

花卉組織培養實用技術手冊—玫瑰花之組織培養

陳榮五、黃勝忠、許謙信、陳彥睿 主編

有關玫瑰花組織培養之實用技術可分為胚培養和微體繁殖兩個項目，茲分述如下：

一、胚培養

胚培養是利用組織培養技術的有性繁殖方法。一般胚培養最常利用於作物育種時，當胚珠已受精，但卻不能發育成成熟的種子的狀況，將未成熟胚超育成植株。而玫瑰花種子由於具內種皮及休眠性，因此需經低溫濕藏打破休眠後，種子才能順利發芽。根據前人研究報告指出，玫瑰花種子，播種六個月後的發芽率僅67%，有些種子甚且在播種後數年才會發芽；若利用胚培養技術，在育種上，可縮短育種時間。

胚培養之無菌操作程序簡述如下：

從成熟果實取出的種子清水洗淨後，經漂白粉濾液（5公克漂白粉加水100毫升攪拌後過濾）2~8小時，以無菌水沖洗3次後，再浸漬於無菌水中12~24小時以軟化種皮，去外種皮（硬殼）。然後再浸漬無菌水，使內種皮易於剝離。經12~24小時後，去內種皮並將胚取出培養。在剝除內種皮時，一定要非常小心，否則胚受傷後，將影響其生長與發育。胚培養到第一片真葉展開後，即可移出瓶外假植健化。移出瓶外2個月後即可定植田間等待開花評選。

胚培養的培養基成分簡單，可利用蘭花播種用的Knudson C配方培養之(如下表)：

Knudson C配方

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500 mg/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg/l
K_2HPO_4	250 mg/l
Fe-tratrate	2 mg/l
pH	5.7
Sucrose	30 g/l
Agar	8 g/l

二、微體繁殖

玫瑰花微體繁殖早在1970年即已開始進行，然而由於繁殖的倍率一直不能提高，以及瓶苗移出瓶外的成活率不高，故一直不能進行商業化生產。近年來有關克服上述困難的技術，頗有成就。因此玫瑰花微體繁殖已可以量化生產，事實上台灣玫瑰花種苗，也已經有少部分是組織培養苗。茲將其操作方法，敘述如下：

1. 初代培養

選擇適宜切花採收成熟度的枝條，經去葉、去刺後，選擇腋芽飽滿的節，並將每一節剪成腋芽在莖段中央的單節插穗。插穗經5倍液的漂白水（即含1% NaOCl）滅菌10分鐘後，立即用無菌水沖洗3次，然後扦插於固體培養基（如下表），使腋芽剛好在培養基的界面上，然後置於3,000 lux的光照強度下。經3~5週後，即可取下萌發的新梢，做為繼代培養的材料。

玫瑰花微體繁殖配方

無機鹽類成分(mg/l)		有機物質成分(mg/l)		生長調節物質(mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650	Myo-inositol	100	(1)初化培養	
KNO ₃	1900	Thiamine-HCl	0.1	Benzyladenine	1~10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Nicotinic acid	0.5	NAA	0.01~0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Pyridoxin HCl	0.5		
KH ₂ PO ₄	170	Glycine	2.0	(2)繼代培養	
Na ₂ EDTA	37.3			NAA	0.01~0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8				
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3			(3)發根培養	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6			NAA	0.1~1.0
H ₃ BO ₃	6.2			或IBA	0.3~3.0
KI	0.83				
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25				
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025				
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025				

在初代培養過程中，最常見的問題是污染，其次是新梢黃葉脫落。控制污染最好的方法是選擇室內栽培的玫瑰花枝條為材料。至於容易葉片黃化脫落的品種，則宜適量的提高培養基中Benzyladenine的濃度，以及降低培養的光強度。凡以有黃化葉片的新梢做為繼代培養的材料，都不會有好的結果，此適時的繼代培養非常重要。

2. 繼代培養

爲了提高瓶苗的生長和繁殖的速率，繼代培養宜採用液體培養或半固體培養基或二相培養基。因爲固體培養基限制了培養基的流動，而影響了培植體的生長。然以液體培養基又常會使培植體組織變成水浸狀或腐爛褐變。利用半固體培養基，即將培養基中的洋菜粉減量，可以促進培植體生長。或先配製好固體培養基，再將殺菌且已冷卻的培養基倒在固體培養基上，製成二相培養基來培養效果更好。然而要注意的是，需要相當大的培植體才可利用二相培養基，否則培植體投入液體培養基中，一樣會有水浸狀發生。利用液體培養基培養，培植體生長速度最快，但操作的技術層次也最高。選擇相當大小的培植體，並將其葉表水分吸乾、風乾後，利用培植體葉片本身的表面張力，可以將培植體漂浮在液體培養基上一段時間。在經2~3週後，雖培植體略爲下沉，然此時培植體的下位葉反捲呈拋錨狀，因使培植體大部分仍支撐在液面上，此種培養方法稱爲「浮耕」。初學者利用浮耕方法培養時，培養基之深度不宜太深，熟練操作後，可增加培養基之深度。若操作上仍有技術上的困難，可以退而求其次，以一代固體培養，一代液體培養交替。或者配製固體培養基後，其上再倒入已滅菌之液體培養基，以這種二相培養基對培植體的生長速度都有相當的改善。

另外在玫瑰花繼代培養的操作中，還有一項與一般作物不同的操作。通常在繼代培養時，操作員常將培植體新長出的新梢切下，培養於新的培養基上，而原來培植體基部肥大成塊的組織丟棄不同。然而玫瑰花之培植體，新梢上的腋芽不太會萌發，而基部肥大的組織塊，常會長出新梢，其生長模式就如同田間的植株在長筍芽（即基部芽Basal shoots）一樣。因此這種基部肥大的組織塊，除非已遭污染，否則應繼續培養。

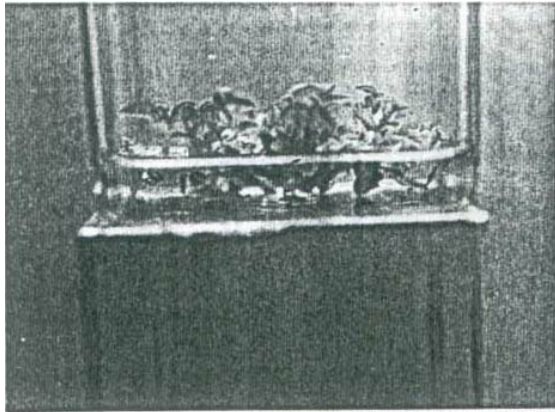
繼代培養的培養基，除了甲苯胺(Benzyladenine)濃度調整到2~4 mg/l外，其餘成分與初代培養培養基相同。培養的光強度則控制在800~3,000 lux。較強的光照可產生較強壯的枝梢，但繁殖率較低。因此前數代的繼代培養，可用較低光度培養，但準備移出瓶外時，則宜逐漸提高光強度爲宜。

3. 瓶內發根與瓶外發根

玫瑰花品種繁多，瓶內發根時，品種差異性很大。一般品種，發根的條件為低鹽濃度、高糖度、或將糖與無機鹽類濃度之比例提高，以及低光度。故移植前的培養基常用1/4~1/2濃度的MS無機鹽配方，加入30~60 g/l的蔗糖，另再加入0.1~3.0 mg/l濃度的IBA或NAA。培養的光強度則為1,000 lux。瓶內發根的小苗移至田間之前，還必需在高濕的環境（可利用噴霧扦插床）假植馴化1個月。

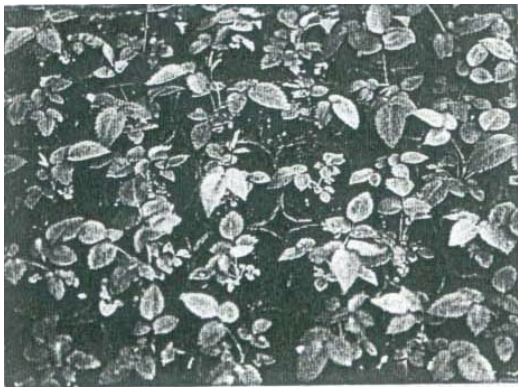
為了降低生產成本，玫瑰花培植體可以直接將繼代培養的枝梢沾發根劑扦插於噴霧扦插床，發根成活後即可定植於一般低濕度且高光度的環境。但在直接從瓶內取插穗時，原來的繼代培養必需是培養在3,000 lux~5,000 lux的光照環境，而且最後一次繼代培養之培養基，宜將蔗糖的含量減半；也可以在光期培養時，每2小時添加二氧化碳，將培養環境中二氧化碳的濃度提高到1,000 ppm都有助於微體插穗直接扦插之成活率。

玫瑰花組織培養



↑利用液體培養基玫瑰之繼代培養

↓玫瑰新梢瓶內誘導發根

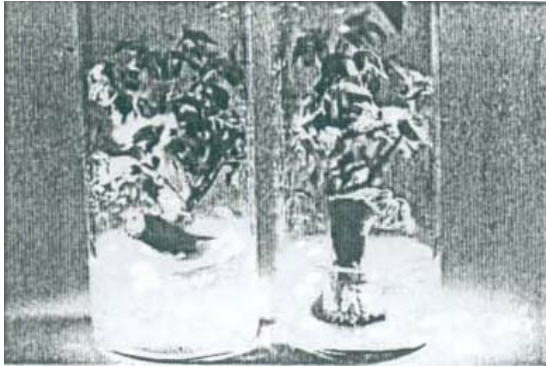


↑發育長成待售之玫瑰苗

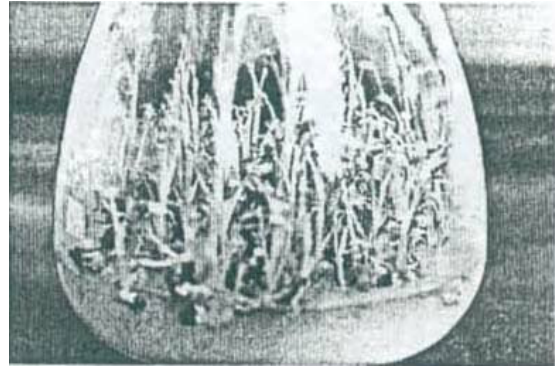


組織培養苗移出瓶外時，需噴霧插床之設備 →

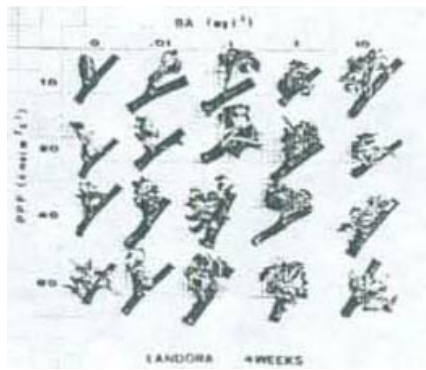
玫瑰花組織培養



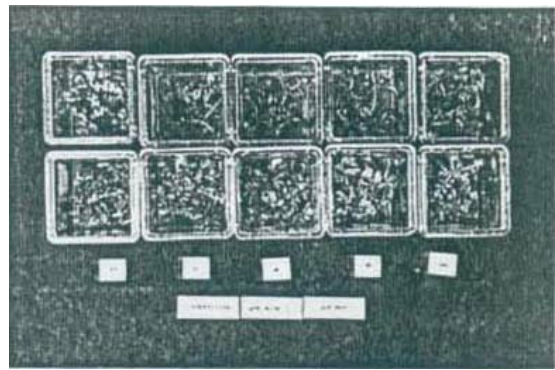
玫瑰枝條無菌扦插培養，長出新梢。



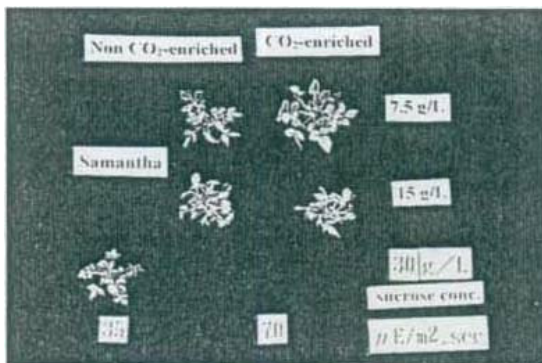
快速增殖的玫瑰新梢。



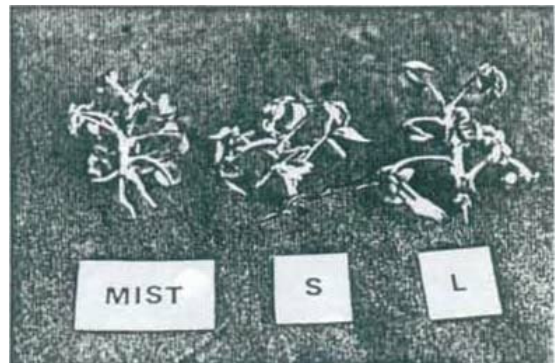
新種黃初代培養四週，甲苯胺(BA)和光強度對新梢發育之影響，甲苯胺濃度1~10 mg/l，光強度10~40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ sec}$ ($1 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ se} \doteq 78 \text{ lux}$)。



培養基物理性質與甲苯胺(BA)對玫瑰花繼代培養的影響；下行爲液體培養基；甲苯胺濃度2~4 mg/l爲宜。



糖、光和二氧化碳對玫瑰花培植體生長之影響；利用提高光和施用二氧化碳培養，一定要先降低蔗糖濃度。



瓶外發根(左)與瓶內在固體培養基(S)或液體培養基(L)發根情形。