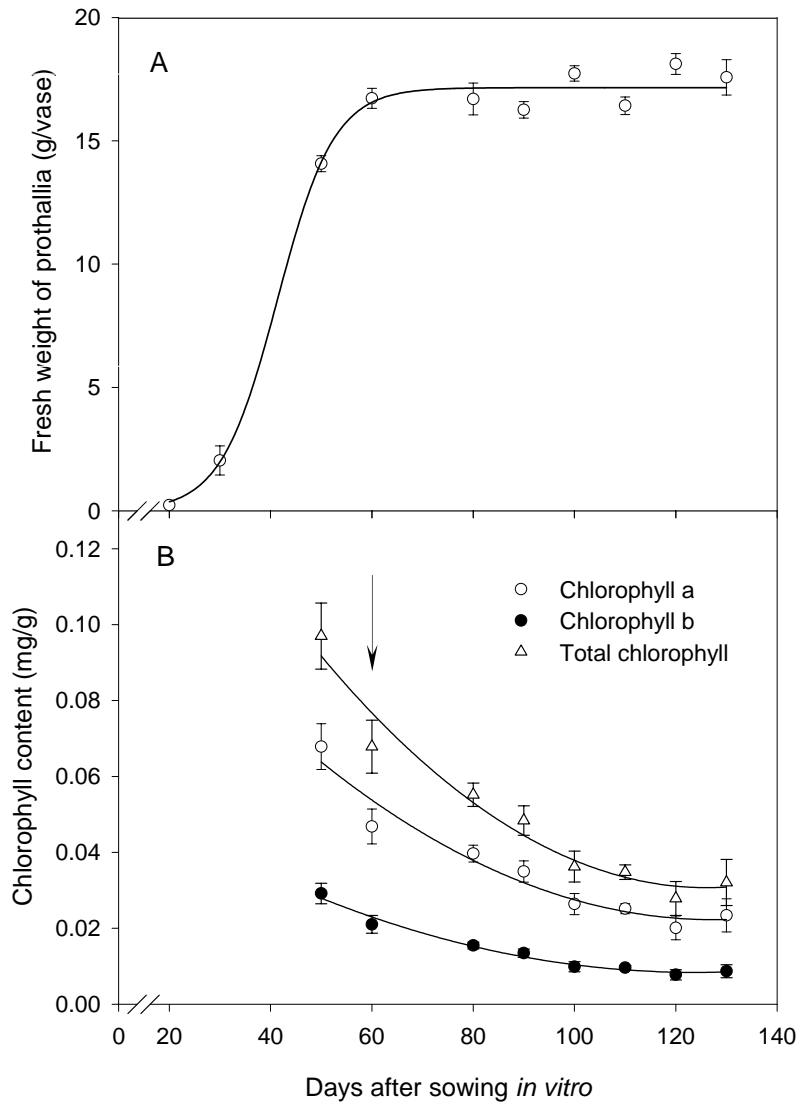


Fig. 1. Changes in fresh weight (A) and chlorophyll contents (B), chlorophyll a , chlorophyll b and total chlorophyll of prothallia with time in *Adiantum tenerum* ‘Scutum Roseum’ sown *in vitro*. Bars indicate standard error of the mean. The arrow indicates the start of browning of upper prothallia.

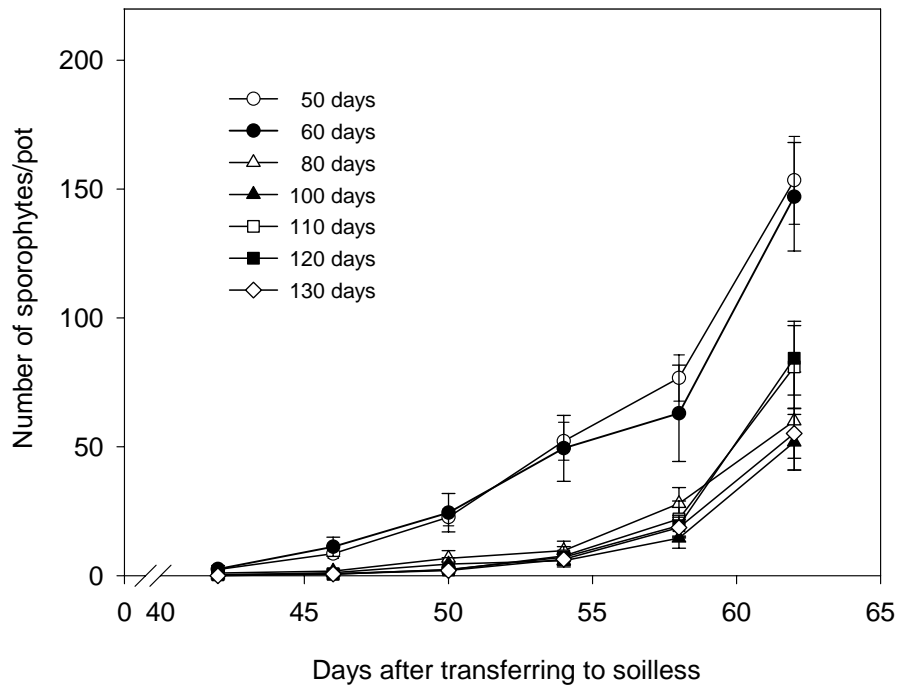


Fig. 2. Changes in number of sporophytes with time in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum' after transferring from *in vitro* to soilless mix. Prothallia were transferred from *in vitro* after sowing for 50, 60, 80, 100, 110, 120 and 130 days. Bars indicate standard error of mean.

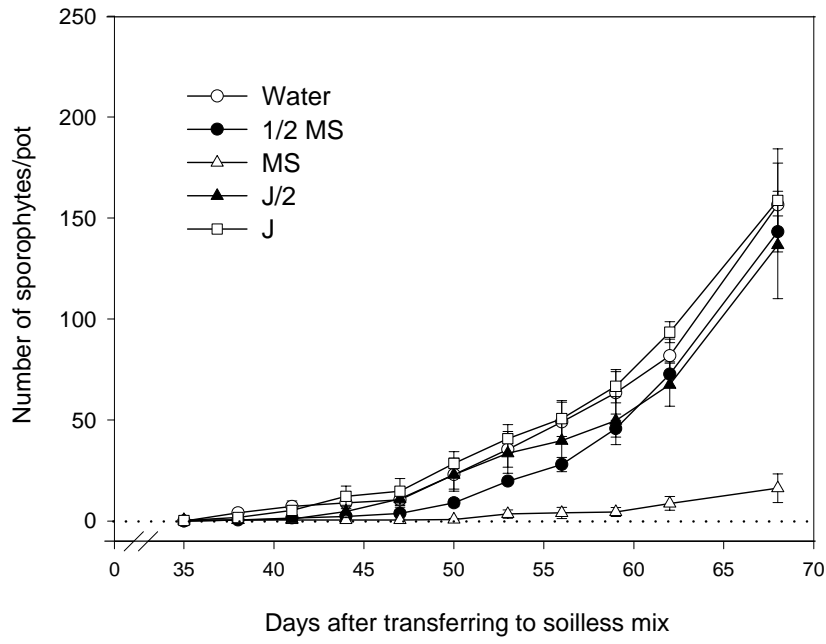


Fig. 3. Effect of soilless mix blended with tap water and nutrient solutions on number of sporophytes in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. Bars represent standard error of the mean.

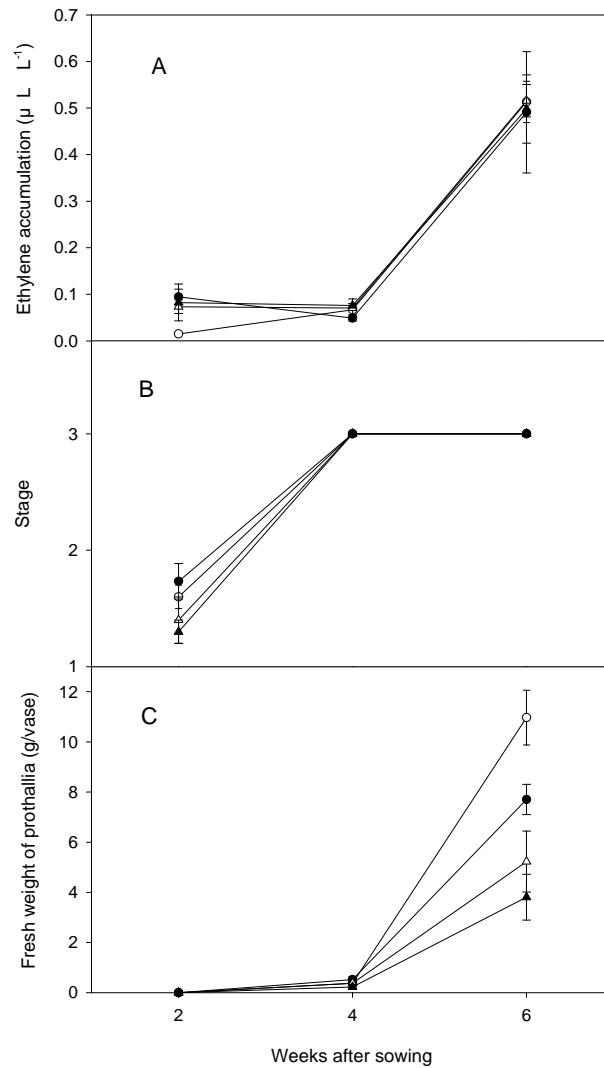


Fig. 4. Effect of ACC concentration at 0 (○), 25 (□), 50 (△) and 100 μM (●) on ethylene accumulation (A), developmental stage (B) and fresh weight (C) of prothallia in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. Bars represent standard error of the mean.

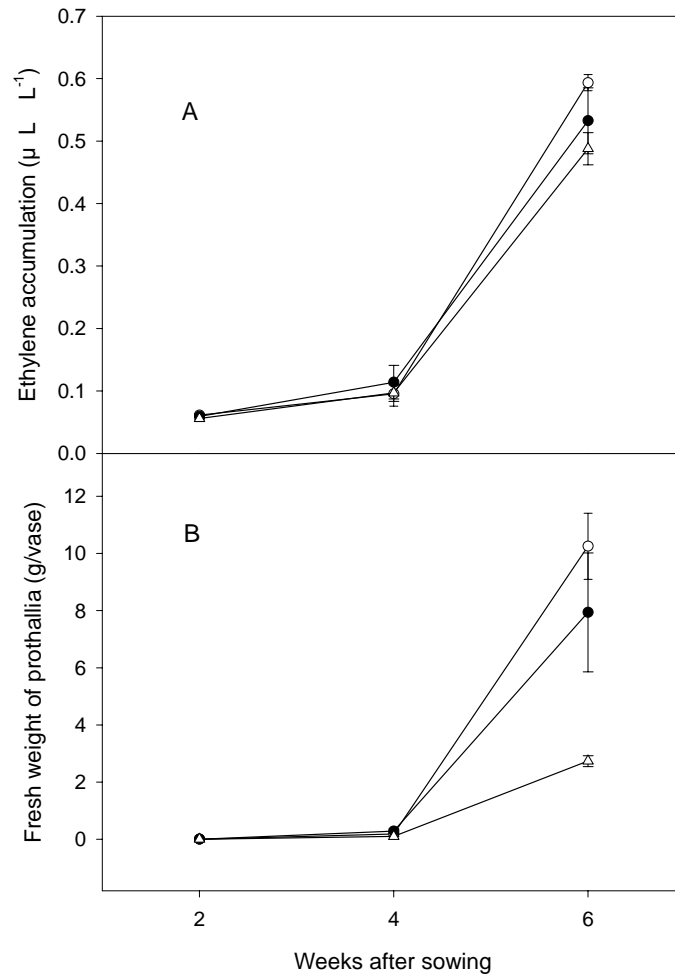


Fig. 5. Effect of AOA concentration at 0 (○), 0.5 (●) and 5.0 μM (△) on ethylene accumulation (A) and fresh weight (B) of prothallia in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. Bars represent standard error of the mean.

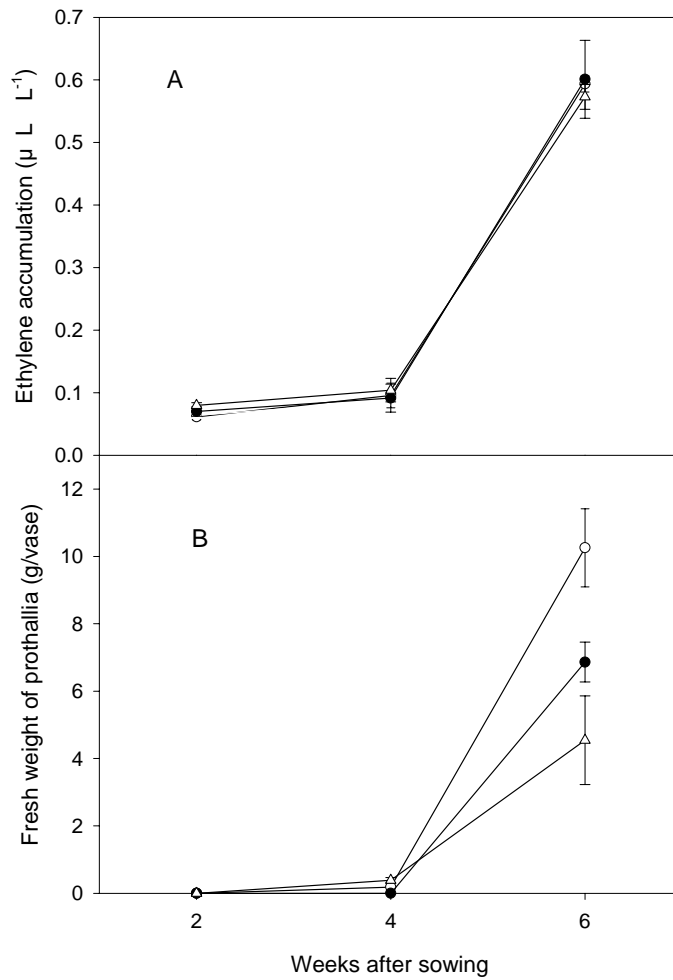


Fig. 6. Effect of AgNO₃ concentration at 0 (○), 100 (●) and 200 μ M (△) on ethylene accumulation (A) and fresh weight (B) of prothallia in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. Bars represent standard error of the mean.

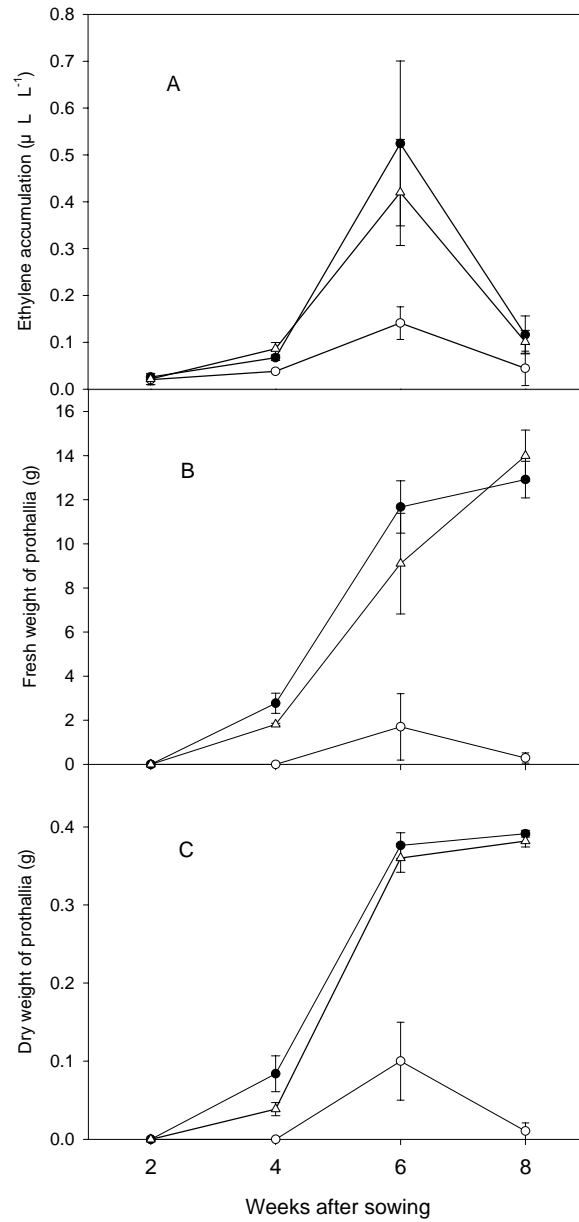


Fig. 7. Effect of activated charcoal at 0 (○), 1 (△) and 2 g/L (■) on ethylene accumulation (A), fresh weight (B) and dry weight (C) of prothallia in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum'. Bars represent standard error of the mean.

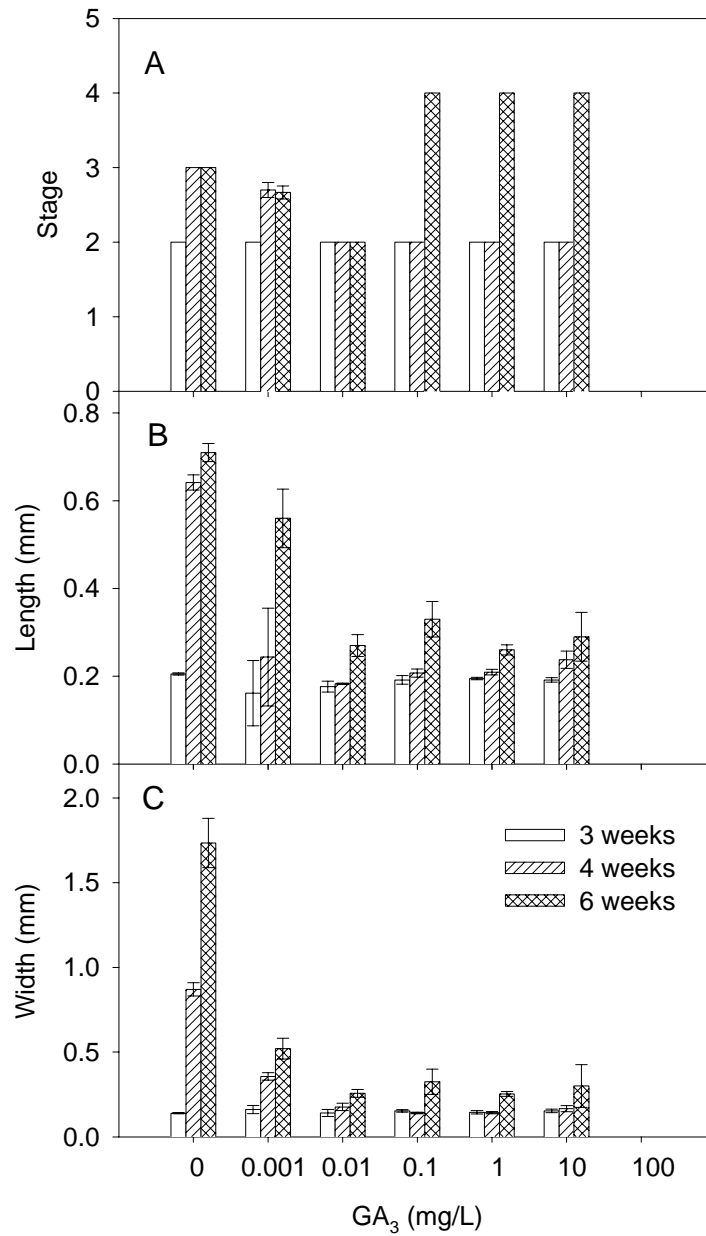


Fig. 8. Effects of GA₃ concentration on developmental stage (A), length (B) and width (C) of prothallia in *Adiantum tenerum* 'Scutum Roseum' cultured *in vitro*. Bars represent standard error of the mean.