

晚香玉花藥培養及其癒合組織再生株之變異¹

紀海珊² 蔡新聲³

摘要 晚香玉單瓣栽培種 (*Polianthes tuberosa* L. cv "Single") 單核期的花藥，接種於含有1ppm 2, 4-D、3%蔗糖及0.8%洋菜之1/2MS基本鹽類 (Na-Fe-EDTA 全量) 培養基中，可獲得具有胚發生能力之癒合組織 (embryogenic callus)。將此癒合組織移植於植物生長調節劑為0.2ppm NAA及2ppm kinetin之1/2MS基本鹽類培養基，可獲得擬胚體及再生植株。所獲得35株之再生植株，據調查已開花8株之園藝性狀，顯示有花序增長、花蕾數增加、花徑變大、花瓣數變少、外花被呈粉紅色及葉片大小的差異，此變異或可供為改良晚香玉單瓣種花序短、花蕾數少及切花品質低等缺點之選拔材料。

晚香玉 (*Polianthes tuberosa* L.) 又名夜來香，月下香或玉簪花，屬於龍舌蘭科 (*Agavaceae*) 之多年生球根花卉，係本省重要的經濟花卉作物之一^(1,2,3,4,5,6,8,9,10)。目前本省主要栽培品種為單瓣與重瓣兩品種，單瓣種因香味濃，可提煉高級香精，亦可當切花材料；然因花序短、花朵數少，所以切花觀賞價值較低。重瓣種花序長、花朵數多、香味淡、適合切花；唯因夏季切花瓶插時着蕾之花朵不能繼續開放，品質不佳，壽命也短⁽⁷⁾，因此育種家一直希望能藉雜交組合育成一兼具單瓣及重瓣優良特性之晚香玉新品種⁽⁴⁾。又因經由組織培養產生之變異植株 (somaclones) 選育優良突變種，已被一些專家應用於實際育種工作⁽¹⁶⁾。因此本試驗以晚香玉花藥為材料，希望能獲得單倍體植株或經由組織培養產生變異植株，以期有利於實際育種工作之進行。

材料與方法

一、花藥的消毒及接種

晚香玉單瓣品種之花藥係採自嘉義農專花園及由嘉義市港坪里之花農提供。依試驗之需，採取適合長度之花蕾，以0.5%次氯酸鈉 (每50ml加入1滴 Tween 20) 消毒10分鐘後，以無菌水清洗三次，用鑷子取出花藥，培養於含有10ml斜面固體培養基之試管中。

二、不同發育時期之花藥培養

以醋酸洋紅壓片法觀察晚香玉小孢子發育，將其分為減數分裂 (meiosis) 至四分子期 (tetrads)、單核期 (uninucleate)、雙核期 (binucleate) 及成熟花粉粒 (pollen grain) 等四個時期，並分別培養於含有2ppm NAA、1ppm BA、6%蔗糖、0.8%洋菜及 Na-Fe-DETA全量之1/2MS⁽¹⁴⁾基本鹽類培養基中，調查癒合組織產生與小孢子發育之關係；誘導之癒合組織分別移至含有0.2ppm NAA及2ppm kinetin 之培養基調查其分化能力。

三、不同蔗糖濃度及植物生長調節劑對花藥癒合組織形成與分化之影響

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第1475號。本文係第一作者碩士論文之一部份。
2. 國立嘉義農業專科學校園藝科助教。臺灣省 嘉義市。
3. 本所農藝系研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

將單核期的花藥接種於含有0.8%洋菜，Na-Fe-EDTA全量之 $\frac{1}{2}$ MS基本鹽類培養基中，並分別以3、6、9及12%四種蔗糖濃度及不同組合與濃度之植物生長調節劑（表3—4）誘導花藥癒合組織及擬胚體形成，並調查癒合組織之形狀、大小、數目及外觀、癒合組織之發生率與植株分化情形。

以上癒合組織之誘導環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒溫的暗處理，擬胚體之誘導則在相同溫度下，以1,500 lux之光強及光期16小時的環境下培養。

四、瓶苗之移植及成活植株園藝性狀及變異之調查

將已分化完成且發育有根之植株，洗去根部附着之洋菜，移植於盛有細粉末蛇木屑之塑膠鉢中，並置於室內盛有水之塑膠盆中培養。移植之初，於植株上覆蓋玻璃燒杯，待植株長出新芽後，於76年7月定植於含有豐富腐植質土壤之塑膠槽中栽培，歷經1年，於77年6月抽苔開花，在此生育階段分別調查花型、花被瓣數、花莖長、花莖寬、花序長、花蕾數、花徑寬、花瓣寬（厚）、外花被顏色、葉長、葉寬、葉厚、葉色、葉形、葉數、株高、抽苔期、每日開花朵數及每朵花開之天數等各項單株園藝性狀。

結 果

一、不同發育時期之花藥培養試驗

表1顯示晚香玉花蕾長度和小孢子發育時期之關係。每朵花含6個花藥，其小孢子之發育大都在同一時期，且花藥長約為花蕾長度之 $\frac{1}{2}$ 。表中資料為10枚花穗之平均值。表2顯示減數分裂至四分時期、單核期、雙核期及成熟花粉粒等四種花藥癒合組織形成率與植株分化情形，各處理於接種後15天

表 1. 晚香玉花蕾長度與小孢子發育時期之關係

Table 1. The relationship between flower bud length and microspore developmental stage in tuberose*

Developmental Stage of Microspore	Flower Bud Length (cm)	Anther Length (cm)
Pollen mother cell	0.4	0.19
Meiosis	0.5—0.6	0.22
Tetrads	0.6—0.7	0.32
Early uninucleate	0.7—0.9	0.38
Middle uninucleate	0.9—1.0	0.53
Late uninucleate	1.0—1.1	0.65
Binucleate	1.1—1.3	0.75
Pollen grain	>1.3	>0.80

*Data are means of 10 observations.

表 2. 小孢子發育時期對晚香玉花藥培養癒合組織誘導與植株分化之影響

Table 2. Influence of developmental stage of microspores on the induction of callus and plant regeneration in tuberose anther culture*

Developmental Stage of Microspore	Number of Anthers Cultured	Anthers Forming Callus		Plant Regeneration from Anther-Derived Callus	
		Number	Percentage	No. of Callus Cultured	No. of Callus Differentiated
Meiosis to tetrads	100	100	100	68	0
Uninucleate	91	86	94	68	7
Binucleate	76	69	90	68	0
Pollen Grain	90	68	75	68	0

*Source of plant material was from National Chiayi Institute of Agriculture. Culture duration for callus induction was 10 days.

花藥壁逐漸膨大呈透明狀，隨著小孢子發育時期之越趨成熟，其癒合組織之誘導率有遞減之趨勢，其中只有單核期花藥誘導之癒合組織有擬胚體 (embryoid) 與植株之再生，共計獲得植株 7 棵。

二、不同蔗糖濃度及植物生長調節劑對花藥癒合組織之形成與質地和植株分化之影響

不同蔗糖濃度對各時期花藥癒合組織之形成與質地之影響，其差異不顯著；而 9% 與 12% 高濃度的蔗糖有抑制癒合組織分化之趨勢 (資料未列出)。

表 3 顯示不同組合與濃度之植物生長調節劑，可影響花藥癒合組織之形成，添加 cytokinin 類之植物生長調節劑可提高癒合組織之誘導率，但對癒合組織之分化能力則無幫助 (資料未列出)。就癒合組織之外形與質地觀之，則 1ppm 2, 4-D 之處理明顯不同於其他組合的處理，其表面具有光滑圓球形突起且有粘稠性之分泌液；其他組合所誘導之癒合組織，表面成疏鬆乾燥狀而無粘稠性之分泌液。

將表 3 各培養基所誘導之癒合組織分別移植於如表 4 所示含有不同植物生長調節劑之分化培養基，結果發現只有 1ppm 2, 4-D 誘導之花藥癒合組織，經移植於分化培養基後可再生植株 (約佔 50% 左

表 3. 植物生長調節劑對晚香玉花藥培養誘導癒合組織形成之影響

Table 3. Effect of plant growth regulators on induction of callus in tuberose anther culture*

Concentration (mg/l) of				Number of Anthers Cultured	Anthers Forming Callus	
2, 4-D	NAA	Kinetin	BA		Number	Percentage
0	0	0	0	106	0	0
1	0	0	0	104	90	86
0	2	0	0	99	84	84
0	2	1	0	100	100	100
0	2	0	1	92	83	90

*Basal medium used was 1/2 MS with full strength of Na-Fe-EDTA, 6% sucrose and 0.8% Phytagar.

表 4. 植物生長調節劑對晚香玉花藥癒合組織分化能力之影響

Table 4. Effect of plant growth regulators on the ability of plant regeneration from anther-derived callus of tuberose*

Concentration (mg/l) of			Number of Callus Cultured	Number of Callus Showing Shoot Differentiation
NAA	BA	Kinetin		
0.2	1	0	21	0
0.2	2	0	21	2
0.2	0	1	21	1
0.2	0	2	23	12
0.2	0	4	21	1**
0	0	2	21	0

*Callus was induced on medium with 1/2 strength MS basal salts containing full strength of Na-Fe-EDTA, 1mg/l 2, 4-D and 6% sucrose.

**Albino plant.

右)，表 4 顯示以 0.2ppm NAA 及 2ppm kinetin 組合之分化培養基較佳，共得再生植株 12 棵，其他組合之分化培養基，癒合組織之再生能力均極差；而 0.2ppm NAA 及 4ppm kinetin 組合之分化培養基則獲得白苗 (圖 1)。

三、瓶苗之移植及成活植株園藝性狀及變異之調查

花藥癒合組織在分化培養基形成芽體後，不需特殊培養基之誘導即可從芽體基部自行發根 (圖 2)，根長可達 10 公分，經移出試管外，其成活力可達 100%，且均能正常生長發育，其中並有 8 棵植株已抽苔開花，其單株園藝性狀如表 5 所列；而植株上之花穗每天約開 1~5 朵，每朵平均開 3~4 天，花型仍為單瓣；其中園藝性狀變異較顯著者有葉片變細小而短 (圖 3)；植株葉片成為平展型；

花瓣數有 3~5 枚之變化 (圖 4)，且各花瓣之大小不均一；而花藥數也有 4—7 個的變異，外形也呈畸形；外花被之顏色有淺粉紅色之變化。又將本試驗再生植株之園藝性狀 (代號 "T") 與本地單瓣栽培種 (與花藥來源母株之相同品種，代號 "L") 及雜交實生後裔植株 (代號 "H") 園藝性狀比較，如表 6 顯示花序長度 "T" 比 "L" 長；花蕾數目 "T" 比 "L" 多，而花徑大小則 "T" 比 "L" 大，外花被顏色由白至粉紅色等，此皆為植株外表園藝性狀之初步調查，至於是否有染色體倍數性或異數性之變異，及其園藝性狀之變異能否遺傳至下一代，則有待進一步之研究與證實。

表 5. 晚香玉花藥培養再生植株園藝性狀調查表

Table 5. Characteristics of tuberosc plants differentiated from anther-derived callus

Plant No.	Flowering Duration (day)	Spike Length (cm)	Flower Stalk Width (cm)	Inflorescence Length (cm)	Number of Flower Bud	Color of Outer Perianthes*	Number of Perianthes	Flower Diameter (cm)	Petal Width (cm)	Petal Thickness (mm)	Leaf Length (cm)	Leaf Width (cm)	Leaf Number
6	34	60.5	0.65	21.9	36	W	6	3.0	0.8	0.5	21.7	1.0	21
7	29	69.6	0.70	29.1	48	P	6	3.4	0.9	0.5	31.3	1.1	26
8	33	72.7	0.70	34.2	58	P	6	3.4	0.9	0.5	27.1	0.9	30
3	17	63.5	0.63	30.6	34	P	4-6	4.3	0.8	0.8	27.8	1.7	23
9	28	54.1	0.74	28.0	33	P	6	4.6	0.8	0.9	31.9	1.7	30
10	17	60.6	0.42	17.2	33	P	6	2.6	0.6	0.7	16.0	0.8	19
15	18	69.0	0.63	28.1	44	P	5-6	3.6	0.8	0.9	24.3	1.2	15
2	13	40.5	0.66	44.2	34	P	3-6	3.9	0.6	0.7	28.6	1.8	31

*W: white; P: pink.

表 6. 晚香玉花藥培養再生植株與本地單瓣栽培種及雜交實生後裔園藝性狀之比較調查表

Table 6. Comparison of plant characteristics among plants from anther culture, native variety and hybrid progeny selections

Plant Source	Petal Type	Spike Length (cm)	Flower Stalk Width (cm)	Inflorescence Length (cm)	Number of Flower Bud	Flower Diameter (cm)	Petal Width (cm)	Petal Thickness (mm)	Color of Outer Perianthes*	Number of Perianthes
Hybrid progeny** (H)	Single	67.3-133.3	0.57-0.73	12.9-29.0	48-58	3.47-4.36	0.81-0.91	0.75-1.01	W-R	6-10
Anther culture (T)	Single	40.5-72.7	0.42-0.74	17.2-44.2	33-58	2.6-4.6	0.60-0.90	0.50-0.90	W-P	3-6
Local variety (L)	Single	80.0-120.0	0.45-0.55	12.0-20.0	20-40	3.5-3.8	0.75-0.80	0.80	W	6

*W: white, R: red, P: pink.

**Data on hybrid selection are from J. Natl. Chiayi Inst. Agri. 12: 36, 1985.

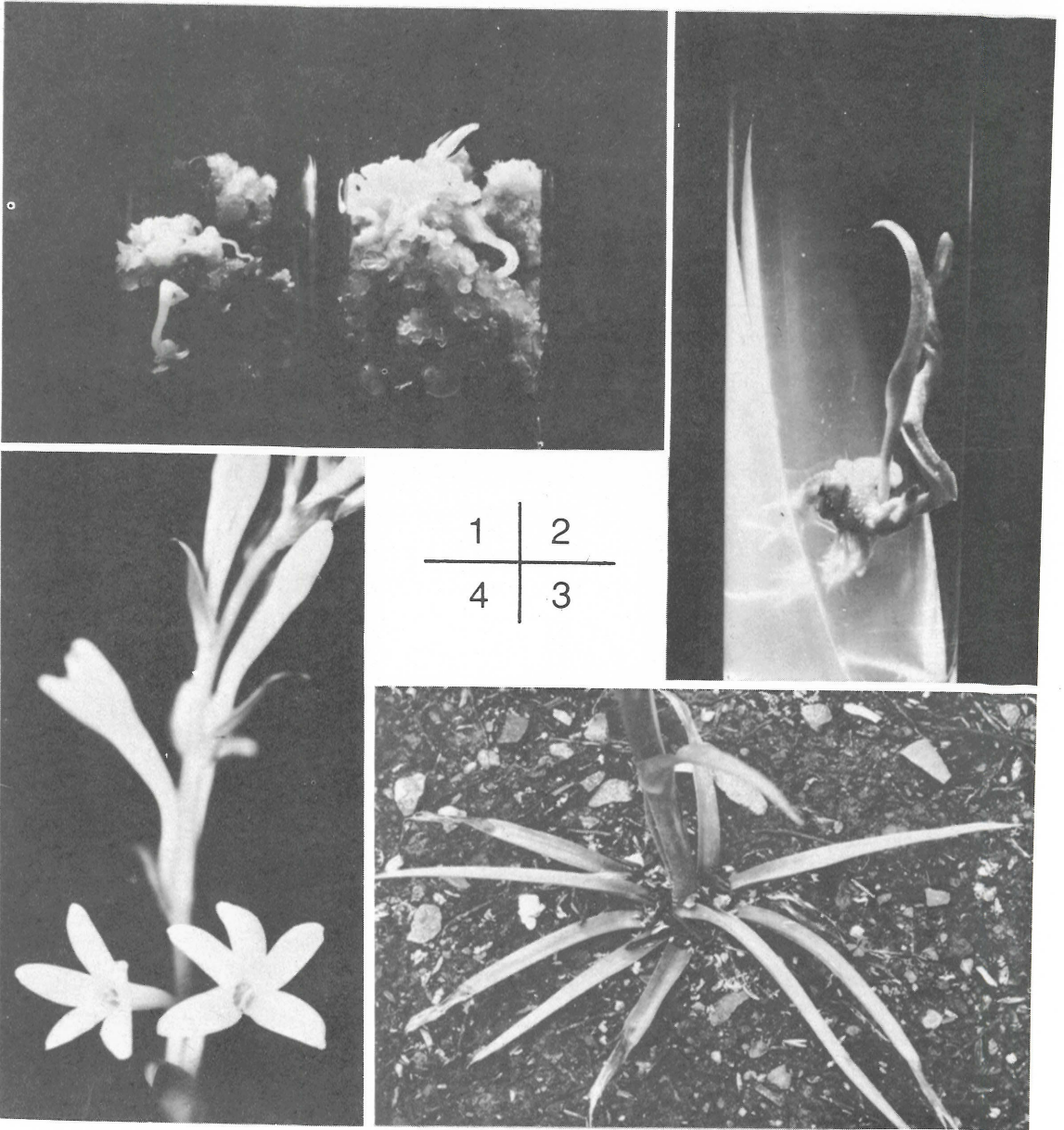


圖1.晚香玉花藥培養所獲得之白苗。

圖2.晚香玉花藥培養所獲得具有根及芽之健康植株。

圖3.晚香玉花藥培養所獲得叶片變為細小而叶數較少之變異株。

圖4.晚香玉花藥培養所獲得花瓣5枚之變異株。

Fig. 1. Albino plant obtained from anther culture of tuberose.

Fig. 2. Root formation of regenerated shoot from anther culture of tuberose.

Fig. 3. Leaf variation of slim and short (16cm) shape obtained from anther culture of tuberose (No. 16 plant).

Fig. 4. The variant with 5 petals obtained from anther culture of tuberose.

討 論

單瓣種晚香玉花藥最適當之培養時期為單核期(表2)，由於培養後大約15天左右即發現花藥壁明顯膨脹呈透明狀，因而初步推測其癒合組織可能係來自花藥壁等體細胞之組織。

晚香玉花藥誘導具有胚發生能力之癒合組織(embryogenic callus)以1ppm 2, 4-D之效果較佳；進一步分析2, 4-D之最適濃度，雖然從0.5ppm至2ppm均能誘導外表形狀相同而色澤稍異之癒合組織(資料未列出)，但誘導擬胚體形成與再生植株之能力仍以1ppm 2, 4-D最好。Narayanaswamy與Prabhudesai (1979)亦曾以2ppm 2, 4-D培養晚香玉花瓣等器官誘導擬胚之發生，但並未從此擬胚獲得再生植株⁽¹⁵⁾。而誘致癒合組織再生方面則 kinetin 之效果優於 BA，但必須加入適當濃度之 NAA 以促進癒合組織之分化(表4)，Chen與Lin (1976)亦曾提出分化培養基中添加NAA可促進水稻花藥癒合組織之分化能力⁽¹³⁾。又花藥癒合組織經培養半年後，仍然有再生植株之能力，顯示其癒合組織可維持較長時間之分化能力。

瓶苗之移植據 Barnes (1979)報導西瓜組織培養苗以塑膠杯罩住盆苗較田間噴霧式栽培容易繁殖成功⁽¹²⁾，本研究延用此法，且因晚香玉對介質之要求性不高，因此在保持高濕度之環境下，移植之成活率高達100%。

本試驗中，再生植株園藝性狀及變異之調查，花莖長度較雜交後裔及對照植株短，未達晚香玉外銷切花花莖80公分以上之標準。而花序長度則較雜交後裔及對照植株明顯增加；至於花蕾數則比對照植株多，與雜交後裔花蕾數相當；因此其花序上花蕾與花蕾間之距離增大，此性狀在切花外銷運輸過程中或許可減少花蕾間相互擠壓造成之損失，而使切花之品質提高。又單瓣種晚香玉外花被四季均為白色，本研究則有外花被顏色為粉紅色之變種。又有關葉片形態之變異，以往Abraham and Desai (1976)曾以放射線處理晚香玉之塊莖，結果花色、花型均未獲得變異，只有葉色改變，即沿著葉片中脈有寬而黃色等之帶狀條紋，並且也有白苗之發生⁽¹¹⁾。本試驗中也有白苗發生(圖1)。而所獲得之16號植株葉片變為細小而葉數較少(圖3)，導致花徑變小而香味較淡。

綜合本試驗再生植株園藝性狀調查結果，園藝性狀之變異歸納之有花序變長、花蕾數增加、花徑變大、花瓣數變少、外花被呈粉紅色及葉片大小之改變等，對提供改良單瓣種晚香玉之切花品質或可作為育種之選拔材料。

引用文獻

1. 杜廣性•1966•第三篇 花卉篇。農業要覽第8輯。pp. 134-135. 臺灣省政府農林廳。
2. 沈再木•1983•夜來香花粉貯藏及不親和性之研究。中國園藝28(3): 231-239。
2. 沈再木•1984•香花集。pp. 67. 豐年社。
4. 沈再木, 黃光亮, 黃達雄•1985•夜來香雜交育種之研究。嘉義農專學報12: 31-41。
5. 黃達雄•1975•晚香玉。嘉義農專園藝學報5: 1-5。
6. 黃敏展•1980•三、花卉篇。農業要覽。pp. 1150-1151. 豐年社。
7. 黃達雄, 沈再木•1982•夜來香開花及種球發育之初步觀察。嘉義農專園藝學報12: 15-22。
8. 黃達雄•1984•香花集。pp. 61-66. 豐年社。
9. 陳德順, 胡大維•1976•臺灣外來觀賞植物名錄。pp. 447-448. 川流出版社印刷所。
10. 蕭政文•1975•臺灣外銷花卉產銷現況。花農生活及發展希望。臺灣花卉53: 70-74。
11. Abraham, V. and B. M. Desai. 1976. Biological effectiveness of fast neutrons and gamma rays in some bulbous ornamentals. Indian J. Genet. Plant Breed. 36: 230-237.
12. Barnes, L. R. 1979. In vitro propagation of water melon. Sci. Hort. 11: 223-227.
13. Chen, C. C. and M. H. Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Academia Sinica 17: 18-24.

14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
15. Narayanaswamy, S. and V. R. Prabhudesai. 1979. Somatic pseudoembryogeny in tissue culture of tuberose *Polianthes tuberosa*. *Indian J. Exp. Biol.* 17 : 873-875.
16. Tsay, H. S., J. Y. Hsu and C. C. Yeh. 1987. Production of new plant genetic resource through tissue culture. In: *Crop exploration and utilization of genetic resources* (Ed. by S. C. Hsieh). PP. 247-258. Proc. International Symp. Held at Taichung DAIS, Changhua, Taiwan ROC. Dec. 6-12, 1986.

Anther culture and somaclonal varivation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.)¹

H. S. Gi² and H. S. Tsay²

Summary

Anthers of tuberose variety with single-petal flowers was used in this experiment for callus induction and plant regeneration. Anthers with microspores at uninucleate stage were cultured on medium of ½ strength MS basic salts (with full strength of Na-Fe-EDTA) supplemented with 1ppm 2, 4-D, 3% sucrose and 0.8% phytagar. The produced embryogenic callus was able to differentiate into embryoids and plantlets after transferring to medium containing 0.2ppm NAA and 2ppm kinetin. A total of 35 plantlets were produced by the procedures described above. Among them, 8 plants grew to bloom showing significant variaton in various floral traits. These included inflorescence length, number of flower buds, flower size and color. It is suggested that the plants produced from tissue culture can be used as a source for varietal improvement.

¹. Contribution No. 1475 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

². Assistant, Department of Horticulture, National Chiayi Institute of Agriculture and Senior Agonomist, Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan 41301, ROC.