

蜜棗莖頂組織培養之研究

陳嘉惠¹⁾ 楊耀祥²⁾

關鍵字：印度棗、組織培養

摘要：本研究係探討蜜棗(*Zizyphus mauritiana* Lam. cv. Mizao)莖頂組織培養之方法。在夏季生長旺盛時期，採取 5cm 之新梢於解剖顯微鏡下切取 0.5mm，含 4 片葉原體之莖頂生長點進行培養。初代培養以 1/2MS 添加 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基培養 30 日後，將生長強健之培植體，以 1/2MS 添加 0.22 μ M BA、1.25 μ M IBA、30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基，經 3 次繼代培養後可移至 1/2MS 添加 0.5 μ M BA、30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基中進行增殖培養。發根階段則取 1cm 長之幼梢扦插於 1/2MS 添加 25 μ M NAA、30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基，經 2 週黑暗處理後移植至不含 auxin 之培養基，在 30 日後可獲得發根的小苗。

前 言

印度棗(*Zizyphus mauritiana* Lam.)原產印度、緬甸及中國雲南一帶。台灣目前之栽培面積為 2,305 公頃，總產量為 32,844 公噸(94 年農業統計年報)，其中蜜棗在市場之佔有率達 7 成以上，是現今最受消費者歡迎的主要經濟栽培品種，產區集中於高雄、屏東、台南、嘉義等縣(邱，2005)。傳統上，印度棗繁殖方法主要是以嫁接為主，果農多以實生苗定植，翌年春季施行切接商業品種。目前國內利用莖頂組織培養的方法，除了高朗 1 號(葉及楊，1999)之外，並未有其他品種之研究報告。本研究主要目的在探討適合蜜棗品種的培養方法，建立其組織培養健康苗的繁殖技術，進一步期供作栽培之利用。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班學生。
 - 2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

材料及方法

一、試驗材料

(一) 植物材料

本試驗之植物材料選用栽植於台中縣霧峰鄉中興大學葡萄中心 4 年生、彰化縣大村鄉台中區農業改良場之 3 年生及屏東市高雄區農業改良場之 5 年生蜜棗植株，供試植株依一般果園管理，採芽前未進行任何預措處理。

(二) 基本培養基之配製及培養環境

基本培養基之配方為 MS 鹽類，該成分包括大量元素、鐵源、微量元素及有機酸與維生素等。培養基中添加之植物生長調節物質包括 IBA、NAA、BA、kinetin、zeatin 及 GA3。以固體培養者添加 8g/l 洋菜，pH 值以 1N 之 KOH 或 1N 之 HCl 調整為 5.7-5.8。培養容器用 25×150 mm 試管，每支試管加入培養基 10ml。配置好之培養基用鋁箔封口，置於高溫高壓殺菌釜中以壓力 1.05kgcm²、溫度 121°C、滅菌 20 分鐘。培養環境條件為光照 69μmol m⁻²s⁻¹，光期 16 小時，暗期 8 小時，溫度 27±1°C。

二、試驗方法

(一) 初代培養

採取生長旺盛之新梢長約 5cm，除去葉片後，以 1% 之 NaOCl 添加 1-2 滴 tween 20 震盪消毒 10 分鐘，在無菌操作台內用無菌水淋洗 5-6 次，於解剖顯微鏡下切取長約 0.5mm 含 4 個葉原體之莖頂生長點，做為培植體。

1. 基本鹽類及培養基物理形態對莖頂初代培養之影響

以不同濃度鹽類之培養基及培養基之物理形態進行培養試驗，鹽類濃度包括 1/4 MS、1/2MS、MS、2MS 四種，培養基物理形態分別為液態及固態二種。液態紙橋培養基僅添加 30g/l 蔗糖，固態除了 30g/l 蔗糖外多添加 8g/l 洋菜，皆不添加任何植物生長調節物質。本試驗共 8 種處理，每處理取 10 個培植體，培養 30 日後調查其成活率、鮮重及大小。

2. IBA 對初代培養之影響

以 1/2MS 為基本鹽類分別添加 0、0.5、1、2μM 之 IBA 及 30g/l 蔗糖、8g/l 洋菜，每種處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其成活率、大小、鮮重及癒傷組織量。

3. NAA 對初代培養之影響

以 1/2MS 基本鹽類分別添加 0、0.5、1、2μM 之 NAA 及 30g/l 蔗糖、8g/l 洋菜，每處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其成活率、大小、鮮重及癒傷組織量。

4. BA 對初代培養之影響

1/2MS 基本鹽類分別添加 0、0.25、0.5μM BA 及 30g/l 蔗糖、8g/l 洋菜，每處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其成活率、大小、鮮重及癒傷組織量。

(二) 增殖培養

1. BA 對增殖培養之影響

將培植體植於分別添加 0、0.5、1、5 及 10 μ M BA 於含 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之 1/2MS 培養基，每處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其增殖率、大小、鮮重及癒傷組織量。

2. Kinetin 對增殖培養之影響

將培植體植於分別添加 0、0.5、1、5 及 10 μ M kinetin 於含蔗糖及 8g/l 洋菜之 1/2MS 培養基，每處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其增殖率、大小、鮮重及癒傷組織量。

3. Zeatin 對增殖培養之影響

將培植體植於分別添加 0、0.5、1、5 及 10 μ M zeatin 於含 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之 1/2MS 培養基，每處理各 10 個培植體，培養 30 日調查其增殖率、大小、鮮重及癒傷組織量。

(三) 幼梢生長培養

1. GA3 對幼梢生長之影響

將培植體植於分別添加 0、0.5、1、5 及 10 μ M GA3 於含 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之 1/2MS 培養基，每處理各 10 個培植體，培養 30 日後調查其長度、鮮重及癒傷組織。

2. 蔗糖對幼梢生長之影響

將培植體植於分別添加 0、10、20、30、40 及 50g/l 之蔗糖於含 8g/l 洋菜之 1/2MS 培養基，每處理各 10 個培植體，培養 30 日後調查其長度、鮮重及癒傷組織。

(四) 發根培養

取長約 1cm 之幼梢植於含 25 μ M NAA 之 1/2MS 添加 8g/l 洋菜之固態培養基，同時配合不同週數之黑暗前處理後，移植至不含 auxin 之發根培養基中，於第 30 日調查其發根率、根數及根長。

結 果

一、初代培養

(一) 基本鹽類濃度及培養基物理形態對初代培養之影響

基本鹽類對蜜棗初代之影響，結果如表 1 所示。以 1/4MS 固態培養之成活率最高，達 80%，其次為 1/2MS、1/4MS 固態及 1/2MS 液態培養基，成活率皆為 70%，2MS 之高鹽濃度培養者，不論固態或液態，存活率皆低，其中液態培養基僅有 10% 的成活率。在培植體的大小方面，以 1/2 量之 MS 液態培養獲得之枝梢最長，達 8.2mm，其次為 1/2 量之 MS 固態培養基，枝梢長達 8mm，生長最差者為高鹽濃度之 2MS。在鮮重方面，液態培養基皆普遍高於固態培養基，其中以 MS 液態培養基之鮮重最高，達 38.1mg，但玻璃質化情形也最嚴重。

(二) IBA 對初代培養之影響

IBA 對初代培養之影響，結果如表 2 所示。4 種不同濃度之 IBA，成活率皆達 90% 以

上，在培植體的長度方以未添加 IBA 者最長為 14.5mm，鮮重方面亦最重。IBA 處理會刺激癒傷組織之形成，隨著 IBA 濃度的提高，癒傷組織量隨之增加。

(三) NAA 對初代培養之影響

NAA 濃度對初代培養之影響，結果如表 3 所示。培植體的大小以未添加 NAA 者最長達 11.6mm，鮮重方面亦以無添加 NAA 者最重；另外，隨著 NAA 使用濃度的提高癒傷組織量會隨之增加。

(四) BA 對初代培養之影響

BA 濃度對初代培養之影響，結果如表 4 所示。培植體之生長以無添加 BA 者最長達 10.9mm，其次為添加 0.25 μ M BA 者，隨著 BA 使用濃度之增加，幼梢長度則隨之降低。當 BA 濃度為 0.5 μ M 時，即產生大量癒傷組織。

二、增殖培養

(一) BA 對增殖培養之影響

BA 對增殖培養之影響，結果如表 5 所示。培養基中加入 BA，雖有芽體之形成，但僅 1~2 個芽，增殖情形並不顯著，無 BA 添加則無芽體增殖；幼梢長度方面則隨 BA 濃度的提高而下降，癒傷組織之形成量則呈相反之結果。當 BA 濃度提高至 5 μ M 以上時，部份培植體莖部則產生肥大且透明之玻璃質化情形。

(二) Kinetin 對增殖培養之影響

Kinetin 對增殖培養之影響，結果如表 6 所示。培養基中添加 kinetin 時，對芽體之增殖及生長並無促進之作用。

表 1. 不同濃度鹽類及培養基型態對蜜棗莖頂培養之影響^z

Table 1. Effects of salt levels and medium types on initial culture of shoot tip in 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| Salt level | Solid medium | | | Liquid paper bridge | | |
|------------|--------------|-----------------------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| | Survival (%) | Fresh weight | Explant length | Survival (%) | Fresh weight | Explant length |
| 1/4MS | 80 | 22.0 \pm 3.5 ^y | 5.3 \pm 0.6 | 60 | 22.3 \pm 2.6 | 4.2 \pm 0.8 |
| 1/2MS | 70 | 29.6 \pm 3.1 | 8.0 \pm 0.5 | 70 | 37.4 \pm 3.5 | 8.2 \pm 1.0 |
| MS | 70 | 31.8 \pm 4.5 | 7.2 \pm 0.8 | 50 | 38.1 \pm 3.1 | 5.3 \pm 0.6 |
| 2MS | 40 | 13.6 \pm 2.1 | 3.7 \pm 0.8 | 10 | — | — |

^z: Basal medium: liquid medium contains 30g/l sucrose, solid medium 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Means \pm S.E.

表 2. IBA 對蜜棗莖頂初代培養之影響^zTable 2. Effects of IBA on initial culture of shoot tip in 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| IBA (μM) | Survival (%) | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 90 | 14.5 \pm 0.6 ^y | 37.4 \pm 6.7 | 0 | — ^x |
| 0.5 | 100 | 9.8 \pm 0.5 | 35.5 \pm 4.6 | 20 | + |
| 1 | 90 | 7.4 \pm 0.5 | 34.5 \pm 5.9 | 30 | ++ |
| 2 | 100 | 8.3 \pm 0.5 | 30.8 \pm 3.4 | 60 | +++ |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Means + S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus < 5mg (+), callus > 5mg (++), callus > 20mg (+++).

表 3. NAA 對蜜棗莖頂初代培養之影響^zTable 3. Effects of NAA on initial culture of shoot tip in 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| NAA (μM) | Survival (%) | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 100 | 11.6 \pm 0.5 ^y | 39.7 \pm 4.0 | 0 | — ^x |
| 0.5 | 70 | 9.1 \pm 0.5 | 38.7 \pm 5.2 | 30 | ++ |
| 1 | 70 | 5.1 \pm 0.6 | 32.0 \pm 3.9 | 30 | ++ |
| 2 | 90 | 6.1 \pm 0.9 | 33.6 \pm 7.1 | 60 | +++ |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Means \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus < 5mg (+), callus > 5mg (++), callus > 20mg (+++).

表 4. BA 對蜜棗莖頂初代培養之影響^z

Table 4. Effects of BA on initial culture of shoot tip in 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| BA (μM) | Survival (%) | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 90 | 10.9 \pm 0.6 ^y | 41.7 \pm 4.4 | 20 | + ^x |
| 0.25 | 80 | 8.6 \pm 0.7 | 34.5 \pm 9.6 | 30 | ++ |
| 0.5 | 100 | 6.9 \pm 0.9 | 30.2 \pm 4.0 | 60 | +++ |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Means \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus < 5mg (+), callus > 5mg (++), callus > 20mg (+++).

表 5. BA 對蜜棗芽體增殖之影響^z

Table 5. Effects of BA on shoot multiplication of 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| BA (μM) | Axillary bud/explant | Fresh weigh (mg) | Shoot length (mm) | Callus (%) | Callus size |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 1 | 28.4 \pm 2.3 ^y | 8.0 \pm 0.8 | 0 | - ^x |
| 0.5 | 1.7 | 30.1 \pm 7.1 | 8.0 \pm 1.0 | 20 | + |
| 1 | 1.7 | 32.7 \pm 7.2 | 7.7 \pm 0.6 | 60 | ++ |
| 5 | 1.7 | 44.9 \pm 8.4 | 7.3 \pm 0.5 | 90 | ++ |
| 10 | 2 | 48.4 \pm 3.8 | 7.0 \pm 1.0 | 100 | +++ |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Mean \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus < 5mg (+), callus > 5mg (++), callus > 20mg (+++).

(三) Zeatin 對增殖培養之影響

Zeatin 對增殖培養之影響，如表 7 所示。芽體增殖方面，zeatin 對增殖並無顯著的改進，添加 1 μ M 者呈較多之趨勢，而培植體的伸長亦無明顯的不同。愈高濃度的 zeatin 處理對培植體之增殖的幫助不大之外，尚會導致培植體的生長畸形，明顯的症狀為莖部肥大且有白化之情形產生。

三、幼梢生長培養

(一) GA₃ 對幼梢生長之影響

不同濃度 GA₃ 對蜜棗幼梢生長之影響，結果如表 8 所示。在幼梢長度方面，以植於 1 μ M GA₃ 下之培植體，節間具有明顯之增長及葉片之開展，但頂端部位有黃化之現象，葉部有離層產生造成脫落並在離層處產生癒傷組織，當 GA₃ 處理濃度為 5 μ M，培植體基部會產生褐化。在重量方面，有添加 GA₃ 者呈增加的趨勢。

(二) 蔗糖對幼梢生長之影響

不同濃度蔗糖對幼梢生長之影響，結果如表 9。在幼梢鮮重方面，以 30g/l 之鮮重最大，為 34.6mg，以 10g/l 最低，僅 19.4mg。幼梢的長度方面，同樣以 30g/l 之長度最佳。蔗糖濃度低於 30g/l，除了褐化較為嚴重外，尚有培植體黃化之情形。

四、發根培養

本試驗結果如表 10 所示。以經過 2 週黑暗及前處理之培植體具有發根之能力，發根率達 50%，根則由基部癒傷組織形成處抽出，經由不同週數之前處理，其基部皆會有癒傷組織之形成。

表 6. Kinetin 對蜜棗芽體增殖之影響^z

Table 6. Effects of kinetin on shoot multiplication of 'Mizeo' Indian jujube *in vitro*^z.

| Kinetin (μ M) | Axillary bud/explant | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 1 | 6.4 \pm 0.5 ^y | 23.7 \pm 5.5 | 0 | — ^x |
| 0.5 | 1 | 6.4 \pm 0.9 | 39.3 \pm 6.0 | 0 | — |
| 1 | 1.3 | 6.1 \pm 0.9 | 27.5 \pm 7.5 | 0 | — |
| 5 | 1 | 6.8 \pm 0.5 | 31.7 \pm 5.2 | 0 | — |
| 10 | 1 | 6.1 \pm 0.3 | 22.4 \pm 8.4 | 0 | — |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Mean \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus < 5mg (+), callus > 5mg (++) , callus > 20mg (+++).

表 7. Zeatin 對蜜棗芽體增殖之影響^z

Table 7. Effects of zeatin on shoot multiplication of 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| Zeatin (μ M) | Axillary bud/explant | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|----------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 1 | 7.5 \pm 0.5 ^y | 29.8 \pm 5.0 | 0 | — ^x |
| 0.5 | 1.3 | 7.3 \pm 0.6 | 35.5 \pm 4.5 | 80 | + |
| 1 | 1.7 | 6.8 \pm 0.8 | 38.3 \pm 5.5 | 80 | ++ |
| 5 | 1.3 | 7.2 \pm 0.6 | 41.2 \pm 9.5 | 100 | +++ |
| 10 | 1.3 | 7.0 \pm 1.0 | 33.8 \pm 4.1 | 90 | +++ |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Mean \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus <5mg (+), callus >5mg (++), callus >20mg (+++).

表 8. GA₃ 對蜜棗幼梢生長之影響^z

Table 8. Effects of GA₃ on shoot growth of 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| GA ₃ (μ M) | Shoot length (mm) | Fresh weight (mg) | Callus (%) | Callus size |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| 0 | 7.8 \pm 1.0 ^y | 33.7 \pm 7.5 | 0 | — ^x |
| 0.1 | 8.8 \pm 0.8 | 39.7 \pm 5.9 | 0 | + |
| 0.5 | 8.0 \pm 1.0 | 38.5 \pm 5.0 | 10 | + |
| 1 | 10.4 \pm 0.9 | 38.4 \pm 6.9 | 10 | + |
| 5 | 8.3 \pm 0.7 | 40.7 \pm 3.3 | 10 | + |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar. Culture duration was 30 days.

^y: Mean \pm S.E.

^x: Callus size, no callus (-), callus <5mg (+), callus >5mg (++), callus >20mg (+++).

表 9. 不同濃度蔗糖對蜜棗幼梢生長之影響^zTable 9. Effects of sucrose levels on shoot growth of 'Mizao' Indian jujube *in vitro*^z.

| Sucrose (g/l) | Browning (%) | Shoot fresh weight (mg) | Shoot length (mm) |
|------------------|-----------------|----------------------------|----------------------|
| 0 | 80 | — | — |
| 10 | 40 | 19.4 ± 0.6 ^y | 6.8 ± 0.5 |
| 20 | 20 | 27.6 ± 2.1 | 6.3 ± 0.6 |
| 30 | 10 | 34.6 ± 4.3 | 7.3 ± 0.6 |
| 40 | 20 | 25.2 ± 4.0 | 6.0 ± 0.0 |
| 50 | 10 | 24.5 ± 3.8 | 6.3 ± 0.6 |

^z: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 8g/l agar. Culture duration was 30 days

^y: Means ± S.E.

表 10. NAA^z 及黑暗前處理對蜜棗發根之影響。Table 10. Effects of NAA^z and dark pretreatments on rooting of 'Mizao' Indian jujube *in vitro*.

| Dark Pretreatment (week) | Rooting (%) | Root number | Root length (cm) | Shoot length (cm) |
|-----------------------------|----------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 50 | 1.3 ± 0.6 ^x | 2.9 ± 2.0 | 3.4 ± 0.6 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^z: Concentration of NAA was 25μM.

^y: Basal medium: 1/2MS solid medium contains 30g/l sucrose and 8g/l agar without auxin.
Culture duration was 30 days.

^x: Means ± S.E.

討 論

一、初代培養

適量的鹽類濃度及培養基形態為影響培養成功之因子(Thomas and Ravindra, 1997)。Lux-Endric 等人(2000)發現蘋果培養在 3MS 高鹽濃度培養基中會導致葉色萎黃及莖頂壞疽死亡，草莓培養在鹽類減半之 MS 培養基成活率較高(Hdider *et al.*, 1994)。本試驗之結果發現，以 1/4MS 固態培養之成活率最高達 80%，接著以 1/2M 之固、液態及 MS 固態培養基達 70% 居次；但在培植體大小的表現上則以 1/2MS 液態最佳，其次為 1/2MS 固態培養基；液態培養可能可增加培植體的生長及器官的形成(Ebrahim and Ibrahim, 2000)；在高鹽濃度 2MS 下，固態雖有 40% 芽體存活，但鮮重低且芽體小，在液態則僅有 10% 之存活率，其餘皆褐化死亡。Choi 等人(1998)指出高鹽濃度會促使培植體褐化，顯示高鹽濃度不利於培植體之生長，推測可能是由於離子間之不平衡、離子毒性或貧乏的水分潛勢所造成。在培養基型態方面，以固態培養基之成活率較高，而芽體大小方面卻以 1/2MS 液態培養較佳，芽體長度達 8.2mm，但培植體有玻璃質化之現象發生，Debergh(1983)指出液態培養基或半固態培養基容易導致植株之生理失調(即玻璃質化)的產生，Avila 等人(1998)指出液態培養基會影響 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ，導致氮的濃度過高。古及蔡(1994)指出培植體若自培養基中吸收過量的氮易使體內 C/N 比率降低，而導致木質素及纖維素合成缺乏，進而產生玻璃質化的症狀。

植物生長調節劑是促進植物生命活動所必須的物質，其中 NAA、IAA 及 IBA 有利於器官之分化(陳, 1987)。本試驗分別以不同鹽類濃度之 IBA 與 NAA 對初代培養之影響，結果發現以 1/2MS 不添加任何濃度之 IBA 及 NAA 處理之效果最佳；幼梢長度方面，未添加 IBA 與 NAA 者其幼梢長度分別達 14.5mm 及 11.6mm。當添加不同濃度之 IBA 與 NAA 後，幼梢長度皆低於 10mm 以下，亦導致癒傷組織之形成，其形成率及形成量亦隨著 IBA 與 NAA 使用濃度的提高而增加。當添加 BA 處理時，亦有相同之結果，以不添加 BA 之 1/2MS 基本鹽類固態培養基之幼梢生長最長，但隨著 BA 使用濃度的高，培植體之長度會隨之降低，綜合以上結果顯示，最佳的處理以 1/2MS 且不需添加任何植物生長調節物質之基本培養基最佳。可能是由於莖頂為合成 auxin 之主要部位，其本身已具備足夠供其生長發育所需之生長素(George, 1993)，推測可能是由於蜜棗本身具有較高之內生荷爾蒙含量，因此培養基中不需添加任何植物生長調節物質便可生長，添加生長調節物質反而抑制生長(陳, 1987)。

二、增殖培養

細胞分裂素的濃度及類型對芽體器官之形成具有極大影響(Shankarmurthy *et al.*, 2004)。Vijaya Chitra 及 Padmaja (1999)指出桑樹培養時，培養基加入 0.5-1.0mg/l BAP 可促進芽體之增殖。本試驗分別探討 BA、kinetin 及 zeatin 等不同類型之 cytokinin 對增殖培養之影響，結果發現當培養基中以 BA 處理時，僅有些微增殖之情形，而以較低濃度 0.5 μM

BA 處理有較高的芽體長度但增殖率差。Heloir 等人(1997)指出增殖培養階段適宜的 BA 濃度可維持較佳的芽體增殖率，要達到較高的芽體增殖率必須確定理想之 BA 濃度，因此推測在蜜棗芽體增殖階之 BA 尚未求得適宜濃度，因此導致芽體增殖率低之情形；另外，試驗中也發現，當蜜棗培養於無 BA 或低濃度 BA 條件下，不會有玻璃質化現象，當培養基中添加 5 μ M BA 以上時則會引起蜜棗莖部肥厚，組織顯得易脆且葉片呈現水浸狀，當濃度提高至 10 μ M 此現象更為顯著；相同之情形亦發生於枇杷培養上，其以 BA 4mg/l 的增殖效果最佳，但是持續以高濃度 BA 培養 2~3 代後，除降低培植體之增殖率外亦導致嚴重玻璃質化現象(王及楊，1999)；杏(Marino *et al.*, 1993)在培養基中加入高濃度之 BA 亦產生嚴重玻璃質化現象。Heloir(1997)在葡萄的組織培養中也發現，添加濃度 8.9 μ M 的 BA 後即產生玻璃質化現象，降低 BA 的濃度則可降低玻璃質化率；Phan(1991)發現 BA 濃度與玻璃質化的程度成正比，許多的研究亦指出 BA 與玻璃質化有關，因此推測玻璃質化是由 cytokinin 引起細胞分裂之不平衡，為分化過程的一種干擾，進而影響木質素形成所產生之結果(Phan, 1991)。Kinetin 對芽體增殖之試驗，發現其對芽體之增殖亦不具效果，此結果與葉及楊(1999)之試驗結果相似，推測可能 cytokinin 之濃度不適宜，因此，導致蜜棗芽體增殖率差。黃及楊(1998)指出霧台柿添加 zeatin 並利用雙相培養基進行培養，可明顯提高增殖率及枝梢長度，但會刺激培植體基部產生大量的癒傷組織；本試驗結果發現，zeatin 處理除了刺激蜜棗培植體產生大量癒傷組織外，對芽體之增殖效果差，對幼梢的抽長亦不具效果。綜合以上不同種類 cytokinins 之試驗結果發現，高濃度的 cytokinin 皆會造成培植體產生大量的癒傷組織及玻璃質化等現象，導致芽體畸型，葉片捲曲、葉綠素降低；因此為了使培植體能達到較高的增殖率並具有較佳之品質、健康及低變異等條件，必須先知道作物本身的習性及生長素的作用，以施用最適合之生長調節物質及濃度(Vieitez and Vieitez, 1983)。

三、GA₃ 對幼梢生長之影響

GA₃ 對細胞分裂或伸長具有促進之作用(陳，1987)。本試驗以添加不同濃度 GA₃ 對幼梢生長之影響。結果以添加 1 μ M GA₃ 成活率最高，褐化率最低。在長度之表現上則無差別。橄欖培養於添加 GA₃ 培養基中對芽體之伸長具有明顯促進之效果(Chaari-Rkhis *et al.*, 2006)；*Acacia* (Vengadesan *et al.*, 2003) 及 *Quercus* (Purohit *et al.*, 2002) 以 GA₃ 處理同樣具有相同的效果。本試驗結果發現，除了以添加 1 μ M GA₃ 對幼梢之生長有促進之效果外，其餘濃度則效果不顯著，且會導致部份培植體黃化及葉片脫落之情形發生，推測可能是由於 GA₃ 會誘發培植體乙烯之生成而抑制芽體的伸長及促進離層之形成。

四、暗處理對發根培養之影響

Pierik(1997)指出發根需有連續的黑暗處理。本試驗將幼梢扦插於含 25 μ M NAA 之 1/2MS 固態培養基進行黑暗前處理，結果發現，經過 2 週黑暗前處理之培植體具有發根之能力；Monteuuis(2000)指出相思樹(*Acacia mangium*)在發根培養基培養暗處理 14 日有較高的發根率，而橡樹以連續 42 日暗處理之幼梢發根率最高(Pierik *et al.*, 1997)，可能是由於在

暗環境下可減緩內生 auxin 或外加 auxin 之新陳代謝而有助於根之誘導(Norton and Boe, 1982)，而不同植物之發根有不同的暗處理需求。

綜合本試驗之結果發現，蜜棗之組織培養過程中。在夏梢生長旺盛時期採取莖頂，培養於 1/2MS 添加 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基 30 日，即可生長良好；接著移至 1/2MS 添加 0.5 μ M BA、30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜之固態培養基中促進幼梢生長。發根培養以 25 μ M NAA 添加 30g/l 蔗糖及 8g/l 洋菜經 2 週之黑暗前處理後移至不含生長素之 1/2MS 培養基中，再經 30 日之培養後即可獲得發根小苗，本研究增殖培養試驗中並未發現效果明顯的培養方法則有待進一步探討。

誌 謝

試驗期間，感謝高雄區農業改良場邱祝櫻副研究員、鳳山熱帶試驗研究所張麗華助理研究員及台中區農業改良場邱禮弘副研究員提供試驗材料及寶貴意見。

參 考 文 獻

- 王珠容、楊耀祥。1999。枇杷莖頂組織培養之研究。興大園藝。24(3): 1-14。
- 古新梅、蔡新聲。1994。繼代培養對康乃馨試管苗玻璃質化的影響。中華農業研究。43(3): 308-319。
- 邱祝櫻。2005。台灣農家要覽，農作篇(二)。財團法人豐年社。163-168 pp。
- 黃慧美、楊耀祥。1998。霧台柿莖頂組織培養之研究。興大園藝。23(1): 1-15。
- 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。
- 農業統計年報。2004。果品(14) 棗、番荔枝。行政院農業委員會。
- 陳振光。1987。莖尖離體培養，果樹組培養。上海科技出版社。101-125pp。
- 羅惠萍、楊耀祥。2000。錫蘭橄欖莖頂培養。興大園藝。25: 13-25。
- 廖明芳、楊耀祥。2005。酪梨砧木'G755'莖頂初代培養之研究。植物種苗。7(4): 33-40。
- Avila, D. L., S. M. Pereyra, and J. A. Argello. 1998. Nitrogen concentration proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience 33(2): 336-338.
- Baker, B. S. and S. K. Bhatia. 1993. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 273-277.
- Bansal, Y. K. and P. Pandey. 1993. Micropropagation of *Sesbania acculeata* Pers. adventitious organogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 32: 351-355.

- Chaari-Rkhis, A., M. Maalej, S. O. Messaoud, and N. Drira. 2006. *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA₃ treatment. Full Length Research Paper.
- Choi, Y., D. Yang, and K. Choi. 1998. Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 52: 177-181.
- Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
- Ebrahim, M. K. H. and I. A. Ibrahim. 2000. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. *Sci. Hortic.* 86: 211–221
- George, E. F. 1993. Effects of gibberellic acid on tissue culture. In: *Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. (2nd)*. Exegetics Ltd., Edington, Wilts. BA 13 4QG, England. pp.420-453.
- Hdider, D., L. P. Vezina, and Y. Desjardins. 1994. Short-term studies of ¹⁵NO₃⁻ and ¹⁵NH₄⁺ uptake by micropropagation strawberry shoots cultured with or without CO₂ enrichment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 185-191.
- Lux-Endrich A., D. Treutter, and W. Feucht. 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 15-21.
- Marino G., G. Bertazza, E. Magnanini, and A. D. Altan. 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34: 235-244.
- Mathur, N., K. G. Ramawat, and D. Nandwani. 1995. Rapid *in vitro* multiplication of jujube through mature stem explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 75-77.
- Mensuali-Sodi, A., M. Panizza, and F. Tognoni. 1995. Endogenous ethylene requirement for adventitious root induction and growth in tomato cotyledons and lavandin microcuttings *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 32: 381-390.
- Monteuuis, O. and M. C. Bon. 2000. Influence of auxin and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 63: 173–177.
- Nordstrom, A. M. and L. Elisaaon. 1984. Regulation of root formation by auxin-ethylene interaction in pea stem cuttings. *Physiol. Plant.* 61: 298-302.
- Norton, M. E. and A. A. Boe. 1982. *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. *Hort. Sci.* 17: 190–191.
- Phan, C. T. 1991. Vitreous state *in vitro* culture: Ethylene versus cytokinin. *Plant Cell Rept.* 9: 517-519
- Pierik, R. L. M., J. Oosterkamp, and M. A. C. Ebbing. 1997. Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* 'Fastigiata'. *Sci. Hort.* 71:

87-92.

- Purohit, V. K., S. Tamta, S. Chandra, P. Vyas, L. M. S. Palni, and S. K. Nandi. 2002. *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Quercus glauca*: Important Himalayan oaks. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69(2): 121-133.
- Rathore, T. S., R. P. Singh, N. S. Deora, and N. S. Shekhawat. 1992. Clonal propagation of *Zizyphus* species through tissue culture. *Sci. Hort.* 51: 165-168.
- Shankarmurthy, K., V. Krishna, K. R. Maruthi, and B. A. Rahiman. 2004. Rapid adventitious organogenesis from leaf segments of *Embelia ribes* Burm. — a Threatened Medicinal Plant. *Taiwania* 49(3): 194-200.
- Sriskandarajah, S., S. Frello, and M. Serek. 2001. Induction of adventitious shoots *in vitro* in *Campanula carpatica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 295-298.
- Thomas, P. and M. B. Ravindra. 1997. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, and decontamination treatment on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J. Hort. Sci.* 72(5): 713-722.
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, P. Anand, and N. Selvaraj. 2003. *In vitro* propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. from nodal segments of 10-year-old tree. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 409-414
- Vieitez, A. M. and M. L. Vieitez. 1983. *Castanea Sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort.* 18: 343-351.
- Vijaya Chitra, D. S. and G. Padmaja. 1999. Clonal propagation of mulberry (*Morus indica* L. cultivar M-5) through *in vitro* culture of nodal explants. *Sci. Hort.* 80: 289-298.
- Ziv, M. 1991. Quality of micropropagated plants-vitrification. *In Vitro Cell and Dev. Biol.* 27: 64-69.

Studies on Shoot Tip Culture of Indian Jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam. cv. Mizao)

Chia-Hui Chen¹⁾ Yau-Shiang Yang²⁾

Key words: Indian jujube, Tissue culture

Summary

In vitro propagation of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lam.cv. Mizao) was carried out to develop an optimal micropropagation system in this study.

Shoot tips about 5cm in length were harvested from active summer shoots and shoot apices ca. 0.5mm were excised under microscope for initial culture. Shoot tips culture was achieved by employing a soild 1/2MS medium. Survived explants were transferred to solid agar medium containing the 1/2MS, 0.22 μ M BA, 1.25 μ M IBA, 30g/l sucrose and 8g/l agar for further growth. Multiple shoots were induced by 1/2MS medium containing 30g/l sucrose and 8g/l agar plus 0.5 μ M BA for 30days.

For rooting, the shoots grew above 10mm in height, were cultured in darkness pretreatment in 1/2MS medium containing 25 μ M NAA for two weeks, then transplanted to an auxin-free 1/2MS medium for 30days.

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

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

