

# 菊花莖頂培養<sup>1</sup>

許謙信<sup>2</sup>

## 摘 要

菊花0.2~0.5 mm之莖頂，於含NAA, kinetin及GA之MS培養基中培養，一個月後，莖頂可長成一或數個枝條，也有癒合組織之生成及不定芽之分化。培養基中含NAA 0.2 mg/l較0.02 mg/l者，癒合組織之生成較多；含kinetin 5.0或2.0 mg/l者，培植體直接長成枝條之比率及枝條生成之個數較0.5 mg/l者為多。NAA 0.02 mg/l及kinetin 2.0 mg/l之組合適合菊花莖頂培養生成較多枝條。GA對癒合組織之生成及枝條生成之比率及枝條生成之個數無明顯影響，但會促進莖之伸長。側芽之繼代培養中，NAA在0.1或1.0 mg/l，kinetin在1.0或10 mg/l，(NAA/kinetin為1或1/10)，GA濃度較低者(0.001, 0.01或0.1 mg/l)，能生成較多不定芽。

在5°C低溫或黑暗條件下，保存菊花側芽6個月，側芽生長緩慢，取出後放置於25°C，光照條件下，能迅速恢復生長，長成健全之枝條。是保存種源一個經濟有效之方法。

## 前 言

在園藝作物種苗生產上，已普遍利用莖頂培養技術，在短時間內繁殖大量營養系種苗<sup>(14)</sup>，尤其是高經濟價值之花卉及觀賞植物，如康乃馨<sup>(6)</sup>、非洲菊<sup>(8)</sup>、蘭花<sup>(3,16)</sup>等。而利用莖頂培養，配合病原菌及病毒之檢定，培育健康無病之母株，生產健康種苗提供農民栽培，控制病害之傳播，可以確保作物產量及品質<sup>(14)</sup>，例如馬鈴薯<sup>(2,3)</sup>，在本省園藝作物栽培之種苗生產，已實際廣泛應用。近年來，種源保存之重要性廣受重視，在以營養繁殖之作物種類，利用莖頂培養技術配合低溫貯存來保存重要種源是一經濟有效之方法<sup>(9)</sup>。

菊花組織培養繁殖之研究，國外已應用於商業種苗生產<sup>(13)</sup>，國內亦有以莖頂及花序為培植材料行組織培養繁殖之研究報告<sup>(1)</sup>。本試驗以本省目前栽培之菊花品種，進行莖頂培養之繁殖試驗，應用於新品種育成或引進時，快速大量繁殖種苗，建立健康種苗制度及重要種源之保存。

## 材料與方法

一、本試驗使用之培養基為MS培養基之基本鹽類配方<sup>(15)</sup>，另外還加入myo-inositol 100 mg/l, thiamine. HCl 1 mg/l, pyridoxin 0.5 mg/l, nicotinic acid 0.5 mg/l, glycine 2 mg/l及蔗糖30 mg/l。依試驗需要加入不同濃度之NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid), kinetin及GA<sub>3</sub> (gibberellic acid)等生長調節劑。pH調整為5.7後，培養基加入洋菜(Bacto) 8 mg/l，加熱溶解，分裝於2 cm×9 cm之圓形平底試管，每瓶裝入10 cc培養基，以鋁箔封口，用高壓殺菌釜於121°C，1.1 kg/cm<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 臺中區農業改良場研究報告第 0140 號。

<sup>2</sup> 臺中區農業改良場助理。

條件下殺菌15分鐘後，取出備用。本試驗操作用之器具均於酒精燈火焰上滅菌後備用。

#### 二、菊花莖頂培養：

採取在夜間照明，暗期中斷條件下行營養生長之菊花<sup>(5,12)</sup>，德國紅品種<sup>(7)</sup>(*Chrysanthemum morifolium* cv. Royal purple)之頂芽。除去大於5 mm之葉片後，以95%酒精浸漬20秒滅菌後，於無菌操作箱(Laminar air-flow cabinet)內取出風乾，在40倍之解剖顯微鏡下依序剝除包覆頂芽之各層小葉片，露出頂芽生長點後，切取0.2~0.5 mm之莖頂，包括生長點及1~2葉原體(圖一及圖二)，置於培養基上，光照強度為2,000 lux，光照時間每天14小時，日溫27°C，夜溫25°C條件下培養。

#### 三、莖頂培養菊花苗之健化：

將試管中培養之菊花小植株，切取1.5至3 cm長之枝條，基部沾覆NAA 1,000 ppm滑石粉劑，扦插於蛭石中，定時澆水，觀察其發根及生長情形。

#### 四、低溫冷藏保存種源：

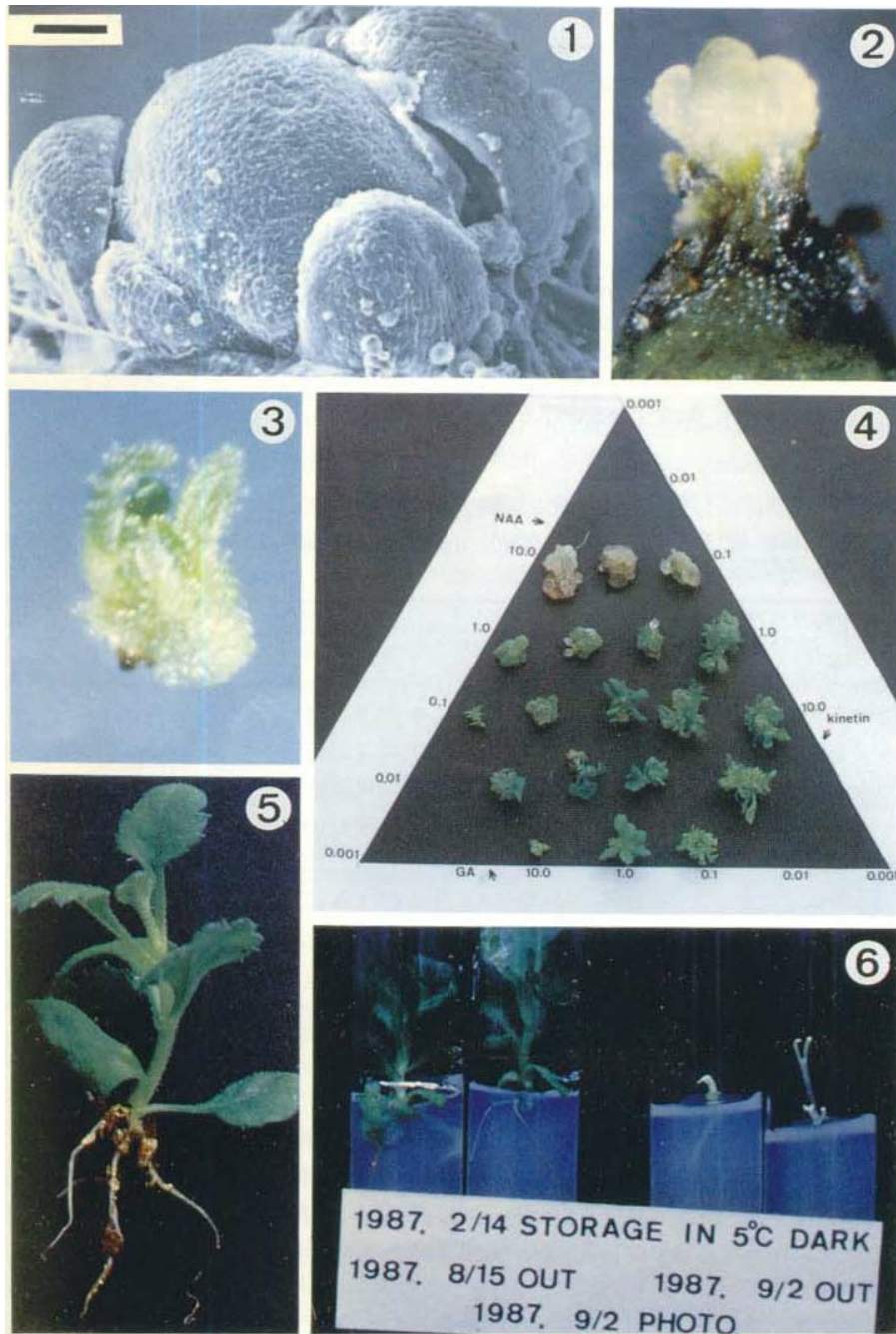
利用試管內培養之菊花幼株，切取含側芽之節位，切除葉片，置於不含生長調節劑之MS基本培養基中，放入5°C，黑暗條件下之冷藏櫃中，觀察菊花側芽在低溫保存下及以後之生長情形。

## 結果與討論

菊花葉片被覆絨毛，頂芽外被之新葉彼此緊密包覆，切取生長點進行培養，污染率極低。菊花之莖頂0.2~0.5 mm大小之生長點於培養基上培養二週後，即有3~6正常葉片長出，形成健全之枝條。枝條基部亦常伴隨有癒合組織之生成(圖三)。菊花莖頂培養之初期，有部份培植體為直接由芽體部位長成枝條，有的則先發生癒合組織，再由癒合組織分化不定芽。培養一個月後，其枝條生長或癒合組織之生成等形態上的變化依培養基中所含生長調節劑之成分與含量而異(表一)。對於癒合組織之生成，NAA有顯著之影響；NAA 0.2 mg/l處理較0.02 mg/l者，發生癒合組織之比率為高。在相同之NAA濃度下，癒合組織生成比率相近。GA在NAA低濃度(0.02 mg/l)下，會增加癒合組織發生之比率，而在NAA高濃度(0.2 mg/l)下則無明顯效果。對於培植體直接發生枝條生長之比率與每個培植體發生之枝條個數，NAA及kinetin之濃度同時發生影響，NAA 0.2 mg/l濃度下，12個培植體個數中，直接發生枝條之比率較0.02 mg/l為低，而較高之kinetin濃度5.0或2.0 mg/l發生枝條之比率較低濃度0.2 mg/l下為高。較高濃度之kinetin下，每個培植體發生之枝條個數比低濃度下為多，由此可知kinetin有助於枝條之發生，培養基中添加GA與否對於直接形成枝條之比率與發生之枝條個數則無明顯影響，但添加GA，會增加芽生長之速率，使莖平均長度較未添加者為長。

利用初次培養之幼植株側芽進行繼代培養，在濃度範圍更廣的情形下探討NAA, kinetin及GA對形態發生之影響(圖四)。由圖中可以看出kinetin與NAA濃度之比例對不定芽發生與癒合組織之生成明顯之影響。其中以NAA在0.1或1.0 mg/l，kinetin在1.0或10 mg/l，(NAA/Kinetin為1或1/10)，GA濃度較低者(0.001, 0.01或0.1 mg/l)能生成較多不定芽。Ben-Jacov和Langhans<sup>(10)</sup>及Earle和Langhans<sup>(12)</sup>曾利用菊花不同品種之莖頂進行微體繁殖，所得之結論，對於生長調節劑NAA、kinetin之適宜濃度與比例及本試驗使用德國紅品種之結果相近。試驗中亦曾以黃秀芳、白大將、月友<sup>(7)</sup>、冬王等品種進行試驗，亦獲致相近之結果。

Bhojwani和Razdan指出利用莖頂培養繁殖種苗，依荷爾蒙之調節，培養產生大量之癒合組織，再改變培養基，促使分化芽體，雖可得大量之不定芽，但其發生變異之可能性較大<sup>(11)</sup>，故以無性繁殖種苗為目的者，應以直接發生枝條之情形能得到較純正之種苗。本試驗亦發現癒合組織再分化不定芽之現象，但在實用上應可能以芽體直接生長枝條者，較能符合無性繁



- 圖一 菊花頂芽掃描式電子顯微鏡觀察。20  $\mu\text{m}$  (圖片左上方黑線長度)
- 圖二 菊花莖頂在解剖顯微鏡下觀察，包括生長點及三葉原體。40  $\mu\text{m}$
- 圖三 菊花莖頂培養二週後之發育。1.5 mm
- 圖四 菊花側芽培養在不同生長調節劑組合下之生長情形比較。30 mm
- 圖五 菊花莖頂培養幼苗扦插一週後，不定根之發育。3 mm
- 圖六 菊花側芽在 5°C 低溫黑暗下保存半年後，置於 25°C，光照條件下之生長情形。10 mm

- Fig. 1. Scanning electron photomicrograph of shoot tip of *Chrysanthemum morifolium* cv. Royal purple. scale bar=20  $\mu$ m
- Fig. 2. Microscopic observation of *C. morifolium* cv. Royal purple scale bar=40  $\mu$ m
- Fig. 3. Shoot developed from shoot tip explant of *C. morifolium* cv. Royal purple after 2 weeks incubation. scale bar=1.5 mm
- Fig. 4. Callus and shoots developed from axillary buds of *C. morifolium* cv. Royal purple on media with combination of plant growth regulators after 3 weeks incubation. scale bar=30 mm
- Fig. 5. Cutting from plantlet in shoot tip culture of *C. morifolium* cv. Royal purple after 2 week. scale bar=3 mm
- Fig. 6. Axillary buds of *C. morifolium* cv. Royal purple.  
 left: in 5 $^{\circ}$ C dark condition for six months, and then growing in 25 $^{\circ}$ C lighting condition for two weeks.  
 right: in 5 $^{\circ}$ C dark condition for 6 and half momths. scale bar=10 mm

表一 植物生長調節劑對菊花莖頂培養之影響

Table 1. Effects of NAA, kinetin (KN), and GA in shoot tip culture of *Chrysanthemum morifolium* cv. Royal purple

NAA	KN (mg/l)	GA	shoot formation (%) <sup>1</sup>	callus formation (%) <sup>2</sup>	No. of shoot explant	length of shoot (mm)
0.2	0.5	0	0.36 (4/11)	0.36 (4/11)	1.5	7.4
0.2	2.0	0	0.42 (5/12)	0.42 (5/12)	2.4	5.5
0.2	5.0	0	0.50 (6/12)	0.42 (5/12)	1.3	6.1
0.2	2.0	5	0.50 (6/12)	0.33 (4/12)	2.8	6.6
0.02	0.5	0	0.58 (7/12)	0.17 (2/12)	1.4	4.0
0.02	2.0	0	0.67 (8/12)	0.08 (1/12)	2.0	4.2
0.02	5.0	0	0.73 (8/11)	0.09 (1/11)	2.1	4.5
0.02	2.0	5	0.42 (5/12)	0.42 (5/12)	1.8	5.2

<sup>1</sup> explants formed shoot/No. of explant in each treatment.

<sup>2</sup> explant formed callus/No. of explant in each treatment.

殖之目的。

試管中莖頂培養之菊花幼苗使用NAA 1000 ppm滑石粉劑，以蛭石為介質，扦插一週後，即可長出不定根(圖五)，然後移植於3寸盆中，可以很快長成正常之小植株。菊花幼苗扦插之成活率高達90%以上，勿需於培養試管中誘發根群，可節省試管內發根移植之手續。

菊花側芽於5 $^{\circ}$ C黑暗條件下培養，經過半年後取出，在5 $^{\circ}$ C低溫條件下，芽之生長極為緩慢，舊有組織雖仍呈現綠色，但新生之部位呈白化現象，移出於25 $^{\circ}$ C光照條件下，能迅速恢復生長，二週內即長成約2 cm之小植株(圖六)。Bajaj曾指出利用低溫冷藏之方法來保存無性繁殖作物之種源，是一經濟而有效之方法<sup>(9)</sup>，菊花為本省最大宗之花卉作物，但使用之品種，多由日本引進，適應性優良之舊有品種常因新品種之引進而流失。為發展本省菊花產業，育成臺灣自有優良品種為重要之工作，搜集並保存種源為育種之基礎。本試驗結果發現利用低溫貯藏保存菊花種源是一簡便之方法，對於更長期之保存方法及長期貯存所發生之遺傳及生理上的變化，則需更進一步之探討。

## 參考文獻

1. 王淑娥、馬溯軒 1978 菊花組織培養繁殖之研究 中華農學會報 新101:64-73。
2. 王博仁 1973 生長點培養防治馬鈴薯毒素病 豐年 23(19):18-19。
3. 王博仁 1984 蘭花的繁殖法 臺灣省農業試驗所特刊第14號 p. 73-108。
4. 王博仁、盧耀村 1973 染毒素病馬鈴薯組織培養治療法 生物科學 2(5):19-24。
5. 林 哖 1984 菊花 臺灣農家要覽 p. 1069-1078. 豐年社。
6. 林雨森 1984 本省康乃馨育苗栽培之探討 臺灣省農業試驗所特刊第14號 p. 183-190。
7. 黃敏展 1987 臺灣花卉彩色圖鑑 255 pp. 臺灣區花卉發展協會出版。
8. 黃敏展、朱建鏞 1987 非洲菊種苗之微體繁殖 花卉改進研討會專集 p. 123-129. 臺灣省桃園區農業改良場發行。
9. Bajaj, Y. P. S. 1986. *In Vitro* preservation of genetic resources: techniques and problems. in Nuclear Techniques and *In Vitro* Culture for Plant Improvement. p. 43-57. International Atomic Energy Agency. Vienna.
10. Ben-Jaacov, J., and R. W. Langhans. 1972. Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem-tip proliferation. HortSci. 7: 289-290.
11. Bhojwani, S. S., and M. K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. p. 313-372. Elsevier Science Publishing Co. New York.
12. Earle, E. D., and R. W. Langhans. 1974. Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 128-131.
13. Machin, B., and N. Scopes. 1978. Chrysanthemums Year-Round Growing 233 pp. Blandford Press. London.
14. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25: 133-166.
15. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
16. Rao, A. N. 1977. Tissue culture in the orchid industry. in Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (ed. by Reinert, J., and Y. P. S. Bajaj) p. 616-646. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

# Shoot Tip Culture of *Chrysanthemum morifolium*<sup>1</sup>

Chian-Shinn Sheu<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Shoot tips (0.2-0.5 mm) of *Chrysanthemum morifolium* cv. Royal purple were cultured on MS media with different combinations of NAA, kinetin and GA. shoots and callus were developed 4 weeks after the incubation. In the medium containing 0.2 mg/l of NAA produced more callus than containing 0.02 mg/l of NAA. In the medium containing 5.0 or 2.0 mg/l of kinetin produced more shoot than containing 0.5 mg/l of kinetin under the same level of NAA concentration. It was found that MS medium containing 0.02 mg/l NAA and 2.0 mg/l of kinetin was suitable for shoot tip culture of *Chrysanthemum morifolium* cv. Royal purple. It had no difference of containing 5.0 mg/l GA or not on the development of callus and/or adventitious buds formation was noticed. However, GA promoted the shoot elongation.

Axillary bud grew slowly under 5°C and dark condition. It resumed active growth after it was removed to 25°C under light condition after six months of low temperature preservation.

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0140 from Taichung DAIS.

<sup>2</sup> Assistant of Taichung DAIS.