中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 49(4): 48～55 (2000)

油桃早期胚培養之研究[1]

溫英杰　吳雅婷[2]

摘要：爲了育成早熟油桃(*Prunus persica* var. necturina Maxim.)品種，以避開低海拔地區果實蠅高峰期，本計畫以具有果實發育日數短的桃及油桃爲育種親本，並用胚培養方式培養在自然狀態下無法萌芽生長的未成熟胚。試驗結果顯示，特早熟油桃的胚在果實軟化時呈嚴重退化，胚培養的適當時期爲果實硬熟期。以MS培養基培養早熟和特早熟桃及油桃的雜交胚獲得74%的成苗率，較培養在NN培養基的13%及SH培養基的10%爲佳。添加1mg/l BA +1mg/l IAA與1mg/l BA +1mg/l IBA較單獨添加或其他生長調節物質之組合爲佳，但與對照比較並無顯著差異。未經低溫處理的雜交胚，萌芽率低且芽體呈簇生狀，無法發育成正常小苗。而經4℃的低溫處理的雜交胚，1-2個月後即陸續長出胚根，可發育成正常小苗。經健化處理出瓶後成活率仍低，爲尚待解決之問題。

關鍵詞：油桃、胚培養、早熟。

前　言

油桃(*Prunus persica* var. necturina Maxim.)爲桃(*Prunus persica* Maxim.)之隱性突變而來，果實表皮呈光滑無毛而得名[6]。果實表皮沒有茸毛，在採後處理及食用上都較簡便，而且油桃果實裡之糖及酸含量皆較桃爲高[3,5,10,23]，風味好，香氣強，著色亦佳，在國外甚受消費者的喜愛。本省每年自美國加州及南半球等地進口80萬箱油桃，市值超過四億台幣，以玫瑰桃爲名販售，亦受國人好評，足証此一新的水果能爲國內消費者接受。

油桃與桃都是不耐貯藏的果實，決定果實風味的糖及酸含量在成熟前二星期才迅速累積[7]，由國外進口的油桃因需長途運輸，必須在6～7分熟採摘，本省油桃可在8～9分熟採摘供售，品質上可望優於舶來品，未來加入WTO後在全面開放的市場中，可以以品質取勝。

本省高海拔地區可供農耕的和緩坡地有限，在生態保育觀念日益被重視的今天，高海拔地區農業活動的空間日益趨狹，因此在國科會經費支持下於1996與1997連續兩年調查本試驗所羅娜果樹種原保存園27個油桃品種之種質資源特性，選出'Sunblaze'，5-40N及90-50CN等三個優良品系，其並適合台灣平地種植爲低海拔地區農友提供一個新的作物供其選擇栽培[1]。

本省近十年來果實蠅密度一直居高不下，導致農藥使用量增加，直接危害廣大消費者的健康並且增加農民生產成本(農藥、網室或套袋)。依據歷年來的經驗，台灣中部平地在五月之前，果實蠅的密度甚低，不用施藥或套袋而可收獲果實。因此育成低需冷性且果實發育日數短的油桃品種，將可收獲到不用農藥的清潔水果，並且降低農民栽培成本。四月底前收獲的水果，正值本省早春的果歉期，水果一向高價，可謂一舉數得。

1.行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2044號。

2.本所作物種原室副研究員及約聘助理。台灣省　台中縣　霧峰鄉。

台灣平地在四月之前成熟的油桃品種，必須具有兩個要件：1.低溫需求量在250小時以下。2.果實發育日數需短於80天。Hammerschlag等人[4]的試驗結果顯示，胚的成熟度影響體外培養器官形成的潛能、時間與形態正常與否，開花後125天(PF_1=100)之胚具有成熟形態雙極性，體外培養萌發成小植株百分率高，而花後56天或70天(PF_1爲30或70)之未成熟胚，則發芽率低且易產生畸型小植株。Mowery等人[11]的研究結果指出授粉後110天內採收的桃種子，發芽率低於50%，90天內則胚皆未發育完全，需以胚培養才能獲得雜交後代。Lesley及Bonner[9]認爲早熟桃的果實發育期(FDP)若小於75天，其胚太小不易由濕冷層積獲得苗木。

本試驗依據低需冷性油桃種原評估結果，選擇具有短發育日數及低溫需求量在250小時以下的品種作爲育種親本進行雜交，再利用胚培養培育技術，以期挽救雜交胚並培育成雜交苗。

材料與方法

一、試驗材料

由農試所羅娜種原保存園保存過去育種所得及由世界各地收集而來之油桃及桃種原中選擇具有1.低溫需求量少，2.果實發育期短之條件者作爲雜交親本。參試親本品種(系)特性詳如表1。

表1. 試驗所用桃及油桃品種特性

Table 1. The characteristics of peaches and nectarines used in this experiment

Cultivars	Estimated chill unit	FDP[z] (days.)	Fruit size(g)	Flesh[y] color
Flordaprince	150	70	85.2 ± 7.2	Y
5-40N	150	90	93.3 ± 10.3	W
Sunblaze	250	90	80.8 ± 12.1	Y
90-50CN	200	88	93.0 ± 8.8	Y
Armking	500	68	94.1 ± 6.7	Y
Armking Precoce	475	65	82.0 ± 15.4	Y
82-25N	50	120	77.5 ± 7.5	Y

[z] Time from 50% bloom to first commerical harvest maturation.

[y] Y=yellow，W=white.

二 試驗方法

(一)雜交授粉

按雜交計畫所需，採集父本預定於次晨開放之花蕾，將花藥取出後鋪放在培養皿中，置於25℃之恆溫箱讓花藥開裂，收集花粉置於硫酸紙袋內，裝入含乾燥劑之玻璃瓶中，放在-20℃中貯藏。雜交授粉於信義鄉羅娜村果樹種原保存園進行，授粉後按正常管理程序讓果實成熟至8分熟採摘。

(二)胚培養

果實去除果肉後，將果核清洗並稍陰乾，移入無菌操作台用95%酒精稍加浸洗後燃燒滅菌。種胚去除種皮後置於不同培養基中，觀察其生長發育情形。培養基採用MS[12]、NN[13]、SH[19]等三種基本配方，添加3%蔗糖，0.7%洋菜及不同組合之auxin(IAA, NAA, IBA, 2,4-D)、cytokinin(BA, Kinetin, Zeatin)、GA等完整配方(詳如表2)，pH調至5.7，每處理接種4～6個胚。

(三)培養環境

接種於培養基之胚分別置放在4° 及25℃之黑暗環境中，待胚根長出後移至25℃光照環境下培養，二個月後調查幼苗生育情形及成活率。成活率以胚根與胚軸伸長1公分以上並具有葉片的胚數佔

表2. 油桃胚培養培養基代號及添加成分

Table 2. Combinations of plant growth regulators in different medium used in this experiment

Medium \ PGR (mg/l)	BA	IBA	NAA	IAA	Kinetin	2,4-D	GA	Zeatin
MS								
MS1G							1	
MS2G							2	
MS5G							5	
MS2B2G	2						2	
MSG0	1		0.1					0.05
MSG1	1		0.1				0.1	0.05
MSG2	1		0.1				1	0.05
MS1B1A	1			1				
MS1B1I	1	1						
MS1A1K	1				1			
MS1I1A		1						
MSI. B. K.	0.1	0.1		1	0.1			
MS1D1B	1					1		
MS2BN.05	2		0.05					
MS4D2K					2	4		
MSB.52D	0.5					2		
NN								
NN1B	1							
NN1B1I	1	1						
NN1B1A	1			1				
SH								
SH1B1I	1	1						

MS(Murashige and Skoog, 1962)

NN(Nitsch and Nitsch, 1969)

SH(Steward and Hsu, 1972)

接種後不發霉胚數的百分率計算。

(四)健化

試管苗生長至具5～7片本葉時，移至室內窗前接受間接光照射3天後打開鋁箔紙繼續馴化3天，每天添加2～3滴蒸餾水以避免植株失水。瓶苗出瓶後以蒸餾水充分清洗根部；並以億力殺菌劑浸泡30分鐘後，再植於以2份消毒土壤，2份蛭石，1份泥炭土所配成的培養土中培育。

結果與討論

一、胚之發育與取樣時期

作爲母本的4個品種(系)中，'Armking'及'Armking Precoce'的胚在硬熟期達到最大，但PF_1(種子充實度指標=胚長／種子長x100％)只有60左右，在採取105個達軟熟期的雜交果實，發現所有胚均已敗育或腐爛，說明此二品種之胚並未隨果實的成熟繼續增長。'Flordaprince'的胚在硬熟時已完全充實(PF_1=100)，種皮仍呈白色，軟熟時胚之鮮重增加，但種皮仍維持白色，此未成熟的種子很難利用溼冷層積法萌發成苗。作爲對照的82-25N，果實發育期爲120天，花後100天時種子充實度已達100，種皮呈白色，硬熟時種皮呈黃褐色，軟熟時胚不退化或腐爛。

有關胚培養之研究，起源甚早。Tukey[22]在60幾年前就建議培養發育到最大形狀的胚，方可得到最佳結果。Theobald與Hough[20]的試驗結果指出培養開花後75-85天的胚，可以得到最佳存活率。PF_1

愈大的胚其培養效果愈好[8,16]，因此選取早熟品種中，胚發育較快的品種，有助於胚培養成功[2,15,17]。'Armking'及'Armking Precoce'的果實發育日數特別短，分別爲68及65天，但硬熟時平均胚長可達0.92公分及0.93公分(表3)，此說明在短FDP品種中挑選胚發育迅速的品種是可能的，從而可以降低其在試管培養時的困難度。

表3. 桃及油桃雜交胚之發育特性

Table 3. The average embryo length in different cross combination of nectarines and peaches

Embryo length(cm) / Parents(♀×♂)	Avg. of embryo length (cm)		
	Embryo length	Seed length	Embryo length /seed length
'Armking'× 90-50CN	0.89 ± 1.08	1.61 ± 0.57	0.55
'Armking'×'Sunblaze'	0.94 ± 1.02	1.62 ± 0.57	0.58
'Armking Precoce'× 90-50CN	0.88 ± 1.09	1.41 ± 0.66	0.64
'Armking Precoce'×'Sunblaze'	0.97 ± 0.98	1.67 ± 0.55	0.58
'Flordaprince'×'Flordagold'	1.21 ± 0.85	1.21 ± 0.85	1.00
'Flordaprince'× 5-40N	1.12 ± 0.80	1.12 ± 0.80	1.00

特早熟桃胚的退化與果實軟化和老化有關，可能成熟的果皮與發育中的胚存在著某種競爭，當果皮開始軟化時，24小時內胚將引起迅速的退化；也可能是與包圍胚的不利環境條件有關[21,24]。本試驗觀察到'Armking'及'Armking Precoce'在果實成熟時，引起發育中的胚退化的情形，但對胚已發育到一定程度的早熟品種如'Flordaprince'，則不會有胚退化的現象。

二、胚培養對不同培養基之反應

胚培養參試MS，SH及NN爲基本培養基，並添加不同濃度之生長調節物質，以比較其對裸胚發芽及生長之影響。由表四結果顯示，在所有試驗之培養基中以不添加任何生長素之MS培養基對'Armking Precoce' x 90-50CN或以'Sunblaze' 爲父本之雜交胚的發育效果較好，成活率達74％，於NN及SH培養基中之成活率分別只有13％及10％。添加不同濃度的GA, 2,4-D, Zeatin於任何基本培養基中，則使胚之生長完全停止，而導致死亡(資料未顯示)。

表4. 培養基組成分對油桃雜交種胚培養成活率(%)的影響

Table 4. Effects of different combination of plant growth regulators on the survival ratio of immature embryos of 2 nectarine hybrids

Survival ratio(%) / Medium	'Armking Precoce' × 90-50CN	'Armking Precoce' × 'Sunblaze'	Avg.
MS	80	67	74
MS1B	25	25	25
MS1B1A	67	67	67
NN	0	25	13
NN1B	0	25	13
NN1B1A	20	33	27
SH	20	0	10
SH1B1A	33	0	17

單獨添加BA或IAA或同時添加BA與IAA於MS基本培養基皆未能提升'Armking Precoce'雜交胚的成活率，但同時添加BA及IAA之效果較單獨添加BA效果佳。單獨添加BA於NN基本培養基上未能提高'Armking Precoce'雜交胚之成活率，但同時添加BA及IAA於NN培養基中，則成活率提升一倍。

同時添加BA及IAA於SH基本培養基上亦可改善'Armking Precoce'雜交胚之成活率。

Scozzoli and Pasini[18]採用MS培養基添加0.5 mg/l BA，培養桃的未成熟胚，Hammerschlog等人[4]以MS培養基添加1mg/l 2,4-D及0.1mg/l BA或0.5mg/l BA及0.1mg/l NAA培養桃未成熟胚。而Pinto等人[14]則認爲培養基中添加IAA和Kinetin並沒有刺激胚生長。本試驗結果與Pinto等所報告結果類似，有關未熟胚對生長調節物質在各試驗結果，反應不一致，至今並未有適當的解釋，可能與胚體之遺傳組成或培養前胚之生育環境有關。

以'Flordaprince'及82-25N爲母本各分別授粉5-40N及'Flordaprince' 所得之雜交胚，其PF_1達100但未充分成熟之胚，接種在以MS爲基本培養基並添加不同組合之生長調節物質，培養結果如表5所示。胚在添加BA+IAA或BA+IBA，與未添加任何生長調節物質之MS培養基之成活率並無差異，以Kinetin取代BA則大幅降低培養成活率，僅用Auxin類而不添加Cytokinin類生長調節物質在所試驗組合中效果最差，但同時添加Kinetin及BA基本培養基中亦未見提升成活率。綜合以上結果顯示，生長調節物質對於油桃的未熟胚的培養並無正面效益。

表5. MS培養基不同生長素組合對油桃雜交種胚培養成活率(%)的影響

Table 5. Effects of different combination of plant growth regulators on the survival ratio of immature nectarine hybrid embryos

Survival ratio(%) / PGR(mg/l)	82-25N × 5-40N	82-25N × 'Flordaprince'	'Flordaprince' × 'Flordagold'	'Flordaprince' × 5-40N	Avg.
Control	83	75	86	50	74
BA1.0+IAA1.0	80	83	75	65	76
BA1.0+IBA1.0	83	83	70	60	74
IAA1.0+Kinetin1.0	50	40	20	33	36
IBA1.0+IAA1.0	33	20	10	50	28
IBA0.1+BA0.1+Kinetin0.1	67	70	65	70	68

三、低溫處理對胚培養成活率之影響

未經低溫處理的雜交胚，經二個月的黑暗25℃培養，其雜交胚只轉綠膨大，未能抽芽或雖發芽但芽體呈簇生狀，無法發育成正常小苗。而經4℃低溫處理的雜交胚，1-2個月後即陸續長出胚根，移至25℃光照環境下培養3-4星期後，可發育成株高2-6公分且具4-7片本葉之正常小苗。因此，低溫處理爲油桃胚培養不可缺少之步驟。

四、健化處理

將體外培養的胚苗移到土壤中種植是否能成活，是爲雜交育種應用重要的關鍵。培養成功的試管苗，經過一星期漸進的健化，在移出後於溫室培養時仍大量死亡(表6)，主要的現象有1.整株植株乾枯

表6. 油桃雜交胚培養苗之馴化成活率

Table 6. The survival ratio of seedlings from immature embryo culture after one week acclimation

Growth response / Cross combinations	Dead(%)		Survival(%)
	Basal browning and Atrophy	Whole plant dry and died	
'Armking'× 90-50CN	71	29	0
'Armking'×'Sunblaze'	30	50	20
'Armking precoce'× 90-50CN	64	9	27
'Armking precoce'×'Sunblaze'	71	8	21
'Flordaprince'×'Flordagold'	43	7	50
'Flordaprince'× 5-40N	31	23	46

2.莖部與土接觸部分皺縮腐爛，原因可能是早期胚莖過於柔嫩，當土壤水分過多時，表皮發生縱裂，導致雜菌侵入後褐變腐爛，或可能與葉片尚未形成角質層與組織不夠成熟，易受雜菌感染有關，及根系發育不全，未能及時發揮吸收功能所致。

由發育較好的胚如'Flordaprince' (PF_1=100) ，所培養的試管苗其成活率較由'Armking' (PF_1=57)或'Armking Precoce' (PF_1=61)所來的試管苗高出一倍左右，可能由較成熟的胚所培養的試管苗較爲健壯之故。

結　論

本試驗由試管中成功的培養油桃及桃的未成熟胚，使低需冷性特早熟油桃品種的育種工作跨出關鍵的一步，但是也遭遇到出瓶後死亡率太高的難題。藉由控制環境的溫濕度並延長健化時間，或者使胚珠在培養基中不立即發芽，而繼續生長至更成熟後再萌芽生長，可能有助於提高出苗率也是後續工作的重點。

誌　謝

本試驗工作承國科會經費補助(計畫編號:NSC 87-2313-13-055-005[溫英杰 1])，保存園之建立及管理維護蒙行政院農業委員會及前台灣省政府農林廳經費支持，謹致謝忱。

引用文獻

1. 溫英杰、吳雅婷。 1999 。本省低海拔地區種植低需冷性油桃可行性。中華農業研究48(3): 75-83 。
2. Brooks, H. J. and L. F. Hough. 1958. Vernalization studies with peach embryos. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 71: 95-102.
3. Derman, H. 1956. Histogenetic factors in color and fuzzless peach sports. J. Hered. 47: 64-76.
4. Hammerschlag, F. A., G. Bauchan, and R. Scorza. 1985. Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos. Theor. Appl. Genet. 70: 248-251.
5. Hedrick, U. P. 1917. The peach of New York. *pp*.22-23. Albany, N. Y. J. B. Lyon.
6. Heese, C. O. 1975. Peaches. pp.306-320. In: J. Janick and J. N. Moore(eds.) Advances in fruit breeding. W. Lafayette, Ind. Purdue Univ. Press.
7. Ishida, M., A. Inaba and Y. Sobajima. 1971. Seasonal changes in the concentration of sugars and organic acids in peach fruits. Sci. Rpt. Kyoto Pref. Univ. Agr. 23: 18-23.
8. Kester, D. E. and C. O. Hesse. 1955. Embryo culture of peach varieties in relation to season of ripening. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 65: 265-273.
9. Lesley, J. W. and J. Bonner. 1952. The development of normal peach seedlings from seeds of early-maturing varieties. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 60: 238-242.
10. Magness, J. R. 1957. The world in your garden. pp.170-224. Nat. Geog. Soc. Washington, D. C.
11. Mowery, B. and W. B. Sherman. 1984. Breeding early-ripening, low-chilling peaches in Florida. Fruit Varieties J. 38: 6-8.
12. Murashiage, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
13. Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.
14. Pinto, A. C. Q. 1994. Growth of immature peach embryos in responses to media, ovule support method and ovule perforation. HortScience 29: 1081-1083.
15. Ramming, D. W., G. Bauchan, and R. Scorza. 1985. Regeneration of peach plants from callus derived from immature embryos. Theor. Appl. Genet. 70: 248-251.
16. Ramming, D. W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25: 393-398.
17. Schenk, R. U. and Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. of Bot. 50: 199-204.

18.Scozzoli, A. and D. Pasini. 1991. Effects of different media constituents on the development of peach embryos cultured *in vitro*. Acta Horticulturae 300: 265-268.

19. Stewart. J. M. and C. L. Hsu. 1978. Hybridization of diploid and tetraploid cottons through in ovule embryo culture. J. Hered. 69: 404-408.

20. Theobald, W. L. and L. F. Hough. 1960. The relationship between stage of peach embryo development and seedling growth and survival. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75: 163-170.

21. Tukey, H. B. 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. J. Hered. 24: 7-12.

22. Tukey, H. B. 1934. Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 32: 313-322.

23. Wen, I. C., K. E. Koch, and W. B. Sherman. 1995. Comparsion of fruit and tree characters of two peaches and their nectarine mutants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 101-106.

24. Zagaja, S. W., L. F. Hough, and C. H. Bailey. 1960. The responses of immature peach embryos to low temperature treatments. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 75: 171-178.

Factors Affecting Embryos Culture of Nectarine[1]

Ien-Chie Wen and Ya-Tin Wu[2]

Summary

For breeding early-ripen nectarine varieties in order to avoid fruit fly damage in Taiwan lowland area began from May. This program chose peach and nectarine varieties which had short fruit development period and low chilling requirement as female parent and used embryo rescue technique to culture immature hybrid embryos.Embryo aborted when 'Armking' and 'Armking Precoce' fruits became soft. The optimum time for culturing embryos was when fruits were firm ripe. The best results came from embryos were cultured on Murashige and Skoog medium better than those on Nitsch and Nitsch or on Steward and Hsu medium. Supplemented with 1mg/l BA+ 1mg/l IAA or 1mg/BA + 1mg/l IBA on MS basal medium was better than supplement with any single plant growth regulators or combinations. However, no significant effect between MS medium with or without plant growth regulators.Embryos germinate difficulty without 4°C treatment and usually produced plants that rosette and are difficult to grow. Transplanting the growing embryo from the culture tube to soil is the most critical stages for successful embryo culture in this program.

Key words : Nectarine, Embryo culture, Early ripen.

---

1. Contribution No.2044 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectively, Associate Researcher and Project Assistant, Office of Plant Germplasm, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.