

菊花組織培養繁殖之研究¹

王淑娥² 馬溯軒³

國立臺灣大學園藝系

一、緒 言

菊花 (*Chrysanthemum morifolium*, Ramat) 一般以扦插分株繁殖，當育成或引進新品種原株數量極少時，傳統扦插方法難於短期內繁殖大量植株，以供品種比較試驗或推廣栽培之需。組織培養實為可試之途徑 (MURASHIGE, 1974)。近年來菊花感染 virus 之情況日益嚴重，影響生長和品質 (Pirone, 1970)，故莖頂分生組織 (shoot apical meristem) 培養之研究將有助於菊花之企業栽培。

菊花組織培養繁殖之研究極多，莖段 (stem) (HILL, 1968)，莖頂 (shoot tip) (BEN-JAACOV and LANGHANS, 1972；藤野守弘等, 1973；EARLE and LANGHANS, 1974；1974)，管狀花 (tubular floret) (IIZUKA *et al.*, 1973) 以及花梗 (pedicel) (ROEST and BOKELMANN, 1975) 皆可作為培植體，誘發多數不定芽，應用於加速繁殖。

本研究以不同品種的菊花，用莖頂及花序為培植體，於不同培養基上，誘發芽及不定根，以獲得新個體。其目的為探究：(1)組織培養應用於加速繁殖之過程，(2)莖頂分生組織培養成功的條件，以期應用於獲得無病毒感染之植株。

二、材料及方法

一、植物材料：

本研究採用之菊花品種有 Blue Bird, Montana, Meladion, Delaware 及 Christmas Greeting 等。材料來源為取插穗種植於噴霧插床上，經 2 週發根後移至溫室行盆栽。以電燈延長照明使其保持營養生長狀態；隨時採取頂芽供給莖頂培養之用。花序培養材料則由短日處理 (每日光期 8 小時) 獲得。

二、培植體之調理：

1. 莖頂 (shoot tip)：不經消毒手續，在解剖顯微鏡下，用已消毒過之小刀及鑷子將一層層葉片及葉原體剝掉，然後接種於培養基上。莖頂大小依長度分為三種：(1) 0.15~0.25 mm 為幾乎不含葉原體之莖頂分生組織，(2) 0.50~0.75 mm，(3) 1.25~1.50 mm。後兩者均含有明顯之葉原體及發育中之幼葉。

2. 花序 (inflorescence)：以鑷子將包圍於幼小花序外之苞片一層層剝去，浸在 0.8% 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite) 溶液，並加 0.01% 展着劑 Tween 20，消毒 15 分鐘後，以無菌水沖洗三次，接種於培養基上。花序大小依直徑分為：(1) 0.5~1.5 mm，(2) 3.83 mm，(3) 5.75 mm 三種。

3. 莖段與葉芽插 (stem section and leaf bud cutting)：莖頂或花序培養發育而成的幼枝 (shoot)，取長度約 5 mm 之節間，除去及附有一葉片之節作為培植體。

三、培養基之調配：

本研究使用 M_1 ， M_2 及 M_3 三種培養基。 M_1 用於花序與莖頂培養以誘發多數不定芽， M_2 用

1. 本文為第一作者在國立臺灣大學園藝研究所提出碩士論文之一部分。

2. 3. 國立臺灣大學園藝學系研究助理及教授。

4. 本稿於民國 66 年 12 月 1 日收到。

於培養長度為 0.2~0.5 mm 之莖頂以形成單一小植株， M_3 用於培養幾乎不具葉原體之莖頂分生組織。三種培養基之無機鹽類均照 Murashige 及 Skoog (1962) 之鹽類成分。其用量為 (mg/l)：

NH_4NO_3 , 1650; KNO_3 , 1900; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 440;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370; KH_2PO_4 , 170; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 37.3;
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27.8; H_3BO_3 , 6.2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 22.3;
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 8.6; KI , 0.83; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25;
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025。

另加用 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ， M_1 為 340； M_2 為 170。

有機成分使用種類與用量 (mg/l) 如表 1。

表 1：各種培養基使用有機成分之種類與劑量
 Table 1: Organic constituents of media (mg/l)

有機成分 Organic constituents	培 養 基 Media		
	M_1	M_2	M_3
Meso-inositol	100	100	100
Thiamine•HCl	0.4	0.4	1
Pyridoxine•HCl	—	—	5
Nicotinic acid	—	—	5
L-tyrosine	100	—	—
IAA	2	2	—
NAA	—	—	0.3
Kinetin	2	—	0.1
Adenine sulfate	160	—	40
Difco Bacto malt extract	—	—	500
Sucrose	30,000	30,000	25,000
Difco Bacto agar	8,000	8,000	6,000

註： M_1 、 M_2 均照 Smith 及 Murashige (1970) 配方， M_3 照 Murashige 等 (1971) 配方。

M_1 、 M_2 from Smith and Murashige (1970), M_3 from Murashige *et al.* (1971).

培養基於殺菌前調整為 pH 5.7，分裝於 8×3 cm 或 8×2.5 cm 之平底試管，每管內盛培養基 10 ml，管口蓋以鋁箔。加壓殺菌（溫度 120°C，壓力 1.2 kg/cm²）15 分鐘。

四、培養環境：

培養室以日光燈每日照明 16 小時，光強度為 200 呎燭光 (foot candle)，溫度保持 25±2°C。

五、解剖觀察：

採用石臘切片法 (Johansen, 1940)，花序以 FAA 固定。較幼嫩的莖頂用 Craff III 固定液。採用 TBA (tertiary butyl alcohol) 脫水。封埋於石臘中，切片厚度為 10 μ，染色採用 Safranin and Delafield's hematoxylin，以 Euparal 封片。

三、結 果

一、莖頂培養：

依培養基成分及培植體大小之不同，莖頂培植體之再生反應不同，在繁殖上可以達到不同的目的。莖頂培養之結果就 Meladion 品種說明如下：

1. 在 M_1 培養基：不具葉原體之莖頂分生組織不易成活。具有 3~4 個葉原體之莖頂（長度約

0.5~0.7 mm) 約經 1~2 週同時出現數個芽。長度為 1.25~1.5 mm 之莖頂於培養一週內可同時出現 10 個左右的芽，短期內長成叢生之幼枝 (圖 3)。

2. 在 M_2 培養基：莖頂長度小於 0.5 mm 者在 M_1 培養基不易成活。以除去 kinetin, adenine sulfate 及 tyrosine 三種成分之 M_2 培養基來培養 0.2~0.5 mm 長之莖頂經 18 天成活率可達 58.3%，在 M_2 培養基中，菊花莖頂生長分化的情形有：(1) 僅形成癒合組織，(2) 只發根不長芽，(3) 培養 10~

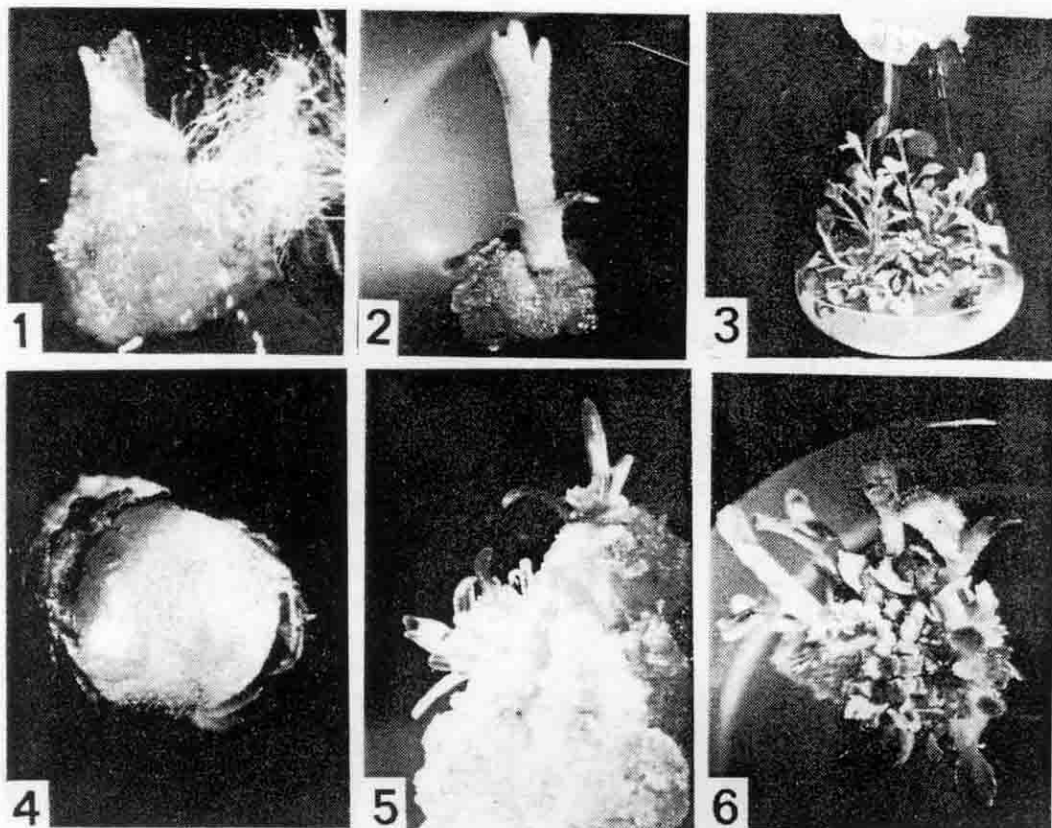


圖 1-6：菊花莖頂與花序之培養反應。

Fig. 1-6: Cultural responses of shoot tip and inflorescence explants of cultivars of chrysanthemum. 1-3, Meladion; 4, 5, Blue Bird; 6, Montana)

圖 1：莖頂 (長 0.5 mm) 在 M_2 培養基上，經 3~4 週先發根，再長幼枝而形成一小植株。
Fig. 1: Root and shoot formation in shoot tip (0.5 mm in length) cultured on M_2 medium for 3-4 weeks. ($\times 14$)

圖 2：莖頂分生組織 (長 0.2 mm) 在 M_3 培養基，先形成癒合組織，經 4~5 週於原來培植體中央部分長出幼枝。

Fig. 2: Callus with shoots from shoot apical meristem (0.2 mm in length) cultured on M_3 medium for 4-5 weeks. ($\times 8$)

圖 3：莖頂培養叢生多數幼枝之情形。

Fig. 3. Multiple shoots from shoot tip culture. ($\times 1.2$)

圖 4：培養前之花序培植體。

Fig. 4: Inflorescence explant before culturing. ($\times 9$)

圖 5：花序 (直徑約 5.75 mm) 於 M_1 培養基，經 4 週形成癒合組織及不定芽。

Fig. 5: Formation of callus and adventitious buds on inflorescence (5.75 mm in dia.) cultured on M_1 medium for 4 weeks. ($\times 10$)

圖 6：花序於 M_1 培養基上經 5~6 週，形成多數不定芽及幼枝。

Fig. 6: Callus with many shoots proliferated from inflorescence cultured on M_1 medium for 5-6 weeks. ($\times 8$)

20天先發根，再長一芽(圖1)，(4)培養經2~6個月，葉片長出後再形成根，發育成一小植株。於 M_2 培養基上一特點即由一莖頂培植體僅直接發育成一小植株，不能同時發生多數之枝。

3. 在 M_3 培養基：幾乎不含葉原體之莖頂分生組織在 M_1 或 M_2 培養基均不能成活，但在 M_3 培養基上，可由培植體邊緣迅速形成薄層的癒合組織，約經4~5週後由其中中央原培植體部分長出幼枝(圖2)。

由解剖觀察長度約為0.8~1.2mm的莖頂培養於 M_1 培養基上經3天，原有的葉原體有伸長的現象(圖7)，培植體與培養基接觸處形成一由3~5層細胞所構成之類似形成層區(cambium-like region)，由細胞分裂形成癒合組織。莖頂培養時，芽的來源有二：(1)原培植體之頂芽與側芽繼續生長，及經培養後形成新的側芽(圖8)。因此莖頂培養容易在短期內同時長出許多幼枝。(2)由原培植體上形成癒合組織再分化形成不定芽(圖9)。

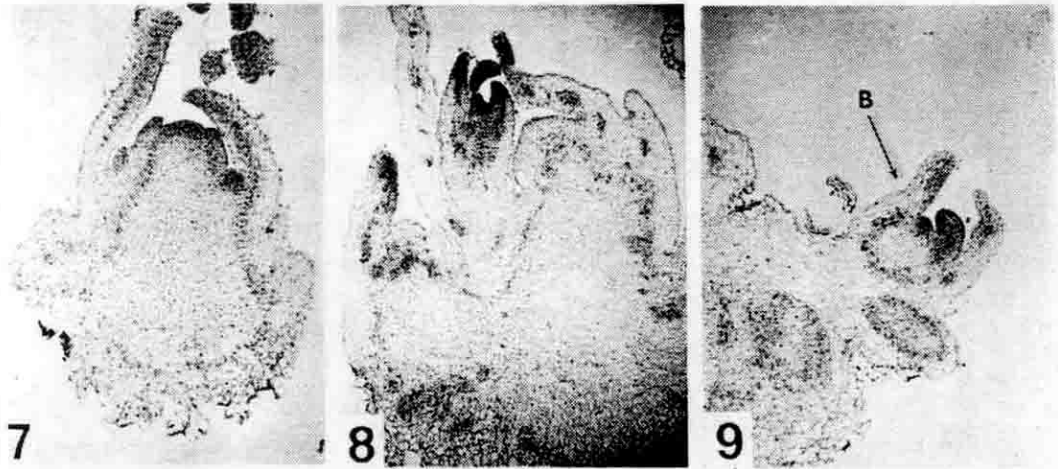


圖 7-9：莖頂培養芽來源之解剖 (Blue Bird 品種，均為縱斷面)：
Fig. 7-9: Photomicrograph showing origins of buds in cultured shoot tip (Blue Bird cultivar, all longitudinal section):

圖 7：莖頂培養 10 天，頂芽與側芽生長之狀。

Fig. 7: Shoot tip cultured for 10 days showing apical meristem and lateral buds. ($\times 27$).

圖 8：莖頂培養 18 天，頂芽旁兩個側芽同時長大。

Fig. 8: Growing of two lateral buds near the apical meristem after 18 days culturing. ($\times 20$)

圖 9：由癒合組織分化形成不定芽。

Fig. 9: Adventitious buds (B) from callus. ($\times 44$)

二、花序培養：

僅用 M_1 一種培養基，目的為誘發不定芽。其反應亦依培植體之大小而不同。以下就 Blue Bird 及 Montana 品種花序培養繁殖之結果說明如下：

Blue Bird 品種之花序培養經一週左右，直徑最大者(5.75 mm)在培植體基部周圍已形成癒合組織，三週後可見長出不定芽(圖5)，但此種不定芽多數不繼續發育，甚或轉成癒合組織。直徑 3.83 mm 之花序(圖4)經培養7週後可形成不定芽，而不定根之發生則需時甚久，約需3~6個月。直徑 0.5~1.5 mm 之花序培養經4~6週即有不定芽之發生。所以分化程度愈低者，再生能力愈強，不定芽發生較快(表2)。Montana 品種培養時不定芽之發生較 Blue Bird 容易。直徑約 2~3 mm 之花序培養經5~6週，同一花序上可有20~30個不定芽發生(圖6)。故品種不同其再生不定芽之能力亦有差異。其他品種如 Christmas Greeting, Delaware, Meladion 皆可成功地誘發不定芽。

已形成小花，直徑平均為 1.48 mm 之花序(圖10)於培養初期，依解剖觀察可見花序邊緣之小

花形成癒合組織，花托基部與培養基接觸之細胞分裂形成癒合組織，在其中形成類似形成層區，此與莖頂培養時相同。花序培養時不定芽之發生有下列方式：(1)培養經 4 週，花序培植體上發生之癒合組織再分化形成不定芽 (圖 11)，(2)培養經 4~10 週，有些小花之花被腋下細胞分裂形成不定芽 (圖 13)，(3)由花托臨近表皮之薄壁細胞分裂而形成芽原體 (圖 12)。

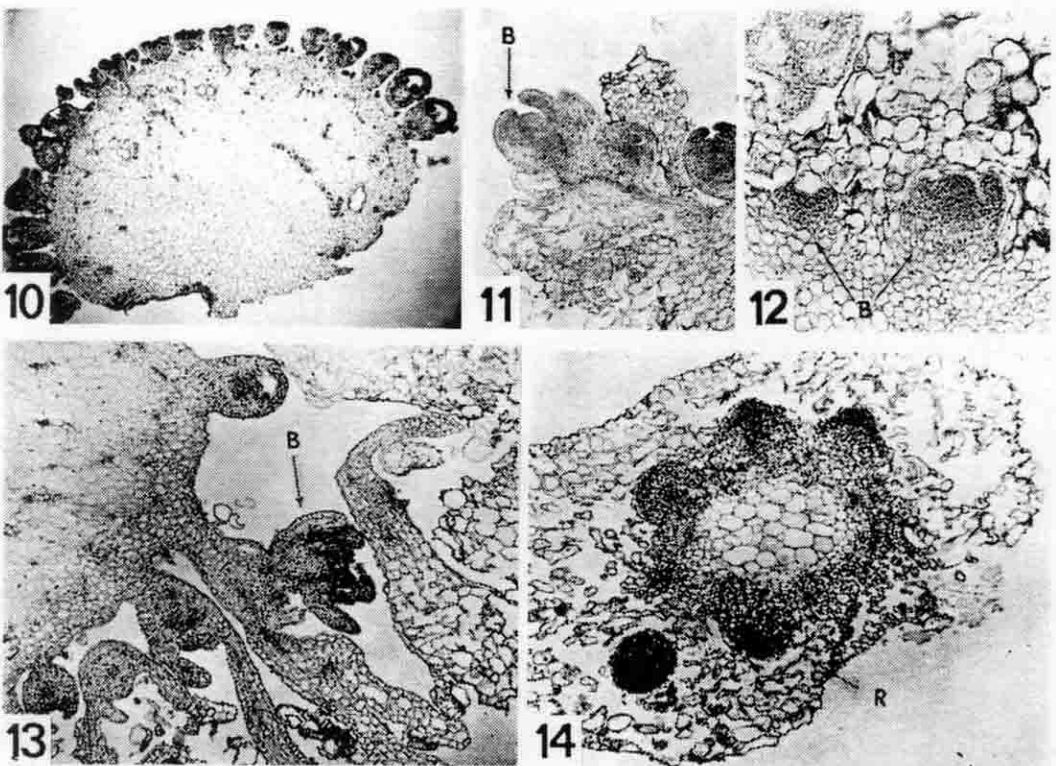


圖 10-13：花序培養不定芽發生之解剖 (Blue Bird 品種，均為縱斷面)：
Fig. 10-13: Photomicrograph showing origins of adventitious buds in cultured inflorescence (Blue Bird cultivar, all longitudinal section):

圖 10：培養前之花序

Fig. 10: Inflorescence before culturing. (×20)

圖 11：由癒合組織分化形成不定芽。

Fig. 11: Adventitious bud (B) from callus. (×75)

圖 12：由花托臨近表皮之薄壁細胞分化形成不定芽。

Fig. 12: Adventitious buds (B) from the sub-epidermal parenchyma cells of receptacle. (×56)

圖 13：由小花之花被腋間形成不定芽。

Fig. 13: Adventitious buds (B) from axile of perianth of partially differentiated florets. (×25)

圖 14：幼枝在 M₂ 培養基，經 5~6 天由束間形成層之薄壁細胞分化形成根原體。(橫斷面)

Fig. 14: Adventitious root initials (R) protruded from interfascicular cambium of young shoot cultured on M₂ medium for 5-6 days. (cross-section ×32)

三、莖段培養與葉芽插：

莖頂或花序培養所發育而成的幼枝，取其除去葉片之節或節間部分培養於 M₁ 培養基。節上之側芽於培養一週後即開始萌發，同時基部發生癒合組織，3 週後形成不定芽。節間培養時在 10~12 天後形成癒合組織，3 週後分化形成不定芽。莖上附有一葉片之節當作插穗插植於 M₂ 培養基，約經 10~20 天即發根成爲小植株。

表 2：菊花莖頂與花序不同大小培植體之發育過程所需週數

Table 2: Time (weeks) required for different developmental stages as influence by different size of shoot tip and inflorescence explants of chrysanthemum.

發育過程 Developmental stages	莖 頂 長 度 Shoot tip length (mm)			花 序 直 徑 Inflorescence diameter (mm)		
	0.10~0.20	0.50~0.75	1.25~1.50	0.50~1.50	3.83	5.75
出現第一個芽 Appearance of first bud	4~5 wks	1~2 wks	1 wk	4 wks	7 wks	3 wks
長成幼枝插穗 Formation of shoot cuttings	6~7	4	3	6	13	—
發根小植株 Rooted plantlets	8~9	5~6	4~5	7~8	14~15	—

註：除莖頂分生組織 (0.1~0.2 mm) 需要 M_2 培養基外，其他均為 M_1 培養基。

All cultured on M_1 medium except shoot apical meristem (0.1~0.2 mm) required M_2 medium.

四、不定根的發生：

為達加速繁殖的目的，使幼枝提早發生不定根，由莖頂或花序培養所得之幼枝，於長至 2.5~3.0 cm 高時，由其基部切下作為幼枝插穗，扦插於含有 IAA 之 M_2 培養基上，經 10~20 天每一幼枝插穗都發育成具有數個不定根的小植株。小植株自試管移出，栽植於碎石內行鉢植，置於噴霧播床下，成活後再移植於培養土中，其成活率可高達百分之百。由解剖觀察，幼枝扦插於 M_2 培養基後第 5~6 天已有根原體，係由束間形成層 (interfascicular cambium) 之薄壁細胞發生 (圖14)。

四、討 論

一、不同培養基之影響：

在 M_1 培養基上莖頂與花序培植體皆可誘發多數之芽。包括莖頂培植體上之頂芽及側芽以及由莖頂及花序培植體兩者發生之不定芽。 M_1 培養基內含有 kinetin 及 adenine sulfate，其對不定芽形成之功效已由許多試驗證實 (SKOOG and MILLER, 1957; SCHAEFFER and SMITH, 1963; GRESSHOFF and DOY, 1972)。THORPE 及 MURASHIGE (1970) 引述文獻認為 tyrosine 及一些含經基之芳香族化合物 (hydroxylate aromatic compounds) 可以刺激 IAA oxidase 之產生而改變組織中 auxin 與 cytokinin 之比例，使趨向有利於芽的形成。 M_2 培養基因缺 kinetin, adenine sulfate 及 tyrosine 三種成分，對菊花莖頂再生方向之效果則完全不同。在 M_2 培養基一個莖頂培植體僅能發育成單獨小植株，而無多數芽的發生。

在 M_3 培養基上，菊花莖頂分生組織的發育又是另一種形式，先在周圍形成癒合組織，然後由原培植體中央部分長出幼枝 (圖 2)。 M_3 與 M_1 培養基成分之差別，主要在有機成分的不同。 M_3 較為複雜，含有 malt extract, pyridoxine, nicotinic acid 等，這些成分可能為適合此極小分生組織培養成活發育之原因。

二、培植體大小與培養之關係：

在 M_1 培養基上，莖頂及花序培植體大小不同時，不定芽形成之快慢也有差別。由表 2 可知花序分化程度愈低即個體愈小者，不定芽形成較易。莖頂則以含葉原體數目愈多者，芽的生長較快，因初期發生之幼枝皆來自莖頂培植體上原有之頂芽及側芽，尤其以長度為 1.25~1.50 mm 之莖頂，培養 1~2 週左右可以同時長出許多幼枝，有利於加速繁殖。

在莖頂培養獲得無病毒植株方面，因為全身性感染病毒 (systemic infectious virus) 在植物體內移動方式是經由維管束組織而傳導 [(MATTHEWS, 1970)，所以用不帶葉原體之莖頂分生組織來培養得

到無病毒感染植株之機會較高。本研究中莖頂長度小於 0.5 mm 者在 M_1 培養基上不易成活，在不合 kinetin, adenine sulfate 及 tyrosine 之 M_2 培養基上，培養 0.2~0.5 mm 長之莖頂，結果成活率可達 58.3%，且可以直接發育成單獨新個體。但在此培養基中芽的發生並不穩定，有些培植體於半年之久後始有芽長出。而無葉原體之莖頂分生組織於此培養基無法成活。

莖頂分生組織在 M_2 培養基可以育成小植株，此對獲得無 virus 感染之原株具有實用的價值。在實用上如採用已感染 virus 之植株為材料，則由其莖頂分生組織培養所得之植株須再測定是否為特定 virus 之感染，而不宜認為由莖頂分生組織培養所得之個體即為絕無 virus 之感染。

三、加速繁殖及品種保存上之應用：

本研究證明菊花莖頂及花序培養於 M_1 培養基均可發生多數的芽。當芽長成 2.5~3 cm 之幼枝，即可切下移入 M_2 培養基促生不定根而成小植株。切除枝條後之幼枝基部又可長出許多側枝，如此由同一培植體可連續獲得更多的小植株。莖頂及花序的培植體在 M_1 培養基上發生癒合組織可經分切行繼代培養，再分化更多的不定芽，發育成為幼枝。取幼枝分切所得之莖段（節或節間）培養於 M_1 培養基上經癒合組織又可再分化形成許多不定芽。其中以節帶有腋芽者其再生不定芽較節間者易。取莖上附有葉片之每一節當作插穗，扦插於 M_2 培養基，百分之九十以上皆可發根而成新個體。由試管內培養出來的菊花小植株移到自然環境下非常容易，其成活率可高達百分之百。不似蘆筍限制條件之嚴格 (HASEGAWA *et al.*, 1973)。以最保守的估計，一個培植體如果於三個月內可形成 10 個芽，長成幼枝後又可分成 10 個培植體，一年之內至少可以得到 $(10^2)^4 = 10^8$ 個新植株。應用組織培養行大量繁殖對空間、設備以及勞力利用等方面可能較傳統繁殖方法為經濟。引進或育成之新品種皆可利用這種方法將少數個體於短期內大量繁殖，以供品種比較試驗或栽培上更新品種之用。另一方面利用組織培養於試管內保存品種較普通栽培保存方式更可節省空間、勞力，而且不受外界環境因子之影響。EARLE 及 LANGHANS (1974) 就菊花以及 MULLIN 及 SCHLEGEL (1976) 就草莓之研究均證明在 4°C 之環境下，菊花之癒合組織及草莓之小植株可貯藏數月或數年之久，而於需要時進行繁殖獲得植株。此對無性繁殖園藝作物之種質保存 (germplasm storage) 方面將有重要應用。

四、芽之來源與變異：

一般組織培養芽的來源可分為三種：(1)培植體原有之頂芽及側芽，例如蘆筍 (HASEGAWA *et al.*, 1973)，杜鵑 (MA and WANG, 1977)，(2)由培植體原有組織恢復分裂能力形成不定芽，如香蕉去頂幼莖培養時於相鄰葉基節間表皮下之組織發生之不定芽 (馬及許, 1972)，煙草莖段培養不定芽源自形成層外韌皮部 (external phloem) 及內韌皮部 (internal phloem) (STERLING, 1951)。(3)由培植體先形成癒合組織，再分化形成不定芽，例如柑桔莖段培養 (Grinblat, 1972)，花椰菜花序培養 (WALKEY and WOOLFITT, 1970)，天竺葵莖頂培養 (PILLAI and HILDEBRANDT, 1969)，以及矮牽牛莖段培養 (RAO *et al.*, 1973)。

菊花莖頂培養芽之來源包括上述三種方式，花序則屬於第 2、3 類。莖頂與花序在培養初期芽多由培植體直接發育而成，由這種方式所獲得之芽，將來長成植株發生變異的機會較少，表現型較穩定，此對無性繁殖保持原株優良性狀來說是最大的優點。本研究中所得 Blue Bird 品種之植株，經田間栽培觀察，其開花特性與母株相同，未有變異發生。HILL (1968) 指出 Bronze Pride 品種莖段培養所得植株之生長與開花特性與母株相同，僅有少數植株個體較矮，BEN-JACOBY 及 LANGHANS (1972) 由 Indianapolis White 品種莖頂培養所得植株中少數葉形，光週反應與花色有變異發生。此二者之不定芽皆由癒合組織分化而成。ROEST 及 BOKELMANN (1975) 用 Super Yellow 及 Bravo 二品種之花梗作培植體，所育成數百開花植株中未見有變異發生。由解剖觀察，其不定芽係直接由表皮細胞分裂形成 (BROERTJES *et al.*, 1976)。因此芽的來源可以影響植株之變異。菊花無性繁殖減少變異之發生應儘可能採用莖頂培養促進側芽萌發。由癒合組織再分化而得之不定芽較容易發生變異，染色體數目常常增加而成多倍體 (MUIR, 1965)，然而也可用為育成新品種之手段。而且配合誘變

處理，使不定芽發生突變 (BRORTJES *et al.*, 1968; STEWART and DERMEN, 1970; NETTANCOURT *et al.*, 1971; BROERTJES *et al.*, 1976)，則在引變育種上更具有實用性。

五、摘 要

菊花 (*Chrysanthemum morifolium*, Ramat) 之 Blue Bird, Montana, Meladion, Delaware 及 Christmas Greeting 等品種之莖頂及花序等培植體之生長反應，依培植體大小及培養基之成分不同而異。較大莖頂 (長 0.5~1.5 mm) 與花序 (直徑 0.50~5.75 mm) 培養於含 MURASHIGE-SKOOG (1962) 無機鹽及有機添加物用量 (mg/l) 為：inositol, 100; thiamine, 0.4; tyrosine, 100; IAA, 2; kinetin, 2; adenine sulfate, 160 之 M_1 培養基 (SMITH and MURASHIGE, 1970)，可以誘發多數的幼枝。較小莖頂 (長 0.2~0.5 mm) 在上述培養基除去 tyrosine, kinetin 及 adenine sulfate 而僅含 IAA 2 mg/l 之培養基 (M_2)，可以直接發育成一單獨小植株。長度為 0.1~0.2 mm 幾乎不含葉原體之莖頂分生組織在含 MURASHIGE-SKOOG (1962) 無機鹽及有機添加物用量 (mg/l): inositol, 100; thiamine, 1; pyridoxine, 5; nicotinic acid, 5; NAA, 0.3; kinetin, 0.1; adenine sulfate, 40; malt extract, 500 之 M_3 培養基 (MURASHIGE *et al.*, 1971)，先形成癒合組織，再由原培植體中央部分長出幼枝，然後於幼枝基部發生不定根，成一小植株。

當幼枝長達 2.5~3.0 cm 時切下，插植於 M_2 培養基上，經 10~20 天，可促發根，而得多數小植株。小植株自試管移植於碎石中在噴霧插床下極易成活。

莖頂或花序培養發育而成之幼枝，可進一步利用作培植體加速繁殖，其方法為：(1)取除去葉片之節或節間部分，培養於 M_1 培養基上，使發生癒合組織，再誘發不定芽。(2)取莖上附有一葉片之節扦插於 M_2 培養基，則每一葉芽插穗可長成一小植株。

由解剖觀察，莖頂培養時，發生幼枝的芽有二種：(1)原莖頂培植體上之頂芽與側芽及經培養後形成的新葉之葉腋側芽。(2)由莖頂培植體所生癒合組織再分化形成不定芽。花序培養時，形成幼枝之不定芽來源有三種：(1)由部分分化之小花之花被腋間形成，(2)由花托臨近表皮之薄壁細胞分裂形成，(3)經癒合組織再分化形成。幼枝上之不定根則來自束間形成層 (interfascicular cambium) 之薄壁細胞分裂而成的根原體。

組織培養在菊花加速繁殖，品種保存上應用之有關問題曾予討論。

參 考 文 獻

- (1) 馬溯軒、許別塗 (1972): 香蕉幼莖切頂組織培養應用於不定芽誘發之研究。中國園藝, 18(3): 135-142。
- (2) 藤野守弘、藤岡作太郎、藤村良 (1973): 莖頂培養によるキクの増殖。兵庫縣立農業試驗場研究報告第20號別刷, pp. 125-130。
- (3) BEN-JACOV, J., and R. W. LANGHANS. (1972): Rapid multiplication of *Chrysanthemum* plants by stem-tip proliferation. HortScience 7: 289-290.
- (4) BROERTJES, C., B. HACCUS, and S. WEIDLICH. (1968): Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. Euphytica 17: 321-344.
- (5) BROERTJES, C., S. ROEST, and G. S. BOKELMANN. (1976): Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using in vivo and in vitro adventitious bud techniques. Euphytica 25: 11-19.
- (6) EARLE, E. D., and R. W. LANGHANS. (1974): Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 128-132.
- (7) EARLE, E. D., and R. W. LANGHANS. (1974): Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 352-358.
- (8) GRESSHOFF, P. M., and C. H. DOY. (1972): Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-170.
- (9) GRINBLAT, U. (1972): Differentiation of *Citrus* stem in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 599-603.
- (10) HASEGAWA, P. M., T. MURASHIGE, and F. H. TAKATORI. (1973): Propagation of asparagus

through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Hort. Sci.* **98**: 143-148.

- (11) HILL, G.P. (1968): Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'. *Physiol. Plant.* **21**: 386-389.
- (12) IZUKA, M., E. MATSUMOTO, A. DOI, R. MADRIGAL, and A. FUKUSHIMA. (1973): Tubular floret culture of *Chrysanthemum* and *Cineraria* in vitro. *Japan. J. Genetics.* **48**: 79-87.
- (13) JOHANSEN, D. A. (1940): *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., N. Y.
- (14) MA, S.S., and S.O. WANG. (1977): Clonal multiplication of azaleas through tissue culture. *Acta Hort.* **78**: 209-215.
- (15) MATTHEWS, R. E. F. (1970): Movement of viruses within the plant. In: *Plant Virology*. pp. 209-216. Academic Press, N. Y.
- (16) MUIR, W.H. (1965): Influence of variation in chromosome number on differentiation in plant tissue cultures. In: *Plant Tissue Culture* (P. R. White and A. R. Grove ed.), pp. 485-492. McCutchan, Berkeley.
- (17) MULLIN, R. H., and D. E. SCHLEGEL. (1976): Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience* **11**: 100-101.
- (18) MURASHIGE, T., and F. SKOOG. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- (19) MURASHIGE, T., M. N. SHABDE, P. M. HASEGAWA, F. H. TAKATORI, and J. B. JONES. (1971): Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **97**: 158-161.
- (20) MURASHIGE, T. (1974): Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 135-166.
- (21) NETTANCOURT, D. DE., P. DIJKHUIS, A. J. G. VAN GASTEL, and C. BROERTJES. (1971): The combined use of leaf irradiation and of the adventitious bud technique for inducing and detecting polyploidy, marker mutations and selfcompatibility in clonal populations of *Nicotiana glauca* Link and Otto. *Euphytica.* **20**: 508-520
- (22) PILLAI, S. K., and A. C. HILDEBRANDT. (1969): Induced differentiation of geranium plants from undifferentiated callus in vitro. *Amer. J. Bot.* **56**: 52-58.
- (23) PIRONE, P. P. (1970): *Diseases and Pests of Ornamental Plants*. pp. 191-192. 4th ed. The Ronald Press. Co., N. Y.
- (24) RAO, P. S., W. HANDRO., and H. HARADA. (1973): Bud formation and embryo differentiation in vitro cultures of petunia. *Z. Pflanzenphysiol.* **69**: 87-90.
- (25) ROEST, S., and G. S. BOKELMANN. (1975): Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Hort.* **3**: 317-330.
- (26) SCHAEFFER, G. W., and H. H. SMITH. (1963): Auxin-kinetin interaction in tissue cultures of *Nicotiana* species and tumor-conditioned hybrids. *Plant Physiol.* **38**: 291-297.
- (27) SKOOG, F., and C. O. MILLER. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **11**: 118-131.
- (28) SMITH, R. H., and T. MURASHIGE. (1970): In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *Amer. J. Bot.* **57**: 562-568.
- (29) STERLING, C. (1951): Origin of buds in tobacco stem segments cultured in vitro. *Amer. J. Bot.* **38**: 761-767.
- (30) STEWART, R. N., and H. DERMEN. (1970): Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. *Amer. J. Bot.* **57**: 1061-1071.
- (31) THORPE, T. A., and T. MURASHIGE. (1970): Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.* **48**: 277-285.
- (32) WALKEY, D. G. A., and J. M. G. WOOLFITT. (1970): Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. *J. hort. Sci.* **45**: 205-206.

Clonal Multiplication of *Chrysanthemum in vitro*

by

SHU-O WANG and SU-SHIEN MA

Department of Horticulture, National Taiwan University

Summary

Studies were made on developing a tissue culture method for clonal multiplication of cultivars of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*, Ramat). Shoot tips and young inflorescences of different size of 'Blue Bird', 'Montana', 'Meladion', 'Delaware' and 'Christmas Greeting' were used as explants. Cultural responses differed in respect to size of the explants as well as difference in organic additions to the medium. Larger shoot tips (0.5-1.5 mm in length) and inflorescences (0.50-0.75 mm in diameter) produced multiple shoots on medium containing Murashige-skoog (1962) salts supplemented with (mg/l): inositol, 100; thiamine, 0.4; tyrosine, 100; IAA, 2; kinetin, 2 and adenine sulfate, 160 (SMITH and MURASHIGE, 1970) (M_1 medium). Smaller shoot tips (0.2-0.5 mm in length) grew into single plantlet with well developed roots on the same medium containing IAA 2 mg/l but kinetin, adenine sulphate and tyrosine were excluded (M_2 medium). Shoot apical meristem (0.1-0.2 mm in length) almost without leaf primordia cultured on medium supplemented with (mg/l): inositol, 100; thiamine, 1; pyridoxine, 5; nicotinic acid, 5; NAA, 0.3; kinetin, 0.1; adenine sulfate, 40; malt extract, 500 (MURASHIGE *et al.*, 1971) (M_3 medium) induced callus formation first and then a single shoot arising from the central part of the explant. Adventitious roots were formed later at the base of the shoot and a complete plantlet was regenerated.

Shoot cuttings (2.5-3.0 cm in length) taken from culture tube rooted easily within 10-20 days in medium containing IAA in 2 mg/l (M_2). Rooted cuttings transplanted to vermiculite gave 100% survival under intermittent mist in greenhouse.

Sterile shoots from culture tube may further be used as explants for multiplication. This was accomplished in two ways: (1) defoliated nodal and internode sections cultured on M_1 medium induced callus formation and then multiple adventitious shoots, (2) leafy nodal sections grew into single shoot and rooted on M_2 medium.

Histological examination revealed that origin of buds in cultured shoot tips were of two types: (1) apical and lateral buds on the original explants, (2) adventitious buds arose from callus. The origin of adventitious buds in cultured inflorescences were of three types: (1) from cells in the axile of perianth of partially differentiated florets, (2) from sub-epidermal parenchyma cells of receptacle and (3) from callus. Adventitious roots on young shoot were originated from interfascicular cambium.

Problems related to the use of tissue culture for propagation and conservation of cultivars of chrysanthemum were discussed.