

觀賞鳳梨 *Guzmania* 'Focus' 不定芽誘導與增殖之研究

黃柄龍¹

摘 要

本研究目的為探討不同濃度BA與NAA組合、不同莖節部位側芽及去頂對觀賞鳳梨 *Guzmania* 'Focus' 不定芽誘導與增殖之影響，及建立其植株再生系統。結果顯示，莖頂及側芽培植體之不定芽發生率，均以 1.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 或 1.0 mg l^{-1} NAA，及 3.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 mg l^{-1} NAA 之誘導效果較佳，並以最基部側芽的不定芽發生率最高，為 35%，且其不定芽誘導能力約隨莖節位置的上升而有下降的趨勢。此外，*G.* 'Focus' 之去頂組培苗，培養於含有 3.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} NAA 的培養基，第 16 天起，即開始形成不定芽體，但此現象並未發生在未去頂的培植體上，僅產生突起的瘤狀物。不定芽可生長及發育成完全的植株，並可移植至試管外種植。

關鍵語：觀賞鳳梨、不定芽、去頂

前 言

擎天屬觀賞鳳梨(*Guzmania*)約有 185 個原種，原生於熱帶雨林地區，附生或地生都有⁽²⁾，其在園藝上用於觀賞的原種或變種的數量並不多，至今多為人工栽培的雜交種所取代⁽²¹⁾。擎天屬鳳梨也是臺灣栽培最多的觀賞鳳梨種類，株型分大、中及小型，呈倒錐狀生長。葉型呈長帶狀具革質，葉片向上成凹型，葉梢尖銳葉緣無刺，葉片基部相互抱合呈漏斗狀，有蓄水功能，外觀看不到莖部，葉色濃綠有光澤，開花時從基部中心處抽出花穗，花萼及花苞具觀賞價值，花穗顏色有紅色、橙色、紫色、黃色或其他混雜之顏色，花穗觀賞期可維持 2-3 個月。其中，*Guzmania* 'Focus'，中文名稱為火炬鳳梨，為經濟栽培的雜交種，屬中型品種，高約 50 cm，植株漏斗狀，葉片寬，綠色，葉背基部暗紅色；穗狀花序，花苞片紅色，黃色小花生於苞片內，集生成錐狀，外形似手持的火炬⁽²¹⁾。

利用吸芽及種子繁殖是觀賞鳳梨最常見的繁殖方式。種子繁殖因種子活力喪失快及發芽率低，且會產生雜交變異無法生產均一的種苗，一般較少採

¹高雄區農業改良場副研究員

用；而吸芽繁殖是鳳梨科植物最常用的繁殖法，因大多數觀賞鳳梨只有一個生長點，當這個生長點由營養生長轉變為生殖生長後就會死亡，而從基部長出吸芽來替代母株的生長，不過，吸芽繁殖常受限於繁殖母株的數量及病原菌如fusarium等的污染，導致所獲得的種苗數量有限⁽¹⁰⁾，栽培管理亦會影響到抽出的吸芽數及品質，且隨著產生的吸芽數愈多，吸芽的生長勢也愈加微弱⁽²⁷⁾，因此限制了種苗的生產，而無法供應市場上的龐大需求。

組織培養為提高種苗生產效率的有利工具，且生育整齊，可達成經濟栽培所需大量繁殖之目的。許多觀賞鳳梨組織培養都是採用短縮莖為培植體，誘導由葉腋長出芽體^(11, 12, 17, 28)或瘤狀物⁽²²⁾，但吸芽短縮莖因長期暴露於空氣中及受灌溉水的污染，材料較不容易徹底消毒。並且，培植體的大小、成熟度與來源部位，均會影響植株再生，通常是選擇細胞分裂旺盛的部位^(6, 9, 15, 16)，Thorpe (1986)也指出⁽²³⁾，含有莖頂或分生組織的培植體，較容易再生植株；而不同部位的培植體對荷爾蒙的感受性不同，甚至在不同發育時期的同一組織對荷爾蒙的反應亦有差異⁽²⁴⁾。因此，本研究將以G. 'Focus'緊密包裹之吸芽的莖頂及側芽為培植體，探討不同濃度BA與NAA對不同部位側芽與去頂短縮莖之不定芽誘導與增殖之影響。

材料與方法

一、試驗材料與滅菌處理

本研究係取栽培於高雄區農業改良場(Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station)網室之G. 'Focus'之分蘖吸芽為材料。首先，將外型健康的開花株切除整個花柱，去除頂芽優勢，令其從母株基部長出吸芽(圖 1A)。分離吸芽，以自來水洗淨後，逐層剝除其上緊密包裹的葉片，使莖節上的側芽裸露。切取莖頂(圖 1B)及側芽(圖 1C)等組織，利用 0.5% 次氯酸鈉(NaOCl) (Clorox; Clorox Co, Oakland, CA)溶液，每 100 ml 並加入 2 滴展著劑 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)，以超音波振盪 10 分鐘進行表面消毒，再以無菌水沖洗 3 次，每次 3 分鐘，並去除受滅菌劑傷害的組織。

二、基礎培養基與培養條件

基礎培養基組成以大量鹽類濃度減為 1/3 之MS (Murashige and Skoog, 1962)⁽¹⁹⁾培養基為主，其他添加有機物包括 50 mg l⁻¹ arginine、50 mg l⁻¹ asparagine、50 mg l⁻¹ L-glutamine、0.5 mg l⁻¹ Ca-panthothenate及 200 mg l⁻¹ citric acid，另添加 3% sucrose，並以 0.8% Merck agar作為固體凝膠劑，滅菌前pH值調至 5.7，並經高溫高壓滅菌釜以 121°C，加熱 20 分鐘。培養環

境溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，採 16 小時光週明期照光培養(光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，日光燈管 FL-30 D/29, 40W，東亞，中國電器股份有限公司)。

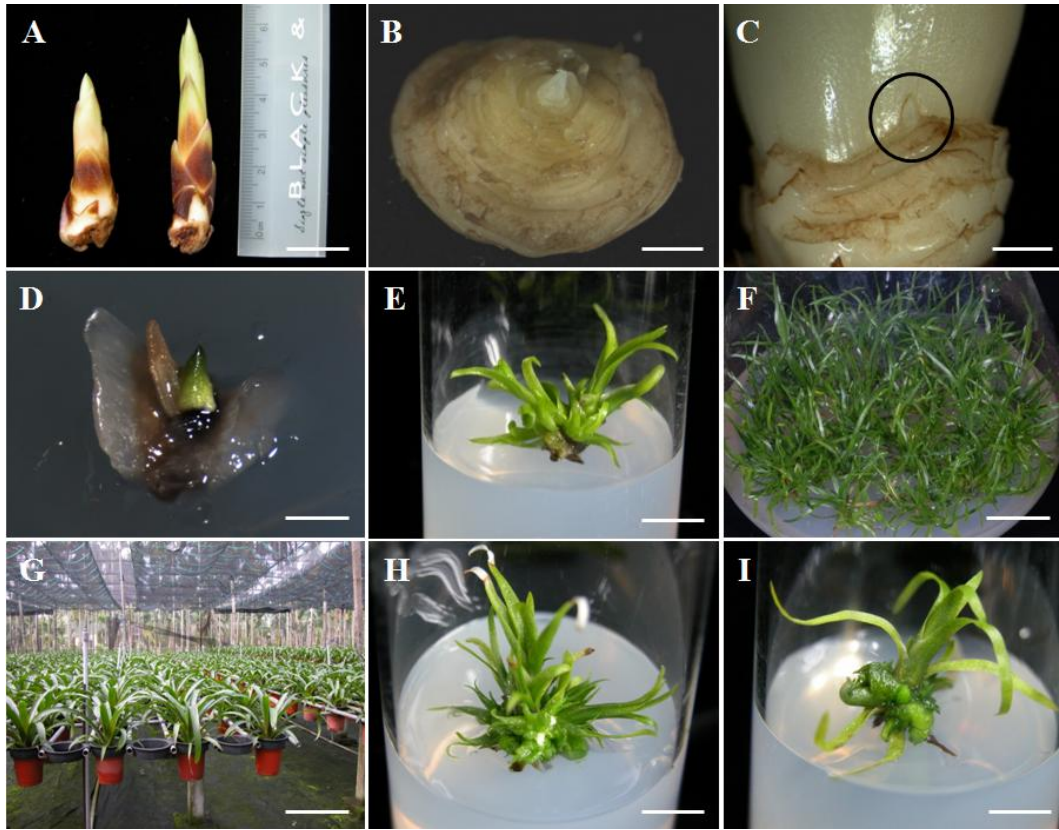


圖 1. 觀賞鳳梨 *G. 'Focus'* 不定芽誘導、增殖與植株再生之情形 (A)吸芽(bar = 18 mm) (B) 莖頂組織(bar = 3 mm) (C)側芽培植體(bar = 2 mm) (D)側芽培養(bar = 3 mm) (E)不定芽增殖(bar = 10 mm) (F)大量繁殖(bar = 16 mm) (G)移植於網室栽培的組培苗(bar = 400 mm) (H)去頂組培苗基部形成抽長不定芽(bar = 9 mm) (I)未去頂組培苗基部形成叢生狀瘤狀物(bar = 9 mm)

Fig. 1. Adventitious bud induction and proliferation and shoot regeneration of *G. 'Focus'* via bud explants culture. (A) The suckers excised from the stem base (bar = 18 mm). (B) Shoot apex explant obtained from sucker (bar = 3 mm). (C) Lateral bud explant obtained from sucker (bar = 2 mm). (D) Lateral bud explant cultured on 1/3MS basal medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} NAA (bar = 3 mm). (E) Adventitious buds proliferated after cultured on 1/3MS basal medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} NAA (bar = 10 mm). (F) Mass propagation by shoots developed into plantlets (bar = 16 mm). (G) Plantlets cultivated in greenhouse and developed regularly into mature plants (bar = 400 mm). (H) Proliferation of elongated adventitious shoots from the stem base via decapitated plantlet culture (bar = 9 mm). (I) Formation of protruding nodules at the base through undecapitated plantlet culture (bar = 9 mm)

三、不同 BA 與 NAA 濃度組合對不定芽誘導之影響

將莖頂及側芽培植體，培養於添加不同濃度 BA (1.0 、 3.0 mg l^{-1})與 NAA (0.5 、 1.0 mg l^{-1})組合之基礎培養基，每單位容器內之培養基定量成 10 ml 。每一處理 4 個重複，每重複分別培養 5 個莖頂或 20 個側芽培植體。培養 10 週後，調查培植體之不定芽發生率。不定芽發生率為計算能誘導或增殖不定芽之培植體所占之比率。

四、不同莖節部位之側芽培植體對不定芽誘導之影響

逐層剝除 G. 'Focus'吸芽之葉片，使側芽裸露。切取莖節最基部(lower)、中間部位(middle)及最上部位(upper)之側芽組織，並依序編號。滅菌方法同上。各部位側芽培植體培養於含有 1.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 或 1.0 mg l^{-1} NAA，及 3.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 mg l^{-1} NAA 等三種不定芽誘導反應較佳的培養基。每一處理 4 個重複，每重複分別培養 10 個側芽培植體。培養 10 週後，調查各部位側芽培植體之不定芽發生率，不定芽發生率估算方法同上，以瞭解不同部位的側芽培植體與不同種類及不同濃度之植物生長調節劑(PGRs, Plant growth regulators)組合，對不定芽誘導之影響。

五、去頂對組培苗短縮莖不定芽增殖效果之影響

以 G. 'Focus'側芽培植體誘導產生的 $1-2 \text{ cm}$ 植株為材料，將頂芽切除，培養於含有 1.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 或 1.0 mg l^{-1} NAA，及 3.0 mg l^{-1} BA 組合 0.5 mg l^{-1} NAA 等三種不定芽誘導反應較佳的培養基。頂芽切除時必須切及生長點。每一處理 4 個重複，每個重複 10 個培植體，並以不切除頂芽之處理為對照。調查短縮莖基部開始形成不定芽體之時間；並於培養 12 週後，調查培植體之死亡率及不定芽發生率與不定芽之增殖情形。

六、統計分析

各處理均經過 4 重複以上試驗，所得數據使用 SAS 軟體(SAS Institute, Cary, NC)進行 GLM 變異數分析($\alpha=0.05$)，並以 LSD (Least significant difference)方法統計其差異性。

結果與討論

一、不同 BA 與 NAA 濃度組合對不定芽誘導之影響

觀賞鳳梨組織培養以吸芽為培植體時，由於葉片基部相互抱合呈漏斗狀，易積水，導致吸芽容易受灌溉水、雨水及病原菌的污染，造成滅菌不易。邱(1991)⁽¹⁾將新芽陰乾 2-3 天，再以 1.0% NaOCl 處理 10 分鐘，可減少污染率達 13.8%。楊(1999)⁽⁵⁾也認為需於取芽前一星期每隔 2 天輪流噴施 Previcur (Bayer CropScience AG, Wolfenbuttel, Germany)、Benlate (Du Pont de

Nemours & Co, Wilmington, DE)及鏈黴素(*Streptomycin*)等藥劑殺菌，但其污染率仍高達 75%。研究發現，*G. 'Focus'*可選擇幼嫩、葉片尚未展開、緊密包裹的小型吸芽為材料(圖 1A)，就能減少培植體不容易充分殺菌的問題，不需以較高濃度NaOCl或較長滅菌時間處理⁽⁴⁾，僅以 0.5% 濃度即可達到培植體殺菌的效果。

圖 2 結果顯示，*G. 'Focus'*之莖頂培植體的不定芽誘導率分別為 25%、35%、35%及 10%，其中，添加 3.0 mg l⁻¹ BA + 1.0 mg l⁻¹ NAA之培養基的誘導效果明顯較差。雖然器官分化與培養基內的cytokinin及auxin間的含量比值有關，比值高時，可促進芽的分化與側芽的增殖^(6, 8, 25)，然而本研究中，含 1.0 mg l⁻¹ BA + 1.0 mg l⁻¹ NAA之培養基的誘導率卻反較含 1.0 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ NAA之培養基高，此與Huang et al. (2011)⁽¹³⁾於*Aechmea fulgens* var. *fulgens*之不定芽的誘導結果不同，推測其原因可能是品種間對植物生長調節劑的反應差異所致。而 1.0 mg l⁻¹ BA組合 0.5 或 1.0 mg l⁻¹ NAA，及 3.0 mg l⁻¹ BA組合 0.5 mg l⁻¹ NAA，其莖頂之不定芽發生率均較 3.0 mg l⁻¹ BA + 1.0 mg l⁻¹ NAA之處理為高，亦可能是不同植物體對荷爾蒙的感受性不同所致⁽²⁴⁾。而側芽組織之不定芽誘導率亦呈現類似的結果，1.0 mg l⁻¹ BA組合 0.5 或 1.0 mg l⁻¹ NAA，及 3.0 mg l⁻¹ BA組合 0.5 mg l⁻¹ NAA，其產生不定芽的培植體數亦較 3.0 mg l⁻¹ BA + 1.0 mg l⁻¹ NAA之處理為多，分別為 25%、22.5%、26.2%與 18.8%。一般來說，莖頂培植體之不定芽發生率高於側芽培植體，但側芽培植體卻可提供較多的材料來源。圖 1D和圖 1E為*G. 'Focus'*利用側芽組織誘導不定芽發生及增殖之情形，經培養後，側芽培植體逐漸膨大及轉變成綠色(圖 1D)，並於基部增生許多不定芽(圖 1E)，達到大量繁殖的目的(圖 1F)。

二、不同莖節部位之側芽培植體對不定芽誘導之影響

表 1 結果顯示，*G. 'Focus'*吸芽之最基部、中間部位及最上部位之側芽培植體培養於相同組成之培養基，不定芽誘導率均以最基部的側芽為最高，分別為 32.5%、22.5%及 35.0%，約隨cytokinin/auxin比值的增加而增加，並且，培植體的不定芽誘導能力亦大致隨莖節位置的上升而有減弱的趨勢。此外，本研究中，*G. 'Focus'*之側芽的不定芽誘導率均較Huang et al. (2011)⁽¹³⁾對*A. fulgens* var. *fulgens*的誘導率為低，這除了與品種間的差異及*A. fulgens* var. *fulgens*的側芽較*G. 'Focus'*為大之外，許多觀賞鳳梨商業栽培品種，均為自交不親和，其遺傳組成大多呈異質性，雜交後裔的變異極大⁽⁷⁾，可能導致*G. 'Focus'*的生長勢較原生種的*A. fulgens* var. *fulgens*為弱有關。

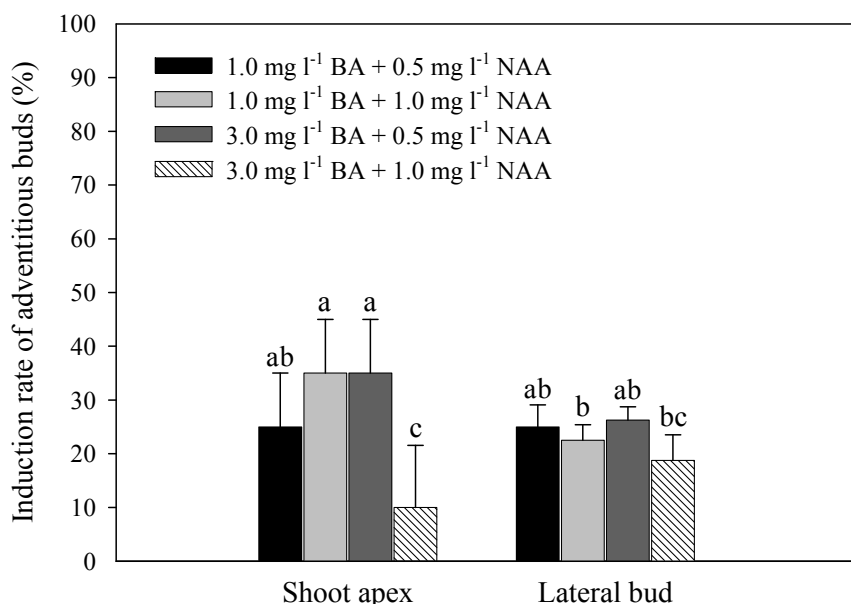


圖 2. 不同濃度之 BA 及 NAA 組合對觀賞鳳梨 G. 'Focus' 莖頂及側芽培植體不定芽誘導之影響
 Fig. 2. Effect of different combinations of BA and NAA supplemented to 1/3MS basal medium on the induction of direct adventitious buds from shoot apices and lateral buds culture of G. 'Focus'.

表 1. 觀賞鳳梨 G. 'Focus' 不同莖節部位之側芽培植體對不定芽誘導之影響
 Table 1. Percentage of adventitious bud induction from different positions of lateral bud explants culture of G. 'Focus'.

Explant position	Adventitious bud induction (%)		
	B ₁ N _{0.5} ^x	B ₁ N ₁	B ₃ N _{0.5}
Upper	20.0 ^{a,b}	7.5 ^b	15.0 ^c
Middle	17.5 ^b	15.0 ^{a,b}	22.5 ^b
Lower	32.5 ^a	22.5 ^a	35.0 ^a

Data shown are mean of four replicates; each replicate consisted of 10 explants. Means followed by the same letter within column are not significantly different at $p < 0.05$.

^x B₁N_{0.5}, 1/3MS basal medium with 1 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ NAA; B₁N₁, 1/3MS basal medium with 1 mg l⁻¹ BA + 1 mg l⁻¹ NAA; B₃N_{0.5}, 1/3MS basal medium with 3 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ NAA.

三、去頂對組培苗短縮莖不定芽增殖效果之影響

G. 'Focus' 去頂組培苗培養於含有 3.0 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ NAA 的培養基，第 16 天起即開始有不定芽體產生(圖 1H)。表 2 結果顯示，去頂組培苗致死率為 7.5-12.5%，且各處理間無顯著差異，而未去頂的組培苗致死率為 0-5%，均較去頂處理組為低，此結果或許與內生 auxin 量有關，因為頂芽為

auxin合成之主要部位，可促進細胞生長及刺激形成層之細胞分裂等生理作用。此外，組織受傷害應是致死發生的另一項原因。未老化的組織受傷或受機械傷害，在 25 至 30 分鐘內，它們乙烯產生量可能增加數倍⁽¹⁴⁾，而乙烯在植物組織培養過程中容易誘使培植體褐化，本研究中，去頂組培苗之致死率較高，也許亦是受乙烯的影響。因此，若在培養基中添加硝酸銀(AgNO₃)，讓Ag⁺有效抑制乙烯的生理作用，吸收植物在培養過程中釋放的乙烯，應可減少培植體的褐化，增加不定芽的再生^(18,20)。而切除頂芽的短縮莖培養於含有 1.0 或 3.0 mg l⁻¹ BA組合 0.5 mg l⁻¹ NAA的誘導培養基，其培植體基部之不定芽發生率分別為 65%及 67.5%，較 1.0 mg l⁻¹ BA + 1.0 mg l⁻¹ NAA的 35%呈顯著差異。但短縮莖基部誘導不定芽形成的現象並未發生在未去頂的培植體上，培養 12 週後，所有培植體均未直接形成不定芽，僅產生突起的瘤狀物(nodule) (圖 11)。生長中的頂芽含有高濃度的auxin，可以抑制側芽的發育，使側芽保持不活動狀態⁽²⁶⁾。摘除頂芽或利用cytokinin處理，可以增加側芽內cytokinin的含量，促使營養物質向側芽部位流動，而促進側芽的生長⁽¹⁴⁾。因此，未去頂的短縮莖基部無法直接形成不定芽的現象應屬合理。

表 2. 去頂對促進觀賞鳳梨 *G. 'Focus'* 短縮莖不定芽增殖之影響(%)

Table 2. Effect of decapitation on the promotion of adventitious bud proliferation of *G. 'Focus'*. Data were scored after 12 weeks culture.^z

Plant growth regulators ^y		Decapitated			Undecapitated		
BA	NAA	% of dead explants	% of explants forming adventitious shoots	No. of proliferated shoots	% of dead explants	% of explants forming nodule	No. of forming nodule
1.0	0.5	7.5 ^a	65.0 ^a	++ ^x	2.5 ^a	52.5 ^a	++
1.0	1.0	12.5 ^a	35.0 ^b	++	5.0 ^a	27.5 ^b	+
3.0	0.5	7.5 ^a	67.5 ^a	+++	0.0 ^a	62.5 ^a	+++

^zData shown are mean of four replicates; each replicate consisted of 10 explants. Means followed by the same letter within column are not significantly different at $p < 0.05$.

^yTested media, 1/3MS basal medium with different BA and NAA combinations (mg l⁻¹).

^xSignal representation: +++, mass; ++, moderate; +, few.

四、植株形成

不定芽培養於大量鹽類濃度減半之MS培養基，對芽體地上部發育具有促進作用⁽³⁾。組培苗經適當的馴化⁽¹³⁾，即可移植至試管外種植，並正常發展為成熟植株(圖 1G)。

參考文獻

1. 邱金春. 1991. 蜻蜓鳳梨(*Aechmea fasciata* Baker)微體繁殖之研究. 中華農業研究 40: 274-279.
2. 胡松華. 2003. 觀賞鳳梨. 珊瑚鳳梨屬及星花鳳梨屬. 中國林業出版社編印. 中國. pp. 30-105.
3. 陳鴻吉. 2002. 觀賞鳳梨 RAPD 遺傳親緣性分析及擎天屬龍鳳品種之細胞培養與體胚再生. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
4. 張麗慧. 2003. 玉扇鳳梨(*Tillandsia cyanea*)及擎天屬栽培種(*Guzmania* cv. Cherry)觀賞鳳梨花器衍生癒合組織細胞懸浮培養及再生. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
5. 楊晴惠. 1999. 觀賞鳳梨組織培養不定芽再生之研究. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
6. Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 502.
7. Chan, Y. K. 1993. Recent advancements in hybridization and selection of pineapple in Malaysia. Acta Hort. 334: 33-44.
8. Chawla, H. S. 2002. Introduction to plant biotechnology, 2nd edn. Science Publishers, Enfield, pp. 3-56.
9. Chen, J. and M. Ziv. 2005. The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescences stem explants of *Narcissus tazetta*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41: 816-821.
10. Feuser, S., K. Meler, M. Daquinta, M. P. Guerra, and R. O. Nodari. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 72: 221-227.
11. Fitchet, M. 1990. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapple. Acta Hort. 275: 261-266.
12. Hosoki, T. and T. Asahira. 1980. *In vitro* propagation of bromeliads in liquid culture [*Quesnelia quesneliana*, *Vriesea poelmannii*, *Aechmea fasciata*, *Guzmania* spp.]. HortScience 15: 603-604.

13. Huang, P. L., L. J. Liao, C. C. Tsai, and Z. H. Liu. 2011. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 105: 73-78.
14. Kieber, J. 2006. Ethylene, In: Taiz, L. and E. Zeiger (Eds.), *Plant physiology*, 4th edn. Sinauer, Sunderland, pp. 543-591.
15. Lowe, K. C., M. R. Davey, and J. B. Power. 1996. Plant tissue culture: past, present and future. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 2: 175-186.
16. Margarita, C. and M. Margarita. 1991. Morphogenesis in leaf, hypocotyls and explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 25: 117-123.
17. Mekers, O. and J.G. van Onsem. 1983. *In vitro* propagation *Viresea* cultivars in comparison with other ornamental Bromeliaceae. *Acta Hort.* 131: 125-130.
18. Mohiuddin, A. K. M., M. K. U. Chowdhury, Z. C. Abdullah, and S. Napis. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51: 75-78.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
20. Raharjo, S. H. T. and Z. K. Punja. 1994. Regeneration of plantlets from embryogenic suspension cultures of pickling cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Endeavor). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 30: 16-20.
21. Steens, A. 2003. Bromeliads for the contemporary garden. Random House New Zealand, Auckland.
22. Teng, W. L. 1997. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. *Plant Cell Rep.* 16: 454-457.
23. Thorpe, T. A. 1986. *Plant tissue culture*. Academic Press, Inc. New York, pp. 45-46.
24. Trewavas, A. J. 1982. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiol. Plant.* 55: 60-72.
25. Van Staden, J., E. Zazimalova, and E. F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E. F., M. A. Hall, and G. J. De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue*

- culture 3rd edition. Volume 1. The background. Springer, New York, pp. 205-226.
26. Weier, T. E., C. R. Stocking, M. G. Barbour, and T. L. Rost. 1982. Botany – An introduction to plant biology, 6th edn. University of California, USA, pp. 396-398.
 27. Williams, B. E. and I. Hodgson. 1990. Growing bromeliads. Christopher Helm, London.
 28. Zimmer, K. and W. Pieper. 1976. Methods and problems of clonal propagation of bromeliads *in vitro*. Acta Hort. 64: 25-30.