

蔗糖對花生花藥癒合組織誘導及分化的影響¹

曾銀位、王瑞章²、葉茂生³

摘 要

曾銀位、王瑞章、葉茂生。2004。蔗糖對花生花藥癒合組織誘導及分化的影響。台南區農業改良場研究彙報 43：18~27。

以栽培種花生 (*Arachis hypogaea* L.) 台南 11 號 (TN11) 及台農 5 號 (TN5) 二品種之單核期花藥為培植體，利用 MS 配方為基礎培養基，添加 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l kinetin，再各分別添加 30、60、90 g/l 蔗糖，及 8 g/l agar 等三種培養基(代號分別為 D₃₀、D₆₀、D₉₀)：TN11 及 TN5 二品種在 3 種培養基癒合組織之誘導率均佳。TN11 癒合組織之形成率隨蔗糖濃度增加而降低 (92.2%，92.1% 及 83.2%)，而 TN5 卻隨蔗糖濃度增加而增加 (76.7%，89.3% 及 94.6%)，但二品種均以 60 g/l 蔗糖時有最大的生長指數。TN11 及 TN5 於含 60 g/l 蔗糖之 D₆₀ 培養基培養 30 天後，可產生體胚，其誘導率僅為 2.0%，切片顯示體胚已發育至魚雷形期。而 2 品種在 3 種培養基均可形成白色突起，切片顯示白色突起為分化之根，內部已有維管束組織的分化。

關鍵詞：花生、花藥培養、體細胞胚、體胚形成、分化

接受日期：2004 年 1 月 16 日

前 言

花生(*Arachis hypogaea* L.)為一世界上重要的經濟作物，其種子含豐富蛋白質、油分以及多種人類必需之養分，其用途廣泛，適合食用、油用及加工等。

單倍體植物具有單套染色體，長久以來一直被認為是植物育種及細胞遺傳研究的良好材料。然而在自然界中，單倍體植物發生的頻度非常低，大約介於 0.001~0.01%。誘導產生單倍體之傳統方法，如利用遠緣雜交、熱衝擊、放射線處理、延遲授粉或施以化學藥劑等方法，

-
- 1.行政院農業委員會台南區農業改良場研究報告第 297 號。本試驗經費承行政院農業委員會補助，84 科技-1-1-糧-62(16-3)，謹此致謝。
 - 2.國立中興大學農藝學系前研究生（現任名間鄉公所農業課課長）及台南區農業改良場助理研究員。
 - 3.國立中興大學農藝系教授（通訊作者）

雖可或多或少地增加單倍體植株的數目，但其效果甚低，既費勞力且困難⁽⁹⁾。利用花藥培養，是獲得單倍體植株最為有效的方法^(3,18)。單倍體植株經由染色體組倍加，產生同質雙倍體，是使雜交後代純合的一種最快速方法，可克服雜種 F₁ 之分離^(9,18)，並可縮短育種的時間、節省土地及勞力。目前花藥培養獲得單倍體植株，例子已超過 171 種，包括 60 屬，26 科之植物⁽⁸⁾，而花生野生種已有成功的報告^(5,10,11,19)；然而栽培種所獲得的植株仍然很少^(2,4,11,12,23)。

培養基中最主要的有機物質是蔗糖，其主要功用是提供碳源，及可能扮演調節培養基的滲透壓^(13,17)。提高蔗糖濃度造成培植體處於水分逆境狀態有利於分化^(1,13,14,15,17)。在國內花生花藥培養的報告甚少，且花藥培養中不同品種間其分化能力差異極大^(2,4,6,7)。本試驗以本省栽培種花生花藥為材料，探討不同蔗糖濃度對花藥培養癒合組織誘導及分化之效果，並以石蠟切片行組織學上之觀察，期能建立栽培種花生花藥培養體胚形成及芽體分化之基本技術，進而做為育種上之利用。

材 料 與 方 法

一、材料：

以栽培種花生台南 11 號(TN11)及台農 5 號(TN5) 2 個品種為材料。於 1994 年夏作、秋作分批種植於直徑 30cm 高 30cm 的塑膠盆內，每盆種三株，放置於中興大學農藝學系溫室內，待其開花後於始花的 4 週內採其花蕾，以其花藥為培植體，進行培養。

二、方法：

取單核期花藥為培植體，將花藥分別接種於添加 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l kinetin，再分別添加 30、60 或 90g/l sucrose 及 8g/l agar 等之 MS 培養基(代號分別為 D₃₀、D₆₀、D₉₀)。先放置於 27±1 之恆溫，黑暗條件下培養 30 天後，將誘導之癒合組織分別繼代於新鮮的相同培養基，置於 1500 lux，每日 16 小時光照(冷白螢光燈)，27±1 之環境下培養。之後每 30 天更換一次新的培養基，至 90 天為止。每次繼代並調查癒合組織的質地、色澤、褐化、芽體及根形成等分化情形。

利用 Maggioni *et al.*⁽¹⁶⁾方法計算癒合組織之生長指數 (growth index, GI) $GI = \frac{W_{30} - W_0}{W_0}$ ；W₀：第 0 天的癒合組織鮮重，W₃₀：經水分逆境處理 30 天後的癒合組織鮮重。

TN11 及 TN5 二品種經誘導出的體胚與白色突起及外表未分化的癒合組織，除了以解剖顯微鏡觀察外，並以石蠟切片法(paraffin section method)，以 FAA (40 % 福馬林水溶液 5 cc : 100 % 冰醋酸 5 cc : 70 % 酒精 90 cc) 固定後，經酒精序列脫水及一系列 TBA(tert-butanol) 滲蠟、包埋等步驟，以轉動式切片機切取 10 μ 厚度之連續蠟帶，以 Haupt's Adhesive 黏於載玻片上，經 safranin-fast green 染色製成永久片，利用光學顯微鏡觀察，並照相記錄之⁽⁶⁾。

結 果 與 討 論

TN11 和 TN5 之單核期花藥接種於以 MS 為基礎培養基，添加 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l kinetin 分別再添加 30、60、90 g/l 蔗糖(代號分別為 D₃₀、D₆₀、D₉₀)的結果如表 1，由表 1 得知 TN11 之癒合組織形成率於含 30、60、90 g/l 蔗糖時分別為 92.2%，92.1%及 83.2%，而 TN5 之癒合組織形成率分別為 76.7%，89.3%及 94.6%。而癒合組織之生長指數的影響如圖 1

所示，發現 TN11 癒合組織的形成率隨蔗糖濃度增加而降低，而 TN5 癒合組織的形成率卻隨著蔗糖濃度增加而增加。可看出 TN11 和 TN5 於 30、60、90 g/l 蔗糖的培養基內，二品種都以 60 g/l 蔗糖時有最大生長指數(圖 1)。TN11 及 TN5 二參試品種於 60 g/l 蔗糖的 D₆₀ 培養基於花藥接種後 30 天即可形成胚狀體，形成率均為 2.0%，胚狀體經繼代於新鮮的 D₆₀ 培養基 10 天後，胚狀體可進一步的生長，外形似魚雷形期胚(圖 2 A, B)。TN11 於蔗糖 60 和 90 g/l，和 TN5 於 3 種蔗糖濃度下，均可產生白色突起。60 天後為了促使胚成長，將全部癒合組織體胚由含 2,4-D 改變蔗糖濃度的培養基轉移到 H1 培養基(MS + 1 mg/l NAA + 2 mg/l BA)後，體胚並無進一步成長，而癒合組織則大量增生呈膨鬆淡綠色狀態，白色突起則變為光滑淡黃色狀，白色區域逐漸消失，後期為膨鬆淡綠色癒合組織所覆蓋，有逆分化現象。而改變 60 g/l 蔗糖濃度所產生的體胚，切片顯示體胚已發育至魚雷形期(圖 3 A, B)。白色突起為分化的根，內部已有維管組織的分化(圖 4)。

培養基中最主要的有機物為蔗糖，其功能是促進生長所需的碳源及調節培養基的滲透壓^(11,12,15)。由生長指數的公式⁽¹⁶⁾可以瞭解，生長指數為一相對的癒合組織生長速度，本試驗計算經水分逆境處理後第一個月的生長指數，含 60 g/l 蔗糖之 D₆₀ 培養基於 2 個參試品種中都有最高的生長指數，綜合上述結果，花生花藥培養癒合組織分化最佳的蔗糖濃度為 6%。

Brown *et al.*⁽¹³⁾指出，培養基中的蔗糖 2/3 是作為碳源 (carbon-energy source)，另 1/3 則作為滲透調節 (osmoregulation) 之用。本試驗於花生花藥癒合組織的誘導時期改變蔗糖濃度 (30、60、90 g/l)，結果癒合組織的誘導率，TN11 隨著糖量增加而降低；TN5 卻隨著蔗糖濃度增加而提高，顯示 TN5 癒合組織的誘導對高糖濃度的忍受能力較佳。Sopory⁽²¹⁾以馬鈴薯花藥培養的結果顯示高糖濃度 (6%) 對於花粉的分裂是必須的，但後期的分化以降低蔗糖濃度 (2%) 為佳。Bansal *et al.*⁽¹²⁾以 8% 蔗糖對花生花粉胚培養可產生最好的結果。TN11 與 TN5 於 60 g/l 蔗糖的培養基，黑暗中培養一個月後產生胚狀體，形成率均為 2.0%。蔗糖濃度提高造成培植體處於水分逆境狀態有利於分化的原因，Brown and Thorpe⁽¹³⁾指出，具有分化芽體能力的癒合組織可保持較低的水分潛勢和滲透壓及較高的膨壓。Liu and Lai⁽¹⁵⁾指出癒合組織的質地多呈乾燥、緊密狀，故藉由提高蔗糖濃度來作為逆境處理，以造成癒合組織水分潛勢的降低。TN11 於 60、90 g/l 與 TN5 於三個等級的蔗糖培養基內產生白色突起，其外觀結實，比正常根粗大。經繼代於與原相同培養基一個月後，胚狀體分化成體胚，及白色突起伸長膨大。

高糖濃度有利於體胚形成，可由胚胎發育的角度來看，在母株上生長的未成熟胚是浸泡在高滲透壓的液體胚乳中，所以培養基的高滲透壓可使細胞由生長狀態，轉變成分裂狀態促進胚狀化的生長⁽²⁴⁾。另外，從生理的觀點來看，當植物細胞外滲透壓提高形成水分逆境，將誘發許多代謝物，如 proline、polyamine 及 ABA 等，可能因水分逆境使這些代謝物在細胞內產生自動調節，因而改變再生能力⁽¹⁵⁾。

組織學上的觀察顯示體胚的生長已進入魚雷型期胚，白色突起為根的分化，其體積比一般 2 倍體的根粗大的情形，Tran Thanh Van *et al.*⁽²²⁾於翼豆花藥培養時也有相同的報告 (獲得混倍體 mixoploid)。

綜合上述結果癒合組織的分化，以 60 g/l 之蔗糖濃度於起始培養的時期，有形成體胚的效果，顯示今後應將研究的重點致力於起始培養階段各種處理的探討，期望能提高體胚形成率，而針對體胚之分化，及芽體之再生實有再探討的必要。

表 1. 蔗糖對花生花藥癒合組織誘導、體胚形成及根分化之影響

Table1. The effect of sucrose on callus induction ,somatic embryogenesis and root formation from anther culture.

品種 Variety	培養基 代號 Medium code	接種花藥數 No. of anthers cultured	癒合組織形成 Callus formation*		體胚形成 Somatic embryogenesis		根形成 Root formation	
			形成數 No.	百分率 %	形成數 No.	百分率 %	形成數 No.	百分率 %
TN 11	D30	153	141	92.2	0	0	3	2.0
	D60	166	153	92.1	3	2.0	5	3.0
	D90	147	123	83.2	0	0	4	2.7
TN 5	D30	120	92	76.7	0	0	2	1.7
	D60	112	100	89.3	2	2.0	4	3.6
	D90	110	104	94.6	0	0	6	5.5

All media contained MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l kinetin

D₃₀,D₆₀,D₉₀ contained with 30,60,90g/l sucrose , respectively.

* : Callus formation were recorded 30 days after inoculation, the other characteristics were recorded 60 days after inoculation.

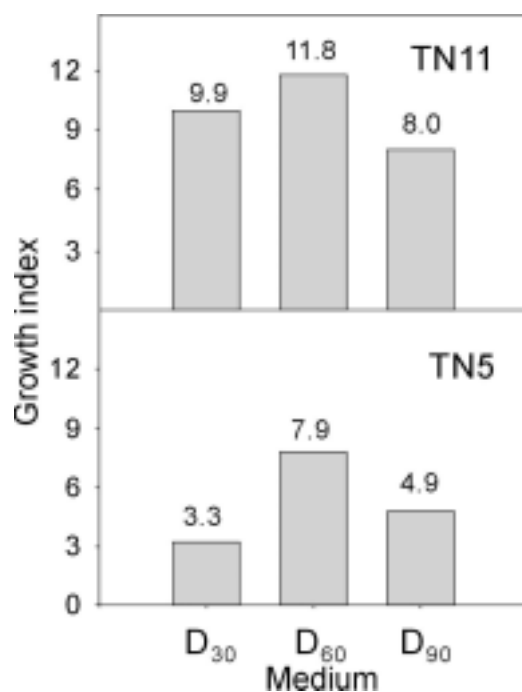


圖 1. 蔗糖對花生花藥癒合組織生長指數的影響

Fig.1. Effect of sucrose on the growth index of anther-derived callus of peanut.



圖 2.花生花藥培養誘導形成體胚(TN11 , TN5 培養於 D_{60} 培養基)

Fig.2. Somatic embryo induced from anther-derived callus of peanut.

(TN11 , TN5 cultured on D_{60} medium)

A. TN11 cultured on D_{60} medium (MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l kinetin + 60g/l sucrose + 8g/l agar)

B. TN5 cultured on D_{60} medium.

se : 體胚(somatic embryo)

wp : 白色突起(white protrusion)

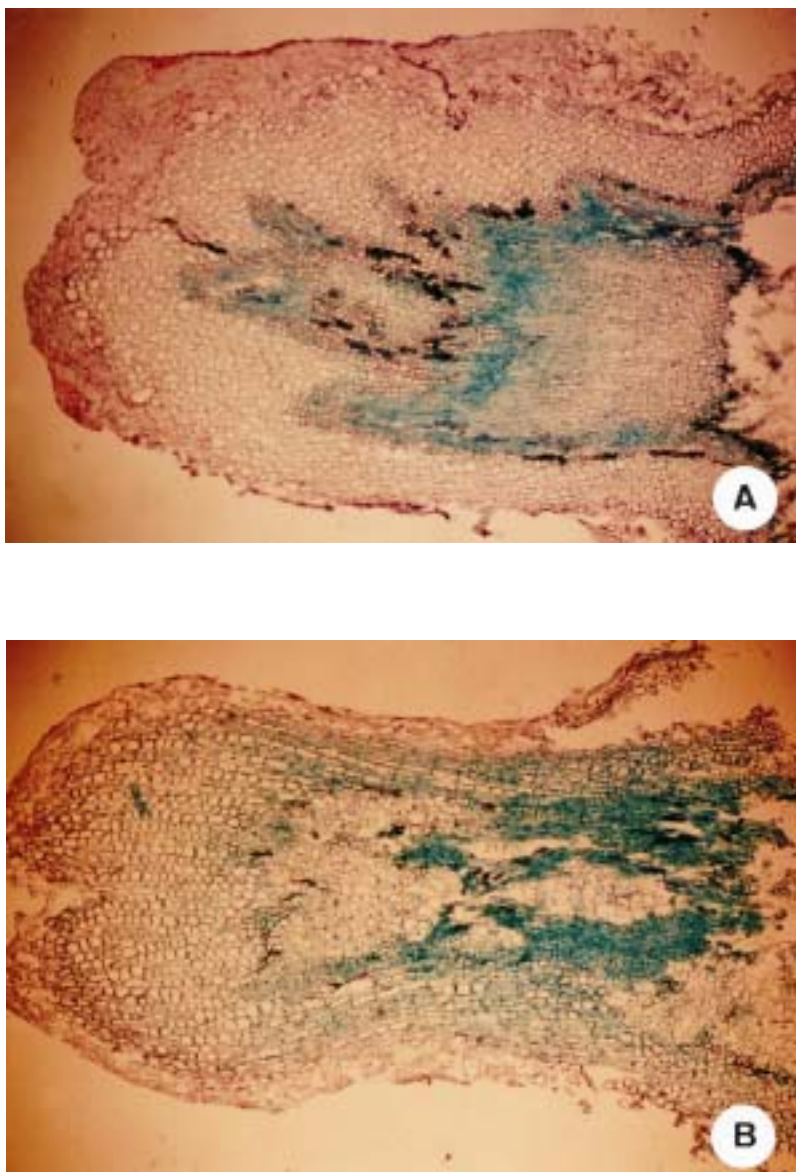


圖 3.花生花藥培養誘導體胚形成(魚雷形期)

A.TN11 培養於 D_{60} 培養基(MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l kinetin
+ 60g/l sucrose + 8g/l agar) ($\times 100$)

B.TN5 培養於 D_{60} 培養基 ($\times 100$)

Fig.3. Somatic embryo induced form from anther-derived
callus of peanut (torpedo stage).

A. TN11 cultured on D_{60} medium (MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l
kinetin + 60g/l sucrose + 8g/l agar) ($\times 100$)

B. TN5 cultured on D_{60} medium ($\times 100$)

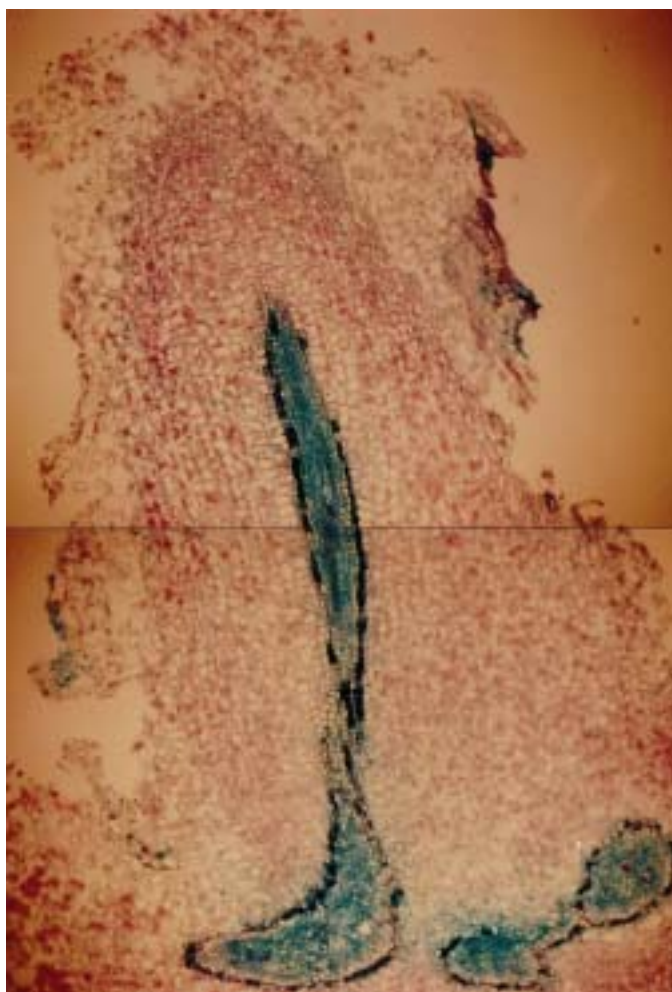


圖 4. TN11 培養於 D₉₀ 培養基(MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l kinetin + 90g/l sucrose + 8g/l agar)產生根突起之切片情形(×20)

Fig.4. Root formation from TN11 cultured on D₉₀ medium (MS + 2mg/l 2,4-D + 0.5mg/l kinetin + 90g/l sucrose + 8g/l agar) (×20)

vt : 維管組織(vascular tissue)

引用文獻

1. 尹光初、朱之垠、徐振、陳力、李學湛、柴風雲。1982。大豆花粉植株的誘導及其雄核發育的研究。大豆科學 1 : 69-75。
2. 李俊寬、葉茂生。2001。花生花藥培養的研究 IV. 花粉發育與體胚形成及芽體再生的研究。農林學報 50 (2) : 65-79。

3. 陳其昌、張穎。1974。花藥培養與單元體育種。科學農業 22:95-103。
4. 葉茂生、李俊寬。2001。花生花藥培養的研究 V. 癒合組織誘導、體胚形成與芽體再生組織學上的觀察。中華農學會報 2 (6) : 502-515。
5. 葉茂生、廖家和。1998。花生花藥培養的研究 I.不同物種花生花藥培養癒合組織誘導及芽體分化的探討。農林學報 47 (3) : 55-65。
6. 葉茂生、曾銀位。1999。花生花藥培養的研究 II.栽培種花生花藥癒合組織誘導與其小孢子發育的探討。農林學報 48 (4) : 27-37。
7. 曾銀位、葉茂生。2000。花生花藥培養的研究 III.ABA及不同種類澱粉對花藥癒合組織分化之影響。農林學報 49 (3) : 25-38。
8. 蔡新聲。1986。禾本科作物之花藥培養與品種改良。中華農學會報 新 134 : 1-23。
9. Bajaj, Y. P. S. 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. pp.3-44. *In*: Bajaj, Y. P. S. (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry 12. Haploids in Crop Improvement I. Springer-Verlag . New York.
10. Bajaj, Y. P. S., K. S. Labana, and M. S. Dhanju. 1980. Induction of pollen-embryos and pollen-callus in anther culture of *Arachis hypogaea* and *A. glabrata*. Protoplasma 103:397-399.
11. Bajaj, Y. P. S., A. K. Ram, K. S. Labana, and H. Singh. 1981. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. Plant Sci. Lett. 23:35-39.
12. Bansal, U. K., G. Bassi, S. S. Gosal, and D. R. Satija. 1991. Induction of pollen embryogenesis and cytological variability in *Arachis hypogaea* L. through anther culture. Ind. J. Genet. 51:125-129.
13. Brown, D. C. W., D. W. M. Leung, and T. A. Thorpe. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant. 46:36-41.
14. Brown, D. C. W. and T. A. Thorpe. 1980. Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant. 49:83-87.
15. Liu, L. F. and K. L. Lai. 1991. Enhancement of regeneration in rice tissue culture by water and salt stress. p.47-57. *In* :Bajaj, Y. P. S.(ed) Biotechnology in agriculture and forestry. 14. Rice. Springer-Verlag. New York.
16. Maggioni, L., M. C. Lusardi, and E. Lupotto. 1989. Effects of cultural conditions on callus induction and plant regeneration from mature and immature embryos of rice varieties (*Oryza sativa* L.). J. Genet. Breed. 43:99-106.
17. Maheshwari, S. C., A. K. Tyagi, and K. Malhotra. 1980. Induction of haploidy from pollen grains in Angiosperms the current status. Theor. Appl. Genet. 58:193-206.
18. Maheshwari, S. C., A-Rashid, and A. K. Tyagi. 1982. Haploids from pollen grains retrospect and prospect. Amer. J. Bot. 69 : 865-879.
19. Mroginski, L. A. and A. Fernandez. 1979. *In vitro* anther culture of species of *Arachis* (Leguminosae). Oleagineux 34:243-248. (in Abst.)
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.

21. Sopy, S. K. 1979. Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. *Can. J. Bot.* 57:2691-2694.
22. Tran Thanh Van, K., H. Lie-Schricke., and T. H. Trinh. 1990. Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. TPt6) : Culture of excised anther and unfertilized ovules. p.472-479. *In* : Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 12. Haploids in Crop Improvement I. Springer-Verlag. New York.
23. Willcox, M. C., S. M. Reed, J. A. Burns, and J. C. Wynne. 1991. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24:25-28.
24. Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in high plants. *Plant Cell* 5:1411-1423.

Effects of Sucrose on Callus Induction and Differentiation from Anther Culture in *Arachis hypogaea* L.¹

Tseng Y. W., R. C. Wang², and M. S. Yeh³

Summary

Anthers at uninucleate stage of two cultivars, Tainan No.11 (TN11) and Tainong No. 5 (TN5) cultured on MS basal medium containing 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin with addition of 30, 60, or 90 g/l sucrose, respectively.

All the three media gave successful induction of callus, and showed that, when the level of sucrose increased, the callus induction rate decreased (92.2%, 92.1% and 83.2%) in TN11, while the rate increased (76.7%, 89.3% and 94.6%) in TN5. Both TN11 and TN5 had the highest growth index of callus in D₆₀ medium. After thirty days, both TN11 and TN5 cultured on D₆₀ medium obtained the 2.0% of somatic embryo induction rate. When anthers of TN11 on D₆₀ and D₉₀ media, or TN5 on D₃₀, D₆₀ or D₉₀ media, there produced the white protrusions. Observation by paraffin section showed that the somatic embryo stage had developed to torpedo stage and the white protrusions were the differentiated roots with vascular system inside.

Key words : *Arachis hypogaea* (peanut), Anther culture, Embryogenesis, Differentiation.

Accepted for publication : 16 January, 2004

1. Contribution NO.297 from Tainan District Agricultural Research & Extension Station. The Research was supported by grant from Council of Agriculture the Executive Yuan (84-AST-1.1-FAD-62 (16-3)) .

2. Former graduate students (Present : Chief, Agricultural Section, Mingchien Township, Nantou and assistant researcher,) Yulin Branch of Tainan DARES.

3. Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taicheng, Taiwan, R.O.C. (Corresponding author)