光和二氧化碳對玫瑰花組織培養培殖體生長的影響(1)

朱建鏞　王美陽(2)

（接受刊載日期：中華民國84年5月20日）

摘要： 初代培養以單節培殖體培養在以MS配方，另添加0.01mg／l之NAA（naphthalene acetic acid），和1-10mg／l之BA（benzyladenine），並培養在80 μ mol／㎡sec光照強度下4-5週，可以得到最好的枝梢供繼代培養。在繼代培養中，'Pitica' 培殖體在40 μ mol／㎡sec的光照下乾鮮重生長最好，但繁殖率則以在20 μ mol／㎡sec的光照下最高。'Samantha' 在25 μ mol／㎡sec光照環境下，鮮重生長量及繁殖率最高。'Landora' 培殖體則以在40 μ mol／㎡sec的光照下鮮重生長量最高。容器內二氧化碳濃度隨照光時間增加而減少。然而以含糖培養基培養四週後，在密封的容器中大量累積二氧化碳；在光期開始時，濃度高達8877ppm，而在光期結束時仍高達6041ppm。生長箱每天通入二氧化碳兩次，使箱內二氧化碳濃度爲1000ppm，可以增加 'Samantha' 培殖體之乾物重。

關鍵詞：玫瑰花、微體繁殖

前　言

玫瑰花微體繁殖之研究始於1970年，至今也已有不少試驗培養成功之報告，然而卻未見有大量的微體繁殖玫瑰花苗出售。因爲玫瑰花品種繁多，不只曾被研究的品種有限（Valles & Boxus 1987; Douglas et al. 1989），而且大部份報告多著重於細胞分裂素（Cytokinin）對枝條增殖的影響（Mederos & Enriquez 1987; Campos & Pais 1990），對於培養的物理環境較少被注意，以致於繁殖效率很低，或瓶苗移出的成活率不穩定。

在前人有關玫瑰組織培養的研究中，培養的光強度度有很大的差異，Bressan et al.（1982）以雜種茶玫瑰 'Improved Blaze' 單節培養的光量爲1.5klux（約19 μ mol／㎡sec）。Douglas et al.（1989）則以50 μ mol／㎡sec培養中輪多花性玫瑰花及迷你玫瑰花，二者差異很大。

微體繁殖必需保持在無菌狀態下進行，因此培殖體的生存空間被侷限在幾近封閉的培養容器內。由於容器內的空氣與外界大氣之交換有限，培殖體無法充分進行光合作用，亦即無法進行光自營性（Photoautotrophy）生長，而需

1）本試驗承蒙行政院農業委員會81農建-12.1-糧67(2)計畫補助經費，謹申謝忱。

2）中興大學園藝系副教授及前研究生。

仰賴培養基的糖，做爲生存與生長能源。因此在植物生理上屬於混營性（Mixotrophy）或異營性（Heterotrophy）生長（Kozai, 1991）。Falque et al.（1991）在試管內培養葡萄（*Vitis rupestris* var. du Lot），發現在明期初期，二氧化碳濃度高達900ppm左右，但不到二小時二氧化碳就降至100ppm以下，由於二氧化碳不足，光合作用於是被抑制。

本研究以台灣三種玫瑰花切花品種爲材料，探討培養光環境和二氧化碳濃度對微體繁殖之生產效率之影響。

材料與方法

一、試驗材料

本試驗所使用的玫瑰花插穗，採自於中興大學園藝系網室中之玫瑰植株。試驗所用的三個品種分別爲Pitica、Samantha，以及Landora。

二、試驗方法

以MS（Murashige and Skoog, 1962）的商業配方（Sigma Chemical Missouri, U.S.A.）爲基本培養基，每公升培養基中除了含4.4克商業配方，另外再添加30g／l的蔗糖、0.01mg／l的萘乙酸（Naphthalene acetic acid, NAA）以及1.0mg／l的甲苯胺（Benzyladenine, BA）。培養基以8g／l洋菜（Difico Bacto-Agar）固化。所有的配方先將pH值調整於5.7±0.1，再放入高壓殺菌釜以高溫（121℃）滅菌15分鐘。培養室及生長箱的溫度控制在25±1℃。光合作用光子流（Photosynthetic photon flux, PPF）除非試驗中特別提及以外，一般控制在40±5 μ mol／㎡sec。所使用的光源爲台灣旭光牌冷白螢光燈（FL 40 D／38），光週期爲明期16小時。

㈠初代培養

培殖體選自花蕾完全著色的切花枝條，切取成腋芽恰好在莖段中央的單節莖段，作爲培養的材料。材料先以1%（v／v）次氯酸鈉溶液消毒10分鐘，再以無菌水淋洗三次，然後立即進行無菌培養（Chu et al, 1992）

初代培養以直徑2.5㎝、長度14.5㎝的試管爲容器。每瓶裝入10ml培養基後，瓶口以雙層鋁箔紙加蓋，每試管培養一個植體。在比較培養基中BA含量與培養的光環境對腋芽生長的交互影響中，培養基中BA的濃度分別爲0、0.01、0.1、1.0或10mg／l，而培養的光照強度則分別爲10±2、20±3、40±5或80±9 μ mol／㎡sec

㈡繼代培養

以初代單節培養所得到的無菌枝梢，作爲繼代培養殖體的來源。並以方型容器GA-7（Magenta Corporation, Chicago, IL; 3"×3"×4"／L×W×H）爲培養容器。每瓶裝入30ml培養基，每個容器培養四個培殖體。培養基分別含0、2、4、8或16mg／l等不同濃度BA的培養基中，並置於光強度爲40 μ mol／㎡sec的環境下培養。另以含4mg／l BA的培養基，在20、40或60 μ mol／㎡sec的光環境下培養 'Pitica' 與 'Landora' 枝梢；或在25、50或75 μ mol／㎡sec的光環境下培養Samantha枝梢。又在50 μ mol／㎡sec下培養 'Samantha' 的處理，部分容器的瓶口先用羊毛脂封口再用雙層具黏性之塑膠帶密封。經四週培養後，以氣相層分析儀（Hitachi 263-30型）測定在光照下培養容器內二氧化碳和乙烯濃度的變化。另外取 'Samantha' 和 'Landora' 0.5-1公分長之經繼代培養的枝梢，培養在不含糖或糖濃度爲30g／l的培養基上。在明期時，利用二氧化碳偵測器（Horiba APBA-250 E）將培養環境的二氧化碳濃度控制在1000±100 ppm，再直接以幫浦將此氣體或一般環境

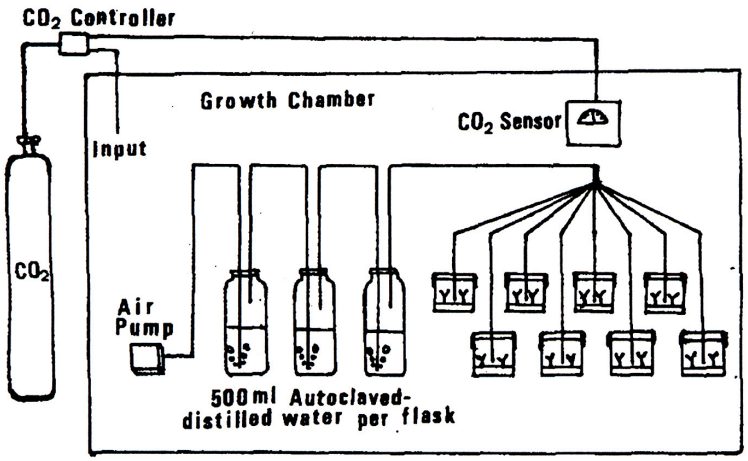


圖1. 瓶內直接通入CO_2的配置圖
Fig. 1. Schematic diagram of the experimental setup for CO_2 enrichment.

的空氣打入GA-7容器內，氣體流量控制爲350ml／min／vessel。注入的氣體先經過3瓶含500ml無菌水以過濾雜菌（圖1）。

初代培養與繼代培養的週期均爲四星期，試驗調查的項目有鮮重、乾重以及繁殖率。新梢的長度小於0.5公分者不予計算，大於2公分者，則切成爲2段培殖體。

三、試驗設計與統計分析

試驗設計全部採用完全逢機設計（Complete Randomized Design），試驗每處理8～12個重複，每一試驗重覆進行3次，試驗結果進行變方分析與最小差異顯著性測驗（Fisher's Least Significant Difference, LSD）檢查其5%的顯著性。

結　果

一、初代培養

(一)BA濃度和光量對腋芽生長的影響

玫瑰花單節培養其腋芽的發育受培養基中BA濃度與培養光強度的影響。'Pitica' 'Samantha' 以及 'Landora' 對BA濃度反應很相似。在BA濃度爲0或0.01mg／l時鮮重最小，隨著BA濃度增加，鮮重也逐漸增加，當BA濃度增至1mg／l時，'Pitica' 和 'Landora' 由單節培殖體發育之新梢其鮮重與乾重不再增加。而 'Samantha' 則在高光強度下（80 μ mol／m^2sec）新梢的鮮重與乾重仍可繼續增加，但在低光度下（20 μ mol／m^2sec）新梢的生長反受到限制（圖2、3）。雖然新梢的生長在高光強度下培養光度下，生長快速，但葉片黃化也較快。不過在含高濃度BA的培養基生長，可以抑制玫瑰花枝梢因高光而產生的黃化現象。又當培養基含有較高濃度的BA時，能促進玫瑰主芽兩旁的副芽發育，而提高增殖率如 'Pitica' 與 'Landora' 在BA濃度0.1mg／l以上，而 'Samantha' BA濃度達到1mg／l，以上才能促進副芽發育（圖4）。但在含高

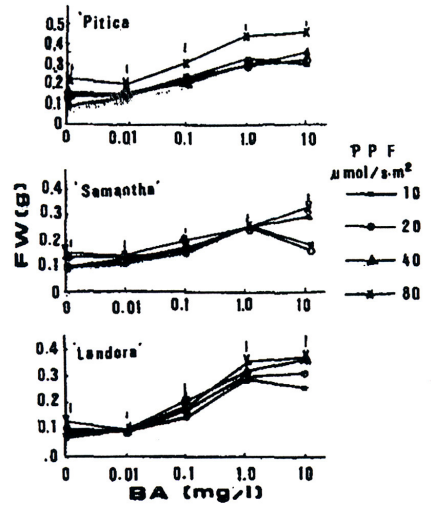


圖2. BA濃度和光強度對 'Pitica', 'Samantha' 和 'Landora' 單節培養新梢鮮重的影響

Fig. 2. Effect of BA concentration and PPFD on the fresh weight of new shoots from nodal explants of 'Pitica', 'Samantha' and 'Landora', respectively. The vertical bars means the LSD at 5%.

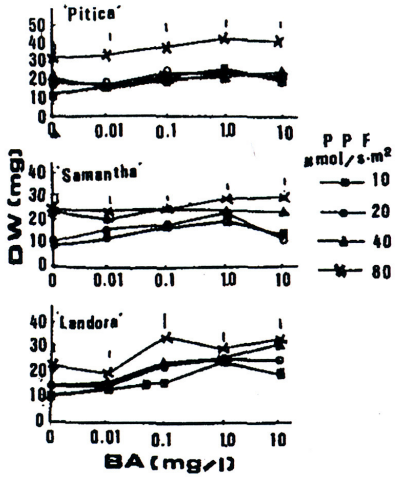


圖3. BA濃度和光強度對 'Pitica', 'Samantha' 'Landora' 單節培養新梢乾重的影響

Fig. 3. Effect of BA concentration and PPFD on the dry weight of new shoots from nodal explants of 'Pitica', 'Samantha' an 'Landora', respectively. The vertical bars means the LSD at 5%.

濃度BA之培養基所發育的芽體數雖較多，但新梢長度較短，葉色也較淺。

二、繼代培養

㈠BA濃度對培殖體的影響

將 'Pitica' 培殖體培養在不含BA時之培養基，培殖體會死亡。若培養基濃度BA濃度增加爲2、4、8或16mg／l時，則在不同培養基上的各培殖體之鮮重與乾重並無差異。但培殖體的繁殖率則以培養在含BA 8與16mg／l培養基中最高，爲1.9倍（表1）。但當培養基中BA濃度在4mg／l以上時葉片有葉身成線形的畸形現象。

'Samantha' 培養在含16mg／l之培養基，其鮮重和乾重大於培養於不含或僅含BA 2mg／l的培養基。但培養在含BA 4-16mg／l培養基時，培殖體的鮮重則沒有差異。在繁殖率則以BA濃度爲8與16mg／l最佳，分別爲2.1及2.4倍（表1）。但BA濃度大於8mg／l時，葉片也有呈成線形的畸形現象。'Landora' 培殖體在不含BA的培養基，植株全部死亡。而BA濃度爲2、4、8或16mg／l時，在鮮重、乾重及繁殖率上都無差異（表1）。但在含BA 16mg／l培養基生長的培殖體，葉片呈現皺縮變小的畸形現象。

㈡光強度對培殖體生長的影響

'Pitica' 培殖體培養在40 μmol／㎡sec光度下之培殖體，其鮮重與乾重皆比培養在培養在60 μmol／㎡sec光度下之培殖體重。而培養在20 μmol／㎡sec光度下培殖體的繁殖率最高，每一次繼代培養培植體繁殖1.2倍。但因培殖體較小，故其乾重反而最輕。'Samantha' 培殖體的鮮重生長量

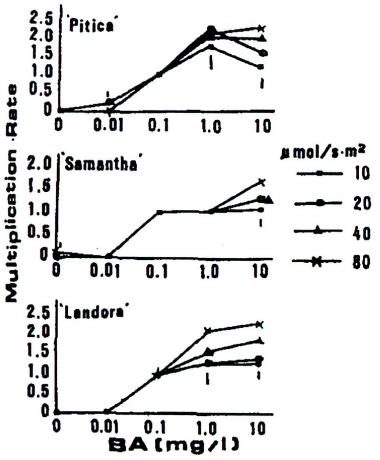


圖4. BA濃度和光強度對 'Pitica', 'Samantha' 和 'Landora' 單節培養繁殖率的影響

Fig. 4. Effect of BA concentration and PPFD on the multiplication rate of nodal explants of 'Pitica', 'Samantha' and 'Landora', respectively. The vertical bars means the LSD at 5%.

以在25 μ mol／㎡sec光量下最重好，且繁殖倍數最高爲1.7倍。'Landora' 在20、40、60 μ mol／㎡sec三種光量下培養，繁殖率相同，唯鮮重生長生長量以培養在40 μ mol／㎡sec者最高（表2）。

㈢培養容器內二氧化碳之消長

培殖體生長在含糖培養基四週後，密封的GA-7容器累積大量的二氧化碳。在明期開始時，二氧化碳濃度高達8877ppm，而後隨照光的時間增加，而容器內二氧化碳濃度下降。但在暗期開始時，二氧化碳濃度仍高達6041ppm。若GA-7容器不密封，在明期開始時，二氧化碳濃度爲894ppm，在照光後第二小時迅速降至281ppm，在第四小時二氧化碳濃度降至192ppm，且濃度維持在此平衡點不再變化（圖5）。至於在不含糖的培養基培養者，在密封的GA-7瓶，明期開始時，二氧化碳濃度高達1069ppm，而在照光後8小時濃度降至207ppm，之後二氧化碳濃度維持平衡。至於在不密封的GA-7瓶，明期開始時，二氧化碳累積濃度約爲678ppm，照光後二氧化碳濃度快速下降，在照光後第二小時降至144ppm且維持平衡（圖5）。

㈣添加二氧化碳與含糖培養基對培殖體生長的影響

'Samantha' 培殖體直接以幫浦將空氣或1000ppm的二氧化碳打入GA-7瓶內，結果二者在鮮重上並沒有差異，但乾重和乾鮮重比值以打入二氧化碳者較大（表3）。以此方式在光期通入二氧化碳，培殖體下位葉也有早期黃化的問題。

'Landora' 培殖體，不論是否添加二氧化碳以及培養基內是否有蔗糖，其鮮重的生長量並無顯著差異。然而培養在含糖培養基者，其乾重比培養在無糖的培養者爲重。然而培殖體之乾鮮重比，則以培養在生長箱內添加二氧化碳且培養基含糖者最高，可達到0.14；但枝梢的下位葉有明顯乾枯情形。培養環境不添加二氧化碳但培養基含糖者，培殖體的乾鮮重比重爲0.13。培養在添加二氧化碳的環境，但培養基不含糖者，其培殖體的乾鮮重比最小（表4）。

討　論

前人研究中在討論培養的光強度對腋芽發育的影響時，並沒有注意到Cytokinin與光強度間有交互影響。試驗結果顯示：培養基的BA含量在1mg／l以下時，'Pitica' 和 'Samanha' 培植體在高光環境下培養，新梢葉片容易黃化落葉。然而當培養基的BA含量提高到1-10mg／l時，

表1. BA濃度對培殖體繼代培養四週後的影響

Table 1. Effect of BA concentration and medium phase on the growth of 'Pitica' explants subcultured for 4 weeks.

BA cone (mg/l)	Fresh Weight (mg)	Dry Weight (mg)	Multiplication (No./Explant)
	'Pitica'		
0	88b*	14b	0.0c
2	206a	21a	1.0b
4	194a	21a	1.0b
8	206a	22a	1.9a
16	181a	19a	1.9a
	'Samantha'		
0	169c	34bc	0.8d
2	269b	31c	1.4c
4	333ab	42ab	2.0b
8	338ab	39abc	2.1ab
16	363a	43a	2.4a
	'Landora'		
0	125b	17b	0.0b
2	267a	29a	1.0a
4	263a	24ab	1.0a
8	267a	28a	1.0a
16	279a	29a	1.0a

*Means with the same letter are not significantly different by LSD at 5% level

表2. 光量對玫瑰花培殖體繼代培養四週後的影響

Table 2. Effect of PPFD on growth of rose explants subcultured for 4 weeks.

PPFD (μmol/m^{2}sec)	Fresh Weight (FW mg)	Dry Weight (DW mg)	Multiplication (No./Explant)
	'Pitica'		
20	175b	19c	1.2a
40	198a	23a	0.9b
60	159c	21b	0.8b
	'Samantha'		
25	294a*	38a	1.7a
50	247b	37a	1.3b
75	243c	40a	1.3b
	'Landora'		
20	240ab	25a	0.8a
40	255a	28a	0.8a
60	225b	27a	0.8a

*Means with the same letter are not significantly different by LSD test at 5% level

表3. 二氧化碳對'Samantha'培殖體培養四週後的影響

Table 3. Effect of CO_2 enerichment on the growth of 'Samantha' explants subcultured for 4 weeks.

Parameter	Air	CO_2
Fresh Weight (FW mg)	142a*	143a
Dry Weight (DW mg)	19b	23a
FW/DW	0.14b	0.16a

*Means with the same letter are not significantly different by LSD test at 5% level

Table 4. Effect of CO_2 enrichment and sucrose on the growth of 'Landora' explants subcultured for 4 weeks.

	+Sucrose		-Sucrose	
	Air	CO_2	Air	CO_2
Fresh Weight (FW mg)	317a*	321a	309a	309a
Dry Weight (DW mg)	40a	46a	21b	26b
FW/DW	0.13b	0.14a	0.07d	0.09c

*Means with the same letter are not significantly different by LSD test at 5% level.

培殖體之繁殖率很顯著的會因提高培養的光強度而增加（圖4）。因此玫瑰花單節培養以培養基BA的含量提高到1-10mg／1時，且在高光度下培養較爲有利。

在繼代培養方面，Davies（1980）發現：'Pauls Lemon Pillar'在較高光度（1000 lux，約13 μmol／m²sec）下瓶苗的葉片較大，但繁殖率比低光度（400 lux，約5 μmol／m²sec）小。Bressan et al.（1982）則發現 'Improved Blaze' 在17與66 μmol／m²sec光量環境下繁殖率相等，但後者有許多老化的葉片。

在本試驗繼代培養中也發現相同的結果，在高光強度下培養，非但不能如初代培養能提高繁殖率，反而有加速培植體老化的現象。換言之，繼代培養所需的適當光度較初代培養的低，可見玫瑰培殖體對環境的馴化反應很快。

瓶內培養的植株在過去被認爲是異營植物（Pierik 1987），但事實上瓶內的綠色植物在適當的環境下仍有光合作用的能力（Galzy and Compan, 1992），例如馬鈴薯在400 μmol／m² sec的光照環境下，並將栽培環境的二氧化碳濃度維持在500-3000ppm，則瓶苗能行光自營生長（Kozai et al. 1988）。本試驗結果發現：容器內的二氧化碳濃度在明期開始後逐漸下降（圖五），可以證明培殖體有光合作用的能力。又Woltering（1990）也曾提到：若在15 μmol／m²

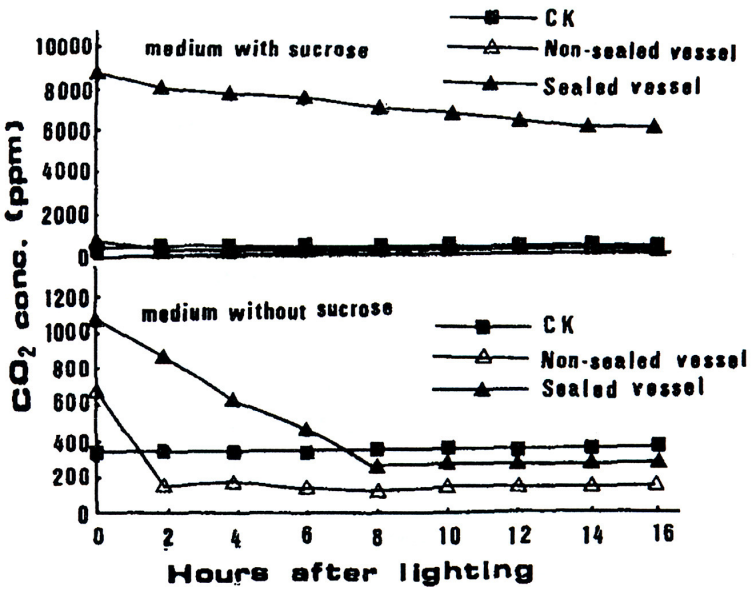


圖5. 經不同光照時間後，培養容器內CO_2濃度之變化。"+Su" 或 "-Su" 分別爲培養基加糖或不加糖。"S" 或 "NS" 分別爲培養容器用羊毛脂膏或雙層膠帶封口或不封口。

Fig. 5. The change of CO_2 concentration in culture vessel during lighting. "+Su" or "-Su" : Medium with or without sucrose, respectively. "S" or "NS" : Culture vessels were sealed or not sealed by lanolin paste and double layers of plastic tapes, respectively.

sec光照環境下，但二氧化碳濃度維持1000-5000 ppm時，則對瓶內培養的玫瑰花和非洲菊比不添加二氧化碳處理葉色較爲濃綠，且老化或落葉的葉片較少。Chu et al.（1991）發現迷你玫瑰瓶苗在40 μmol／m²sec的光量下，每天3次將含二氧化碳1000ppm的氣體直接通入培養容器內1分鐘，會使培殖體的鮮重和乾重提高。然而本試驗中提高容器內的二氧化碳濃度，並不能提高的鮮重（表3、4），只能提高 'Samantha' 的乾物重（表3）。Sasek et al.（1985）發現：棉花長期在二氧化碳1000ppm的環境下生長，對光合作用會產生抑制作用，但若將部分在生長期高二氧化碳濃度下生長的棉花，移植到二氧化碳濃度爲350ppm的大氣環境，3～4天後因爲澱粉的消耗，光合作用速率會逐漸復原。

由本試驗的結果（圖5）看出，培殖體在含糖培養基的呼吸作用旺盛，以至於密封的GA-7瓶內，在4星期後暗期結束時，二氧化碳累積高達8877ppm而在明期結束時二氧化碳濃度仍高達6041ppm。Grout和Donkin（1987）指出，培殖體內有高碳素同化速率時，會抑制ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase的羧化活性，而使光合作用降低。因此本試驗中添加二氧化碳未有顯著促進瓶苗生長的效果，培養基中糖濃度未降低應是主要原因。

參考文獻

1. Bressan, P.H., Y.J.Kim, S.E.Hyndman, P.M.Hasegawa and R.A.Bressan 1982 Factors affecting in vitro propagation of rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(6): 979-990
2. Campos, P.S. and M.S.S.Pais 1990 Mass propagation of the dwarf rose cultiver 'Rosamini '. ScientiaHort. 43: 321-330
3. Chu, C.Y. 1991 The Efficient Propagation Method of Miniature Rose. Thesis of Univ. of Ill. Urbana, U.S.A. pp.113
4. Chu, C.Y., S.L.Knight and M.A.L.Smith 1992 Factors affecting productivity of new shoots from cultured nodal segments of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. minima). J. Chinese Soc. Hort. Sci. 38(1): 7-18
5. Davies, D.R. 1980 Rapid propagation of roses in vitro. Scientia Hort. 13: 385-389
6. Douglas, G.C., C.B.Rutledge, A.D.Casey and D.H.S.Richardson 1989 Micropropagation of floribunda, ground cover and miniature roses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 55-64
7. Falque, M., D.Compan and R.Galzy 1991 A method for the study of CO_2 exchanges in vitro cultured *Vitis rupestris* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 175-181
8. Galzy, R. and D.Compan 1992 Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of Vitis plantlets cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 239-244
9. Grout, B.W.W. and M.E.Donkin 1987 Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures in vitro and at transplanting into soil. Acta Hort. 212: 323-327
10. Kozai, T. 1991 Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Micropropagation technology and application. Ed. Debergh, P.C and R.H.Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. pp: 447-469
11. Kozai, T., Y.Koyama and I.Watananbe 1988 Multiplication of potato plantlesin vitro with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Hortic. 230: 121-158
12. Mederos, S. and M.J.R. Enriguez 1987 In Vitro Propagation of 'Golden Times' roses. Factors affecting schoot tips and axillary buds growth and morphogenesis. Acta Hort. 212: 619-614
13. Murashige, T. and F.Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
14. Pierik, R.L.M. 1987 In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers pp: 344
15. Sasek, T.W., E.H.DeLucia and B.R.Strain 1985 Reversibility of photosyntetic inhibition in cotton after longtrem exopsure to elevated CO_2 concentrations. Plant Physiol. 78: 619-622
16. Valles, M. and P.H. Boxus 1987 Micropropagation of several *Rosa Hybrida* L.cultivars. Acta Horticulturae 212: 611-615
17. Woltering, E.J. 1990 Beneficial effects of carbon dioxide on development of gerbera and rose plantlets grown in vitro. Scientia Hort. 44: 341-345

Effect of Photosynthetic Photon Flux Density and CO_2 on the Growth of Rose Explants in Vitro[1]

Chien-Young Chu and Mei-Yang Wang[2]

(Accepted for publication: MAY 20, 1995)

Summary

Cultures were initiated from nodal explants. Explants grown on a solid medium containing costituents of MS formula, naphthalene acetic acid at 0.01 mg/l, and benzyladenine at 1 to 10 mg/l, under photosynthetic photon flux density (PPFD) at 80 μ mol／㎡sec for 4 to 5 weeks, produced the best lateral shoots for subculture. A PPFD at 40 μ mol／㎡sec was optimum for the growth of fresh and dry weight of 'Pitica' explants. However, a PPFD at 20 μ mol／㎡ sec stimulated multiplication. 'Samantha' explants got higher fresh weight and more multiple shoots under a PPFD at 25 μ mol／㎡sec. 'Landora' explants got higher fresh weight under a PPFD at 40 μ mol／㎡sec. The CO_2 concentration in vessels decreased during the explants cultured under lighting. However, after culture for 4 weeks, the CO_2 concentration in the sealed vessels where explants growing on a medium containing sucrose was high to 8877 ppm at the beginning of lighting. Moreover, at the end of 16-hour lighting the CO_2 concentration was still high to 6041 ppm. The dry weight of 'Samantha' explants was heavier under CO_2 enrichment by adding CO_2 to 1000 ppm twice a day.

Key words: Rose, Micropropagation.

---

1) This study was supported by the Council of Agriculture of Excutive Yuan. (81-AC-12-1-F67(29).

2) Associate professor and former graduate student, respectively, Horticulture Department, National Chung-Hsing University, Taichung Taiwan, R.O.C.