

# 四季蔥莖頂培養之探討

李阿嬌、許苑培

## 摘要

本試驗以四季蔥短縮莖為培植體，以 MS 為基本培養基，進行 ampicillin 對降低污染率、品種間再生差異及細胞分裂素(cytokinin)種類及濃度對四季蔥莖頂培養再生能力的效應等試驗，期建立四季蔥無菌繁殖的系統。結果得知，培養基內加 ampicillin 100 ppm 只能略為降低污染率，以培植體大小來控制污染率為較簡便而有效的方式，較適培植體大小為直徑 2 - 3 mm，含頂芽 3 - 4 mm 高之短縮莖。比較桃園三號四季蔥及桃園四季蔥品種間再生能力，結果顯示，品種間並無顯著差異。細胞分裂素類以 2ip、kinetin 較適宜誘導正常枝梢，其中以 5 ppm 之 2ip 及 kinetin 所誘導的枝梢數較多。

關鍵詞：莖頂培養、四季蔥、品種間差異、植物生長素。

## 前言

青蔥(*Allium fistulosum*)係蔥科蔥屬草本植物，為本省經常使用的香辛佐料蔬菜，亦為北部地區重要的經濟蔬菜，栽培品種主要以北蔥及四季蔥為主<sup>(1,6)</sup>；北蔥較耐熱、濕，但葉身較細、肉質較硬、品質較差，一般以種子繁殖；四季蔥雖然較不耐熱，但葉身較北蔥大、葉肉較厚且柔軟、品質優良，因此，桃園區及花蓮區農業改良場從地方品種中選育出四季蔥優良品種，並分別於民國 84、83 年通過命名；新品種桃園三號及蘭陽一號四季蔥廣為當地蔥農接受並逐漸取代當地原有之地方品種<sup>(5,7)</sup>。惟四季蔥利用分株法無性繁殖，其繁殖倍率低，使得新品種命名後無法即時大量提供種苗給蔥農，導致推廣緩慢。植物組織培養技術中的微體繁殖技術，可以使植物在有限的材料及空間下，於短時間內大量繁殖種苗成一營養系，株間遺傳不但呈均質且與親本相同<sup>(4)</sup>，因此，在新品種推廣之初，微體繁殖技術常是有利的選擇，例如非洲菊、唐昌蒲新品種推廣<sup>(2)</sup>。利用微體繁殖技術亦可避除系統性病毒<sup>(10)</sup>，尤其球根作物利用無性繁殖易傳帶及累積病毒，在沒有抗病品種時，組織培養便成為健康種苗生產的主要途徑<sup>(2)</sup>。

本試驗即針對四季蔥傳統繁殖的限制，及防止日後因分株繁殖造成土壤性病害、毒素病蔓延，進行莖頂培養之再生性探討，期能達到快速繁殖健康種苗的目的，縮短新品種推廣時間。

## 材料與方法

### 一、植物材料準備與消毒方法

供試材料為桃園四季蔥及桃園三號四季蔥，以 2 株為一叢，種於 BVB(2 號)：真珠石(4 號) = 1：1 之混合介質的四寸盆中，2 個月後開始採取植株為材料；植株水洗後去除葉身、幼根，取含短縮莖盤直徑 5 mm、高 5 mm 的葉鞘，於 70 % 酒精振盪 1 分鐘、1 % 次氯酸鈉消毒 15 分鐘後，再於無菌操作台中，以無菌水沖洗 3 次後，剝除葉鞘、部分莖盤，大小約直徑 2 - 3 mm，含頂芽 3 - 4 mm 高之短縮莖為培植體，培養適當培養基中；培養基的製備以 MS<sup>(13)</sup> 配方為基本鹽類，蔗糖濃度為 30 g/l，殺菌前 pH 值以 KOH 或 HCl 調至 5.6，並加入 7 g/l 洋菜粉，培養基分裝至 30 × 80 mm 試管，每管 10 ml，以 121°C、1.5 kg/cm<sup>2</sup> 的高溫高壓滅菌釜滅菌，滅菌時間 20 分鐘。培養室溫度 25±1°C，光照 16 小時，暗期 8 小時，光強度 23 μmol/m<sup>2</sup>/sec。

以下試驗採完全逢機試驗，試驗資料以變方分析測其顯著性，並以鄧肯氏多變域分析檢查各處理間 5 % 的差異顯著性。

### 二、Ampicillin 對降低培植體污染率的效應

以桃園三號四季蔥為材料，培植體大小如上述，分別培養於培養基內加 ampicillin(抗生素)100 ppm、培養前每 2 棵培植體置於 10 ml ampicillin 100 ppm 溶液中振盪一天後，培養於 MS 培養基中，以未加 ampicillin 培養基為對照，每試管培養一個培植體，每處理 20 個培植體；一星期後調查各處理污染之培植體數；ampicillin 以 0.45 mm 孔径薄膜過濾法消毒。

### 三、不同品種間的再生效應

以桃園四季蔥、桃園三號四季蔥為材料，分別培養於含 2ip 2、5 ppm，kinetin 2、5 ppm 的 MS 培養基中，每處理 20 個培植體，六週後調查各處理再生芽體的培植體數及再生芽體數。

### 四、不同種類 cytokinins 及濃度對桃園三號四季蔥芽體再生的效應

以桃園三號四季蔥為材料，培植體大小如上述，分別培養於含 2ip 1、2、5 ppm，BA、kinetin、TDZ 各 0.5、1、2、5 ppm 之 MS 培養基中，每處理 20 個培植體，六週後調查再生芽體之培植體數及再生芽體數。

## 結果與討論

培植體越大，植株存活度高，但污染率亦越高<sup>(14)</sup>。預備試驗結果顯示，四季蔥莖頂培養之培植體大小以直徑 2 - 3 mm，含頂芽 3 - 4 mm 高之頂梢，經表面消毒後的污染率較低，存活率較高。因此，本研究以此種大小的短縮莖為各項試驗的培植體。

### 一、Ampicillin 對降低培植體污染率的效應

培養基內含抗生素可有利抑制培植體內細菌、黴菌生長，降低初代培養污染率<sup>(15)</sup>。本試驗

結果顯示，培養於培養基內含 ampicillin 100 ppm 的污染率雖略低，但與對照組差異不大，而培養前以 ampicillin 處理者的污染率偏高(表 1)，可能於操作過程中，增加了污染機會，且培植體易有水浸狀。因此，ampicillin 處理並不能明顯有效降低污染率，為簡化操作手續，以下試驗即不添加任何抗生素，而以培植體大小控制污染率。

表 1. Ampicillin 對桃園三號四季蔥降低培植體污染率的效應  
Table 1. Effect of ampicillin on reducing contamination of explant of green onion c.v. Taoyuan 3.

處理 <sup>z)</sup> Treatment	培養的培植體數 No. of explants cultured	污染率 Contaminated rate (%)
A	20	15
B	20	35
CK	20	20

z) Treatment A : MS basal medium + ampicillin 100 ppm.  
Treatment B : explants shake in ampicillin 100 ppm solution 24 hours before culture.  
Treatment CK : MS basal medium.  
y) Observations were made after 1 week of culture.

二、不同品種間的再生效應

以桃園三號四季蔥、桃園四季蔥為材料，分別培養於含 2ip、kinetin 2、5 ppm 的 MS 培養基中，比較其再生芽體的能力；結果得知，品種間再生芽體的培植體數及再生能力並無顯著差異(表 2)。此與康乃馨品種間以葉片誘導不定芽的再生能力差異極為顯著的現象<sup>(17)</sup>相去甚遠；酪梨 (*Persea americana*)各品種間的基因型(genotype)亦對芽體增殖有明顯差異的效應<sup>(18)</sup>。本試驗中，桃園四季蔥雖然在田間之分蘖數較桃園三號高，但在瓶內，於供試的培養基中培養，其再生能力則無差異。

表 2. 細胞分裂素對不同品種間的再生效應  
Table 2. Effect of cytokinins on number of shoots of green onion cultivars *in vitro*.

細胞分裂素種類 Cytokinins	濃度 Concentration (ppm)	品種 Cultivars	形成芽體之培植體 Percentage of explants producing shoots (%)	芽體形成數 Mean shoot number per explant
2ip	2	Taoyuan 3	14	1.93 <sup>b</sup>
2ip	2	Taoyuan Shy Jih tron	16	1.56 <sup>b</sup>
2ip	5	Taoyuan 3	17	3.64 <sup>a</sup>
2ip	5	Taoyuan Shy Jih tron	17	4.00 <sup>a</sup>
Kinetin	2	Taoyuan 3	15	2.47 <sup>b</sup>
Kinetin	2	Taoyuan Shy Jih tron	12	2.20 <sup>b</sup>
Kinetin	5	Taoyuan 3	17	3.82 <sup>a</sup>
Kinetin	5	Taoyuan Shy Jih tron	15	3.73 <sup>a</sup>

z) Shoot apex of green onion was cultured in MS medium containing 2ip, kinetin 2, 5 ppm, 20 explants per treatment. Observations were made after 6 week of culture.  
y) The same letters in a column showing insignificant difference at p = 0.05 by Duncan's multiple range test.

### 三、不同種類 cytokinin 及濃度對桃園三號四季蔥芽體再生的效應

以桃園三號四季蔥為材料，培養於含不同種類細胞分裂素及濃度的 MS 培養基中，結果如表 3 所示。發生芽體的培植體百分率以含 2ip 處理者較高，其次為含 kinetin 處理者，最低是以 TDZ 處理者；在硬實柑(*Aegle marmelos*)的莖段培養中，BAP、kinetin 對芽體形成百分率差異不大<sup>(8)</sup>，但 *Woodfordia fruticosa*<sup>(11)</sup>、*Piper species*<sup>(9)</sup>的培養中，其芽體形成卻隨細胞分裂素種類不同而差異甚大。本試驗中，參試的細胞分裂素種類，平均而言，以 2ip 處理者對桃園三號四季蔥形成芽體的培植體百分率較高。平均芽體數以 BAP 5 ppm 處理者 7.5 芽，顯著高於其他處理，其次是 2ip 5 ppm 4.05 芽及 kinetin 5 ppm 4.06 芽，但與同類細胞分裂素相較並無顯著差異，顯示在參試的細胞分裂素種類中，以較高的 BAP 濃度對降低頂芽優勢之效應較為明顯；此結果與黃紋萬年麻的組織培養結果相似<sup>(3)</sup>。Medford 等人<sup>(12)</sup>和 Smigocki<sup>(16)</sup>等人用基因轉殖技術，經由農桿菌將細胞分裂素合成的基因轉入矮牽牛及煙草中，可使內生的細胞分裂素量增加，而促使矮牽牛側芽的生長成叢生狀，更證明細胞分裂素對降低頂芽優勢效果。由表 2 亦可得知，除了 TDZ 5 ppm 處理者外，濃度越高的細胞分裂素可以形成較多的枝梢；在形態發生方面，以 BAP、2ip、kinetin、TDZ 等處理者，都可使蔥培植體發生枝梢，於含 BAP 處理者，培植體膨大、外葉鞘乾枯後，枝梢再由內部抽出(圖 2)；TDZ 處理者，則培植體出現膨大、逆分化現象後，枝梢或葉鞘再由此組織中長出(圖 3A)，此生長組織須再繼代培養到其他培養基，才有可能產生完整植株(圖 3B)；以 2ip、kinetin 處理者可由枝梢直接由短縮莖基部伸長出(圖 4、5)，其中，以 2ip 處理者所長出的枝梢較細。綜合芽體發生率、芽體發生數及形態發生，對桃園三號四季蔥而言，莖頂培養於含 2ip 5 ppm 的 MS 培養基中，所能發生的植株數較多。

表 3. 細胞分裂素對桃園三號四季蔥莖頂培養的影響

Table 3. Effect of cytokinins on multiple shoots of green onion c.v. Taoyuan 3.

細胞分裂素種類 Cytokinins	濃度 Concentration (ppm)	形成芽體之培植體百分率 Percentage of explants producing shoots (%)	芽體形成數 Mean shoot number per explant
2ip	1	90	2.0 <sup>cd</sup>
2ip	2	80	2.57 <sup>bcd</sup>
2ip	5	90	4.05 <sup>b</sup>
Kinetin	0.5	80	1.63 <sup>de</sup>
Kinetin	1	65	2.23 <sup>bcd</sup>
Kinetin	2	60	2.36 <sup>bcd</sup>
Kinetin	5	80	4.06 <sup>b</sup>
BAP	0.5	70	2.78 <sup>bcd</sup>
BAP	1	60	3.0 <sup>bcd</sup>
BAP	2	75	3.42 <sup>bcd</sup>
BAP	5	40	7.5 <sup>a</sup>
TDZ	0.5	10	2.0 <sup>cd</sup>
TDZ	1	5	2.83 <sup>bcd</sup>
TDZ	2	30	3.8 <sup>bc</sup>
TDZ	5	0	0

Z) Shoot apex of green onion was cultured in MS medium containing various concentrations of growth regulator, 20 explants per treatment. Observations were made 6 week after culture.

y) The same letters in a column showing insignificant difference at  $p = 0.05$  by Duncan's multiple range test.

由莖頂培養所再生的枝梢可繼代培養至發根的培養基中培養發根後，移出瓶外健化、定植；或者繼代培養至芽體增殖培養基中大量增殖後，再行誘導根系、瓶外健化、定植，有關此部分擬進一步試驗。

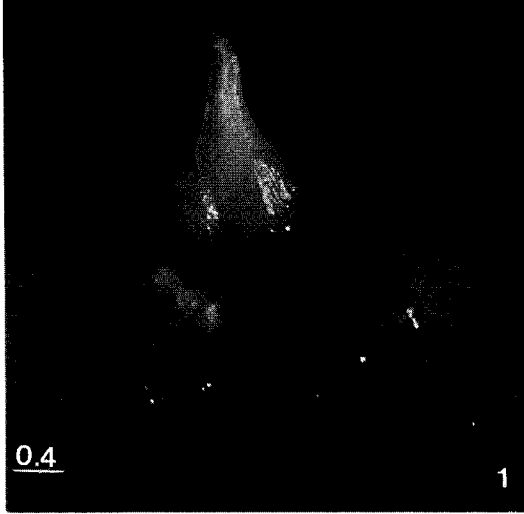


圖1. 培養5日的培植體大小(23x)(單位:mm)  
Fig. 1. Cultured explant of green onion after 5 days of culture.

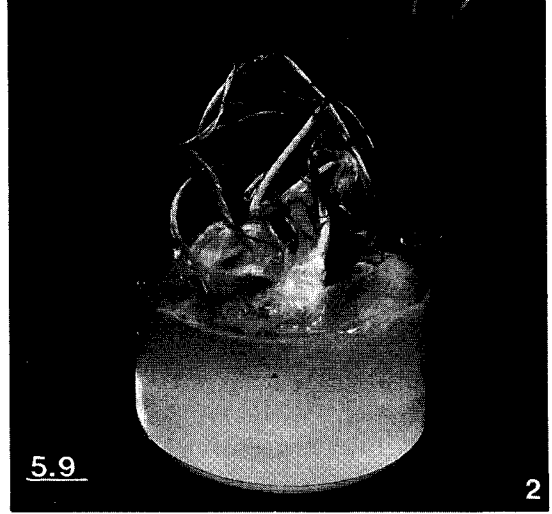


圖2. 蔥莖頂培養於含BAP的MS培養基中，可見新梢於外葉鞘乾枯後，由內部長出。(單位:mm)  
Fig. 2. Multiple shoots formed on MS medium supplemented with 1 ppm BAP after 4 weeks of culture.



圖3A. 蔥莖頂培養在含TDZ 2 ppm的MS培養基中，枝梢由膨大、逆分化的組織中長出。(單位:mm)  
Fig. 3A. Differentiation of multiple shoots from dedifferentiated tissue after 6 weeks culture on MS medium supplemented with 2 ppm TDZ.

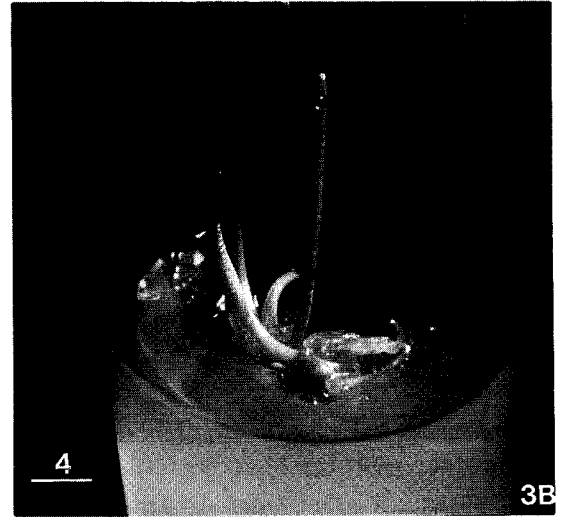


圖3B. 由MS加2 ppm TDZ的分生組織繼代培養至MS加2 ppm kinetin的培代培養至MS加2 ppm kinetin的培養基中，可發育成完整的植株。(單位:mm)  
Fig. 3B. Shoots buds obtained from MS supplemented with 2 ppm TDZ develop after subculturing on MS supplemented with 2 ppm kinetin medium.

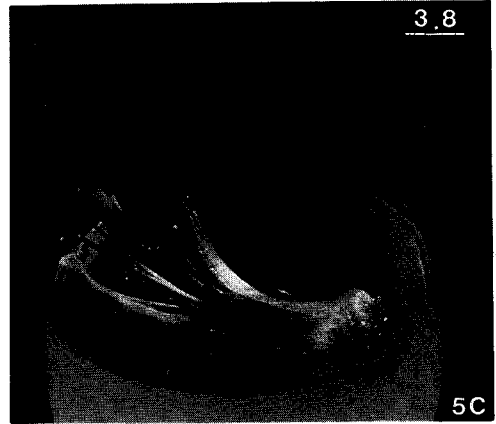
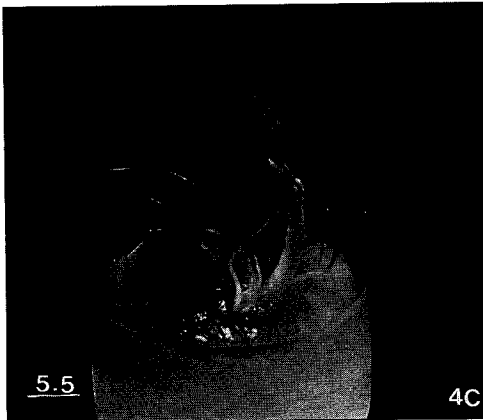
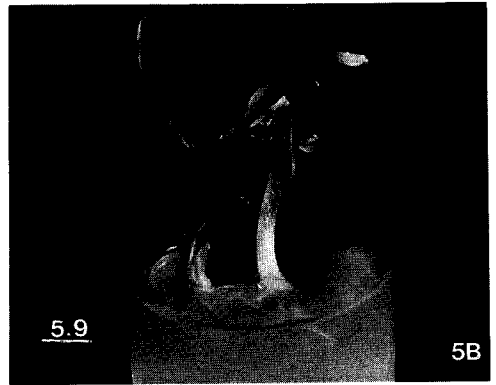
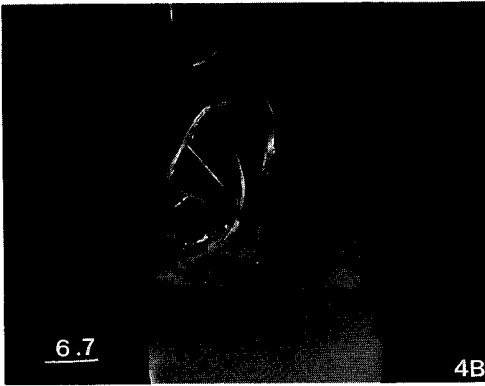
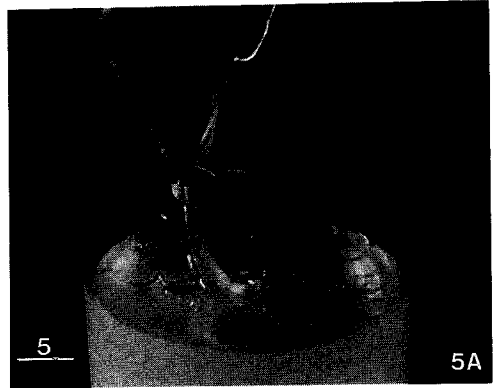
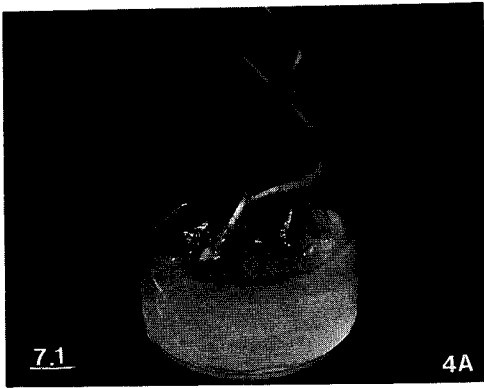


圖 4. 培養在含 2ip 的 MS 培養基，枝梢直接由短縮莖長出。(單位：mm)

圖 5. 培養在含 kinetin 的 MS 培養基，枝梢接由短縮莖長出，且長出的枝梢較為粗壯。(單位：mm)

Fig 4. Shoots formed from explant cultured on MS medium supplemented with 2ip directly.

Fig 5. Shoots formed from explant cultured on MS medium supplemented with kinetin directly.

培養基 (medium used) : A. MS + 1 ppm 2ip  
 B. MS + 2 ppm 2ip  
 C. MS + 5 ppm 2ip

培養基 (medium used) : A. MS + 1 ppm kinetin  
 B. MS + 2 ppm kinetin  
 C. MS + 5 ppm kinetin

## 誌謝

本研究承蒙農委會 87 生技-2.1-糧-02 計畫經費補助，謹申謝忱。

## 參考文獻

- 1.李伯年。1982。蔥科蔬菜。蔬菜育種與採種。茂昌圖書 p.373-420。
- 2.何偉真。1992。觀賞作物組織培養種苗之生產。植物組織培養技術及其應用 p.5-11。
- 3.沈榮壽、沈再木。1997。黃紋萬年麻之組織培養。中國園藝 43(1): 41-49。
- 4.馬湖軒、許圳塗。1992。組織培養原理及應用。園藝作物組織培養實用技術。豐年社 p.15-22。
- 5.許苑培。1996。青蔥新品種-桃園三號。豐年 46(2)16-19。
- 6.黃鵬。1995。蔥及分蔥之產業與研究。台灣蔬菜產業改進研討會專集。台中區農業改良場特刊第 37: 177-192。
- 7.楊宏瑛。1994。耐熱、蔥白長且豐產的青蔥新品種蘭陽一號。花蓮區農業改良場農技報導第 26 號。
- 8.Ajithkumar, D., and S. Seeni.1998. Rapid clonal multiplication through in vitro axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. *Plant Cell Report* 17: 422-426.
- 9.Bhat, S. R., K. P. S. Chandel, and S. K. Malik.1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. *Plant Cell Report* 14: 398-402.
- 10.Bhojwani, S. S., and M. K. Razdan. 1983. Clonal propagation. In: *Plant tissue culture :theory and practice*. Elsevier Sci. Publ. p.313-372.
- 11.Krishnan, P. N., and S. Seeni.1994. Rapid micropropagation of *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz. (Lythraceae), Arare medicinal plantt. *Plant Cell Report* 14:55-58.
- 12.Medford, J. I., R. Horgan, Z. El-sawi, and H. J. Klee.1989.Alteration of endogenous cytokinins in transgenic plant using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell*1: 403-413.
- 13.Mursashiage, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physio. Plant* 15: 473-272.
- 14.Pierik, R. L. M. 1987. The influence of plant material on growth and development. In: *In vitro culture of higher plants*. p.109-114.
- 15.Pierik, R. L. M. 1987. Sterilization of plant material. In: *In vitro culture of higher plants*. p89-94.
- 16.Smigocki, A. C., and L. D. 1990. Cytokinin-to-auxin ratios and morphology of shoots and tissue transformed by a chimeric isopentyl transferase gene. *Plant Physio*.91: 808-811.
- 17.Van Altvorst, A. C., J. J. J. Koehorst, T. Bruinsma, J. Jansen, J. de Jong, and J. JM.Dons. 1992. Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scintia Hortic*. 51: 223-235.
- 18.Zirari, A., and S. M. Lionakis.1994. Effect of cultivar, explants type, etiolation pretreatment and the age of plant material on the in vitro regeneration ability of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae* 365: 69-76.

## Shoot Apex Culture of *Allium fistulosum*

Ah-Chiou Lee and Yuan-Pei Shu

### Summary

The shoot apex of *Allium fistulosum* was used as explant, and MS medium as basal medium, for *in vitro* culture. Result indicated that medium with ampicillin 100 ppm added could reduce the contamination rate slightly, but for operation convenience, optimum size of explant, 2-3 mm in diameter and 3-4 mm in height, was more effective. The difference of regeneration capability of 'Taoyuan 3' and 'Taoyuan Shy' Jih tron was not significant. The efficiency of shoot formation from explants cultured on MS medium supplemented with 5 ppm 2ip, kinetin, was higher than those cultured on MS medium supplemented with BAP, TDZ.

Key words: Shoot apex, Green onion, *Allium fistulosum*, Cytokinin.

Abbreviation: MS medium-Murashige and Skoog (1962) medium; BAP-N6benzyladenine; TDZ-thidiazuron; 2ip-2-isopentenyladenine.