

茶莖頂培養之誘發多芽體的形成

陳際松¹ 陳惠藏² 蔡新聲³ 林品才⁴

摘 要

以 0.75 % 次氯酸鈉於超音波洗滌器中震盪消毒 1.5min 後以 320ppm 之 Streptomycine sulfate 溶液洗滌三次，再放置於含 200ppm Streptomycine sulfate 溶液之 MS 培養液中切取 1mm 莖頂之消毒方式，可使茶樹莖頂培養之成功率達 57 %。

含有 NAA 1 ppm 及 BA 5ppm 之 MS 培養基，可使 40 % 之芽體直接長出 1 到 5 個新芽，其餘 60 % 芽體則形成 callus 或形成芽球相似物 (protocorm-like bodies)，少數的 callus 周邊有紅色細胞之團塊，過高濃度之 BA 易使芽體褐變以致降低培養芽體之成活率。

一、前 言

茶樹 (*Camellia sinensis* L) 為一種多年生木本植物，在育出優良新品種後，以傳統壓條及扦插法常無法滿足栽培者對苗木的大量需求⁽²¹⁾；品種園中有些脆弱品種在田間之發育狀況不良，有失其特有基因之虞⁽²¹⁾；經由莖頂組織培養大量繁殖試管茶苗，並以此做為基因保存及無病毒苗育成之基礎為本研究之目的。

茶樹組織培養自 1970 年英國劍橋大學 Ogutuga 氏首次發表迄今有 8 篇報告 (4,10,11,12,14,15,19,24)。其中由子葉形成之癒傷組織 (callus tissue) 獲得完整植株分化者一篇⁽²⁴⁾；花藥培養形成癒傷組織後長出綠頂 (green tip) 或根及根毛者兩篇^(10,11)；以胚或花藥研究培養條件者各一篇^(4,15)；俄人 Koretskaya 等人以組織培養研究酚類化合物的形成條件⁽¹⁴⁾；英國劍橋大學 Ogutuga 等人由莖頂誘發癒傷組織以研究咖啡因 (caffeine) 的合成⁽¹⁹⁾；日人 Doi 氏則報告可由嫩枝條 (stem segment) 誘生癒傷組織^(10,12)。所有這些報告皆以誘生癒傷組織的形成為第一步 (4,10,11,12,14,15,19,24)，沒有經由莖頂培養直接誘發不定芽體的報告⁽¹⁹⁾，因為前人研究得知癒傷組織在培養過程常誘導出含多倍染色體的突變體，無法得到相同遺傳特性的親本^(1,2,3,8,9,16)，因此這種方法對優良茶樹的大量繁殖沒有用處。本研究嘗試利用莖頂生長點培養直接形成多量同質基因型之植株，以為基因保存與大量繁殖實際應用之需。

1. 2. 4 台灣省茶業改良場助理研究員、副研究員。台灣省 桃園縣 楊梅鎮。

3. 台灣省農業試驗所研究員。台灣省 台中縣 霧峰鄉。

二、材料與方法

(一) 材料：

採3至5年生台茶12號品種 (cv. TTES No. 12) 之茶芽，除去未包緊之外葉，以75%酒精放入超音波振盪器中振盪消毒1分鐘，無菌水洗三次後，剝除最外層葉，分裝消毒試管中供用。

(二) 消毒方法：

(1) 次氯酸鈉濃度與振盪時間之組合試驗：

將含次氯酸鈉有效成份5.25%之clorox稀釋成含0.1%、0.25%、0.5%、0.75%及1.0%之次氯酸鈉溶液；於超音波振盪器消毒1、3及5分鐘後，以無菌水洗三次（第三次無菌水洗滌時振盪15秒鐘）；再於MS無菌溶液中剝除芽葉1到2層使達莖頂1mm左右大，將連梗2mm長之莖頂垂直插入含有8ml MS固體培養基之22×120mm試管中，所用培養基為有機鹽經改變為Thiamine.HCl 0.4mg/l, Nicotinic acid 2.5mg/l, Glycine 1.0mg/l及含有3%蔗糖之Murashige和Skoog⁽¹⁷⁾無機鹽類培養基，以0.8%洋菜 (Phytagar) 凝固。接種後試管材料於25-27°C定溫箱與12小時光照下培養，1週後記錄結果，每處理50個頂芽，做二重複。

(2) 鏈黴素 (Streptomycin Sulfate) 處理效果之試驗：

上述次氯酸鈉消毒濃度與時間之最佳組合找出後，再以下列三種處理消毒茶芽接種，以了解鏈黴素對茶芽內部菌體殺菌效果。

方法A：0.75%次氯酸鈉溶液超音波振盪1分鐘，無菌水洗三次，MS無菌溶液中切芽。

方法B：0.75%次氯酸鈉溶液超音波振盪1分鐘，320ppm鏈黴素無菌水溶液洗三次，MS無菌溶液中切芽。

方法C：0.75%次氯酸鈉溶液超音波振盪1.5分鐘，320ppm鏈黴素無菌水溶液洗三次，含200ppm鏈黴素之MS無菌溶液中切芽。

每處理320個頂芽，做三重複。

(3) Auxin與Cytokinin對頂芽生長之影響試驗：

以上述培養基加入NAA 1.0 ppm及各種濃度（1、2.5、5、10、15、20、25或30ppm）之BA培養14天後，觀察芽體對BA的反應。每處理50個芽，做三重複。

三、結 果

(一) 次氯酸鈉濃度與振盪時間的消毒效果：

茶芽在次氯酸鈉溶液中浸泡過久極易黃化或褐化，消毒時間太短則無法得到無菌頂芽。在各種濃度與時間之組合中以0.75%，1分鐘及1%、1分鐘最好，分別可得25.5%及24.6%之最佳無菌成活率（表一）。濃度增高或時間加長頂芽即呈黃褐色，故以採用0.75%次氯酸鈉溶液，超音波振盪1分鐘比較理想。

(二) 鏈黴素之處理效果：

茶樹終年栽培於田間，春夏季雨期不斷，芽體中藏有極多細菌類之微生物，以致經酒精及次氯酸鈉溶液消毒後，所獲成活頂芽之百分率仍偏低（25.5%），加以新育品種台茶12號頂芽來源有限的情形下，浪費試驗材料實在可惜。由表二之結果得知以0.75%次氯酸鈉溶液於超音波洗滌器中振盪1.5分鐘

表一、次氯酸鈉濃度及振盪時間獲得無菌頂芽之百分率。

Table 1. Percentage of sterile shoot obtained through different treatment with various concentrations of sodium hypochlorite and different shaking time.

Conc. of NaClO (%)	Time (min)		
	1	3	5
0.10	5.2 ^a	1.1	0
0.25	11.6	12.0	0
0.50	20.0	13.7	9.7
0.75	25.5	15.0	12.6
1.00	24.6	14.0	2.7

a Mean percentage of sterilized living shoots by average of 100 samples.

表二、無菌綠色頂芽百分率與消毒方法之關係。

Table 2. Percentage of sterile living shoot obtained in three disinfection methods.

Disinfection method		
A ¹	B ²	C ³
25% ^c	41% ^b	57% ^{a4}

1. Shoot soaked in 0.75% NaClO for 1 min in ultrasonic cleaner; rinsed 3 times in distilled water; then shoot tip was excised in MS liquid solution.

2. Same as above, but washed in 320 ppm streptomycin sulfate solution.

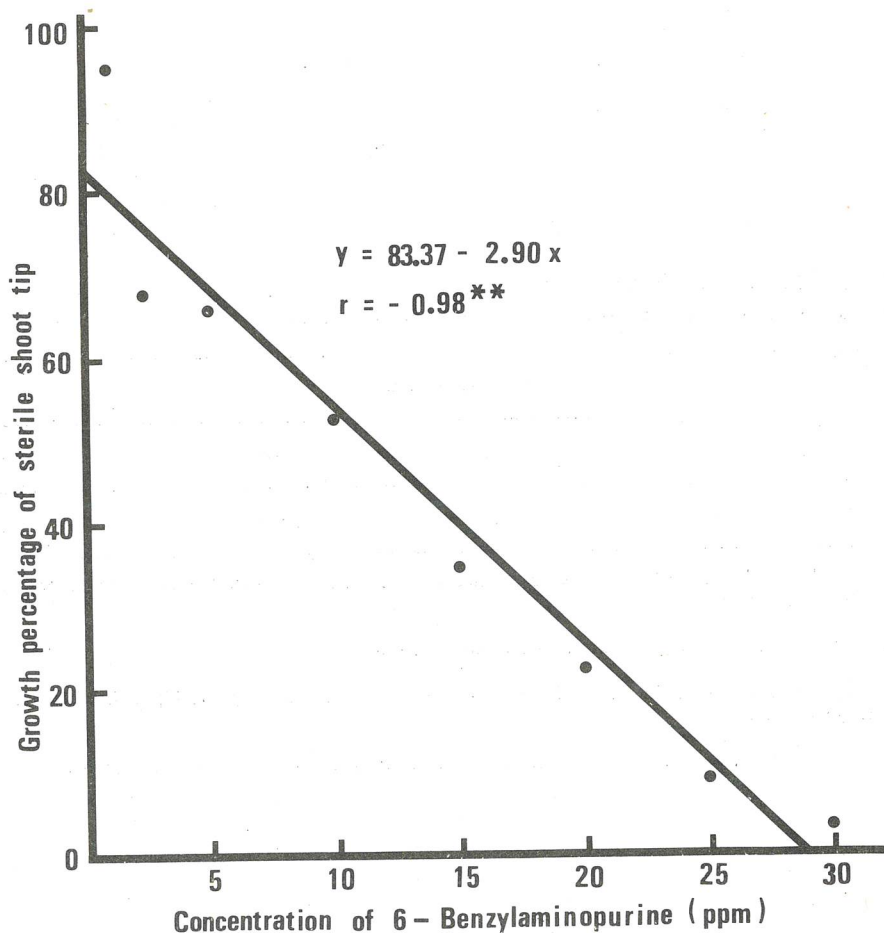
3. Same as above, but soaked in 0.75% NaClO for 1.5 min; shoot tip was excised in MS liquid solution with 200 ppm streptomycin sulfate.

4. Results followed by the same letter are not significantly different at 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

後，再以 820ppm 鏈黴素無菌水溶液做為消毒後之洗滌液洗滌三次，剝除 1 到 2 片葉使頂芽達 1mm 大，放置含 200ppm 鏈黴素之 M S 無菌溶液中切芽使連梗 2 mm 長，再將此莖頂插植於 M S 固體斜面培養基，可得 57 % 之消毒成功率。

(三) Auxin 與 Cytokinin 對茶樹頂芽的效應：

茶芽在 M S 固體斜面培養基培養 1 週後移植到含有 1 ppm 與各種濃度 (1 , 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 及 30 ppm) 之 BA 組合之培養基，14 天後呈現生長、不長及褐化三種現象。圖一即 BA 濃度與茶芽生長百分率之直線迴歸，迴歸方程式為 $y = 83.37 - 2.90x$ ，迴歸係數為 $r = -0.98^{**}$ ；圖中顯示茶芽生長百分率與 BA 濃度呈負相關，亦即 BA 濃度越高，茶芽越易褐化；BA 之濃度以 1 ppm 最佳，成活率達 95.1 %，2.5、5 及 10ppm 次之，成活率分別為 68.1 %、65.9 % 及 53.0 %，15 ppm 以上則芽體大部褐化。

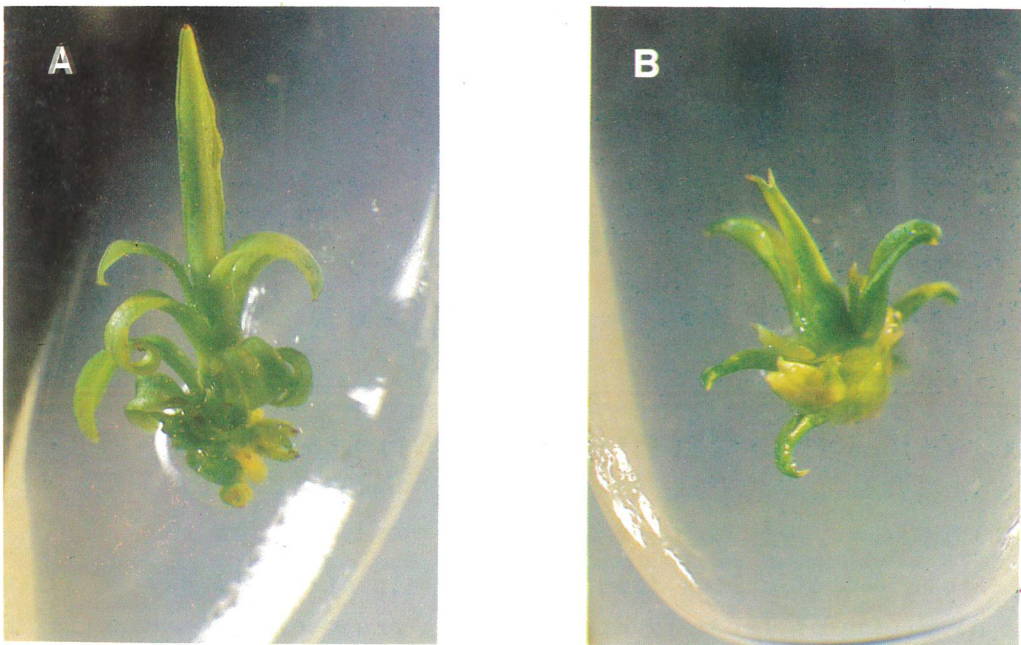


圖一．茶頂芽生長百分率與 6 - Benzylaminopurine 濃度間的直線迴歸。

Fig1. The regression line between growth percentage of shoots and concentration of 6-Benzylaminopurine after 14 days.

培養之茶芽在含有NAA 1 ppm、BA 5 ppm之MS固體培養基中60天後可見長出芽點，80天後可見頂芽展開3到7片葉片，芽體可長達10-15mm，並可見由腋芽長出1到5個新芽體（圖二A，B）。其發生多芽體之百分率為40%，其餘60%只見培養芽體增大或自基部形成癒傷組織。形成之癒傷組織生長迅速，60天後即可達2公分直徑（圖三）。大部分呈綠色，並產生芽球相似物（protocorm-like body）（圖三-A），亦有黃色或周邊呈紅色者（圖三-B,C）。

不加Cytokinin時，頂芽長成展開之狹長葉片2到3片，葉長1到2公分，但發育狀況不佳，移換NAA 1 ppm及BA 20 ppm之高濃度植物荷爾蒙培養基即行褐化，並自葉尖長出新的癒傷組織（圖四）。



圖二. 茶莖頂培養誘發多芽體的形成（培養後154日）

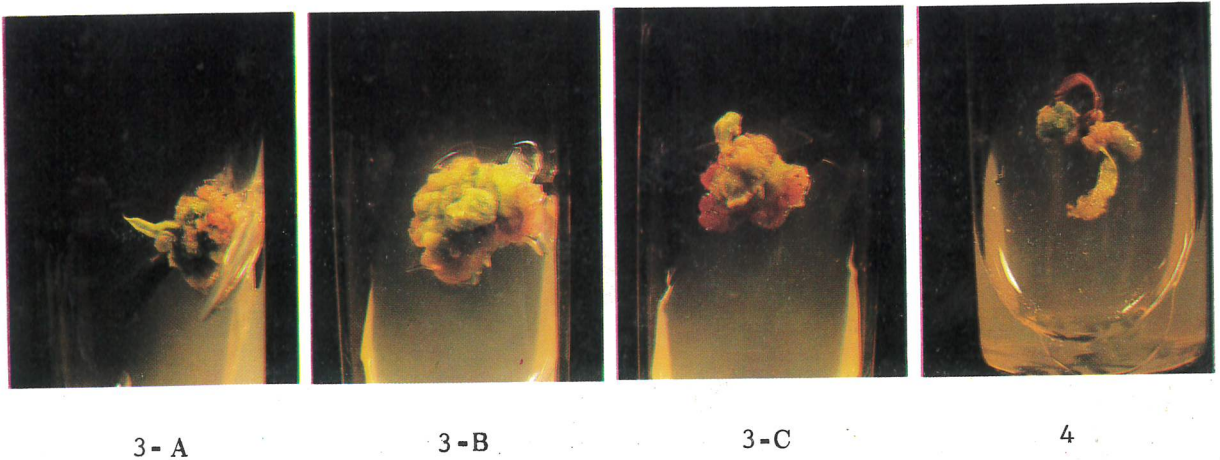
A) 展開5片葉片，並有可見側芽1個及葉腋間小腋芽3個。

B) 自1mm莖頂分化出5個以上的多芽體。

Fig 2. Formation of multiple shoots from tea shoot tip after 154 days in culture. A) with 5 expanding leaves and 4 auxiliary buds are visualized. B) with 5 auxiliary buds at least are differentiated.

四、討 論

田間茶樹由於細菌隨雨水深入芽體內層潛伏，無菌化相當困難；進行溫室盆栽，茶芽生育量低，兼以有些珍貴或纖弱品種頂芽數目有限，故改善消毒方法提高芽體無菌化存活百分率成為莖頂培養首須克服之工作。將鏈黴素加入操作過程可使其無菌率達 50 % 以上（最佳時曾達 73.4 %），對今後茶芽之採取培養幫忙甚大。



圖三．茶莖頂培養誘發癒傷組織（培養 154 日）

- A) 直徑 18mm., 長出芽球相似物, 培養基含 NAA 1 ppm, BA 10 ppm.
 B) 直徑 22mm., 週邊黃色到紅色, 培養基含 NAA 5 ppm, BA 10 ppm.
 C) 直徑 14mm., 週邊呈深紅色, 培養基含 NAA 1 ppm, BA 30 ppm.

Fig 3. Fromation of callus from tea shoot tip after 154-day in culture.

- A) callus of 18 mm in diameter with protocorm-like body in MS medium containing NAA 1 ppm and BA 10 ppm. B) callus of 22 mm in diameter around in yellowish red color in MS medium containing NAA 5 ppm and BA 10 ppm. C) callus of 14 mm in diameter around in deep red color in MS medium containing NAA 1 ppm and BA 30 ppm.

圖四．茶芽於不含植物荷爾蒙之培養基展開 3 到 4 狹長葉片，移種含 NAA 1 ppm 及 BA 20 ppm 之培養基後即行褐化，並自莖頂及葉尖長出癒傷組織。

Fig.4 After having developed 3 or 4 narrow long leaves in MS medium without any phytohormone, and then subcultured in MS medium with NAA 1 ppm and BA 20 ppm, tea shoot tip browned and grew out callus tissue from shoot tip and leaf tips.

Cytokinin 爲促進多芽形成之植物荷爾蒙⁽⁷⁾，木本植物一般用量較高，如kinetin用在檫樹可高達60ppm^(1,2)，本研究發現茶樹莖頂在10ppm以內之BA皆能忍受，以1 ppm NAA及5 ppm BA組合之培養基可誘發40%之芽體形成1到5個新芽最佳，但仍有60%只增大或形成癒傷組織。Ogutuga, Wu 和 Doi 等氏報導，經由莖頂只能長出癒傷組織⁽¹⁹⁾，培育子葉或花藥亦須經由癒傷組織方能長出芽體及根⁽²⁴⁾或綠頂及根^(10,11)之結果相比，本研究發現由茶樹莖頂不經癒傷組織可直接長出多芽體之結果，其對茶樹大量繁殖之應用尤優於前人之研究。木本植物無性繁殖在理論上以促進節上定芽發育成苗爲佳，如此可不虞變種之發生⁽¹⁾，故如何提高芽體形成更多定芽，降低癒傷組織發生的百分率爲今後研究的重點工作之一^(5,6,20)。

木本植物以組織培養法行無性繁殖成功者極少，尤其潤葉樹方面成功的例子更少^(1,3,7,13,16,18,22,23)，本文雖已可使茶芽長出多量芽體，但發根方面之研究則仍有待加強，未來研究之重點爲由Auxin種類及濃度，芽齡，無菌苗齡，培養體之通氣性，培養基有機成分及天然生成物之添加，蔗糖濃度與光照強度等方向研究植物體發根之可能性，以促進長成完整之繁殖體，提供栽培、基因保存以及生理、生化研究之用。

誌

謝

本研究承茶業改良場場長邱博士再發之鼓勵及中央研究院研究員王博士博仁之詳細指導，曾方明君協助統計及資料的整理，在此謹致最誠摯之謝意。

參考文獻

1. 王博仁，林美霞。1980。檫樹 *Sasafra randaiense* (Hay.) Rehd. 的組織培養繁殖。科學發展月刊 8(12):1148-1155。
2. 邱金春，吳永燈。1981。莖頂培養法培育無病毒植物。中央研究院植物研究所專刊第四號：97-130。
3. 林美霞，王博仁。1981。木本植物組織培養之現況。中央研究院植物研究所專刊第四號：34-52。
4. Amma, S. and Y. Suzuki, 1980, Decotylated embryo culture in tea plant. Tea Research Journal 52:7-10. (In Japanese).
5. Barua, D.N. 1969. Seasonal dormancy in tea (*Camellia sinensis* L.). Nature 224:514.
6. Barua, D.N. and S.C. Barua. 1969. Seasonal dormancy in tea. Two and a Bud 15:41-45.
7. Bonga, J.M. 1977. Application of tissue culture in forestry. In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Ed. by Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj). pp. 93-108. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
8. D'Amato, F. 1977. Cytology, cytogenetics and plant breeding. In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture (Ed. by Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj). pp. 343-464. Springer-Verlag, Berlin, New York.
9. D'Amato, F. 1978, Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In Frontiers of Plant Tissue Culture (Ed. by T.A. Thorpe). pp. 287-296. Intern. Asso. Plant Tissue Culture, Calgary, Canada.

10. Doi, Y. 1980. Suitable medium condition for callus induction from stem segment and its application to anther culture in tea plant. *Study of Tea* 58:1-9. (In Japanese).
11. Doi, Y. 1981. Frequency of root differentiation in anther culture of tea. *Study of Tea* 60:1-3. (In Japanese).
12. Doi, Y. 1981. Influence of temperature in growth of callus induced from stem segments of young tea shoots. *Tea Research Journal* 53:42-44. (In Japanese).
13. Ishikawa, H. 1972. Culture of cells and tissues and differentiation of organs in forest tree. *IUFRO Genetics Sabrao Joint Symposia*, 1-12, Tokyo.
14. Koretskaya, T.F. and M.N. Zaprometov. 1975. The tissue culture of tea as a model for studying conditions of phenolic compound formation. *Fiziologiya Rastenii* 22 (2):282-288.
15. Kuranuki, Y. 1978 Effects of sucrose and growth substances concentration of medium on the formation of multicellular pollen grains in anther culture of tea plant. *Tea Research Journal* 48:11-15. (In Japanese).
16. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-165.
17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
18. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. *In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Ed . by Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj). pp. 179-206. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
19. Ogutuga, D.B.A. and D.H. Northcote. 1970. Caffeine formation in tea callus tissue. *Jour. of Exp. Bot.* 21: 258-273.
20. Rustagi, P.N. 1980 Gibberellins and dormancy (notes). *Two and a Bud* 27:33.
21. Singh, I.D. 1978. Application of plant cell, tissue and organ cultures in tea research and development. *Two and a Bud* 25:65-69.
22. Winton, L. 1970. Shoot and tree production from aspen tissue culture. *Amer. J. Bot.* 57:904-909.
23. Winton, L. 1978. Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. *In Frontiers of Plant Tissue Culture* (Ed. by T.A. Thorpe.). pp. 419-426. The Intern. Asso. Plant Tissue Culture, Calgary, Canada.
24. Wu, C.T. 1976. Studies on the tissue culture of tea plant. *J. Agri. Asso. of China, New Series* 93:30-42. (In Chinese).

FORMATION OF MULTIPLE SHOOTS FROM TEA SHOOT TIP CULTURE

Jee-Song Chen¹, Huey-Tzang Chen², Hsin-Sheng Tsay³
and Pin-Tsai Lin⁴

SUMMARY

Tea (*Camellia sinensis* L.) shoot explants were surface-sterilized for 1.5 minute in 0.75% hypochlorite in ultrasonic cleaner, rinsed three times in 320 ppm streptomycin sulfate solution. Shoot tips of 1 mm were then excised in MS solution containing 200 ppm streptomycin sulfate and placed on the nutrient medium. Successful culture reached 57% with this disinfection method.

Multiple shoots were developed in 40% of the shoot tips cultured on MS medium supplemented with 1 ppm of NAA and 5 ppm of BA. The rest of the cultures either developed callus or protocorm-like body. Red cell mass also developed around some cultures. Higher concentration of BA caused browning in shoot tip culture and lowered the survival rate of cultures.

1,2,4 Assistant Plant Pathologist, Assistant Entomologist and Agronomist, respectively, Department of Tea Agronomy, TTES, Yangmei, Taoyuan Hsien, Taiwan, 326, ROC.

3 Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.