杜鵑之組織培養繁殖

馬　溯　軒
國立臺灣大學園藝系教授

摘要：本試驗利用組織培養方法來大量繁殖杜鵑雜交選系。將1～3mm大小之杜鵑莖頂切離後置於經修改之 Murashige 及 Skoog (1962) 培養基上，培養基含½～⅓量之大量鹽類濃度及 inositol 100mg/l, thiamine-HCl 0.4mg/l, Kinetin 5mg/l，酵母抽出液 0.5g/l, Agar7g/l，椰子乳20% (v/v)。加少量之液體培養基於培養三周後之培植體試管中，旋轉培養5天後再靜置培養，成活率及生長狀況皆有顯著之改善。

芽之繼代培養於相同之培養基或不添加酵母抽出液及椰子乳之培養基中，側芽會分枝而形成叢生枝。反覆之繼代培養可得到大量的幼株。

植物再生可藉把叢生枝放在低鹽類濃度且無auxin之培養基上，發根的植株首先移至溫室以水苔種植後再移到土中，其間並行噴霧。

前　言

杜鵑新品種育成至足以大量種植約需10年 (Anderson, 1975)。主因是由於母本太少且扦插效率低所致。組織培養爲商業品種大量繁殖之有效途徑 (Murashige, 1974; Jones et al., 1977)

杜鵑繁殖可利用組織培養的方面有：加速育種計畫之進行，利用無菌狀態來交換植物材料，更迅速供給變異，及在試管裡保存品種。

Anderson (1975) 曾成功地利用組織培養使杜鵑枝條增殖，他所用的培植體大部分來自幼苗。Pierik 和 Steegmans (1975) 亦報導杜鵑屬植物之切離枝條發根研究。

本文敍述在試管中由切離之杜鵑莖頂再生植株之過程。

材料及方法

取開花後3～4年之雜交杜鵑爲材料，這些杜鵑種植在溫室時常摘心以使常有幼嫩的枝條生長。採取3～4公分長之嫩枝。除了包住莖頂之幼葉外，其餘葉片全部去除。經過上面程序處理後之莖頂，放在裝有潮濕濾紙之培養皿中，以使材料吸水膨脹。將此材料置於10倍之立體解剖顯微鏡下切取1～3mm大小之莖頂，立刻置於培養基上。

培養基之營養成份係按照 Murashige 及 Skoog (1962) 之配方，但大量鹽類濃度分全量，½，⅓之處理。其他添加物包括 inositol, 100mg/l, thiamine-Hcl, 0.4mg/l, kinetin, 5mg/l, 酵母抽出液，0.5g/l，蔗糖 20g/l，Agar 7g/l，椰子乳 20% (v/v)。使莖增殖之培養基除了非必須的酵母抽出液及椰子乳去除外，其餘成分與上述相同。椰子乳使用新鮮或煮沸過，但二者皆濾過後冷凍貯藏。發根培養基，使用 Randolph 和 Cox (1943) 配方之½鹽類濃度，蔗糖 20g/l，Agar 7g/l。所有培養基之 PH 皆在殺菌前調到5.7，每一試管 (2.5×8cm) 裝8～10ml 之培養基，以鋁鉑封蓋後，在 121°C，壓力 1.2kg/cm² 殺菌15分鐘。

所有試管皆靜置，但亦研究旋轉培養之效果。培養三周後之培植體，加入3cc液體培養液，旋轉培養 (10rpm) 五天後倒出液體培養基再恢復靜置培養。

莖頂培養初期溫度保持 18°C，旋轉培養時爲25°C，之後仍置放在18°C。讓莖增殖及發根之溫度

皆維持在25°C。每日照光16小時，光度爲1500lux。

結　　果

1. 莖頂培養初期

1-1 鹽類濃度對杜鵑莖頂培養之影響

此期培養時，培養基皆添加酵母抽出液及椰子乳。莖頂在含全量MS大量鹽類濃度時，培養3星期後會逐漸褐化死亡。降低鹽類濃度，莖頂會轉綠生長，葉片伸長且側芽膨大，培養5～6星期後側芽萌發且成活。八周之培養顯示低鹽類濃度對莖頂培養之成活及側芽之萌發較全量爲優（表1.）。

表1. 大量鹽類濃度對雜交杜鵑 "R51" 莖頂培養之影響

Table 1 Effect of salt concentrtion in culture media on establishment of shoot tip explants of azalea hybrid "R51".

MS 大量鹽類濃度 (1962)	成活率%	側芽萌發率%
全量	20	0
½量	60	20
⅓量	90	40

經10週之培養，每一培植體平均約有2～5細長之枝條產生，枝上之葉小，厚、稍圓而光滑與在無菌狀態播種所得之實生苗相似。

1-2 酵母抽出液及椰子乳對杜鵑莖頂培養之影響

在降低鹽類濃度培養基中添加酵母抽出液和椰子乳，顯着提高莖頂之成活率。培養基若無酵母抽出液和椰子乳，培植體在培養3周後會褐化死亡。減少其中之一，莖頂之後續生長不良。酵母抽出液和椰子乳可能含有使杜鵑側芽發育之物質。

1-3 旋轉培養之效果

莖頂培養時，在第4周將之旋轉培養5天，較完全靜置培養者，其成活率顯着提高（表2.）。

表2. 液體旋轉培養對雜交杜鵑 "R51" 莖頂培養之影響

Table 2 Influence of rotation in liquid medium on establishment of shoot tip explants of azalea hybrid "R51".

處　　理	成活率%	側芽萌發率%
固態培養基靜置培養	37.5	25.0
液態培養基旋轉培養	81.3	81.3

2. 幼莖之增殖

由莖頂長出之幼莖在到達2公分長時切離，培養在幼莖增殖培養基中。幼莖之增殖由側芽萌發爲側枝而致。依此會產生包含多數細長枝條之叢生枝，密密地覆蓋住培養基。此方式每10周大約可產生8倍的枝條。

經由不斷之繼代培養可得到大量之叢生枝。此叢生枝再分切成小叢移至幼莖增殖培養基中，反覆培養卽可得到大量之幼莖。

3. 幼莖之生根

爲使幼莖生根成幼株，每一叢生枝（約含10根幼莖）分別移至發根培養基中。培養2～3周後卽有根生成，5～6周後已有很好之根系。叢生枝之發根率約爲85～90%，發根亦可用液體培養基以濾紙爲支撐行之。後者之結果較在洋菜培養基者爲佳。

4. 幼株之發育

發根之幼株種在細水苔中，置於溫室並加噴霧，待健化後移出溫室鉢植。半夜施以間歇照光以達到長日效果。10個月後，植株可達20～30公分高，檢查20個植株，半數已有花芽形成，亦卽離開試管15～17個月卽可開花。臺北長且熱之夏天對加速杜鵑生長頗有助益。

討　　論

本實驗結果顯示，杜鵑莖頂培養在含椰子乳或酵母抽出液之培養基中，需要較低鹽類濃度才會成活。Anderson (1975) 曾報導杜鵑屬植物在低鉀之培養基中生長較好。Pierik 和 Steegmans (1975) 也發現培養基含半量 Knop's 配方之大量鹽類時，對杜鵑屬植物莖之生根較在全量鹽類者爲佳。本試驗用於生根之培養基，其鹽類濃度仍低於½ Knop's 鹽類濃度。杜鵑在低鹽類濃度培養基生長較好，可能與其栽培時需肥甚少有關，施肥很容易對杜鵑造成傷害。

杜鵑莖頂培養時，插入五天液體旋轉培養，對其成活率有顯着之增進。液體旋轉培養對蘋果枝條之組織培養亦甚有助益（Dutcher and Powell, 1972）。我們同時也觀察到液體旋轉培養對其他數種木本植物亦有加速生長之效果。此一效果可能是改善養分之吸收 (Dutcher and Powell, 1972) 和有毒物質之溶解泌出 (Cresswell and Nitsch, 1975) 之故。

幼基增殖培養基所需之營養成分較莖頂培養基爲少。添加 5 mg/l 之 kinetin 足以讓側芽迅速萌發，較之 Anderson 培養基 (1975) 簡單很多。

進一步之試驗應朝向使叢生枝在試管外生根，如此可大量降低費用。初步結果顯示，幼莖在細水苔和粗珍珠石混合培養基中，加以噴霧亦可生根。

試管中由莖頂而來之杜鵑幼株，其葉與在試管中播種而得之實生苗相似，此事實值得探討。這些葉子，長、尖細、多毛與成熟葉不同。此與材料來源爲3～4年生之植株，可能尙帶幼年性或許有關。木本植物根之形成在幼年期材料較易，幼莖之形成可能與幼年性亦有關係。或許我們可以藉培養基之組成及（或）培養環境來將成年之植物變爲幼年性？組織培養爲解決這些問題之有效工具。進一步之試驗可探討由老株而來之枝條形態特徵是否相同，以及產生叢生枝及發根之能力是否一樣。

所得之植株待開花後觀察其變異性，由於培養所得之植株係由側芽產生，並非由癒傷組織分化而來之不定芽產生，因此不會有像由癒傷組織分化而來之植株有變異性 (Murashige 和 Nakano, 1975)，至少其百分率不會那麼高。

參考文獻

1. Anderson, w. C., 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture: part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Proc. Intl. Plant Propagators' Soc., 25:129-135.
2. Dutcher, R. D., and Powell, L. E., 1972. Culture of apple shoots from buds in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97:511-514.
3. Jones, O. P., Hopgood, M. E., and O'Farrell, D., 1977. Propagation in vitro of M.26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52:235-238.
4. Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 15:473-479.
5. Murashige, T., and Nakano, R., 1965. Morphogenetic behavior of tobacco tissue

cultures and implication of plant senescence. Amer. J. Bot. 52:819-827.

6. Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
7. Pierik, R. L. M., and Steegmans, H. H. M., 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of Rhododendron. Scientia Horticulturae 3:1-20.
8. Randolph, L. F., and Cox, L. G., 1943. Factors influencing the germination of Iris seeds and the relation of inhibition substances. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 43:283-300.