

生長素誘導玫瑰花小葉器內培養之體胚發生

徐詠勝¹⁾ 王才義²⁾

關鍵字：玫瑰花、基因型、NAA、picloram、BA、胚性癒傷組織、體胚發生

摘要：為了提高胚性癒傷組織的形成率並縮短體胚發生的時間，因此描述一種從玫瑰花器內小葉經由體胚發生再生植株的步驟。測試 NAA 和 picloram 兩種生長素在不同濃度 (0.25, 0.5, 1 or 2 mg/l) 下對五個品種玫瑰花 (克利斯汀 迪奧、鐵凡尼、奧克拉荷馬、雷射、白英國女王) 的器內小葉培植體誘導體胚發生的能力。在含 NAA 或 picloram 的 MS 培養基中，癒傷組織可從五種玫瑰花品種的器內小葉中被產生。雖然所有品種都能產生癒傷組織，但是僅‘鐵凡尼’能在含 NAA 的 MS 培養基產生胚性癒傷組織。基因型在胚性分化上的影響顯著。‘鐵凡尼’小葉培植體培養在含 1 mg/l NAA 的 MS 培養基 4 週後，再繼代培養到含 2 mg/l BA 的 MS 培養基，再生株數量最高。

前 言

玫瑰花 (*Rosa* spp.) 由於經濟價值高且栽培廣泛，是重要的園藝作物。傳統上，玫瑰花卉種依賴有性交配 (sexual crossing) 和選拔芽變 (sport)。但是由於異質性 (heterogeneity) 高且缺乏自交系，多年生且因染色體數廣泛而造成高度不稔 (Li *et al.*, 2002)。此外，玫瑰花某些園藝性狀的基因庫也受到限制。

體胚發生有潛力促進薔薇屬廣大基因庫的利用，但廣泛的培植體來源和實驗方式被利用在不同的玫瑰花物種和品種上，強烈的暗示一種適用於個別獨立品種產生胚性癒傷組織的方式，並配合再生植株有效瓶外馴化，對玫瑰花而言困難實現 (Marchant *et al.*, 1996)。

本研究的目的是尋求植物生長調節劑誘導體性癒傷組織的最適濃度以提高胚性癒傷組織的形成率，期望能對玫瑰花卉種有所助益。

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副教授，通訊作者。

材料與方法

一、試驗材料

中興大學精密溫室內容器栽培之 5 個品種玫瑰花。分別是：1.‘鐵凡尼’2.‘克利斯汀 迪奧’3.‘奧克拉荷馬’4.‘白英國女王’5.‘雷射’

二、初代培養

(一)、無菌材料之建立

剪取 5 品種之花莖，除花蕾以下 2 節及切剪處向上 2 節不用外，其餘部份作為瓶內單節扦插的材料。先去除皮刺，並修剪成帶單芽的 5 cm 莖段，放入含次氯酸鈉(0.5% v/v) 溶液的 250 ml 三角瓶中，並添加 1 滴 Tween-80。置於含 2/3 水量的震盪水槽內以超音波震盪器(elma[®] ULTRASONIC LC30H, Germany)震盪 12-13 分鐘，再以無菌水漂洗 4-5 次，每次約 5-6 分鐘，之後接種於含 2.5 mg/l BA 及蔗糖 30 g/l 的全量 MS 配方固體培養基，每試管一插穗，每品種 40 支試管。

(二)、培植體材料

每隔 4 週繼代培養一次。培養基成份與初代培養相同。除生長調節劑試驗所使用的培植體材料是經 2 次繼代培養的瓶內株葉片外，其餘實驗都以初代培養 4 週後的瓶內株葉片為材料。

三、體胚形成

(一)、生長調節劑試驗

1.小葉癒傷組織誘導

在已滅菌過且鋪有 Whatman[®] 1 號濾紙的玻璃培養皿內添加少量無菌水，分別將 5 個品種的器內完全展開小葉(length = cm)於水中切割，去除小葉柄，以葉脈為中心用解剖刀縱橫切成帶葉脈之方塊，面積約為 0.5 cm²。將葉片培植體葉背朝上接種於含全量 MS 配方、30 g/l 蔗糖，並添加不同濃度的生長素(NAA、picoram)，濃度分別為 0.25、0.5、1、2 mg/l 的平板培養基上。各處理每皿接種 8 片葉片培植體，共 3 重複。經 4 週暗培養後，調查葉片癒傷組織形成率、發根癒傷組織率、生長指數 (growth index)、褐化指數 (browning index) 及葉片褐化率。生長指數與褐化指數訂定標準如下：

癒傷組織之生長指數：

0：完全無生長。

1：小葉有扭曲變形，葉背有少許癒傷組織。

2：從小葉中脈或葉緣等切口處開始形成癒傷組織。

3：葉緣或葉背內部所形成的癒傷組織未達整個葉培植體的 1/2。

4：葉緣或葉背內部所形成的癒傷組織超過整個葉培植體的 2/3。

5：癒傷組織完全覆蓋住培植體表面。

6：培植體或癒傷組織產生不定根。

褐化指數：

- 0：無褐化。
- 1：葉背出現局部褐色斑點。
- 2：褐斑逐漸擴大，但未達整個培植體 1/2。
- 3：褐斑面積超過整個培植體 1/2。
- 4：培植體僅剩局部一點未褐化。
- 5：培植體完全褐化。

2.小葉癒傷組織增殖

將經生長素處理 4 週後的葉培植體，繼代培養至含(2 和 4 mg/l) BA 和原(0.25、0.5、1 及 2 mg/l) NAA 誘導處理濃度 MS 培養基的三角瓶中，且在光照下培養，每瓶有 2 個培植體，每個濃度處理各 4 重複。經 4 週培養後，調查胚性癒傷組織形成率。之後將培養物再繼代培養至含 2 mg/l BA 的 MS 培養基 4 週後，再移到 1 mg/l BA 的 MS 培養基經 8 週後調查芽體再生率。增殖期間每 4 週繼代培養至原培養基一次。最後將所有胚性培養物都移到不含植物生長調節劑的培養基培養 4 週。

四、再生株馴化

將瓶內再生株(>2 cm)扦插於含扦插海綿(VIVID CUBES; Pioneer U.N.CO.LTD)的穴盤中，轉移到遮有 50%遮蔭網精密溫室的固定栽植床上，每天早晚定時澆水。待發根後，定植於 2 吋盆中。

五、統計分析

試驗採完全隨機設計(Complete Randomized Design)，所得數據以變方分析(Analysis of Variance)測試顯著性，並進行最小顯著性差異測試(Least Significant Difference Test; LSD)，分析比較各品種之差異。

結 果

一、癒傷組織誘導及體胚發生

(一)、生長素種類與癒傷組織誘導

在 picloram 的 4 種濃度處理中，除了最低濃度 0.25 mg/l 處理組的癒傷組織形成率(95.8%)較低外，其餘濃度處理的癒傷組織形成率皆達 100%；而 NAA 處理中，其癒傷組織形成率也是同樣隨著濃度的提升而增加，其中以 NAA 2 mg/l 處理時的誘導率最高(70.8%)，而 NAA 0.25 mg/l 的處理組效果最差(4.2%)。比較各濃度處理間生長指數的差異，兩種藥劑處理都可觀察到最低濃度的處理比最高濃度處理組的效果差且兩者間有顯著差異(表 1 及表 2)。而在褐化指數的表現上，picloram 處理僅最低濃度處理有褐化現象發生，而 NAA 處理則恰好相反。但各處理間並無顯著性的差異。

表 1. picloram 對玫瑰花‘白英國女王’癒傷組織誘導的影響

Table1. Effect of picloram on callus induction of rose ‘White Elizabeth’

picloram (mg/l)	Callus formation (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	95.8a ^z	4.3b	0.2a	4.2±1.5
0.5	100a	5.0a	0.0a	0.0
1	100a	4.8a	0.0a	0.0
2	100a	5.0a	0.0a	0.0

z: means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

y: means±se (Each concentration treatment has 24 leaflet explants)

表 2. NAA 對玫瑰花‘白英國女王’癒傷組織誘導的影響

Table2. Effect of NAA on callus induction of rose ‘White Elizabeth’

NAA (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	4.2c ^z	4.2c	0.3c	0.0a	0.0
0.5	16.7bc	12.5bc	0.8c	0.1a	8.3±1.5
1	33.3b	25.0b	1.3b	0.3a	12.5±2.6
2	70.8a	58.3a	3.7a	0.3a	29.2±5.3

z,y:The same with table 1

在癒傷組織形成率的比較上，NAA 2 mg/l 形成率最高，但 NAA 所有處理都比 picloram 的處理差(表 3 及表 4)。在生長指數的表現上，NAA 0.5 mg/l 的生長指數已達最高(10.7)，即使濃度再提高也無任何促進效果，且 NAA 處理的生長指數遠低於 picloram 處理 3 倍以上。此外，比較發根癒傷組織形成率，發現 NAA 所有處理都會產生，其中以 0.5 mg/l 的形成率最高(20.8%)，但 picloram 處理者僅在濃度 0.25 及 2 mg/l 時才會產生。

比較葉片癒傷組織形成率，NAA 處理其形成率隨濃度而增加，其中以 NAA 2 mg/l 效果最佳，反觀以 picloram 處理，可發現在最低濃度誘導率即可達到 100%(表 5 及表 6)。而在生長指數與褐化指數的比較上，picloram 0.5 mg/l 及 NAA 2 mg/l 的處理其生長指數最高，分別為 37.7 和 46.3；褐化程度的比較上以 picloram 2 mg/l 最嚴重，但 NAA 各濃度各處理間則無顯著差異。另外，發根癒傷組織形成率以 NAA 2 mg/l 者最高(95.8%)，而經 picloram 處理者，僅最高濃度有發根癒傷組織形成。

表 3. picloram 對玫瑰花‘克利斯汀 迪奧’癒傷組織誘導的影響

Table3. Effect of picloram on callus induction of rose ‘Christian Dior’

picloram (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index
0.25	100.0a ^z	4.2a	4.2a
0.5	100.0a	0.0a	4.5a
1	100.0a	0.0a	4.7a
2	100.0a	8.3a	4.7a

z,y: The same with table 1

表 4. NAA 對玫瑰花‘克利斯汀 迪奧’癒傷組織誘導的影響

Table4. Effect of NAA on callus induction of rose ‘Christian Dior’

NAA (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	4.2c ^z	4.2b	0.3b	0.0a	4.2±1.5
0.5	29.2ab	20.8a	1.3a	0.1a	8.3±1.5
1	20.8bc	12.5ab	0.8ab	0.3a	16.7±2.9
2	45.8a	16.7ab	1.3a	0.1a	12.5±2.6

z,y: The same with table 1

表 5. picloram 對玫瑰花‘奧克拉荷馬’癒傷組織誘導的影響

Table5. Effect of picloram on callus induction of rose ‘Oklahoma’

picloram (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	100.0a ^z	0.0a	4.2b	0.4ab	8.3±1.5
0.5	100.0a	0.0a	4.7a	0.0b	0.0
1	100.0a	0.0a	4.5b	0.8a	16.7±2.9
2	100.0a	4.2a	4.6a	1.0a	25.0±2.6

z,y: The same with table 1

表 6. NAA 對玫瑰花‘奧克拉荷馬’癒傷組織誘導的影響

Table6. Effect of NAA on callus induction of rose ‘Oklahoma’

NAA (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	4.2c ^z	4.2c	0.3c	0.0a	4.2±1.5
0.5	62.5b	45.8b	2.7b	0.0a	0.0
1	91.7a	79.2a	5.0a	0.0a	0.0
2	100.0a	95.8a	5.8a	0.1a	4.2±1.5

z,y: The same with table 1

由 NAA 處理者其癒傷組織誘導率隨濃度而提高，4 濃度處理間有明顯的顯著差異，但 picloram 者則否。兩種生長素在生長指數與褐化指數的影響上，NAA 處理濃度與生長指數呈現正相關，而 picloram 處理濃度若高於 0.5mg/l 效果並沒有較佳(表 7 和表 8)，而在褐化指數上兩者皆無顯著差異。發根癒傷組織率也有隨 NAA 濃度增加而提高，但 picloram 則完全不會產生任何發根癒傷組織。

NAA 處理的癒傷組織形成誘導率在 0.25 mg/l 最差；而 picloram 在此濃度的誘導率即以達 100%。當 picloram 及 NAA 濃度分別高於 1 mg/l 和 0.5 mg/l 對癒傷組織誘導並無促進效果(表 9 及表 10)。兩種生長素各別處理的褐化指數都無差異。所有 NAA 處理都會有發根癒傷組織產生，但 picloram 處理卻僅 2 mg/l 濃度才有發根癒傷組織產生。

表 7. picloram 對玫瑰花‘雷射’癒傷組織誘導的影響

Table7.Effect of picloram on callus induction of rose ‘Laser’

picloram (mg/l)	Callus formation (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	100.0a ^z	4.5b	0.2a	4.2±1.5
0.5	100.0a	4.9a	0.0a	0.0
1	100.0a	4.8ab	0.2a	4.2±1.5
2	100.0a	5.0a	0.0a	0.0

z,y: The same with table 1

表 8. NAA 對玫瑰花‘雷射’癒傷組織誘導的影響

Table8.Effect of NAA on callus induction of rose ‘Laser’

NAA (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	33.3c ^z	0.0d	0.3d	0.0a	4.2±1.5
0.5	83.3b	20.8c	1.7c	0.0a	0.0
1	91.7ab	66.7b	4.4b	0.0a	0.0
2	100.0a	95.8a	5.9a	0.2a	8.3±2.9

z,y:The same with table 1

表 9.picloram 對玫瑰花‘鐵凡尼’癒傷組織誘導的影響

Table9.Effect of picloram on callus induction of rose ‘Tiffany’

picloram (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	100.0a ^z	0.0a	4.3b	0.0a	0.0
0.5	100.0a	0.0a	4.3b	0.0a	0.0
1	100.0a	0.0a	4.5ab	0.2a	4.2±1.5
2	100.0a	8.3a	4.9a	0.1a	12.5±2.6

z,y:The same with table 1

表 10.NAA 對玫瑰花‘鐵凡尼’癒傷組織誘導的影響

Table10.Effect of NAA on callus induction of rose ‘Tiffany’

NAA (mg/l)	Callus formation (%)	Rhizogenesis (%)	Growth index	Brown index	Brown of leaf ^y (%)
0.25	58.3b ^z	33.3c	2.3b	0.4a	20.8±2.9
0.5	79.2ab	54.2b	3.8a	0.1a	8.3±2.9
1	91.7a	70.8a	4.5a	0.3a	12.5±2.6
2	91.7a	58.3ab	4.4a	0.2a	8.3±1.5

z,y:The same with table 1

(二)、癒傷組織增殖與植株再生

由於繼代培養後細菌性污染的緣故，picloram 處理無法進行後續的實驗，僅 NAA 處理組得以繼續進行後續實驗。經暗培養 4 週後，將具有癒傷組織的五種基因型其葉片培植體繼代培養到含 2 種濃度 BA 的新鮮培養基或原濃度 NAA 的誘導培養基，並轉移至光照環境下。在所有處理中僅 NAA 1 mg/ BA 0 mg、NAA 1 mg/ BA 2 mg 和 NAA 2 mg/ BA 0 mg 的處理組才會產生胚性癒傷組織 (表 11)，其中以 NAA 1 mg / BA 0 mg 所產生的胚性癒傷組織率最高，但 3 種處理間的效果並不顯著。2 週後將帶有不同階段體胚及胚性癒傷組織的培植體轉移到含 BA 2 mg/l 的新鮮培養基中 4 週，之後，再將培養物再繼代培養至含 BA 1 mg/l 的培養基中 8 週。以 NAA 1 mg/ BA 2 mg 處理產生最多 (10 株)，其次是 NAA 2 mg / BA 0 mg 處理 (6 株)，而 NAA 1 mg/ BA 0 mg 的處理最少 (2 株)。接著將胚性培養物轉移到不含植物生長調節劑的培養基培養 4 週，此期間觀察到胚性癒傷組織顏色會迅速變黑，且不再產生任何體胚。綜合上述結果，決定以 NAA 1 mg/ BA 2 mg 處理進行下一步實驗。最後將正常再生株從子葉中切離，扦插到海綿中移至溫室馴化，2 週後再生株發根，NAA 1 mg/ BA 2 mg 及 NAA 2 mg/ BA 0 mg 處理的存活率分別為 10% 及 50%。

表 11. NAA 與 BA 對玫瑰花‘鐵凡尼’胚性癒傷組織誘導及小植株再生之影響

Table 11. Effect of NAA and BA on embryogenic calli and plantlet regeneration of rose ‘Tiffany’.

Treatment ^z (mg/l)		Embryogenesis (%)	No. of shoot ^x	survival rate ^w (%)
NAA	BA			
0.25	0	0.0b ^y	0d	0
	1	0.0b	0d	0
	2	0.0b	0d	0
0.5	0	0.0b	0d	0
	1	0.0b	0d	0
	2	0.0b	0d	0
1	0	37.5a	2c	0
	1	25.0ab	10a	10
	2	0.0b	0d	0
2	0	12.5ab	6b	50
	1	0.0b	0d	0
	2	0.0b	0d	0

z: NAA/BA, leaf explants were precultured on MS medium supplemented with NAA for 4 weeks and transferred on MS medium with BA or maintained on the same medium for 4 weeks.

y: means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

x: Data were collected 24 weeks after culture initiation.

w: Data were collected 28 weeks after culture initiation. (Each concentration treatment has 8 leaflet explants)

討 論

一、生長素和體胚發生

Kuusiene and Kandzeauskaite(2001)和 Li 等人(2002)都指出玫瑰花癒傷組織的顏色和質地是由基因型和培植體來源決定，而胚性癒傷組織的誘導則取決於基因型和癒傷組織來源。朱(2000)指出同一個培植體可產生不同外觀或不同形態發生能力的癒傷組織，可分為具形態發生能力者(competence cells)及不具形態發生能力者(non- competence cells)。Marchant 等人(1996)從葉柄培植體獲得體胚發生，但從葉片誘導則否，這清楚地反應出品種特有的差異。基因型是影響培養時胚性分化的顯著因子，玫瑰花中也有相似的基因型反應報告(De Wit *et al.*, 1990; Hsia and Korban, 1996; Kintzios *et al.*, 1999)。玫瑰花已可從各種培植體如葉(De Wit *et al.*, 1990)、未成熟葉和莖段(Rout *et al.*, 1991)、未成熟種子(Kunitake *et al.*, 1993)、葉柄和根(Marchant *et al.*, 1996; Roberta *et al.*, 1995)和花絲(Noriega and Söndahl, 1991)獲得體胚發生。前述所發表的材料，從玫瑰花組織產生癒傷組織需要生長素(2,4-D 和 NAA)的存在。其它的生長素如 dicamba (Murali *et al.*, 1996)和 picloram (Kintzios *et al.*, 1999)亦是另一種選擇。在預備試驗中發現，不添加任何生長素無法使器內葉片培植體產生癒傷組織。單獨施用任何種類的生長素都可誘導體胚組織形成，但誘導體胚發生則否。此與 Li 等人(2002)指出玫瑰花與中國月季在各種 2,4-D 濃度的培養基中都能誘導出癒傷組織，但是在缺乏 2,4-D 的培養基則否的結果相似。當玫瑰花‘Tiffany’器內小葉培養在含有 NAA 的 MS 培養基 4 周後，繼代培養到含 BA 2 mg/l 或原生長素濃度(1 或 2 mg/l)的 MS 培養基不但可產生胚性癒傷組織也能誘導體胚發生(表 11)。此結果與 Hsia 和 Korban(1996)及 Dohm 等人(2001)描述葉片可在含生長素/細胞分裂素組合或單一生長素的培養基中產生癒傷組織，但體胚發生僅於 4 週的癒傷組織誘導期間，在含單一生長素的 MS 培養基中發生相類似。但 Noriega 和 Söndahl (1991)利用低濃度 NAA/zeatin 從葉片誘導出胚性癒傷組織，且所產生的體胚培養在相同培養基中仍可正常發育。此外，Kintzios 等人(1999)認為各種生長素/細胞分裂素濃度組合都能從成熟葉誘導體胚組織發生，與特定植物生長調節劑組合無關，但僅特定高濃度 pCPA (p-chloro phenoxyacetic acid)和 Kinetin 組合的培養基中有體胚發生，此現象早已在其它品種中被描述(Burger *et al.*, 1990; De Wit *et al.*, 1990)。許多玫瑰花體胚發生再生方式，都指出培養基含 2,4-D 或和其它植物生長調節劑同時存在，對誘導玫瑰花體胚發生是必要的(Rout *et al.*, 1991; Kunitake *et al.*, 1996; Hsia and Korban, 1996; Marchant *et al.*, 1996; van der Slam *et al.*, 1996; Visessuwan *et al.*, 1997)。但 Dohm 等人 (2001) 卻認為誘導體胚發生最重要的是初代培養期間先使用含生長素的培養基，之後的繼代培養再使用含細胞分裂素的培養基，並表示生長素與細胞分裂素同時存在於培養基中無法造成再生，且刪除或降低培養基中生長素的濃度，並無法促進胚發育。另一方面，Kunitake 等人(1993)卻發現皺葉薔薇(*R.rugosa*)未成熟種子可在不含植物生長調節劑的培養基產生胚性癒傷組織且形成率最高，但野薔薇、*R.× alba*‘Semiplena’則否。Li 等人(2002)也觀察到體胚發生在無生長調節劑或含 9.1 μmol/l TDZ 的培養基中，但在更高

TDZ 濃度中則否。這可能是基因型、培植體內生荷爾蒙、胚性細胞起源及生長調節劑種類和濃度的影響。

Kunitake 等人(1993)發現 BAP 和 kinetin 能促進胚性癒傷組織生長，且 kinetin 可促進體胚形成。且 BA 單施或與 IAA 或 IBA 並施，在玫瑰花體胚成熟上的有益效果已被證實(Rout *et al.*, 1991; Noriega and Söndahl, 1991; Marchant *et al.*, 1996)。BA 和 methyl laurate 的組合也可促玫瑰花的體胚轉換(Sarasan *et al.*, 2001)。在試驗中發現，帶癒傷組織的小葉培植體在含 NAA 的 MS 培養基培養四周後，繼代培養到含 BA 2 mg/l 的 MS 培養基，其再生率比 NAA 處理八週後再轉移至 BA 者高(表 11)。Kintzios 等人(1999)將球形及心形胚繼代培養到含特定 BA/IAA 濃度組合的 MS 培養基 2 週後出現子葉期胚，且未在其他 BA/IAA 組合中觀察到胚成熟。但在生長素試驗中卻發現，癒傷組織繼代培養到含 BA 培養基或維持原生長素濃度培養基後，大約 2 週就會有子葉期胚出現，並未影響成熟。

Marchant 等人(1996)認為玫瑰花癒傷組織需要降低生長素濃度，或將癒傷組織轉移到無生長調節劑的培養基(van der Salm, 1996)，以促進體胚發生。但試驗結果卻發現，癒傷組織培養不必降低生長素濃度或轉移至含細胞分裂素的培養基都能在轉移至光照下培養後誘發體胚發生，因此推測生長素的主要作用僅是誘發癒傷組織形成，而體胚發生可能與光誘導有關。再者 Mathews 等人(1991)表示移除或降低培養基中 2,4-D 的濃度，有助於多種玫瑰花品種體胚的發育和萌芽。但試驗中卻發現，若將含癒傷組織的培植體轉移到不含植物生長調節劑的 MS 培養基，胚性癒傷組織和體胚會快速褐化失去胚性能力，且會產生許多非胚性癒傷組織。此外，僅子葉異常擴大的體胚能繼續在無生長調節劑的培養基中發育，產生正常植株和帶化的異常枝梢。此結果與 Li 等人(2002)發現 2 種胚性癒傷組織其中之一轉移到無生長調節劑的培養基體胚發芽失敗，另一種移到含 8.8 $\mu\text{mol/l}$ BA 培養基的胚性癒傷組織，體胚會發育成正常植物相類似。因此推測體胚要能順利轉換成植株，培養基中必須含有生長調節劑。另一方面，由於二次胚發生具有大量繁殖的潛力，特別是對生長期長與體胚發生率低的重要木本植物，因此引人注意。Rout 等人(1991)和 Hsia and Korban(1996)及 Li 等人(2002)都觀察到玫瑰花二次體胚發生。在研究中發現，玫瑰花‘Tiffany’的異常擴張子葉胚能產生胚性癒傷組織並體胚發生，但子葉轉綠後就失去胚性能力。

參 考 文 獻

- 朱建鏞、趙玉真。2000。聖誕紅之體胚形成。植物種苗 2: 157-171。
- Burger, D. W., L. Liu., K. W. Zary, and C. I. Lee. 1990. Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. Plant Cell Tiss. Org. Cul 21: 147-152.
- de Wit, J. C., H. F. Esendam, J. J. Honkanen, and U. Tuominen. 1990. Somatic embryogenesis

- and regeneration of flowering plants in rose. *Plant Cell Rep.* 9: 456-458.
- Dohm, A., C. Ludwig, K. Nehring, and T. Debener. 2001. Somatic embryogenesis in roses. *Acta Hort.* 547: 341-347.
- Hsia, C. N. and S. S. Korban. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *chinensis minima*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 1-6.
- Kintzios, S., C. Manos, and O. Makri. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep.* 18: 467-472.
- Kunitake, H., H. Imamizo, and M. Mii. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.). *Plant Sci.* 90: 187-194.
- Kuusiene, S and M.Kandzeauskaite. 2001. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda*. 2001. *Acta Hort.* 560: 501-504.
- Li, X., S. F. Krasnyanski, and S. S. Korban. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *J. Plant Physiol.* 159: 313-319.
- Marchant, R., M. R. Davey, J. A. Lucas, and J. B. Power. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci.* 120: 95-105.
- Matthews, D., J. Mottley, I. Horan, and V. Roberts. 1991. A protoplast to plant system in roses. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24: 173-180.
- Murali, S., D. Sreedhar., and T. S. Lokeswari. 1996. Regeneration through somatic embryogenesis from petal-derived calli of *Rosa hybrida* L. cv. Arizona (hybrid tea). *Euphytica.* 91: 271-275
- Noriega, C. and M. R. Söndahl. 1991. Somatic embryogenesis in hybrid tea roses. *Bio Technol.* 9: 991-993.
- Rout, G. R., B. K. Debata, and P. Das. 1991. Somatic embryogenesis in callus culture of *Rosa hybrida* L. cv. Landora. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27: 65-69.
- Sarasan, V., A. V. Roberts, and G. R. Rout. 2001. Methyl laurate 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrida rose. *Plant Cell Rep.* 20: 183-186.
- van der Salm, T. P. M., C. J. G., van der Toorn., C. H., Hänisch ten Cate, and H. J. M., Dons. 1996. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from exised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Cell Rep.* 15: 522-526.
- Visessuwan, R., T. Kawai, and M. Mii. 1997. Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *Rosa canina*. *Breed. Sci.* 47: 217-222.

Auxins induce somatic Embryogenesis *via In Vitro* Culture of Leaflet Explants of Roses

Yung-Sheng Hsu ¹⁾ Tsai-Yih Wang ²⁾

Key words: Rose, genotype, NAA, picloram, BA, embryogenic callus, somatic embryogenesis

Summary

For increasing embryogenic calli formation rate and reducing time of somatic embryogenesis therefore, A procedure for plant regeneration leaflets of roses (*Rosa hybrida* L.) via in vitro culture is described. Two auxins, NAA and picloram alone, at various concentrations (0.25, 0.5, 1 or 2 mg/l) were tested for its capacity to induce somatic embryogenesis from in vitro-derived leaflet of rose of five cultivars (Christian Dior, Tiffany, Oklahoma, Laser, White Queen Elizabeth). Calli could be initiated from in vitro leaflet of five rose cultivars on Murashige and Skoog (MS) medium with NAA or picloram. Although all rose cultivars could form calli but, only 'Tiffany' could produce embryogenic calli on MS medium including NAA (1 or 2 mg/l). the influence of genotype on embryogenic differentiation is remarkable. In auxins experiment, leaflet explants were precultured on MS medium with 1mg/l NAA for four weeks followed by subculture on MS medium with 2 mg/l BA. 'Tiffany' showed the highest amount of regeneration plants.

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

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

Corresponding author.