

瓜類及茄子抗萎凋病根砧品種選育與產業應用

—茄科及瓜類作物花藥培養癒合組誘導之研究

1. 中文摘要

為加速茄科及瓜類作物新品種(系)之育成，本研究嘗試進行苦瓜、絲瓜和辣椒之花藥培養，初步完成癒合組織誘導方法之建立，試驗結果絲瓜以 0.7-1cm 之花蕾取花藥培養於 MS 基礎培養基添加 2mg/L NAA 加 0.5mg/L BA 之處理組合有最高之癒合組織誘導率，達 88.0%；苦瓜-和生翡翠以 0.3-0.5cm 之雄花蕾取花藥培養於 MS 基礎培養基添加 0.5 mg/L NAA 加 0.5 mg/L BA，癒合組織誘導率為 63.3%為最佳；苦瓜-農友月珍以 0.5-0.7cm 之雄花蕾培養於 MS 基礎培養基即可誘導 50.0%的花藥形成癒合組織；辣椒則以取 0.4-0.6cm 雄花蕾之花藥培養於 MS 基礎培養基添加 0.1 mg/L NAA 加 0.5 mg/L BA 之處理組合有最高 64.4%之癒合組織誘導率。

2. 研究目的

瓜類(葫蘆科)和茄科作物在全世界被廣泛栽培作為食用、飼料，部份亦可作藥用，林(2010)提出全球已栽培或具有潛在經濟價值之葫蘆科植物計有55種。而在台灣瓜類作物如：胡瓜、西瓜、甜瓜、南瓜、絲瓜、苦瓜、黃瓜；茄科蔬菜如：番茄、甜椒、辣椒和茄子，皆是重要的果菜作物。在育種上，由於瓜類和茄科作物多為異交作物，易產生自交不親和性，以及部份作物生育期長，導致自交系之育成具有難度或耗費時日。本計畫目的即希望利用組織培養技術進行瓜類和茄科作物花藥(或花粉粒)培養，誘導單倍體植株形成並進行染色體倍加，加速獲得同質純系之植株，以解決茄科及瓜類作物因自交不親和性及生育期長，導致自交系育成困難及耗費時日之問題，透過本項技術之開發亦可提高不同基因型獲得純系植株之可能性，提供作為後續育種親本之來源，有效加速茄科及瓜類作物新品種(系)之育成。

3. 重要工作項目及實施方法

一、茄科及瓜類作物組培純系育成

(一)試驗材料：苦瓜(農友-月珍、和生-翡翠)、絲瓜(農友-東光三號)及辣椒(農友-墨西哥)三種作物，使用市面上主要流通之商業 F1 品種，其中苦瓜母株特性具有多花母系、早生、生育強健之特性；絲瓜東光三號具抗萎凋病特性；墨西哥辣椒具有果大、肥短、肉厚光滑、特強辣味之特性。

(二)花粉發育期觀察：

1. 將雄花蕾依大小分 5 等級：>1cm、0.7-1cm、0.5-0.7cm、0.3-0.5cm、<0.3cm(葫蘆科)或 0.7cm、0.6cm、0.5cm、0.4cm、0.3cm(茄科)，於上午

9:00-10:00 採集 5 種大小等級的雄花蕾。

2. 將採集之雄花蕾浸泡於 Farmer 固定液(酒精：冰醋酸 = 3：1)中放置隔夜。
3. 將花藥自花蕾中取出，以擦手紙稍吸乾水分，放在載玻片上。
4. 將 Acetocarmine 染劑滴於花藥上，用玻棒輕輕搗碎花藥，再將較大的殘渣挑出。
5. 將載玻片以酒精燈稍微加熱，當染劑有蒸發時再添加，持續重複動作 5-10 分鐘，使細胞核染色，之後靜置 5-10 分鐘，再蓋上蓋玻片。
6. 於顯微鏡下觀察並拍照，以作為選取最適合進行花藥培養之雄花蕾大小之參考。

(三)不同雄花蕾大小及培養基配方對茄科、瓜類作物花藥培養癒合組織誘導之影響：

1. 比較雄花蕾大小對茄科(辣椒)、葫蘆科(絲瓜、苦瓜)花藥培養癒合組織誘導之影響。按照花粉粒發育時期觀察試驗之分法將雄花蕾分為 5 級，於試驗當日採取新鮮之雄花蕾，先以 75% 進行表面消毒，再以 0.5% 次氯酸鈉加 1-2 滴 Tween 20 震盪消毒 15 分鐘後，以滅菌水清洗 2-3 次，於無菌操作臺取出，以解剖刀將花藥挑出，將葫蘆科花藥橫切成片狀(約每一花藥切成 5-6 片)，茄科因花藥較小則是採對切及橫切成 4 等份，接種於培養基表面，將培植體輕壓使之稍微沒入培養基中，每培養皿接種 15 個培植體，放置於黑暗、溫度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 之培養室中培養 2-4 週後調查癒合組織誘導率。
2. 比較不同濃度組合的植物生長調節劑(NAA 0、0.1、0.5、1、2 mg/L 加上 0.5 mg/L BA)對茄科(辣椒)、葫蘆科(絲瓜、苦瓜)花藥培養癒合組織誘導之影響。採取當日新鮮不同大小的雄花蕾，消毒及培養方法同上，於培養 2-4 週後調查癒合組織誘導率。

(四)不同培養基配方對茄科及瓜類作物花藥培養癒合組織誘導植株再生之影響：將花藥培養所誘導之癒合組織移到 MS 培養基添加 0.1 mg/L NAA 加上 0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L TDZ 或 0.1、0.5、1、2、3 mg/L BA，以及單獨添加 TDZ 或 BA 之分化培養基，試驗對誘導植株再生之影響。試驗每試管接種 2 團癒傷組織，每處理培養 5 支試管，放置於光照 16 小時、黑暗 8 小時，溫度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 之培養室中培養 2 個月後調查植株再生率。

4. 結果討論

一、茄科及瓜類作物組培純系育成

(一)觀察茄科及葫蘆科作物適合花藥培養之花蕾發育大小

研究指出，花藥(花粉)培養誘導雄性單性生殖(androgenesis)，其成功率受到材料基因型、供體植株之生長環境與發育時期、小孢子發育時期、預處理、培養

基配方、培養條件等之影響(緜和張，2006；周等，2009；唐等，2010)。其中小孢子發育時期為一主要的影響因子，發育期越早的花粉對培養條件要求越高，發育期過晚也難以誘導植株再生(緜和張，2006)，一般認為葫蘆科較適合培養之小孢子發育時期為單核早期至雙核期(周等，2009)，試驗也顯示花瓣、花藥或花蕾長度(何等，2008)可做為區分小孢子發育時期之判定方法。因此本試驗將供試材料：苦瓜(翡翠)、絲瓜(東光三號)、辣椒(墨西哥)，取不同大小的雄花蕾分為5種等級後，進行醋酸洋紅染色鏡檢之。結果顯示苦瓜在花蕾大小小於0.3cm時仍處於花粉母細胞減數分裂期，0.3-0.5cm時約有1/3比例處於小孢子四分體期，2/3為單核早期，0.5-0.7cm則約為單核中晚期到雙核期，0.7cm至1cm以上多為成熟之花粉粒(圖1)。絲瓜花蕾大小<0.3cm時未能觀察到花粉粒細胞，為0.3-0.5cm時皆為小孢子四分體期，0.5-0.7cm為1/2比例四分體期、1/2比例單核期，0.7-1cm多為單核中晚期到雙核期，1cm以上為成熟花粉粒(圖2)。辣椒雄花蕾大小0.3cm皆為四分體期，0.4cm為四分體期到單核期，0.5cm為單核期至雙核期，0.6cm約為雙核期到成熟花粉粒，0.7cm為成熟花粉粒(圖3)。依上述試驗結果，推測苦瓜較適合花藥培養之花蕾大小為0.5-0.7cm，絲瓜為0.7-1cm，辣椒為0.4-0.6cm。

(二) 不同雄花蕾大小及培養基配方對茄科、瓜類作物花藥培養癒合組織誘導之影響

本試驗首先比較雄花蕾大小對葫蘆科(絲瓜、苦瓜)、茄科(辣椒)花藥培養癒合組織誘導之影響，以確認花粉發育期觀察結果之雄花蕾大小是否為較佳之培養條件。經試驗顯示，絲瓜以不同雄花蕾大小培養，結果除花蕾大小>1.0cm癒合組織誘導率較低為54.4%外，其他處理組皆在70.0%以上；而苦瓜僅比較0.3-0.5cm及0.5-0.7cm兩種花蕾大小之癒合組織誘導率，結果兩者之誘導率分別為21.0%、29.0%(表1)。辣椒以培養0.4 cm之雄花蕾有最佳之癒合組織誘導率，達53.3%，其次為0.5cm花蕾之40.5%，0.6cm和0.3cm再次之，癒合組織誘導率分別為35.3%和31.7%，以0.7cm花蕾培養癒合組織誘導最低為23.3%(表2)。上述結果基本上與花粉發育期觀察結果相符。

進一步試驗不同培養基配方對茄科、瓜類作物花藥培養癒合組織誘導之影響，試驗比較不同濃度NAA(0、0.1、0.5、1、2 mg/L)與0.5mg/L BA之組合。結果顯示，絲瓜花藥隨培養基NAA濃度提高，癒合組織誘導率有增加之趨勢，以培養於MS基礎培養基添加2mg/L NAA加0.5mg/L BA之處理組合有最高之癒合組織誘導率，達88.0%(表3)。苦瓜部分由於先前不同花蕾大小之試驗癒合組織誘導率偏低(表1)，故再一次比較花蕾大小及不同培養基配方之影響，結果顯示，苦瓜-和生翡翠以0.3-0.5cm之雄花蕾取花藥培養於MS基礎培養基添加0.5 mg/L NAA加0.5 mg/L BA，癒合組織誘導率為63.3%為最佳；苦瓜-農友月珍則是以0.5-0.7cm之雄花蕾進行花藥培養有較佳的癒合組織誘導率(36.7-57.8%)，不同培養基之處理間則無顯著差異(表4)，此結果指出不同苦瓜品種適合花藥培養之花蕾大小具有差異。另外，辣椒花藥以培養於MS基礎培養基添加0.1 mg/L NAA加0.5 mg/L

BA之處理組合有最高之癒合組織誘導率，達64.4%(表5)。

(三)不同培養基配方對茄科及瓜類作物花藥培養癒合組織誘導植株再生之影響

將自茄科及葫蘆科作物花藥培養誘導之癒合組織，移至MS培養基添加0.1 mg/L NAA加上0.01、0.05、0.1、0.5 mg/LTDZ或0.1、0.5、1、2、3 mg/LBA，以及單獨添加TDZ或BA之分化培養基，試驗對誘導植株再生之影響。初步試驗結果於光照後部分絲瓜癒合組織顏色轉綠、質地變硬，苦瓜、辣椒部分癒合組織能形成根系，但皆無植株再生。

5.結論

本試驗初步建立葫蘆科(絲瓜、苦瓜)以及茄科(辣椒)花藥培養癒合組織誘導條件，試驗指出不同的作物、品種(基因型)、花蕾大小和培養基配方皆會影響葫蘆科及茄科作物花藥培養之癒合組織誘導率。以作物來說，三種作物中絲瓜之癒合組織誘導率明顯較高，其次為辣椒，苦瓜則表現誘導率較低。而不同品種如苦瓜-和生翡翠和農友月珍適合花藥培養之花蕾大小則存在顯著差異，此外不同作物對培養基的反應也不盡相同。綜合試驗之結果顯示，絲瓜以0.7-1cm之花蕾取花藥培養於MS基礎培養基添加2mg/L NAA加0.5mg/L BA之處理組合有最高之癒合組織誘導率，達88.0%；苦瓜-和生翡翠以0.3-0.5cm之雄花蕾取花藥培養於MS基礎培養基添加0.5 mg/L NAA加0.5 mg/L BA，癒合組織誘導率為63.3%為最佳；苦瓜-農友月珍則是以0.5-0.7cm之雄花蕾培養於MS基礎培養基即可誘導50.0%的花藥形成癒合組織；辣椒則以取0.4-0.6cm雄花蕾之花藥培養於MS基礎培養基添加0.1 mg/L NAA加0.5 mg/L BA之處理組合有最高64.4%之癒合組織誘導率。惟截至目前之試驗結果尚未能誘導癒合組織再生單倍體植株，後續仍須針對此部分加強研究。

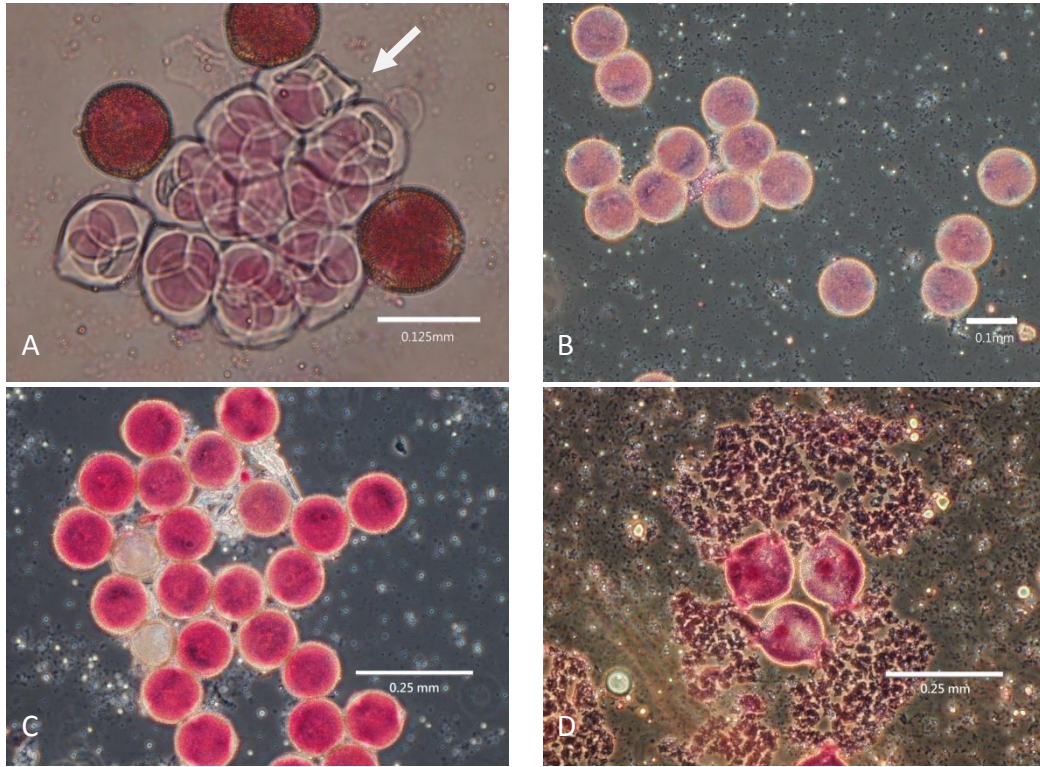


圖1. 苦瓜-和生翡翠不同雄花蕾大小之花粉發育時期
 A. 為0.3-0.5cm花蕾(箭頭指示處為小孢子四分體期)、B. 為0.5-0.7cm花蕾、C. 為0.7-1cm花蕾、D. 為大於1cm以上花蕾。

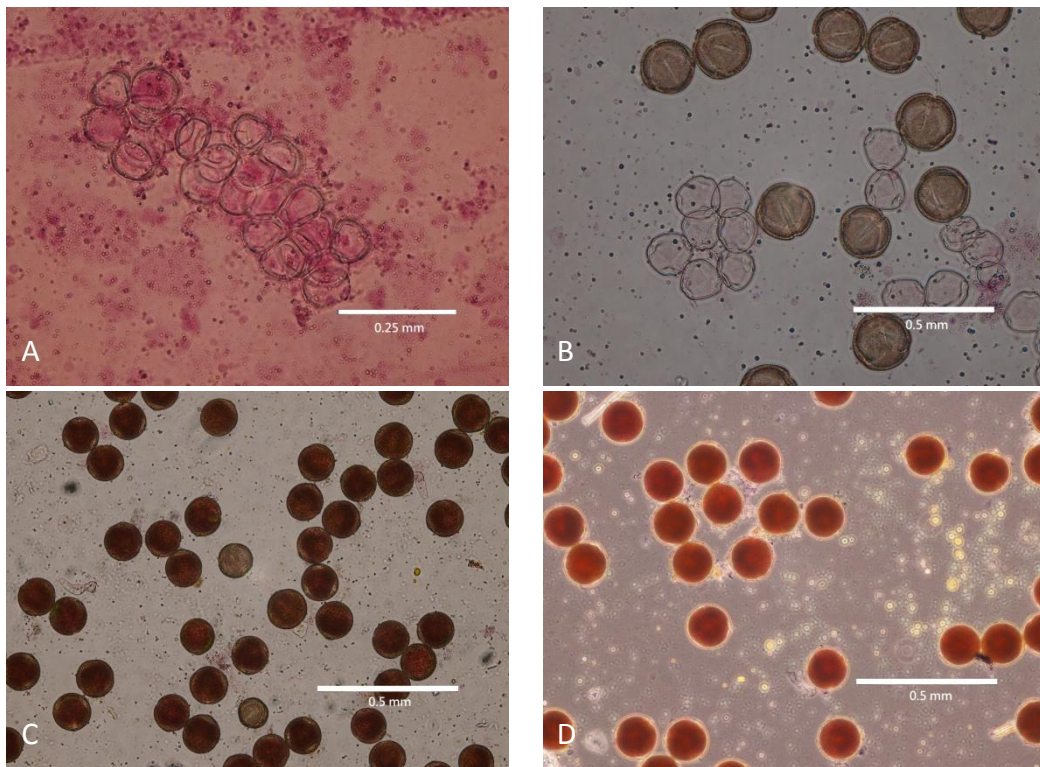


圖2. 絲瓜-東光3號不同雄花蕾大小之花粉發育時期

A.為0.3-0.5cm花蕾、B.為0.5-0.7cm花蕾、C.為0.7-1cm花蕾、D.為大於1cm以上花蕾。

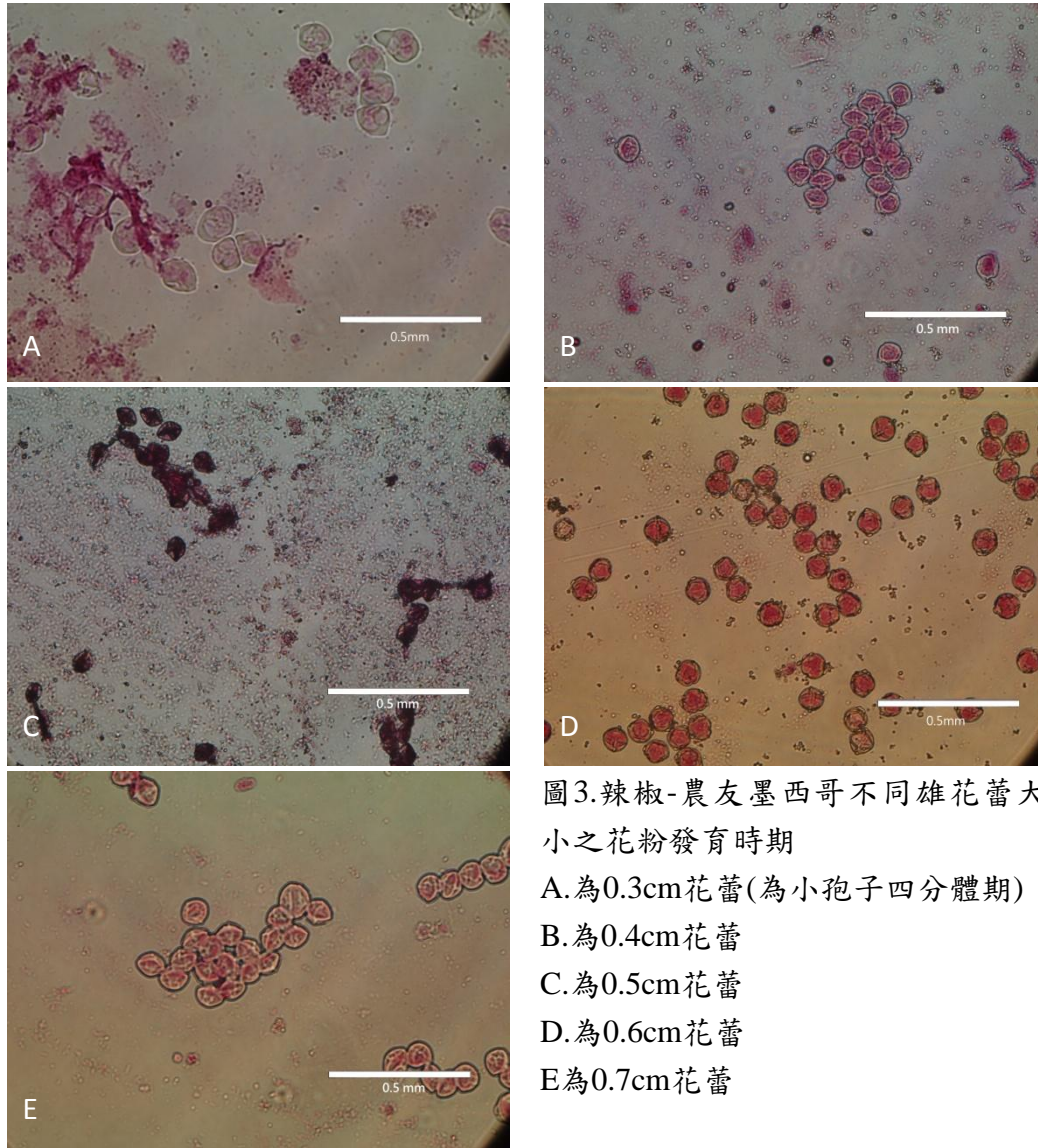




圖4. 絲瓜及辣椒花藥培養誘導之癒合組織經移至分化培養基培養2週之情形

A. 絲瓜癒合組織顏色轉綠，型態變硬。

B. 辣椒癒合組織形成根系。

表 1. 不同雄花蕾大小對絲瓜花藥培養癒合組織誘導之影響

雄花蕾大小	接種數 (No.)	癒合組織誘導率(%)	
		絲瓜	苦瓜
> 1.0 cm	77	54.4±21.6 ^z	-
0.7-1.0 cm	107	73.7±6.8	-
0.5-0.7 cm	58	70.0±17.8	29.0±5.8
0.3-0.5 cm	47	78.1±4.8	21.0±2.7

^z 數值以平均值±標準誤差表示。

表 2. 不同雄花蕾大小對辣椒花藥培養癒合組織誘導之影響

雄花蕾大小	接種數 (No.)	癒合組織誘導率(%)
0.7 cm	48	23.3±4.3 ^z
0.6 cm	140	35.3±12.4
0.5 cm	176	40.5±9.2
0.4 cm	45	53.3±11.6
0.3 cm	92	31.7±2.9

^z 數值以平均值±標準誤差表示。

表 3. 不同培養基對絲瓜花藥培養癒合組織誘導率之影響

NAA	BA	接種數	癒合組織誘導率(%)
0.0	0.0	150	68.0±7.9 ^z
0.1	0.5	150	58.7±8.5
0.5	0.5	150	74.0±6.1
1.0	0.5	150	80.7±3.3
2.0	0.5	150	88.0±4.5

^z 數值以平均值±標準誤差表示。

表 4、不同培養基、雄花蕾大小對苦瓜花藥培養癒合組織誘導率之影響

培養基		癒合組織誘導率(%)			
		翡翠苦瓜		月珍苦瓜	
NAA	BA	0.3-0.5cm	0.5-0.7cm	0.3-0.5cm	0.5-0.7cm
0.0	0.0	38.3±3.2 ^z	15.6±4.4	25.8±2.9	50.0±3.3
0.1	0.5	50.0±7.9	22.2±6.7	25.9±4.5	36.7±10.0
0.5	0.5	63.3±4.3	19.4±4.3	35.0±7.4	42.2±8.0
1.0	0.5	22.2±2.2	22.9±8.3	24.4±4.6	57.8±5.9
2.0	0.5	42.2±2.2	23.7±4.6	15.2±2.4	53.3±2.7

^z 數值以平均值±標準誤差表示。

表 5、不同培養基對辣椒花藥培養癒合組織誘導率之影響

NAA	BA	接種數	癒合組織誘導率(%)
0.0	0.0	45	29.7±15.2 ^z
0.1	0.5	45	64.4±4.4
0.5	0.5	90	49.6±2.0
1.0	0.5	81	49.0±12.2
2.0	0.5	105	20.0±7.7

^z 數值以平均值±標準誤差表示。