酪梨砧木'G755'莖頂初代培養之研究

廖 明 芳[1)] 楊 耀 祥[2)]

關鍵字：酪梨、砧木、組織培養

摘要：本研究主要探討酪梨莖頂組織培養之方法。培殖體取自 10 年生抗病砧木 'G755'(*Persea schiedeana*)之新梢，初代培養以不同鹽類與蔗糖濃度試驗，結果顯示以 1/2 MS 為基本鹽類，蔗糖為 3%之液態紙橋培養有較高的成活率及培殖體生長點，當培養基中添加 kinetin 2 mg/l 時，有利於幼梢生長，且基部不會形成大量之癒傷組織。初代培養基若添加 BA 2 mg/l，基部會形成大量的癒傷組織，而降低培殖體之成活率。另外發現，1/2MS 基本培養基中若添加 0.1%活性碳可有效抑制初代培養褐化之發生。

前 言

酪梨為樟科(Lauraceae) *Persea* 屬之熱帶果樹，原產於南美洲北部、中美洲及墨西哥(Ray, 2002)。根據 FAO 資料指出，2003 年全世界酪梨種植面積有 380,728 公頃，主要栽培地區包括墨西哥、美國、巴西、哥倫比亞、智利及南非等國。目前台灣的酪梨種植面積約有 800 公頃，主要分佈於台南縣大內鄉、麻豆鎮、佳里鎮、嘉義縣竹崎鄉等地(鍾志明，1997)，在栽培上，根腐病(*Phytophora cinnamomi* Rands)之危害為影響其發展最大問題(Phillips, 1985)。目前解決的方式係以抗病砧木實生苗嫁接栽培種居多，但因實生播種時，常因為種子之來源不明、萌芽率不一，所獲得之苗品質生長不整齊，無法獲得滿意的結果(Ben- Yàacov and Michelson, 1995)。另外若以實生苗為砧木時，有時不易保持砧木品種之所有特性，如抗病或產量等問題無法掌握(Ben-Yàacov and Zilberstaine, 1999)。國內對抗根腐病砧木之研究，目前以採用改良 Franqueamiento 法(Salazar-Garcia and Borys, 1983)繁殖砧木，但其方式一直無法達到大量增殖之目的，而且利用組織培養可大量增殖及保持優良

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

營養系之特性值得探討。本研究之目的係選用抗根腐病較強之砧木品種'G755'，嘗試建立其莖頂微體繁殖之方法，以作為未來大量繁殖推廣之用。

材 料 與 方 法

一、試驗材料與方法

(一) 植物材料

本試驗植物材料選用嘉義農業試驗分所果園之 10 年生酪梨抗根腐病砧木品種'G755' (*Persea schiedeana*)，其栽培行株距為 3 m × 3 m，植株高度約 4m，該園每年 9 月進行修剪與施肥。莖頂採取時間在 2003 年夏季(7-8 月)及 2004 年春季(3 月)，採取生長旺盛之新梢莖頂 5-7 cm 作為供試材料。

(二) 基本培養基之配製及培養環境

以 MS(Murashige and Skoog, 1962)鹽類為培養基之基本配方，其中包括大量元素、鐵源、微量元素及維生素 B_1 (thiamine)。液態培養時以濾紙為支持介質，固體培養時則添加 0.7%洋菜，pH 值均調至 5.7。培養器材用 25×150 mm 試管，每支試管加入培養基 10 ml。配置好之培養基用鋁箔封口，放入高溫高壓殺菌釜中滅菌，其壓力為 1.05 kg cm^{-2}、溫度 121℃、時間 20 分鐘。初代培養先暗培養 24 小時後，再移出至光照 69 μmol $m^{-2}s^{-1}$ 處，光週 16 小時，溫度 25±2 ℃。

二、試驗方法

本試驗之培殖體為取用 2 mm 之莖頂，其表面先用 75%酒精處理 5 秒鐘消毒，再用 0.5%次氯酸鈉加入 2~3 滴 Tween-20 展著劑，滅菌 20 分鐘後移至無菌操作台中用無菌水淋洗 3~4 次。

(一) 不同鹽類及蔗糖濃度對酪梨砧木'G755'品種初代培養之影響

為探討培養基中鹽類濃度與蔗糖濃度對莖頂培殖體成活之影響，培殖體之採樣時間為夏季，以 4 種不同濃度基本培養基，包括 1/4MS、1/2MS、MS、2MS；再配合 5 種不同蔗糖濃度，1%、2%、3%、4%、5%，以液態濾紙橋培養，培養時不添加任何生長調節劑。每種處理各 5 個培殖體，重複 3 次。經 28 日後調查其成活率及芽體長度。

(二) Cytokinin 對初代培養之影響

1. kinetin 對初代培養之影響

以 1/2MS 為基本鹽類，添加 kinetin(0、0.5、1、2、4 mg/l)及蔗糖 3%之液態濾紙橋培養，每種處理各 5 個培殖體，重複 3 次。經 28 日後調查其成活率及芽體長度。

2. BA 對初代培養之影響

以 1/2MS 為基本鹽類，添加 BA(0、0.5、1、2、4 mg/l)及蔗糖 3%之液態濾紙橋培養，每種處理各 5 個培殖體，重複 3 次。經 28 日後調查其成活率及芽體長度。

3. TDZ 對初代培養之影響

以 1/2MS 為基本鹽類，添加 TDZ(0、0.05、0.1、0.5、1、2 mg/l)及蔗糖 3%之液態濾紙橋培養，每種處理各 5 個培殖體，重複 3 次。經 28 日後調查其成活率及芽體長度。

(三) 預防莖頂褐化試驗

以 1/2MS 為基本鹽類濃度，添加 3%蔗糖及洋菜粉 0.7%，另外，分別添加活性碳 0.1%、PVP(polyvinylpyrrolidone) 0.1%、維他命 C(ascorbic acid, 100 mg/l)+檸檬酸(citric acid, 150mg/l)及對照組 4 種處理，每種處理各 10 個培殖體，重複 2 次，經 28 日後調查其成活率、褐化率及芽體長度。

結　果

一、初代培養

(一) 鹽類及蔗糖濃度對初代培養之影響

培養基中不同鹽類與蔗糖濃度對初代培養影響之結果，如表 1 所示。在成活率方面，以鹽類濃度而言，以 1/4MS 添加 2%蔗糖及 1/2MS 添加 3%蔗糖者有 100%之成活率；當鹽類濃度提高至全量或二倍濃度時，成活率明顯降低，尤其在 2MS 中成活率無法達到 50%。在芽體長度方面，不同處理間並無明顯差別，其中 1/4MS 添加 4%蔗糖及 1/2MS 添加 3%蔗糖者有稍長之趨勢。後者由於成活率亦高之故，可視為較佳之配方。

(二) Cytokinin 對初代培養之影響

1. Kinetin 對初代培養之影響

培養基中不同濃度 kinetin 對初代培養影響之結果如表 2 所示。以濃度 1 mg/l 之成活率最高可達 100%，培殖體的長度達亦為最長，有 6.7 mm。濃度 4 mg/l 時之成活率最低，僅有 58%；培殖體的長度亦較短；且其褐化程度最嚴重，有 63%。至於癒傷組織方面，有添加 kinetin 者皆會產生，較濃度之發生率反有降低之現象。

2. BA 對初代培養之影響

培養基中不同 BA 濃度對初代培養影響之結果如表 3 所示。由結果可知添加 BA 濃度為 0.5 mg/l 者之成活率最高達 80%，BA 濃度增加至 2 mg/l 時，成活率僅有 5%。其癒傷組織之形成率亦為最高，對照組無添加任何 BA 之癒傷組織形成最低，僅有 20%。褐化率之發生各處理間並無明顯之不同。培殖體之長度，則以添加 4 mg/l 最長，達 5.1 mm；濃度 0.5~1 mg/l 次之，濃度 2 mg/l 幾乎全部壞死而無法生長。

3. TDZ 對初代培養之影響

培養基中不同濃度 TDZ 之添加對初代培養影響之結果如表 4 所示。由結果顯示 TDZ 之添加與否或濃度並不影響其成活率皆可達 100%。在癒傷組織形成方面，添加濃度愈高者產生的量有愈高之驅勢，尤其以添加 2 mg/l 者最高，可達 90%，濃度 0.05 mg/l 以下 TDZ

之癒傷組織形成較少。培殖體之長度以濃度 0.5~1 mg/l 較長，達 5.4~5.8 mm；對照組與高濃度(2 mg/l)者的長度僅有 2.5~2.7 mm 。

表 1.不同濃度鹽類與蔗糖對酪梨砧木' G755 '初代培養之影響 [z]

Table1. Effects of salt levels and sucrose on initial culture of shoot tip of 'G755' avocado [z]

Sucrose(%)	1/4MS		1/2MS		MS		2MS	
	Survial (%)	Explant length (mm)	Survial (%)	Explant length (mm)	Survial (%)	Explant length (mm)	Survial (%)	Explant length (mm)
1	79	2.3±0.1[y]	98	2.1±0.1[y]	72	2.6±0.1[y]	43	2.0±0.1[y]
2	100	2.4±0.1	93	2.2±0.2	68	2.2±0.1	48	2.5±0.1
3	83	2.4±0.2	100	2.8±0.1	69	2.5±0.2	39	2.2±0.2
4	73	2.7±0.1	88	2.3±0.3	78	2.5±0.2	32	2.2±0.1
5	48	2.2±0.2	75	2.1±0.1	68	2.0±0.1	28	2.5±0.1

z：1/2MS 添加蔗糖 3 %，液態濾橋培養，培養 4 週後調查。

z：Basic media: 1/2MS supplemented with 3 % sucrose, culture duration was 4 weeks.

y：平均值±標準誤差。

y：Mean ± S.E.

表 2. Kinetin 對酪梨砧木'G755'初代培養之影響 [z]

Table 2. Effects of kinetin on initial culture of 'G755' avocado shoot tip [z]

Kinetin（mg/l）	Survival （%）	Callus （%）	Browning （%）	Explant length(mm)
0	78	0	10	5.0±0.4 [y]
0.5	65	20	43	5.2±0.2
1	100	28	28	6.7±0.2
2	90	1	35	6.0±0.1
4	58	10	63	5.5±0.2

z：1/2MS 添加蔗糖 3 %，液態濾橋培養，培養 4 週後調查。

z：Basic media: 1/2MS supplemented with 3 % sucrose, culture duration was 4 weeks.

y：平均值±標準誤差。

y：Mean ± S.E.

表 3. BA 對酪梨砧木'G755'初代培養之影響 [z]

Table 3. Effects of BA on initial culture of 'G755' avocado shoot tip [z]

BA(mg/l)	Survival (%)	Callus (%)	Browning(%)	Explant length(mm)
0	73	20	40	3.7±0.1 [y]
0.5	80	65	40	4.7±0.2
1	45	73	40	4.7±0.0
2	5	100	28	2.3±0.0
4	75	60	43	5.1±0.1

z：1/2MS 添加蔗糖 3 %，液態濾橋培養，培養 4 週後調查。

z：Basic media: 1/2MS supplemented with 3 % sucrose, culture duration was 4 weeks.

y：平均值±標準誤差。

y：Mean ± S.E.

表 4. TDZ 對酪梨砧木'G755'初代培養之影響 [z]

Table 4. Effects of TDZ on initial culture of 'G755' avocado shoot tip [z\]

TDZ（mg/l）	Survival （%）	Callus （%）	Explant length（mm）
0	100	3	2.5±0.1 [y]
0.05	100	5	4.5±0.8
0.1	100	18	4.9±0.2
0.5	100	15	5.4±0.5
1	100	47	5.8±0.4
2	100	90	2.7±0.7

z：1/2MS 添加蔗糖 3 %，液態濾橋培養，培養 4 週後調查。

z：Basic media: 1/2MS supplemented with 3 % sucrose, culture duration was 4 weeks.

y：平均值±標準誤差。

y：Mean ± S.E.

(三) 預防莖頂褐化試驗

培養基中添加預防褐化之化學物，對初代培養影響之結果如表 5 所示。添加活性碳的成活率最高達 80%，褐化率也最低，僅有 20%；而以加維他命 C 及加檸檬酸者的結果最差，成活率僅有 47%，褐化率高達 63%。至於添加 PVP 處理者與對照組之成活率相同，

都在 60%。但添加 PVP 處理之褐化程度較對照組稍輕。在培殖體之長度，均在 4~4.9 mm 之範圍，並無明顯的不同。

表 5.培養基中不同預防褐化處理對酪梨砧木'G755'品種初代培養之影響 [z]

Table 5.Effect of medium treatments to prevent browning on initial culture of 'G755' avocado shoot-tip [z]

Treatment	Survival (%)	Browning (%)	Explant length(mm)
CK	60	57	4.4±0.4 [y]
0.1% AC	80	20	4.4±0.3
0.1% PVP	60	45	4.0±0.2
Vit.C+Citric acid	47	63	4.9±0.3

z：1/2MS 添加蔗糖 3%及洋菜粉 0.7 %，培養 4 週後調查。

z：Basic media: 1/2MS supplemented with 3 % sucrose and 0.7 % agar, culture duration was 4 weeks.

y：平均值±標準誤差。

y：Mean ± S.E.

討　論

一、鹽類及蔗糖濃度之影響

於基本鹽類濃度上，大部植物之莖頂組織均可在低濃度之鹽類下成活，而高濃度反而會致死，初代培養培殖體對鹽類之容忍性極低(Uoskainen, 1987)。本試驗於不同鹽類濃度及蔗糖濃度對酪梨砧木初代培養之影響，結果以 1/2MS 成活率最高。當鹽類濃度太高時(2MS)，培殖體嚴重褐化，導致成活率降低，芽亦無法生長。本試驗結果以添加 30 g/l 之成活率達最高 100%，培殖體長度的表現也最佳 2.8 mm。於蔗糖與鹽類濃度交互影響時，以高鹽類濃度(2MS)和高蔗糖濃度(50g/l)成活率最低僅有 28%。推測可能是培養基內滲透壓過高，不利於培殖體之成活與生長。Premkumar 等人(2002)曾發現於高蔗糖濃度(50 g/l)下，酪梨之培殖體所分泌的酚類化合物會較高於低蔗糖濃度(30 g/l)。玫瑰微體繁殖芽體增殖時，也是以蔗糖濃度 30 g/l 為最適合瓶苗之生長(Carelli and Echeverrigaray, 2002)。多數果樹亦以 1/2MS 添加 3%蔗糖濃度較適合，由試驗之結果可知，酪梨' G755'品種初代培養時，蔗糖濃度以 20~30g/l 為適宜。

二、生長調節劑之影響

本試驗中，kinetin 對酪梨'G755'初代培養成活率之影響方面，培養基中以添加 kinetin 1 mg/l 成活率及幼梢長度之表現最佳。但培養基中添加 TDZ 處理之芽體略呈水浸狀，培殖體呈現半透明、組織較肥厚及易碎等問題發生。羅及楊(2000)於錫蘭橄欖之初代培養時，培養基內添加 TDZ 亦有呈水浸狀之問題。此與 *Pyrus pyrifolia* 培養時有類似之結果(Kadota and Niimi, 2003)。添加 BA 或 TDZ 濃度 2 mg/l，培殖體基部易產生大量的癒傷組織，導致癒傷組織阻礙芽體伸長而致死。且癒傷組織呈水浸狀、褐色。其中以添加 kinetin 處理，芽體之伸長最正常，雖芽體長度表現並非最佳，但基部不會產生大量癒傷組織。葉及楊(1999)於印度棗初代培養時，培養基中以加 kinetin 時所獲得之結果最佳。

三、褐化問題之探討

在培殖體初代培養褐化之問題上，除了液態紙橋培養可降低褐化程度，另外，亦可在培養基內添加抗氧化劑、活性碳或 PVP。本試驗以添加 PVP、活性碳及抗氧化劑(ascorbic acid)加檸檬酸(citric acid)。結果以添加 0.1%活性碳的成活率最高 80%，褐化率最低 20%。在長度之表現上則無差別。Wang (1994)在蘋果'Fuji'及梨'Jinhua'之試驗上發現，蘋果初代培養時，以添加 ascorbic acid 及 citric acid，褐化率最低僅有 25%；但梨'Jinhua'以添加 0.25%活性碳對培殖體較具有預防褐化之效果。活性碳與 PVP 都屬大分子化合物，植物體無法吸收利用，但多孔隙之構造可吸附酚類化合物，因此微體繁殖時常被運用在預防培殖體褐化。活性碳普遍被運用在植物組織培養之培養基上，添加活性碳於培養基中可以影響試管苗之形態發育及吸附有毒物質或二次代謝產物(Druat and Wulf, 1993；Pan and Stadan, 1998；Wann et al., 1997；Mensuali-Sodi et al., 1993；Ebert et al., 1993)。綜合以上結果與前人研究，酪梨初代培養，可以添加適量的活性碳以降低培殖體褐化之發生。

綜合本研究之試驗結果，酪梨抗病砧木'G755'之莖頂初代培養可以 1/2MS 基本培養基添加 3%蔗糖及 kinetin 2mg/l 之液態紙橋培養。

參 考 文 獻

葉如毓、楊耀祥。1999。印度棗莖頂組織培養之研究。興大園藝 24:15-28。

鍾志明。1997。台灣酪梨品種改良。提昇果樹產業競爭力研討會專集 I p127-140.

羅惠萍、楊耀祥。2000。錫蘭橄欖莖頂培養。興大園藝 25:13-25。

Ben-Ya'acov A. and E. Michelson. 1995. Avocado rootstocks. Hort. Rev. 17:381-429.

Ben-Yàacov, A. and M. Zilberstaine. 1999. Clonal avocado (*Persea americanc* Mill.) rootstocks in Israel. Revista Chapingo Serie Horticltura 5:39-42.

Carelli, B. P. and S. Echeverrigaray. 2002. An improved system for the in vitro propagation of

rose cultivars. Sci. Hort. 92: 69-74.

Druart, P. and O. D. Wult. 1993. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 32:97-99.

Ebert, A., F. Taylor, and J. Blake. 1993. Changes of 6-benzylaminopurine. and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33:157-162.

Kadota, M. and Y. Niimi. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72:261-265.

Mensuali-Sodi, A., M. Pnizza, G. Serra, and F. Tognoni. 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue culture. Sci. Hort. 54:49-57.

Pan, M. J. and J. van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. Plant Growth Regul. 26:155-163.

Phillips, D. 1985. The clonal propagation of phytophthora resistant avocado rootstocks. Acta Hort. 166:65-66.

Premkumar, A., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro, M. A. Quesada, and J. Mercado. 2002. Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during in vitro cultivation and subsequent ex vitro acclimatization. Trees 16:569-575.

Ray, P. K. 2002. Avocado. Breeding tropical and subtropical fruits. Narosa Publishing House, India. pp.260-275.

Salazar-Garcia, S. and M. W. Borys. 1983. Clonal propagation of the avocado through "Franqueamiento". California Avocado Yearbook 67:69-72.

Uosukainen, M. 1987. Establishment of culture without preconditioning. Acta Hort. 212:60.

Wang, Q., H. Tang, T. Quan, and G. Zhou. 1994. Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear culture in vitro. J. Hort. Sci. 69:833-839.

Wann, S. R., R. L. Veazey, and J. Kaphammer. 1997. Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolysis in tissue culture media during autoclaving. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50:221-224.

Studies on Initial Culture of Shoot Tip of Avocado Rootstock 'G755' (*Persea schiedeana*)

Min-Fang Liao [1)] Yau-Shiang Yang [2)]

Key words: avocado, rootstock, tissue culture

Summary

The objective of this study was to develop an effective method for in vitro propagation of avocado (*Persea schiedeana*). Shoot tips were harvested from ten-year-old 'G755' rootstock trees. Media contained different salt levels and sucrose concentrations were tested. Shoot growth was enhanced when 2 mg/l kinetin was added into the medium. Nevertheless, when 2 mg/l BA was used, instead of kinetin, the survival percentage was decreased and a lot of callus formed at the bases of explants. The browning rate was decreased by adding 0.1% active charcoal to the medium.

1) Graduate student in MS Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.