中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）33(2)：126～131（1984）

百香果的花葯培養[1]

蔡新聲　許家言　楊翠蘋　楊昭容[2]

摘要：本研究之目的乃利用花葯培養的技術，將百香果型質極雜之親本及雜種 F_1 育成純系，供育種選拔之用。花葯培養之初步結果如下：

一、百香果花葯培養 callus 形成之最佳時期爲，小胞子發育屬四分子期至早單核期之花葯，最佳培養基爲含有 6％蔗糖，2mg/l NAA 及 1mg/l BA 之 1/2 Murashige & Skoog (1962) 基本鹽類固體培養基，callus 之誘導與光照關係不大。

二、以多種 auxins, cytokinins 及 ABA 等植物荷爾蒙組合 MS 基本鹽類之數十種分化培養基，進行花葯 callus 分化器官之誘導，只有極少數根的形成。花葯 callus 之來源尚未鑑定。

百香果（*Passiflora edulis*）栽培容易，果汁風味極佳，是飲料界的寵兒，國際市場上供不應求。本省氣候適中，復有廣大山坡地可資利用，故發展潛力大。目前百香果栽培面臨毒素病爲害及授粉率太低兩大問題，均有賴以育種予以克服。由於紫色在來種果實雖小，但具有自花授粉之優點，而黃色大果種雖味香、果大，但却屬異花授粉，結實需賴人力或特定昆蟲媒介十分不便；組合大果、香味及自花授粉之優良特性於同一品種是育種的主要目標[1,2]。靠傳統雜交與選拔的方式培育，約需 7—8 年之長時間，不合眼前急需，雜交種花葯培養單倍體形成再倍加染色體成純系的技術，可克服育種時間過長的缺點；又經由花葯培養可育成純系，以生產雜交 F_1 種子，且病毒之問題亦可因種子繁殖而迎刃解決，實一舉數得[3]。本研究之目的乃找出誘導百香果培養花葯形成單倍體之最適花葯培養期、最佳培養基及與培養成效有關之其它因子，以供實際從事育種工作之參考。

材料與方法

花葯培養所用材料爲紫果種〔(*Passiflora edulis*, Sims)×黃果種(*P. edulis f. flavicarpa* Deg.)〕×黃果種♀之雜種 F_1 分別在民國71年 9 月及11月採自嘉義、鳳山分所及臺東改良場。

試驗初期採取雜種 F_1 不同大小之花蕾，以醋洋紅壓潰法檢定小胞子之發育時期[16]，再以檢定所得花蕾大小，做爲小胞子不同發育時期的指標。每次試驗所採之百香果花蕾，約經10°C低溫貯藏 5 小時後(由鳳山、嘉義取樣至農試所)，以10% clorox（含0.525%NaClO）消毒10分鐘，再以無菌水清洗數次後，將花藥自花蕾中取出，接種於培養基上。基本培養基採用含有 6％蔗糖，0.8% phytagar, 0.4mg/l thiamine. HCl 及 100mg/l inositol 之 Murashige and Skoog[9] 基本鹽類之配方。pH 先調整爲5.7±0.1，以15 lb/in², 121°C之高溫高壓殺菌15分鐘。花葯的採取需特別小心，以避免花葯壁等體細胞組織受到傷害；將所採取之花葯培養於含有 10ml 培養基之 25×120mm 試管內，並於 27°±1°C 的恆溫，以黑暗或 1,500 lux，每日16小時之照光下培養，花葯癒傷組織誘導植物體分化之試驗均行照光處理。

1.臺灣省農業試驗所　研究報告第 1154 號。本研究承農發會〔72農建—4.1—產—102(3)〕及國科會〔NSC73—0405—B055—04〕補助，試驗材料承嘉義、鳳山試驗分所及臺東改良場提供，謹此申謝。

2.本所研究員、助理、助理研究員及約僱技術員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

結　果

以三種植物荷爾蒙在數種不同濃度下組合而成表1之八種不同培養基，測定誘導百香果F_1雜種花葯形成callus之效果，結果如表1及表2顯示，不管培養的花葯爲中單核期或晚單核期，都以 2mg/l NAA 及 1mg/l BA 組合之培養基最好，1mg/l NAA 及 0.5mg/l BA 之培養基次之，其餘不含植物荷爾蒙，或僅單獨含有 NAA, BA, Kinetin 之培養基，均沒有花藥 callus 產生。對 callus 的誘導效率，Kinetin 不及 BA。

表1. 植物荷爾蒙對百香果F_1雜種中單核期之花葯誘導 callus 形成之效應

Table 1. The effects of plant hormones on callus formation from passion fruit anther cultured at middle-uninucleate pollen stage

Media No.	Conc. of plant hormones (mg/l)			No. of anther cultured	No. of anther producing callus	% of anther producing callus
	NAA	BA	Kinetin			
1	0	0	0	30	0	0
2	0	0.5	0	35	0	0
3	0	1.0	0	40	0	0
4	1.0	0	0	45	0	0
5	1.0	0.5	0	35	2	5.7
6	2.0	0	0	35	0	0
7	2.0	1.0	0	80	36	45.0
8	2.0	0	1.0	40	0	0

Culture began on Sep. 10, 1982.

Duration of culture : 50 days.

Basal medium : 1/2 MS salts with 6% sucrose.

花藥培養 callus 之能否形成，常決定於培養花葯小胞子之發育時期，表3爲以含 2mg/l NAA. 1mg/l BA 及6%蔗糖之 1/2,MS 基本鹽類培養基,培養百香果五種不同小胞子發育時期花葯所得之結果。資料顯示四分子期至早單核期之花葯 callus誘導率高達45—46%,隨着花葯的成熟，形成 callus 的能力降低。

爲了測定百香果花葯 callus 形成與光照之關係，以四種不同發育時期之花葯，培養於 2mg/l NAA, 1mg/l BA 及6%蔗糖之 1/2 MS 基本鹽類培養基，分別置照光（1,500 lux，每日 16hr, ）與黑暗下培養，結果如表4顯示，不論照光與否，callus 的形成都以四分子期的花葯最佳，照光與不照光分別爲57.8%及50.8%，似乎照光處理優於不照光者，但統計分析結果二者並沒差異。

由表1—4之結果得知，誘導百香果花葯產生 callus 之最適培養基爲含有2mg/l NAA, 1mg/l BA及6%蔗糖之 1/2 MS 基本鹽類培養基，最適培養期爲小胞子發育屬四分子期至早單核期之花葯。

爲了促使百香果花葯 callus 產生植物體的分化，以含有 NAA, BA, Kinetin 及 ABA 等四種植物荷爾蒙，在數種不同濃度組合下之13種基本 MS 鹽類培養基，測定其對花藥 callus 分化器官之效果，結果發現百香果之花藥 callus 極難形成器官，雖經多次重覆試驗，改用不同濃度之其它植物荷爾蒙處理，均始終無法獲得胚或芽體等器官之形成，僅有極少數（二個）形成類似根之組織。

表2. 植物荷爾蒙對百香果F_1雜種晚單核期之花藥誘導 callus 形成之效應

Table 2. The effects of plant hormones on callus formation from passion fruit anther cultured at late-uninucleate pollen stage

Media No.	Conc. of plant hormones (mg/l)			No. of anther cultured	No. of anther producing callus	% of anther producing callus
	NAA	BA	Kinetin			
1	0	0	0	25	0	0
2	0	0.5	0	45	0	0
3	0	1.0	0	45	0	0
4	1.0	0	0	40	0	0
5	1.0	0.5	0	50	5	10.0
6	2.0	0	0	40	0	0
7	2.0	1.0	0	83	10	11.7
8	2.0	0	1.0	45	2	4.4

Culture began on Sep. 10, 1982.

Duration of culture : 50 days.

Basal medium : 1/2 MS salts with 6% sucrose.

表3. 小胞子發育時期對百香果F_1雜種誘導花**葯** callus 形成的影響

Table 3. The percentage of callus formation from passion fruit anthers cultured at different developmental stages of microspores

Microspore developmental stage	No. of anther cultured	No. of anther producing callus	% of anther producing callus
Tetrads	227	106	46.6
Early-uninucleate	80	36	45.0
Mid-uninucleate	195	26	13.3
Late-uninucleate	85	10	11.7
Binucleate	105	20	19.0

Culture began on Sep. 10, 1982.

Duration of culture : 50 days.

Basal medium : 1/2 MS salts supplemented with 2mg/l NAA, 1mg/l BA and 6% sucrose.

表4. 光照及花粉發育時期對百香果雜種F_1花葯 callus 形成之影響

Table 4. Influence of illumination on callus formation from passion fruit anthers cultured at different developmental stages of microspores

Microspore developmental stage	No. of anther cultured	No. of anther producing callus	% of anther producing callus
Dark condition			
Tetrads	120	61	50.8
Early-uninucleate	100	28	28.0
Mid-uninucleate	90	24	26.6
Late-uninucleate	100	33	33.0
Light condi ion			
Tetrads	95	55	57.8
Early-uninucleate	50	22	44.0
Mid-uninucleate	70	20	28.5
Late-uninucleate	95	16	16.8

Culture began on hou. 4, 1982.

Duration of culture : 50 days.

Basal medium : 1/2 MS salts supplemented with 2mg/l NAA, 1mg/l BA and 6% sucrose.

討　論

植物荷爾蒙之有無是花葯培養能否誘致單倍體的最重要外在因子之一。每種作物或品種的花葯培養對培養基之要求各異，大抵依所需植物荷爾蒙之有無可將作物分成二大類：（1）只含基本的有機、無機鹽類就可誘導花葯形成單倍體，典型的例子如菸草等許多茄科作物[11,12,14]；（2）除了基本鹽類外，尚需添加植物荷爾蒙才可誘導單倍體形成，大部分的禾本科作物如水稻[4,10,17,19]小麥.[18]玉米.[6]及大麥.[5]等均屬此類，百香果之花葯需 2mg/l NAA 及 1mg/l BA 配合才可誘導 callus 形成，其未來單倍體形成之路徑應屬此類。

一般作物花葯培養適當的時期，介於四分子期至花粉第一次有絲分裂剛完畢之早雙核期間，例如菸草培養四分子期之花葯，單倍體形成率極低，單核期以後之花葯則單倍體誘導力直線上升，至花粉第一次有絲分裂達到最高，而後又急遽下降[12,13,15]；百香果則顯示與菸草相反之結果，以四分子期最高，隨着花藥的成熟而 callus 誘導率降低，這種差異可能因各種作物具有不同之因子型所致；例如利用不同品種的菸草花葯培養於不同的培養基上，單倍體可成功的自四分子期的花葯獲得。目前花葯培養之適期早於四分子期之作物不多，如 Gresshoff 及 Doy[7,8]報導蕃茄及 *Arabidopsis thaliana* 以減數分裂期的花葯最好。

百香果花藥 callus 誘導器官之形成，雖經多種荷爾蒙在不同濃度組合下之數十種培養基測定，但仍未成功，目前只有極少之 callus 形成類似根之分化，這種情形與甘藷花葯 callus 之分化情形極爲相似，試測多種誘導體胚形成之有效植物荷爾蒙，尋找其適當的濃度是未來努力的方向。

花葯 callus 有可能來自細胞壁、花絲及絨氈層等體細胞，本研究百香果花葯 callus 之來源，正利用石蠟切片法及細胞學鑑定法進一步測定中。

引用文獻

1. 張振宙・1974・黃百香果（西番果）在臺灣開花不實原因之研究。臺灣農業10（2）：79—89。
2. 張振宙・1976・百香果優良品種比較及授粉方法之研究。臺灣農業12（2）：72—77。
3. 蔡新聲・1980・花藥培養單倍體植物之形成及應用。科學農業28（11—12）：379—396。
4. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1979. A method for anther culture of rice. TCA Manual 5 : 1051-1053.
5. Clapham, D. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. Z. Pflanzenzucht 69 : 142-153.
6. Genovesi, A. D. and G. B. Collins. 1982. In vito production of haploid plants of corn via anther culture. Crop Sci. 22 : 1137-1144.
7. Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Aust. J. Biol. Sci. 25 : 259-264.
8. Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Planta 107(2) : 161-170.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
10. Niizeki, H. and K. Oono. 1971. Rice plants obtained by anther culture. *In* Les cultures de tissues des plantes. Colloq. Intl. CNRS (Paris) 193 : 251-257.
11. Nitsch, J. P. 1971. La production in vitro Dembryons Haplodes : Resultats et perspectives. Colloques Internation aux CNRS No. 193-Les cultures de tissus de plantes 281-294.
12. Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19(4) : 389-404.
13. Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollon grains. Sci. 163 : 85-87.
14. Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. *In* Haploids in higher plants : advances and potantial. Ed. by Kasha, K. J. pp. 91-122. Guelph, Univ. Guelph.
15. Sunderland, N. and F. M. Wicks. 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature 224 : 1227-1229.
16. Tsay, H. S. 1980. Strong acid treatment for making smears of tobacco microspores. J. Agric. Res. China 29(2) : 103-106.
17. Tsay, H. S., L. J. Chen, T. H. Tseng and P. C. Lai. 1982. The culture of rice anthers of japonica ×indica crosses. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. pp. 561-562. Tokyo, Japan.
18. Wang, C. C., C. C. Chu, C. S. Sun, S. H. Wu, K. C. Yin and C. Hsu. 1973. The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured in vitro. Sci. Sinica 16 : 218-222.
19. Woo, S. C. and I. J. Tung. 1972. Induction of rice plants from hybrid anthers of *Indica* and *Japonica* cross. Bot. Bull. Acad. Sinica 13 : 67-70.

Anther Culture of Passion Fruit (*Passiflora edulis*)[1]

H. S. Tsay, J. Y. Hsu, T. P. Yang and C. R. Yang[2]

Summary

The aim of this research is to establish the procedures of haploid plant formation from anther culture of passion fruit F_1 hyhrids. The results are summarized as follows :

1. Passion fruit anthers containing microspores at tetrads to early-binucleate stages were successfully cultured in 1/2 strength of Murashige and Skoog (1962) medium (except Na-Fe-EDTA) supplemented with 2mg/l NAA (Naphthaleneacetic acid), 1mg/l BA (Benzyladenine) and 6% sucrose for callus formation. Highest frequencies of callus induction were obtained from anthers with tetrads or early-uninucleate microspores. Callus could be induced under either light or dark condition.

2. The regeneration ability of anther-derived callus was tested under several kinds of auxins and cytokinins in different concentrations and combinations. None of embryoids or shoot-like structures have been derived from those calli except for some rooty protrusions.

3. The origination of callus was unidentified.

1. Contribution No. 1154 from the Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported in part by National Science Council and Council for Agricultural Planning and Development, Executive Yuan, Republic of China.

2. Senior Agronomist, Research Assistant, Assistant Agronomist and Assistant, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.