中華農業研究（Jour. Agri. Res. China）40(1)：102～114（1991）

蘆筍花葯培養之全雄育種
II. 花葯來源單倍體植株染色體之倍加[1]

許家言[2]　賴本智[3]　葉常青[2]　蔡新聲[4]

摘要：本研究之目的在探討蘆筍花葯來源單倍體染色體倍加的方法，所得結果摘錄如下：

1. 單倍體莖頂培養之繁殖苗，經五次繼代培養後，約有6.0%可自然倍加成二倍體。

2. 秋水仙鹼處理法：在溫室中使用羊毛脂塗抹法與棉花點滴法之倍加成功率爲21.2～97.0%之間，其中以1.2%秋水仙鹼之羊毛脂塗抹法處理之效果最佳，連續處理六天每天一次，倍加率可達97.0%。試管內之培養基法及浸漬法的倍加效果均較液體振盪法爲高。其中以0.4% 秋水仙鹼之培養基法或0.4% 秋水仙鹼浸漬2小時兩個處理的倍加率較高，各爲41.4%及45.0%。經倍加處理後所產生之高倍數體 (polyploid)、異數體(aneuploid)、混雜體(mixaploid) 及細胞嵌合體(cytochimeras) 的現象極少。但染色體之倍加效果易受外界環境影響而呈現不穩定的現象，且倍加效果因單倍體的來源不同而異。

3. 利用單倍體莖頂培養於含有2 mg／l 2;4－D(2,4－dichlorophenoxyacetic acid)之MS(Murashige and Skoog,1962)培養基中誘導之癒合組織，再繼代培養於分化培養基上，所獲得植株中有7.7%～50.0%的二倍體。且所獲得的二倍體發根有改善之現象。因此可解決部份超雄株發根困難之問題。

利用以上所述之方法，已可由花葯培養所得之單倍體經染色體倍加後育成蘆筍之超雄株個體。

關鍵詞：蘆筍，花葯培養，全雄育種，染色體倍加。

蘆筍(*Asparagus officinalis* L.)是百合科多年生的宿根性植物，雌雄異株，爲本省重要的經濟作物之一。自1943年至今，許多學者專家均認爲蘆筍雄株之嫩莖產量高於雌株，因此若育成全雄品種，則單位面積產量將可大大提高[1,16,17,20,21]。利用花葯培養獲得之單倍體，進行染色體數目的倍加，可得同質二倍體，這種方式的育種法不但可縮短育種時間，且能提高選拔效果[3,13]；又蘆筍花葯培養獲得的雄性單倍體（Y），經染色體倍加成超雄性雙倍體（YY） 後，再與雌性個體（XX）交配，可得全雄且均質之F_1種子（XY），此種新的育種法近年來已成爲世界蘆筍生產國家所急欲達成之目標[10,11,12,19,32,33]。

Tsay *et al.*報導蘆筍花葯培養，所獲得之植物體中約有8.2% 爲單倍體[31,33]；因單倍體不稔實，故必須使染色體倍加成純質二倍體，才可應用於育種上，因此在蘆筍的全雄育種過程中，進行單倍體染色體倍加之工作極爲重要。倍加染色體的方法可分爲自發性倍加（spontaneous doubling）及人爲倍加處理[2]。自發性的倍加屬偶然巧合之現象，一般產生之比例相當低 [9,26]，因此人爲倍加乃成爲必然手段。

1. 台灣省農業試驗所　研究報告第1556號，本研究承農委會經費補助，文稿英文部份承本所農藝系劉大江博士斧正，特此申謝。

2. 3. 4. 分別爲本所農藝系助理，前助理研究員（目前爲台大蘭園總經理）及研究員。台灣省　台中縣　霧峰鄉。

人爲倍加染色體處理之方法有：1) 異種屬間之雜交：在後代中尋求稔性高之多元體，唯此等現象發生之機會極少[2]。 2) 再生現象之利用：即切斷植物體，由其癒合組織養成再生之不定芽，由此可獲得多倍體，此種方法常用於育成同質多元體[2,7,23,25]。3) 物理及化學的刺激法：如高溫、低溫、遠心力、X－ray及化學葯品 aurantia、acenaphtein及秋水仙鹼（colchicine）之處理等；其中除秋水仙鹼外，多倍體之發生率均甚低或常產生生理障礙，故不具實用性[2]。秋水仙鹼法使用簡單，且染色體倍加比率頗高，故一般學者常利用之以育成多元體[2,4,6,14,18]。秋水仙鹼爲由秋水仙（*Colchicum autumnale* L.）之種子及球莖中所抽出之一種植物鹼（alkaloid），其分子式爲 $C_{22}H_{25}NO_6$，呈黃色粉末或結晶狀，爲強苦味之有毒物質，其主要生化學作用爲抑制分裂中細胞之紡錘絲與細胞膜形成，但對染色體之分裂毫無影響[2,22,30]。一般處理的方法有浸漬法、點滴法、羊毛脂法、洋菜培養基法、噴霧法及振盪培養法等[2,22]。本試驗將探討各種處理法之倍加效果及優缺點。

材料與方法

本試驗係利用蘆筍花葯來源之單倍體植株進行以下試驗：

一、以繼代培養產生之染色體自然倍加：

自溫室中選取外表型及根尖細胞鏡檢均確定爲單倍體之幼苗22株，切取基部新長出長度約2～3 mm之分蘗幼芽莖頂，培養於含有0.3 mg／l NAA、0.1 mg／l kinetin、40 mg／l adenine sulfate、170 mg／l $NaH_2PO \cdot 2H_2O$、500 mg／l malt extract及 2.5% sucroseのMurashige *et al.*(1972)蘆筍繁殖培養基上（簡稱 AM 培養基），三個月後分株繼代培養於相同培養基，如此經過五次繼代培養後，移出試管進行根尖細胞壓片鏡檢染色體數目，以統計單倍體植株之自然倍加率及調查不同來源單倍體之倍加差異性。

二・以秋水仙鹼處理之人爲染色體倍加：

㈠本試驗所有秋水仙鹼之配製均使用以下的方法：

1. 配製原液(stock solution)：將4g秋水仙鹼粉末與2ml DMSO(dimethyl sulfoxide)，0.2 mg GA和0.1 ml Tween 20充分攪伴至完全溶解後，加蒸餾水全量至100 ml，調整pH值爲5.7(此原液濃度爲含秋水仙鹼 40,000 ppm)。
2. 在配製含有秋水仙鹼之洋菜培養基時，先配置基本培養基，置於高壓殺菌釜(autoclave) 中殺菌後，在無菌操作台上冷卻至60°C以下，加入經0.45μ millipore membrane過濾之秋水仙鹼溶液 （因60°C以上可使秋水仙鹼失去生化作用），攪拌均勻後，分別盛裝於經殺菌過之容器中。

㈡秋水仙鹼之處理如下：

1. 培養基法：配製如表2含不同濃度秋水仙鹼之MS培養基（含3% sucrose），培養約2～3 mm之單倍體莖頂。一個月後，繼代培養於不含秋水仙鹼之繁殖培養基(AM)，兩個月後調查外表性狀之倍加比例及致死率。
2. 浸漬法：將5 mm長的單倍體莖頂浸漬於不同濃度秋水仙鹼溶液中，行不同時間及溫度處理（如表3,4及5），再切取1 mm莖頂培養於不含秋水仙鹼之繁殖培養基(AM)。兩個月後調查外表性狀之倍加情形及致死率。
3. 液體振盪法：切取5 mm長之單倍體莖頂，於表6所示之不同濃度秋水仙鹼溶液中行振盪培養(suspension culture),振盪速率爲150rpm,10～15天後，切取3 mm莖頂培養於不含秋水仙鹼之繁殖培養基(AM)，兩個月後調查倍加百分比。
4. 羊毛脂塗抹法：如表7將不同比例之秋水仙鹼粉末與羊毛脂(lanolin)充分拌均後，塗抹於3～4個月齡盆栽單倍體幼苗新發出之分蘗芽頂端，每日處理一次，連續六次後，調查芽體外

表膨大之倍加比例。

5. 棉花點滴法：如表8以棉花沾取不同濃度之秋水仙鹼溶液，點滴於盆栽幼苗新長出分蘗芽之頂端，每日處理一次，連續六次後，調查芽體外表膨大之倍加比例。

三、經由癒合組織誘致的染色體倍加法：

切取約2～3 mm長之單倍體莖頂，培養於含有1～2 mg／l 2,4－D或2 mg／l NAA(α－naphthaleneacetic acid) 之 MS 培養基，置於黑暗中培養，待癒合組織生成後，再繼代培養於含有 1 mg／l NAA、0.5 mg／l BA、40 mg／l adenine sulfate、170 mg／l $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 、500 mg／l malt extract 、2.5% sucrose及 MS 基本鹽類之分化培養基以誘導植物體形成。形成之植株進行外表倍數性調查以統計單倍體與二倍體之比例。

預備試驗顯示經秋水仙鹼處理後之蘆筍單倍體可呈膨大現象，此膨大組織經發根誘導進行染色體數目之鑑定，發現 80%以上之膨大體染色體均已倍加成二倍體，由於染色體鑑定費時費力，所以本試驗之調查資料，以膨大代表染色體倍加成功之比率。

結　果

一、以繼代培養產生之自然倍加：

將22株單倍體分別行莖頂培養，三個月後分株繼代培養於相同的繁殖培養基上，如此每三個月繼代培養一次，至第五次共繁殖352株試管苗。移出試管後一個月進行外表倍數性的調查及壓片鏡檢根尖細胞的染色體數目。由表1顯示在352株中有21株（6.0%）自然倍加爲二倍體，1株（0.3%）爲四倍體。不同來源單倍體植株之自然倍加率有明顯差異，如CA－202,CA－194與CA－ 210雖經數次繼代培養仍保持其單倍體的染色體數目（n＝10），但CA－192則有38.9%的自然倍加率，其他單倍體來源自然倍加率在1.4～16.7%。

二、秋水仙鹼處理的倍加效果：

1. 培養基法：表2顯示秋水仙鹼在培養基中之濃度以0.4%處理的倍加比率最高，爲41.4%，0.2%與0.8%處理次之，爲23.0% 左右。依處理濃度之降低，倍加率亦隨之下降。0.05%處理則無倍加現象。過高濃度的處理，如0.8 %、1.2%，倍加率亦呈降低的趨勢。致死率則依處理濃度的上升而有增加的現象。0.05%與0.1%處理的致死率僅1.7%，而1.2%處理的致死率則達21.1%。圖1爲花葯來源單倍體經秋水仙鹼處理後所得之染色体倍加苗。
2. 浸漬法：表 3顯示以0.05%、0.1%、0.2%及0.4% 四種秋水仙鹼濃度，浸漬4小時的倍加率在14.3～16.7%；0.4%濃度處理浸漬8小時以上的倍加率降低，尤其是浸漬12及24小時兩處理之死亡率皆達100%。高濃度如0.8%、1. 6%的秋水仙鹼處理4小時，亦有相當比例的倍加成功率各爲12.5% 與 11. 1%；所有4小時處理中除對照組、0.05及0.1% 秋水仙鹼之處理無致死外，其餘處理之致死率在1.9～22.2%之間，且處理濃度愈高，死亡率亦愈高。表4顯示，在23°C溫度條件下，所有處理的倍加率介於3.3～45.0%之間，其中以0.4%浸漬2小時之倍加率最高，達45.0%(圖2)；在處理濃度上，以0.4%之倍加率最高(平均爲24.0%)，0.2%次之(平均爲20.0%)，0.1%又次之（平均爲12.5%)，0.05% 最低 (平均爲6.7%)；在浸漬時間上，低濃度的處理如0.05%、0.1%與0.2%，以浸漬4小時的倍加率較高(分別爲10.0%, 23.3%與30.0%)，0.4% 則以浸漬2小時的倍加率最高(45.0%)。致死率則只在0.4%秋水仙鹼浸漬8小時之處理有10.0%致死外，其他處理均無致死現象。而表 5則顯示在28°C溫度條件下，所有處理的倍加成功率一般均較23°C爲低，介於 0～16.7%間；浸漬濃度則以 0.05% 的倍加率最高，濃度增高，倍加率反有降低的現象；各種濃度秋水仙鹼之浸漬時間均以2小時的處理倍加率較佳，浸漬1小時的處理均無倍加現象，而浸漬8小時者不僅倍加率降低，且致死率增高(約6.7～16.0%)。

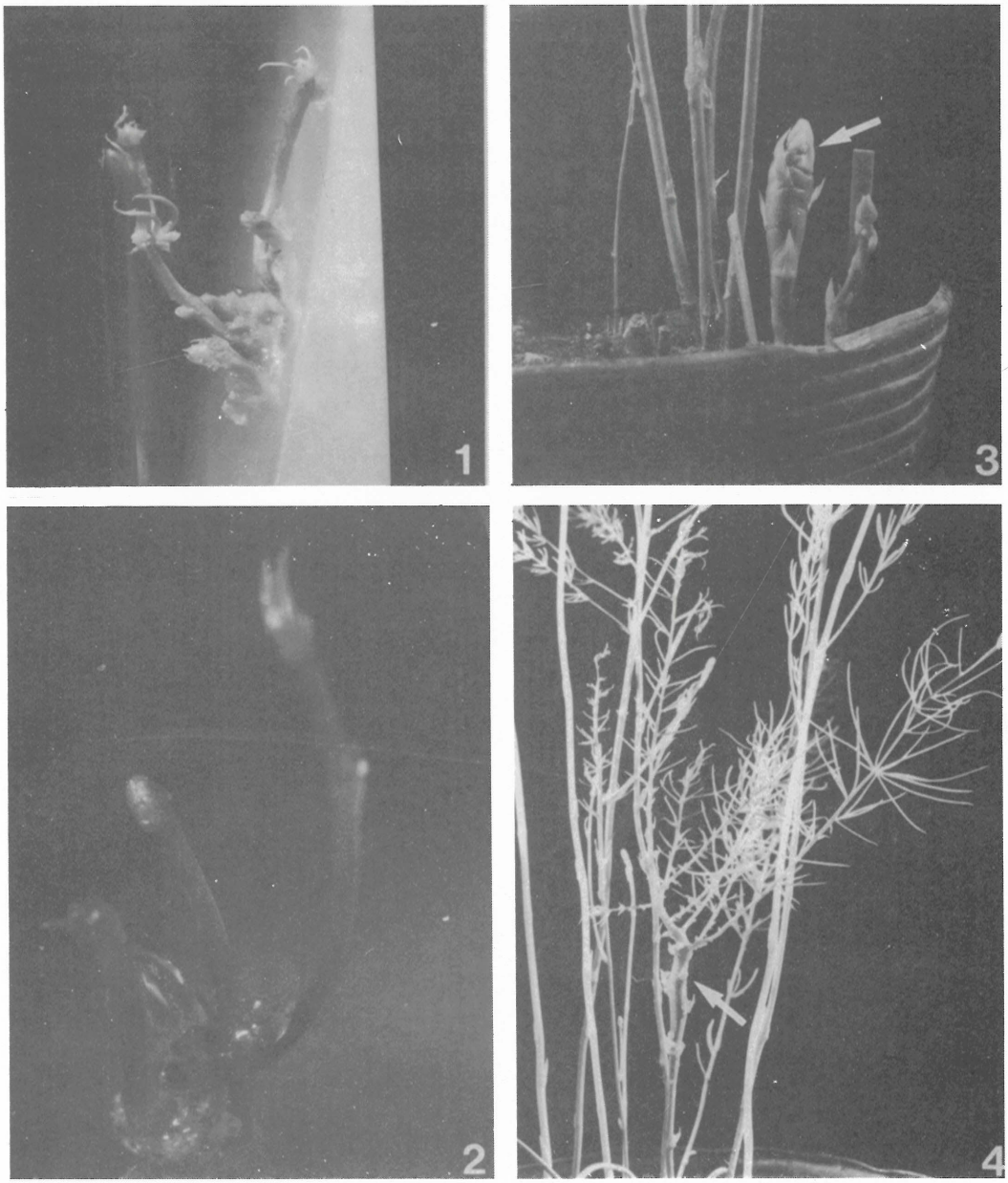


圖 1. 蘆筍單倍体芽体經以含有秋水仙鹼之培養基處理後獲得之二倍体植株。
Fig. 1. Chromosome doubled plant from haploid bud cultured in colchicine－containing medium.

圖 2. 蘆筍單倍体芽以0.4%秋水仙鹼溶液處理 2小時後，再培養於MS培養基中獲得之二倍体芽。
Fig. 2. Chromosome doubled plant from haploid bud treated by 0.4% colchicine solution for 2 hrs and cultured in MS medium.

圖 3－4. 盆栽單倍体芽以秋水仙鹼羊毛脂軟膏處理後2天（圖3）及7天（圖4）芽体膨脹情形（箭頭所指）。
Fig. 3－4. Swelled bud (arrow) was obtained from haploid spears treated by colchicine－paste for 2 days (Fig. 3) and 7 days (Fig. 4).

3. 液體振盪法：表6顯示單倍體莖頂以0.001～0.005%秋水仙鹼溶液振盪處理的倍加率在2～6%，其中以0.005%處理的倍加率較好(6%)。處理 10天及15天的倍加率差異不大，但處理15天者，有部份致死現象產生，且致死率隨秋水仙鹼濃度之增加而提高，而 10 天處理都無致死現象產生。
4. 羊毛脂塗抹法：表7顯示四種處理濃度中以1.2% 的倍加比例最佳，高達97 %，且處理 2～3次即有倍加效果。0.8%及0.4%濃度次之，倍加率均爲64.7 %，0.2%濃度之倍加率最低爲21.2%，且需處理至少 4次以後才產生倍加效果，而濃度高於 0.4%之處理，經處理第四次後倍加已達2／3以上。圖 3及圖 4爲單倍體幼苗分蘖芽，經秋水仙鹼的羊毛脂塗抹法處理2天及7天的膨大倍加情形。
5. 棉花點滴法：表8顯示以1.2% 秋水仙鹼溶液處理之倍加率最高，爲57.6%，處理次數愈多倍加之機會愈高，唯芽之死亡率亦隨之提高。0.8%濃度的處理效果次之(51.7%)，0.4%效果最低(30.3%)，且需處理3次以上才有倍加效果，處理六次之倍加效果顯然優於處理次數少者。

三、經由癒合組織誘致染色體倍加法：

表9顯示將單倍體莖頂培養於含有2 mg／l NAA或2 mg／l 2,4－D之 MS培養基，誘導癒合組織形成，再繼代培養癒合組織於分化培養基上，獲得之植株調查外表型倍數性。兩個處理以 2 mg／l 2,4－D 的倍加率較高爲12.3%，2 mg／l NAA 的倍加率爲10.5%。表10爲以2 mg／l 2,4－D處理不同單倍體來源之莖頂，再分化獲得植株倍加之比率，在7.7～50.0%之間，比1 mg／l 2,4－D處理效果介於（0～10.9%）間爲優。在所有表10之不同來源單倍體中，均有2 mg／l 2,4－D優於1 mg／l極爲一致之結果，而不同來源之單倍體亦顯現不同的倍加率。

四、超雄株之育成：

本試驗利用秋水仙鹼處理及癒合組織再生不定芽的方法，已成功的將單倍體倍加爲二倍體而育成超雄株（圖5）。超雄株之外表特性與單倍體植株稍有類似，但葉針較長、莖葉色較綠且節間較長，與一般異質二倍體亦有少許不同，如開芒較多、葉針較長且開展性強，及幼年植株呈叢生狀等特性。

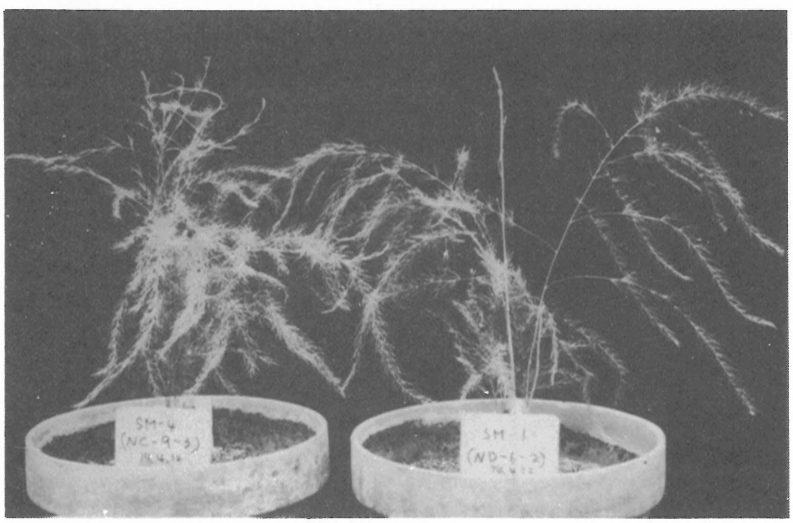


圖 5. 染色體倍加成功之蘆筍超雄株已供雜交組合力核定及生產全雄種子之用。

Fig. 5. Supermale plants are selected for combining ability test and all－male seeds production.

討　論

一般花葯培養所得之單倍體具不稔實且生長勢較弱之特質。若要廣泛應用於育種上，使染色體倍加成同質二倍體乃爲必須之過程。倍加染色體的方法可分爲自然倍加及人爲倍加兩種[2,22]。自然倍加多由於核內有絲分裂（endomitosis）或核融合（nuclear fusion）所導致，可藉多次繼代培養以促進，但因屬偶發性的，故產生比率不穩定[2,9,26]。本試驗顯示蘆筍單倍體經五次繼代培養自然倍加成二倍體的比率爲5.7%，不同來源單倍體之自然倍加率有明顯的差異。如CA－192達38.9%、CA－223 爲16.7%，而CA－202、CA－194 及CA－210等單倍体植株則無倍加的現象（表1）。

表 1. 蘆筍單倍体經5次繼代培養後植株之染色体倍數性

Table 1. The ploidy level in some representative anther－ derived haploids of asparagus plants after five successive subculture

Source of haploids	No. of plants	Ploidy level of plants		
		N	2N	4N
CA－192	36	22	14(38.9)*	0
CA－194	12	12	0	0
CA－197	18	17	1(5.6)	0
CA－202	24	24	0	0
CA－208	28	26	2(7.1)	0
CA－210	12	12	0	0
CA－223	6	5	1(16.7)	0
CA－224	216	212	3(1.4)	1(0.5)
Total	352	330	21(6.0)	1(0.3)

* ( ):percentage.

秋水仙鹼對分裂中的細胞，有抑制紡錘絲及細胞壁形成的效果，因此可使染色體數目倍加[2,5,22,30]。一般處理的方法有浸漬法[2,6,15,28,29]、羊毛脂塗抹法[2]、點滴法[2,24]、培養基法[2,8,14]、噴霧法[2]、液體振盪法[4,15,18]、及兩界面法[8]等。Braak報導以1.6%秋水仙鹼溶液使用浸漬法（soaking method）與滲透法（infiltration method）處理二倍體種子，可得到60%的四倍體，而以0.2%溶液處理僅有極少數的四倍體產生[6]。Goldy and Lyrene 使用液體振盪法處理藍莓（blueberry）的扦插苗[15]；Heinz and Mee 進行甘蔗的細胞培養[18]；Chavade and Becker 使用培養基法處理 *Valeriana wallichii* DC的扦插苗[8]；Perry and Lyrene 以浸漬法處理 *Vaccinium* spp. 的營養体（包括許多芽體）均顯示有染色體倍加的現象，且有少數異數體的出現[28]。本研究顯示秋水仙鹼的處理方法，對倍加染色體具有明顯不同的效果，其中以羊毛脂塗抹法的倍加效果最高，芽體膨脹率約在21.2～97.0平均達 61.9%（表7）；棉花點滴法之倍加率次之，在30.3～57.6%之間平均達46.3%（表8）；培養基法之誘導倍加率介於 0～41.4%（表2）之間；浸漬法倍加率則在 0～45%間（表 3,4,5）；而以液體振盪法最低，僅2～6%（表6）。本研究的結果得知，在試管外植物體上的處理效果較試管內倍加率佳；而試管外之處理，秋水仙鹼濃度較高者（如1.2%)的倍加率較佳，且處理次數少即可產生倍加效果（表7,8）。試管內處理則以較低濃度(如0.2%及0.4%)短時間的效果較佳，所有試管內處理

以含0.4%秋水仙鹼之培養基法(倍加率爲41.4%)及 0.4%秋水仙鹼2小時之浸漬法(倍加率爲45%)兩處理倍加率最高，濃度過高(如 0.8%)常有生長受抑制或致死現象 (表2,4) 。秋水仙鹼的處理效果不甚穩定，易受外界環境因子的影響，如浸漬法在23°C時倍加率爲3.3～45.0%，但在28°C時僅0～16.7%，且致死率大幅提高 (表4,5) 。

表 2. 含有秋水仙鹼之培養基對蘆筍單倍体染色体倍加之效果(CA－224)

Table 2. The effect of colchicine containing medium on the formation of swelling bud of anther－derived haploid asparagus plants(CA－224)*

Conc. of colchicine in MS medium	No. of bud cultured	Swelled bud		Dead bud	
		No.	－ % －	No.	－ % －
－ %－					
0	60	0	0	0	0
0.05	60	0	0	1	1.7
0.1	60	3	5.0	1	1.7
0.15	60	11	18.3	4	6.7
0.2	60	14	23.3	6	10.0
0.4	29	12	41.4	3	10.4
0.8	13	3	23.1	2	15.4
1.2	57	9	15.8	12	21.1

* Buds were cultured on colchicine containing medium for one month.

表 3. 秋水仙鹼處理5mm莖頂對蘆筍單倍体染色体倍加之效果(CA－224)

Table 3. The effect of in vitro colchicine solution on the formation of swelling bud of anther－derived haploid asparagus plants(CA－224)*

Conc. of colchicine － % －	Time duration (hr)	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud	
			No.	－ % －	No.	－ % －
0	0	30	0	0	0	0
0.05	4	7	1	14.3	0	0
0.1	4	7	1	14.3	0	0
0.2	4	52	8	15.4	1	1.9
0.4	4	18	3	16.7	1	5.5
0.4	8	11	1	9.1	2	18.2
0.4	12	21	0	0	21	100.0
0.4	24	14	0	0	14	100.0
0.8	4	8	1	12.5	1	12.5
1.6	4	9	1	11.1	2	22.2

* 5 mm buds were dipped in colchicine solution for 0－24 hrs,
1 mm buds were then dissected and cultured in AM medium.

表 4. 23°C下不同秋水仙鹼濃度及浸漬時間對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果(CA－224)

Table 4. Effect of colchicine concentration and immersed duration on formation of swelling bud in shoot tip of haploid asparagus plants (CA－224) at 23°C*

Conc. of colchicine －%－	Time duration (hr)	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud	
			No.	－%－	No.	－%－
0.05	1	30	2	6.7	0	0
	2	30	2	6.7	0	0
	4	30	3	10.0	0	0
	8	30	1	3.3	0	0
Total and average		120	8	6.7		
0.1	1	30	2	6.7	0	0
	2	30	3	10.0	0	0
	4	30	7	23.3	0	0
	8	30	3	10.0	0	0
Total and average		120	15	12.5		
0.2	1	30	5	16.7	0	0
	2	30	6	20.0	0	0
	4	30	9	30.0	0	0
	8	30	4	13.3	0	0
Total and average		120	24	20.0		
0.4	1	30	6	20.0	0	0
	2	20	9	45.0	0	0
	4	45	10	22.2	0	0
	8	30	5	16.7	3	10.0
Total and average		125	30	24.0		

* 5 mm buds were dipped in colchicine solution for 1－8 hrs, 1 mm buds were then dissected and cultured in AM medium.

表 5. 28°C下不同秋水仙鹼濃度及浸漬時間對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果 (CA－224)

Table 5. Effect of colchicine concentration and immersed duration on formation of swelling bud in shoot tip of haploid asparagus plants (CA－224) at 28°C*

Conc. of colchicine －%－	Time duration (hr)	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud	
			No.	－%－	No.	－%－
0.05	1	30	0	0	0	0
	2	30	3	10.0	0	0
	4	30	5	16.7	2	6.7
	8	35	1	2.9	3	8.6
Total and average		125	9	7.2		
0.1	1	30	0	0	0	0
	2	30	2	6.7	0	0
	4	30	2	6.7	0	0
	8	45	0	0	5	11.1
Total and average		125	4	3.2		
0.2	1	30	0	0	0	0
	2	30	1	3.3	0	0
	4	30	1	3.3	0	0
	8	35	0	0	0	0
Total and average		125	2	1.6		
0.4	1	30	0	0	0	6.7
	2	30	1	3.3	2	6.7
	4	30	0	0	3	10.0
	8	50	0	0	8	16.0
Total and average		140	1	0.7		

* 5 mm buds were dipped in colchicine solution for 1－8 hrs, 1 mm buds were then dissected and cultured in AM medium.

表 6. 不同秋水仙鹼濃度之振盪處理對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果(CA－224)

Table 6. Effect of colchicine concentration and treatment duration on the formation of swelling bud in shoot tip suspension culture of anther-derived haploid asparagus plants(CA-224)*

Conc. of colchicine －%－	Time duration (hr)	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud	
			No.	－%－	No.	－%－
0.001	10	50	1	2	0	0
	15	50	2	4	0	0
0.002	10	50	2	4	0	0
	15	50	1	2	2	4
0.003	10	50	1	2	0	0
	15	50	1	2	4	8
0.004	10	50	3	6	0	0
	15	50	1	2	9	18
0.005	10	50	3	6	0	0
	15	50	3	6	10	20

* 5 mm buds were dipped in colchicine solution for 1－8 hrs, 3 mm buds were then dissected and cultured in AM medium.

表 7. 秋水仙鹼羊毛脂塗抹法對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果(CA－224)

Table 7. The effect of in vivo colchicine－paste treatment on the formation of swelling bud of anther－derived haploid asparagus plants(CA－224)*

Conc. of colchicine －%－	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud		No. of buds swelled after 1－6 treatments					
		No.	－%－	No.	－%－	1	2	3	4	5	6
0.2	33	7	21.2	4	12.1	0	0	0	2	3	2
0.4	34	22	64.7	0	0	3	2	9	3	3	2
0.8	34	22	64.7	1	2.9	1	7	4	3	1	6
1.2	33	32	97.0	1	3.0	0	7	10	9	4	2
Total and average	134	83	61.9	6	4.5						

* Lanolin with colchicine was placed on the shoot tip of haploid buds.

表 8. 秋水仙鹼棉花點滴法對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果(CA－224)

Table 8. The effect of in vivo colchicine solution treatment on the formation of swelling bud of anther－derived haploid asparagus plants(CA－224)*

Conc. of colchicine －%－	No. of bud treated	Swelled bud		Dead bud		No. of buds swelled after 1－6 treatments					
		No.	－%－	No.	－%－	1	2	3	4	5	6
0.4	33	10	30.3	3	9.1	0	0	3	1	1	5
0.8	29	15	51.7	0	0	0	4	3	5	0	3
1.2	33	19	57.6	5	15.2	1	2	5	3	4	4
Total and average	95	44	46.3	8	8.4						

* Cotton with colchicine solution was placed on the shoot tip of haploid buds.

利用秋水仙鹼進行染色體倍加處理過程中，常會產生以下三種現象：

1. 多倍體的產生：Espino and Vaequez曾指出由於秋水仙鹼的基本作用爲產生多核細胞(polynucleate cells)，而核的融合會導致多倍數核 (polyploid nuclei)之形成[14]。Broerties研究指出秋水仙鹼的處理濃度愈高或處理時間愈長，多倍體形成的機會愈大，而幼小植株的成活率因而降低[7]。本試驗經秋水仙鹼處理所產生的植株經根尖染色體壓片檢定，僅有極少數多倍體產生（<1%），所得資料尙不足以顯示處理時間長短與處理濃度高低影響多倍體發生之關係。

2. 混雜體、異數體及細胞嵌合體的出現：Espino and Vaequez以秋水仙鹼處理 *Saintpaulia ionantha* 之單倍體得到9%的細胞嵌合體[14]。而 Broerties則得到 1～2%的混雜體，而此類混雜體可藉細胞壓片技術在分裂細胞中鏡檢出染色體數目的變異[7]。混雜體產生的原因，Espino and Vaequez認爲有二，（1）秋水仙鹼無法使所有細胞進行正常分裂。（2）植株的所有細胞分裂並非同時進行，故有些細胞分裂時未受到秋水仙鹼的作用，而其他相鄰細胞分裂時卻受影響導致不同的染色體數目，形成的植株則爲細胞嵌合體[14]。本試驗秋水仙鹼處理後之植株約有 0.5%爲混雜體，亦有約1%的鑲嵌（mosaic）現象，其中包括單倍體與二倍體的嵌合體，二倍體與四倍體的嵌合體。

3. 處理部位產生畸形、壞疽、腐爛或生長受抑制的現象：所有處理方法中以羊毛脂塗抹法與棉花點滴法發生畸形的比例最多（約5%左右）。有時雖見處理部位膨大，但經過一段時間後腐爛壞疽，其原因可能爲溫室高溫多溼的環境所致，此種情形有待移入較冷涼環境，或在已有倍加現象時立刻切取膨大芽尖進行莖頂培養予以克服。Espino and Vaequez 曾提及在培養基中加入0.01～0.02%之秋水仙鹼，培植體即有明顯的壞疽腐爛現象[14]。本試驗之培養基法雖無此種現象，但卻有抑制生長發育甚至致死的情形。這種生長受抑制的現象可藉移植至無秋水仙鹼之繁植培養基予以克服。

許多報告指出植物體之分生組織培養，由其癒合組織誘導再生之不定芽，可獲得多元體，且此多元體大部分屬同質多元體[2,7,23,25]。因此將植物的分生組織培養於含有auxin類生長素，如IAA、NAA、IBA、2,4－D 或其他purine類的培養基中，可完全轉變爲快速增殖而不分化之細胞團（即癒合組織），若調整適當之細胞分裂激素或植物生長素的濃度，則可大量誘致癒合組織之增殖擴大[2,27]，尤其是2,4－D 對癒合組織之誘導及增殖具有很大的效果，故最常被使用[7]；而且 2,4－D可使癒合組織發生細胞學上之改變，在生長進行中，使原爲二倍體之細胞發展爲多倍體[25,27]。本試驗利用此種原理，將單倍體莖頂培養於含有2,4 －D之培養基以誘導出癒合組織後，再繼代培養於分化培養基上，可得6.7～50.0%倍加率（表9,10）。在不同來源單倍體上顯示出利用此法之倍加效果，較秋水仙鹼法穩定，且處理後分化之植株較容易發根，可同時解決蘆筍在試管中不易發根之困難，這似乎與培養基中auxin類生長素濃度提高有關。

表 9. 誘導癒合組織再生法對蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果 (CA－244)

Table 9. The effect of callus induction media on the formation of swelling bud of anther－derived haploid asparagus plants(CA－244)*

Media	No. of bud treated	Swelled bud	
		No.	－ % －
MS + 2 mg／l NAA	57	6	10.5
MS + 2 mg／l 2,4－D	65	8	12.3

* The shoot tip of haploid were cultured on the treatment media for callus induction, the induced callus were then transferred to differentiation medium for plant regeneration.

表 10. 2,4－D 對不同來源蘆筍單倍体莖頂染色体倍加之效果

Table 10. Influence of 2,4－D on the chromome ploidy of differentiated plants from shoot tip culture of haploid asparagus plants

Haploids	Conc. of 2,4－D (mg／l)	No. of bud treated	Swelled bud	
			No.	－ % －
CA－192	1	38	0	0
	2	102	19	18.6
CA－193	1	20	1	5.0
	2	13	1	7.7
CA－194	1	150	12	8.0
	2	177	46	26.0
CA－197	1	60	3	5.0
	2	33	10	30.3
CA－199	1	20	0	0
	2	26	3	11.5
CA－201	1	31	2	6.5
	2	40	10	25.0
CA－202	1	60	6	10.0
	2	86	29	33.7
CA－208	1	40	4	10.0
	2	28	14	50.0
CA－210	1	46	5	10.9
	2	50	18	36.0
CA－223	1	28	0	0
	2	60	5	8.3
CA－224	1	64	1	1.6
	2	29	4	13.8

引用文獻

1. 洪立。1975。蘆筍之育種。台灣農業研究中心專刊第6號 pp. 151～176。
2. 盧守耕。1961。現代作物育種學。第十九章：誘致多元體與作物育種。第二十章：誘變育種。國立台灣大學農學院叢書第十號 pp.255～302。
3. 蔡新聲。1986。禾本科作物之花葯培養與品種改良。中華農學會報 134：1～ 23。
4. Bayliss, M.W. 1976. Variation of cell cycle duration within suspension cultures of *Daucus carota* and it's consequence for the induction of ploidy changes with colchicine. Protoplasma 88:279－ 285.
5. Blakeslee, A.F. and A.G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosome in plants by treatment with colchicine. J. Hered. 28:393－411.
6. Braak, J.P. and A.E. Zeilinga. 1957. Production of a colchicine－induced tetraploid asparagus. Euphytica 6:201－212.
7. Broerties, C. 1974. Production of polyploids by the adventitious bud technique. IAEA.－PE－503／6. Polyploid and induced mutations in plant breeding. Vienna. 1974. pp. 29－34.
8. Chavade, J.S. and H. Becker. 1984. Influence of colchicine treatment on chromosome number and growth rate of tissue cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Cell Tissue Organ Culture 3:265 － 272.
9. Collins, J.L. and K.R. Kerns. 1938. Mutations in the pineapple. J. Hered. 29:163－172.
10. Corriols－Thevenin, L. 1979. Different methods in asparagus breeding. In:Eucarpia, 5th Asparagus Symposium, under the Auspices of the Hassian Minister of Agriculture. pp. 8－20. Geisenheim Forschungsanstalt, Federal Republic of Germany.
11. Dore, C. 1974. Production de plantes homozygotes males et femelles a partir d'antheres d'anthge, cultivees *in vitro* (*Asparagus officinalis* L.). C.R. Acad. Sci. 278:2135－2138.
12. Dore, C. 1977. *In vitro* techniques as an efficient tool in asparagus breeding. Acta Horti. 78:89－93.

13. Dore, C. 1979. Anther culture as a way towards F_1 hybrids. In: Eucarpia, 5th Asparagus Symposium, under the Auspices of the Hassian Minister of Agriculture. pp. 87−90. Geisenheim fors−chungsanstalt, Federal Republic of Germany.
14. Espino, E.J. and A.M. Vaequez. 1981. Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regene rated from leaves cultured *in vitro* with caffeine and colchicine. Euphytica 30:847−853.
15. Goldy, R.G. and P.M. Lyrene. 1984. *In vitro* colchicine treatment of 4X blueberries, *Vaccinium* sp. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 336−338.
16. Haigh, J.C. 1960. All−male asparagus. New Scientist 7:389−391.
17. Haigh, J.C. 1963. The production of all male asparagus. In:13th Annual Report of the National Vegetable Research Station, Wellesbourne, Warwick, U. K. 1962. pp. 26−29.
18. Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1970. Colchicine induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. Crop Sci. 10:696− 699.
19. Hondelmann, W. and B. Wilberg. 1973. Breeding all−male varieties of asparagus by utilization of anther − and tissue−culture. S. Pflanzenzuctg. 69:19−24.
20. Hugskes, J.A. 1959. Breeding an all−male varieties of asparagus: Problem and possibilities. European Assoc. Res. Plant breeding Rpt. Cong. 2:188.
21. Hung, L. 1979. Feasibility of selected all−male seedling planting method of asparagus in Taiwan. J. Chinese Soc. Horti. Sci. 25: 155−163.
22. Jensen, C.J. 1974. Chromosome doubling techniques in haploids. In:Haploids in Higher Plants:Advances and Potentials. (ed. by K.J. Kasha) pp. 153−190. Univ. of Guelph, Guelph, Canada.
23. Karp, A., R. Risiorr, M.F.K. Jones and S.W.J. Brirht. 1984. Chromosome doubling in monohaploid and diploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. Plant Cell Tissue Organ Culture 3: 363−373.
24. Langton, F.A. and H. Ross. 1982. The effects of colchicine doubling of potato dihaploid x wild species on eelworm resistance and pollen "Stainability". Pototo Res. 25:257−263.
25. Malnassy, P. and J.E. Ellison. 1970. Asparagus tetraploids from callus tissue. Hortsci. 5:444−445.
26. Miller, J.C. 1954. Selection of desirable somatic mutations. A means of potato improvement. Am. Potato J. 31:358−359.
27. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. In:Applied and fundamental aspacts of plant cell, tissue and organ culture. (ed. by J. Reinert and Y.P.S. Bajaj) pp. 179−180. Spriger−Verlag, Berlin, Heidelberg.
28. Perry, J.L. and P.M. Lyrene. 1984. *In vitro* induction of tetraploidy in *Vaccinium darrowi, V. elliottii* and *V. darrowi* x *V. illiottii* with colchicine treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:4−6.
29. Ross, R.W., L.A. Dionne and R.W. Hougas. 1967. Doubling the chromosome number of selected *Solanum* genotype. European Potato J. 10:37−52.
30. Stecher, P.G. 1968. The Merck index. (An Encyclopedia of Chemical and Drugs) 8th edition, Merck Co. Inc. p. 278.
31. Tsay, H.S., P.C. Lai, L.J. Chen and N.C. Chi. 1981. The development of haploid plants of *Asparagus officinalis* L. through anther culture. In:Crop Improvement Research. (ed. by T.C. Yap, K.M. Grahan and J. Sukaimi) pp. 313−324. Proc. of the 4th Intl. SABRAO Congress, Kuala Lumpus, Malaysia.
32. Tsay, H.S., P.C. Lai and L.J. Chen. 1982. Breeding for all−male plants through tissue culture in asparagus. In:Plant Breeding. (ed. by S.C. Hsieh and D.J. Liu) pp. 201−208. Proc. of a Symp. on Plant Breeding. Agricultural Association of China.
33. Tsay, H.S. 1983. The breeding of all−male asparagus plants by means of tissue culture. Technical Bull. 72:1−15. Food and Feritlizer Technology Center, ASPEC. Taipei, Taiwan, ROC.

Breeding for All−Male Plants through Anther Culture in Asparagus II. Chromosome Doubling Techniques of Anther−Derived Haploid Plants[1]

J. Y. Hsu[2], P. C. Lai[3], C. C. Yeh[2] and H. S. Tsay[4]

Summary

The purpose of this experiment was to study various chromosome doubling techniques in order to obtain homozygous male and female asparagus plants from anther cultured haploids. Supermales have been successfully obtained through the following techniques:

1. Spontaneous doubling: Haploids were spontaneously doubled at a rate of 6.0 % through five times of subculturing the shoot tip meristem.

2. Colchicine treatment: Doubling ratio of 21.2−97.0% could be obtained from colchicine treatment on shoot tips of seedlings by means of lanolin method and spotting method *in vivo*. 1.2% colchicine−lanolin treatment for 6 times had the best doubling effect (97%) among all of treatments. *In vitro*, both colchicine containing medium method and colchicine solution soaking method resulted in better doubling rate than colchicine suspension method did. The best methods were 0.4% colchicine containing medium and/or soaking at 0.4% colchicine solution for 2 hr. However, the chromosome doubling effect was not stable. The incidence of polyploids, aneuploids, mixaploids and cytochimeras was low in all treatments.

3. Callus derived haploids: The shoot tip meristem of haploid was cultured in MS basal medium containing 2 mg/l 2,4−D to induce callus formation upon culturing in differentiate medium, the plantlets derived from the shoot tip−callus were homozygous diploids at a proportion of 7.7−50.0%. The doubling effect was more stable than that from colchicine treatment. Moreover, rooting was much easier for these diploid plantlets in tubes.

Key Words : Asparagus, Anther culture, All-male breeding, Chromosome doubling.

---

1. Contribution No. 1556 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant from Council of Agriculture, Republic of China.

2. 3.4 Research Assistants, former Agronomist (The President of Taida Orchid Nursery,Currently), and Senior Agronomist, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 413, ROC.