

鳳仙花屬植物種間雜交障礙與子房培養

林庭聿¹⁾ 邱清安²⁾ 張正³⁾

關鍵字：非洲鳳仙花、黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花

摘要：台灣原生鳳仙花屬植物具有特殊花形及花色，試驗試圖將台灣原生黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花作為花粉親與台灣冬季重要的花壇作物非洲鳳仙花雜交。三種鳳仙花皆由花絲包覆柱頭。棣慕華鳳仙花於開花當日柱頭即伸入已開裂花藥中，黃花鳳仙花及非洲鳳仙花須待雄蕊脫落後始進入雌花期，且柱頭並未伸入花藥中。以鮭紅色及白色非洲鳳仙花'Accent'為種子親與黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花進行單向雜交，蒴果平均在授粉後 4~6 天內落果。由切片圖觀察，以黃花鳳仙花為父本，於授粉後 8 天胚囊已呈現空洞化；授粉後 6 天有觀察到球形胚，此時胚囊內部已無胚乳。使用不同生長調節劑比例進行子房培養，以 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 內部褐化速率較慢，未來以此濃度比例進行微調並減短繼代的時間應為可嘗試的方向。

前 言

鳳仙花科 (Balsaminaceae) 鳳仙花屬 (*Impatiens*) 植物是常見的盆花及花壇作物，然而僅有印度鳳仙花 (*I. balsamina* L.)、喜馬拉雅鳳仙花 (*I. glandulifera* Royle)、新幾內亞鳳仙花 (*I. hawkeri* Bull) 以及非洲鳳仙花 (*I. walleriana* Hook.) 被廣泛種植 (Grey, 1983)。非洲鳳仙花於 2010 年占台灣秋冬季花壇作物總量的 39%，為重要的花壇作物之一 (陳等, 2011)。

台灣原生鳳仙花屬植物共有三種，其中黃花鳳仙花分布於海拔 2000~3000 公尺、棣慕華鳳仙花分布海拔 2000~2100 公尺 (Huang, 1977)，於平地難以見到其蹤跡，期能透過與平地生長的非洲鳳仙花雜交，生產出可於平地生長，並具有台灣原生花卉特色之鳳仙花。

-
- 1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。
 - 2) 國立中興大學森林學系副教授。國立中興大學實驗林管理處副研究員兼任研究發展組組長
 - 3) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

本試驗採用非洲鳳仙花為母本、黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花為父本，報導指出此種組合會發生受精後障礙 (王，2010)，透過石蠟切片釐清障礙發生的原因、時間，並採用子房培養期能克服雜交障礙。

材料方法

一、黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花、非洲鳳仙花開花階段調查

2016 年 6 月將黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花以及非洲鳳仙花栽培於組合式植物生長箱 (A 型-600uE 照度，名器 Fame) 恆溫 20°C，每周以 1000 mg L⁻¹ Peters 20-20-20 (J. R. Peters, Inc., Allentown, USA) 澆灌施肥，觀察開花當日及其後數日的花朵各階段特徵，拍照紀錄雄花期轉至雌花期花藥開裂狀況、花絲脫落、花柱伸長及開張情形，使用解剖顯微鏡 (Nikon, SMZ645, Japan) 觀察雌雄蕊相對位置，並以 CCD 影像系統 (Prog Res MF scan, Germany) 進行拍照紀錄。

二、黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花花藥開裂天數與花粉萌發率調查

黃花鳳仙花花藥完全開裂花絲未脫落柱頭時的狀態，可於 20°C 生長箱中維持二天，調查花粉體外萌發率；使用鑷子沿著花絲將雄蕊取下，將單一雄蕊的花粉均勻灑布雙凹玻片的單一凹槽中，內含 2 滴 10% 蔗糖的修改過的 BK 培養基 (Brewbaker and Kwack, 1963) 成分為 100 mg L⁻¹ H₃BO₃、200 mg L⁻¹ Ca(NO₃)₂ · 4H₂O、100 mg L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O、100 mg L⁻¹ KNO₃；pH = 5.7，在 20°C 黑暗培養 1 小時後，於 100 倍光學顯微鏡 (Primo star, ZEISS, Germany) 視野下拍照記錄。每次試驗使用三個雄蕊，每個凹槽取三個視野，計算萌發率平均值。

三、非洲鳳仙花與黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花種間雜交與子房培養

(一) 非洲鳳仙花與黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花種間雜交果實發育情形

2016 年 5~7 月取用種子繁殖，培養於 20°C 之黃花鳳仙花以及棣慕華鳳仙花花藥開裂所釋出之花粉，用鑷子夾住花絲將花粉均勻塗抹於有黏液分泌之非洲鳳仙花雌蕊期的柱頭上，視花粉量多寡，單一花藥之花粉授於多朵花之柱頭，直到花粉用盡為止；授粉組合如下：1. 白色非洲鳳仙花 × 棣慕華鳳仙花、2. 白色非洲鳳仙花 × 黃花鳳仙花、3. 鮭紅色非洲鳳仙花 × 棣慕華鳳仙花、4. 鮭紅色非洲鳳仙花 × 黃花鳳仙花，授粉後之柱頭吊掛標牌加以辨識，每天進行觀察，蒴果若有出現萎縮、掉落情形即加以紀錄，每種組合均至少紀錄 30 個以上之蒴果。

(二) 非洲鳳仙花與黃花鳳仙花種間雜交胚發育階段之觀察

將採集樣本放置於裝 FAA (福馬林：醋酸：70%酒精 = 1:1:18) 固定液的離心管中，靜置隔夜後，抽氣直至材料沉至底部。再以 50% 酒精溶液浸泡材料清洗三次後，將組織浸泡在含有 1% Safranin O 染劑的 50% 酒精中，使組織染色以便觀察。

染色完畢後，以不同濃度的三級丁醇 (TBA; t-butanol) 溶液，經 50%、70%、85%、95%、100% 進行脫水。脫水後接續進行滲蠟步驟，將固定瓶添加 100% TBA 置於 60°C 烘箱 (Firstek, Taiwan) 中，與 TBA 體積等量之蠟粒 (LEICA, surgipath paraplast)，以一小時四十五分為一單位，將總蠟粒分四次加入，並在加完最後一次的蠟粒後，放回烘箱中打開固定瓶蓋，靜置隔夜使 TBA 揮發。隔天進行埋蠟，於室溫下將樣品埋入蠟塊中，以轉動式切片機 (LEICA, RM2235, Germany) 切片，厚度為 10 μ m。將切片後的蠟帶，置於滴有純水的載玻片上展片，並置於 40°C 加熱板上隔夜至水分完全蒸發後，進行後續脫蠟步驟。

以二甲苯 (Xylene) 進行脫蠟 30 分鐘，經 100%、95%、70%、50% 酒精序列各浸 1 分鐘，以 1% Safranin O 染色 1 小時，再以 50%、70%、95% 序列各浸泡 1 分鐘後，以 0.5% Fast green 染色 5~10 秒鐘，再浸泡 100% 酒精、二甲苯各 6 分鐘，每一濃度的浸泡，皆須以紙巾吸附多餘的溶液。最終從染缸中取出玻片，多餘的二甲苯擦拭乾淨後，滴上適量的封片膠 (Entellan, Merck)，蓋上蓋玻片 (蔡, 1975) 後，將玻片中的氣泡擠壓出，置於室溫下待封片膠乾後即可以光學顯微鏡觀察 (Axiolab, ZEISS, Germany) (蔡, 1975)。

(三) 非洲鳳仙花與黃花鳳仙花種間雜交授粉與子房培養

105 年 5~8 月，將鮭紅色非洲鳳仙花 'Accent' 為種子親與黃花鳳仙花為花粉親，依照前述步驟進行授粉，授粉後花梗會下垂，子房變長，以此作為判斷之依據，在授粉後 5 天取下未落果之子房連同花梗，一同放入含有 1% 次氯酸鈉的漂白水 (由高樂氏漂白水含 6% 次氯酸鈉稀釋而得) 及一滴 Tween20 (展著劑) 的 50 ml 離心管中，震盪 10 分鐘，於無菌操作臺中將子房以無菌水漂洗直至無泡沫為止，僅留花梗約 5 mm，其後，放入 5 種含有不同生長調節劑組合的培養基試管中，培養基成分為 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 鹽類濃度、MS 5-6 全量，myo-inositol 100 mg L⁻¹、蔗糖 30g L⁻¹，使用 0.01 N NaOH 與 0.01 N HCl，調整 pH 至 5.7，生長調節劑比例含量分為五種 (1) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹、(2) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹、(3) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 1 mg L⁻¹、(4) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹、(5) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 5 mg L⁻¹，培養基經 121°C、1.2 kg cm⁻² 高溫高壓冷卻後使用。培養時，子房基部埋入培養基中，完成後於培養室中黑暗培養。每種培養基至少培養 6 個子房，觀察子房膨大情形並於培養後的三天以及第八天切開子房觀察胚珠發育情形，使用解剖顯微鏡 (Nikon, SMZ645, Japan) 拍照記錄。

結 果

一、黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花、非洲鳳仙花之開花階段調查

黃花鳳仙花，由花苞轉成黃色後至開放約需 3~5 天時間，待上萼片往上開展而二側花瓣往前伸出時即進入開花的第一天；開花後的第一階段為雄花期，由五枚花絲將柱頭緊密包覆，花絲之間的裂縫細微不易拆解，花絲末端往下延伸連接五枚花藥，分布為左二枚、

右二枚以及後部一枚，此階段白色塊狀花藥尚未開裂，花藥由花絲懸掛於空中，並未和花絲內包覆住的雌蕊接觸，此時期多維持 1 天；開花後第二階段，仍為雄花期，此時的花藥已開裂，由花朵正面可見花絲下方懸掛的花藥往二側展開，露出如棉絮般白色的花粉，此時，花絲間隙變大，較開花第一階段易與柱頭分離，後期花絲會由基部與小花梗分離而自動脫落，過程中並未見到花粉沾染於柱頭之情形，受氣溫環境影響，該階段約可維持 2 天；開花第三階段，進入雌蕊期，除花絲脫落外，雌蕊未有蜜液分部或柱頭開裂之情形，僅留子房於小花梗上 (圖 1)。

棣慕華鳳仙花於花朵發育第一階段，上部萼片往下蓋住囊狀萼片前端，距向後伸直，拆解花朵可見白色略為透明的花絲包覆柱頭，花絲共五枚彼此間的裂縫大，花絲往下延伸的末端則為花藥，此時期未見花粉；花朵發育第二階段，上萼片往上開展與囊狀萼片前端分離，視為開花第一天，花絲基部與花梗分離，此時，花藥已開裂釋放出白色略帶粉紫色之花粉，由解剖顯微鏡可觀察到柱頭前端已沾有花粉，而子房部位出現不規則突起；開花階段三，子房明顯伸長，此時，花瓣仍未掉落，花柱已明顯突出柱頭並沾有花粉 (圖 2)。

非洲鳳仙花開花第一階段雄蕊期肥厚的花絲共五枚包覆住雌蕊，花絲間隙於靠近花梗的基部部位有較大的裂縫，花絲末端與花藥緊密結合，此時期的花粉尚未釋放；開花後第二階段，雄蕊期，花藥開裂花粉釋放，此時期的花絲基部仍與花梗相連，花絲間的裂縫較第一階段較為開張，肥厚的花絲將柱頭包覆住，柱頭並未與花粉接觸；開花第三階段，雌蕊期，花絲由基部脫落，柱頭末端共五裂呈星形，並有黏液分布 (圖 3)。

二、黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花花藥開裂天數與花粉萌發率

黃花鳳仙花於開花階段二花藥已開裂可維持二天，第一天花粉萌發率為 41.3%、第二天為 11.7%；棣慕華鳳仙花於階段二僅維持一天，此時的花粉萌發率為 28.2%，於第三階段同樣維持一天，花粉萌發率為 13.8% (表 1)。

表 1. 黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花花藥開裂天數與花粉萌發率

Table 1. Effect of anther cracking days on pollen germination percentage of *Impatiens tayemonii* and *I. devolii*.

Anther cracking day	Pollen germination rate (%)	
	<i>I. tayemonii</i>	<i>I. devolii</i>
1	41.3	28.2
2	11.7	13.8

Value represented the mean of 3 replication.



圖 1. 黃花鳳仙花開花階段雌雄蕊構造變化。(A) 開花階段一，花朵略為開放，(B) 花絲緊密包覆柱頭，(C) 花藥未完全開裂，(D) 開花階段二，花朵開放，囊狀萼片較為立體，(E) 花藥完全開裂，花粉釋放，(F) 花絲裂縫增大，(G) 開花階段三，花朵開放，(H) 花瓣自基部脫離花梗，(I) 雌花期柱頭無蜜液。

Fig. 1. *Impatiens taymonii* flowering stage and the change of stamen and pistil. (A) The flower of stage 1, (B) Stage1, filaments covered stigma, (C) Stage1, the anther didn't crack yet, (D) The flower of stage2, (E) Stage2, the anther cracked, pollen released from anther, (F) Stage2, flower filaments covered stigma but became loose, (G) The flower of stage3, (H) Stage3, from the base of stalk, the petals dropped, (I) Stage3, female flower, the stigma didn't secrete mucus.



圖 2. 棣慕華鳳仙花開花階段與雌蕊構造之變化。(A) 開花階段一，距伸直花朵尚未完全開放，(B) 花絲緊密包覆柱頭，(C) 花藥尚未開裂無花粉分布，(D) 開花階段二，花朵開放，(E) 花絲與花梗基部分離，(F) 於花藥部位已略可看到柱頭，(G) 開花階段三，花瓣尚未掉落且子房明顯伸長，(H) 子房伸長略為膨大，(I) 柱頭前端已穿透花藥之分布區，並沾有花粉。

Fig. 2. *Impatiens devolii* flowering stage and the change of stamen and pistil. (A) Stage1, spur became straighten and flower not opening yet, (B) Stage1, filaments covered stigma closely, (C) Stage1, anthers didn't crack and didn't observe pollen distribution, (D) Stage 2, flower opening, (E) Stage 2, filaments separated from the base of stalk, (F) Stage 2, from the anther side showed a little part of stigma, (G) Stage 3, the petal had not dropped yet but can see the ovary elongation, (H) stage 3, ovary elongation and became bigger. (I) stage 3, the stigma got into the anther and contacted with pollen.



圖 3. 白色非洲鳳仙花'Accent'開花階段。(A) 開花階段一，雄蕊期花朵，花瓣略微皺摺未平整，(B) 花藥未開裂，(C) 花絲緊密包覆且未有花粉，(D) 開花階段二，雄蕊期花朵，花瓣平整，(E) 花藥開裂花粉分布，(F) 花絲緊密包覆，花粉裸露，(G)開花階段三，雌蕊期花朵，(H) 柱頭五裂並有黏液分布。

Fig. 3. *Impatiens walleriana* 'Accent' flowering stage. (A) Flowering stage one, staminate flower and petals surface are roughness, (B) The anther did not crack yet, (C) Filments closely cover the ovary and did not observe pollen, (D) Flowering stage two, flower staminate and petals surface are flatness, (E) The anther cracked and the pollen distribution, (F) Filments closely cover the ovary and observed pollen, (G) Flowering stage three, pistillate flower, (H) Stigma cracked into five parts and had mucilage.

三、非洲鳳仙花與黃花和棣慕華鳳仙花雜交試驗

(一) 非洲鳳仙花與黃花和棣慕華鳳仙花雜交後落果情形

鮭紅色非洲鳳仙花與黃花鳳仙花雜交於授粉後第 5.5 天落果，與棣慕華鳳仙花 5 天後落果；白色非洲鳳仙花與黃花鳳仙花雜交於授粉後第 4.9 天落果，與棣慕華鳳仙花於第 6.1 天後落果 (表 2)。

表 2. 非洲鳳仙花與原生種鳳仙花雜交後之落果時間

Table 2. Average capsuls dropping time of the *Impatiens walleriana* crossed with *I. devolii* and *I. tayemonii*.

Seed parent	Pollen parent	Capsule drop ^z (day after pollination)
<i>I. walleriana</i> (紅)	<i>I. devolii</i>	5.0
	<i>I.tayemonii</i>	5.5
<i>I. walleriana</i> (白)	<i>I. devolii</i>	6.1
	<i>I.tayemonii</i>	4.9

^z Each cross including at least 30 fruits.

(二) 鮭紅色非洲鳳仙花與黃花鳳仙花受精後觀察

鮭紅色非洲鳳仙花'Accent'與黃花鳳仙花雜交，於授粉後第 3 天，可觀察到合子後已極化的原胚 (圖 4A)或是部分尚處於具有助細胞及卵的未受精階段 (圖 4D);授粉後 6 天，除可觀察到原胚 (圖 4B)，另也觀察到一個球型胚，然而胚內部並未觀察到胚乳的存在 (圖 4E);授粉後第 8 天，胚囊內多呈現空心，於珠孔端有類似卵或是原胚的黑色模糊沉澱物 (圖 4C)，另也有類似未受精階段的胚囊內部構造，然而，此時胚囊內空腔佔有多數體積，助細胞輪廓模糊 (圖 4F)。

(三) 鮭紅色非洲鳳仙花與黃花鳳仙花種間雜交授粉與子房培養

鮭紅色非洲鳳仙花'Accent'與黃花鳳仙花雜交，子房培養 8 天後皆可觀察到子房膨大的現象，除了 NAA 1 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹ 所培養的子房膨大處位於基部 (圖 5B)，其餘皆呈現均勻膨大的情形；於同一時間，將子房培養之胎座連同胚珠一同取出，觀察到多數胚珠均已褐化或黑化，僅 NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹ 的培養基組合，子房內部胚珠褐化比例較低 (圖 5F)。

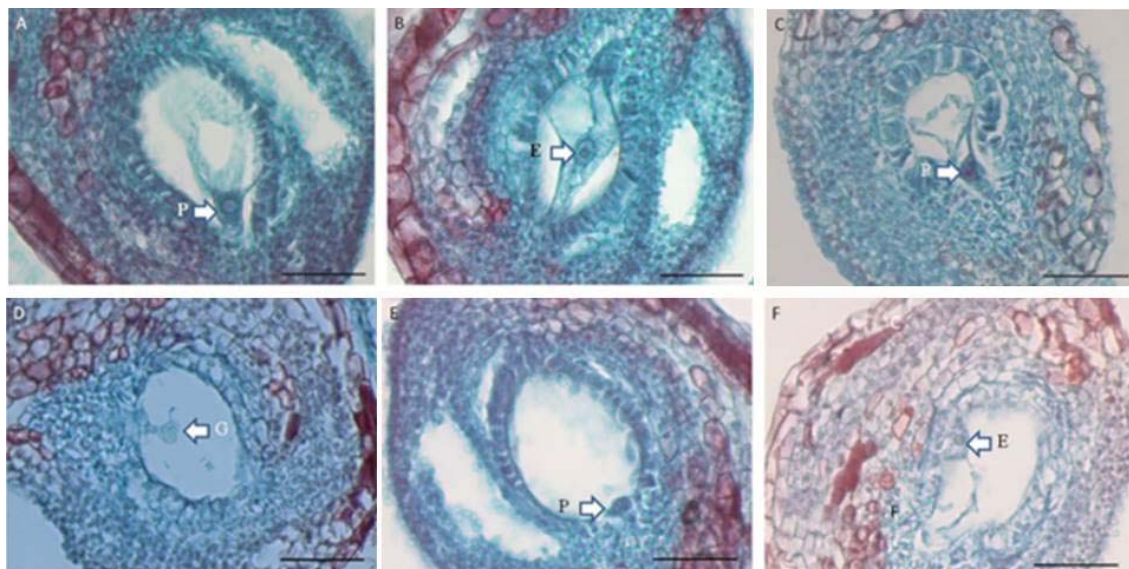


圖 4. 鮭紅色非洲鳳仙花'Accent'與黃花鳳仙花雜交胚發育。(A) 授粉後三天之原胚，(B) 授粉後三天未授精胚囊，(C) 授粉後六天原胚，(D) 授粉後六天之球形胚胚囊內無胚乳，(E) 授粉後八天原胚胚囊內無胚乳，(F) 授粉後八天未授精卵。E = 卵； G = 球形胚； P = 原胚。

Fig. 4. The development of embryo which used *Impatiens walleriana* 'Accent' salmon red to cross with *I. tayemonii*. (A) Pollination after 3 days, proembryo stage, (B) Pollination after 3days, egg stage, (C) Pollination after 6 days, proembryo stage, (D) Pollination after 6 days, globular stage had no endosperm, (E) Pollination after 8 days, proembryo stage and no endosperm, (F) Pollination after 8 days, egg stage. E = Egg; G = goulbar embryo; P = proembryo.

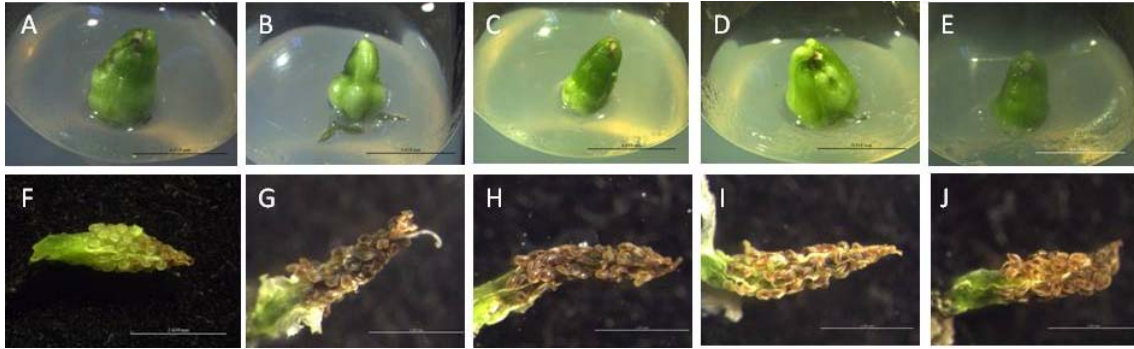


圖 5. BA、NAA 的濃度對鮭紅色非洲鳳仙花 × 黃花鳳仙花子房及胚珠發育之影響。(A、F) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹, (B、G) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹, (C、H) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 1 mg L⁻¹, (D、I) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹, (E、J) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 5 mg L⁻¹。(A - E) 子房培養八天後膨大情形，(F - J) 子房培養八天後胚珠生長情形。

Fig. 5. The effect of different BA and NAA concentration on the ovary culture of *Impatiens walleriana* (salmon red) × *Impatiens tayemonii*. (A, F) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.1 mg L⁻¹, (B, G) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹, (C, H) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 1 mg L⁻¹, (D, I) NAA 5 mg L⁻¹ + BA 0.5 mg L⁻¹, (E, J) NAA 1 mg L⁻¹ + BA 5 mg L⁻¹. (A - E) Ovaries after culture 8 days, (F - J) Ovules after ovary culture 8 days.

討 論

一、黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花、非洲鳳仙花開花階段調查

雌雄同花為鳳仙花屬植物之特徵，雄蕊期較雌蕊期早，雄蕊的上部花絲長度較下部長並且連接花藥，而花藥壁會相互黏合，整體構造花藥朝下，而不與內部柱頭接觸 (Fischer, 1822)。然而，亦有部分鳳仙花屬植物具有閉花授粉特性 (Waller, 1983; Shemske, 1978; Kulawiec *et al.*, 1996)。

黃色為目前商業上的非洲鳳仙花品種所欠缺的 (Uchneat, 2007); 黃花鳳仙花於囊狀化的萼瓣側邊有螢光粉紅色之線狀條斑分布相當豔麗，花器構造精巧特別，然而，多著生於葉片下方，較難被注意到。黃花鳳仙花於花朵發育過程中，花苞階段至開花後一天，花藥皆尚未開裂，直至花粉釋出，柱頭與花粉之間皆由花絲將兩者隔離、不相接處，此時期大多維持二天花絲即開始脫落，柱頭裸露進入雌花階段，試驗過程中尚有發現花絲連同花粉掉落於囊狀萼片，其後柱頭有接觸到花粉的情形，因此認為黃花鳳仙作為種子親時應於花藥未開裂時除雄較為適宜，

棣慕華鳳仙花為總狀花序，花型小巧且精緻，著生於莖頂，開放時相當明顯，具有囊

狀的下萼片，無論在花朵、花序形態與非洲鳳仙花相差甚遠。棣慕華鳳仙花花朵一旦開放即可見柱頭已伸入成熟且開放的花藥中並沾有自身的花粉，此觀察結果與王 (2010)於梅峰地區觀察棣慕華鳳仙花花朵發育的結果一致，顯見其為自交作物，與蕭 (2000)觀察到棣慕華鳳仙花遺傳變異極低，且族群內幾乎沒有遺傳變異的現象相互呼應；因此，棣慕華鳳仙花於人工授粉時，應於花苞時期除雄並套袋，隔日即可授粉。

非洲鳳仙花花器由花瓣五枚、萼片三枚組成，花朵形態平坦，花形圓整，為重要的花壇作物。花絲部位肥厚多汁，將花藥與花粉隔離，且花絲脫落進入雌花階段的第一天，柱頭前端尚未開裂且未有黏液分布，因此，非洲鳳仙花作為親本應可不必進行除雄。於非洲鳳仙作為花粉親方面，非洲鳳仙花花朵完全開放後多需等待 1~2 天才可見花藥開裂花粉釋放，在夏季溫度高的時期甚至未見花粉，雄蕊花藥緊閉皺縮，數天後掉落，進入雌蕊期；相似的結果在顧等 (2011)的研究指出高溫 (34°C)會導致非洲鳳仙花花粉萌發率顯著降低。而在開花天數與花粉萌發率方面非洲鳳仙花'Super Elfin'於花朵，以及花朵開放初期有較佳的萌發率 (顧等, 2011)，非洲鳳仙花'Accent rose'花藥開裂後開花天數對於花粉萌發率差異不大，又以花藥開裂的第二天較高。

二、黃花鳳仙花及棣慕華鳳仙花花藥開裂天數與花粉萌發率

植物授粉授精過程中，花粉於柱頭上萌發並藉由花粉管將精細胞送至胚珠。以體外培養的方式檢測花粉萌發率有助提高授粉後之著果率。試驗中黃花鳳仙花以及棣慕華鳳仙花之花粉均於花藥開裂第一天有較佳的花粉萌發率，可能與花粉活力受溫度、濕度、基因、花朵年齡、植株狀態等影響有關 (Johriand and Vasil, 1961)。

三、非洲鳳仙花與黃花和棣慕華鳳仙花種間雜交與子房培養

非洲鳳仙花'Accent'與黃花鳳仙花、棣慕華鳳仙花雜交授粉後皆出現子房脫落、無法順利產生種子的現象，證實種間雜交具有障礙；Arsumi (1980)進行非洲、印度以及新幾內亞三個地理區位之間的鳳仙花植物雜交，蒴果平均在授粉後的 4-7 天脫落，此外，由區域內鳳仙花雜交之親和性，推估非洲以及印度的鳳仙花屬植物演化相當早；因此，試驗中非洲鳳仙花與台灣原生棣慕華鳳仙花、黃花鳳仙花種間雜交障礙之原因應和地理隔閡以及演化的差異有關。

種間雜交落果現象在桃屬 (*Prunus*) (Liu *et al.*, 2007)、麒麟花 (*Euphorbia milii*) 等皆曾有相關報導；以非洲鳳仙花為種子親與黃花鳳仙花雜交，授粉後 3 天胚珠狀態為原胚期或是無受精狀態，於授粉後 6 天，摘取仍在植株上之子房進行切片，胚珠狀態停留在原胚階段，而以鮭紅色非洲鳳仙花為母本的切片圖中，有觀察到球形胚，然而，此時胚囊內已無胚乳，掛果 8 天的子房切片，胚珠內部空洞且胚囊內部細胞已降解，輪廓相當模糊，推測胚珠開始敗育與子房落果時間點相當接近，取授粉後 3 天至 6 天的胚珠或子房進行培養應較為適當，而導致非洲鳳仙花與黃花鳳仙花雜交胚敗育的原因似乎與胚乳發育異常、崩解有關；此現象會抑制養分供給 (Baskin and Baskin, 2005)，在蕓苔屬 (*Brassica*) (Grubor *et al.*, 1998)、風鈴草屬 (*Campanula*) (Roper *et al.*, 2015)種間雜交胚囊內部發育狀況皆曾出現類

似的情形。

太過幼小的胚直接進行培養會造成發芽率低 (Cai *et al.*, 2015)或是不易與母體分離(王等, 2006)等問題, 試驗中所採取授粉後五天之胚珠尚處於原胚階段, 且子房內胚珠分布緊密易造成損傷, 因此嘗試使用子房進行培養。

培養基種類為影響胚拯救成功與否的重要因子。有報導指出低濃度的 Auxin 對於胚發育有促進作用, 然而高濃度卻會造成胚萌發受到抑制甚至長出癒傷組織 (Raghavan and Srivastava, 1982); 然而, 以鮭紅色非洲鳳仙花為母本與黃花鳳仙花雜交, 子房於培養後八天均有膨大, 以 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA}$ 較其他比例的生長調節劑組合內部褐化速率較慢; 在繡球花屬 (*Hydrangea*) 種間雜交子房培養中以 $1/2\text{MS} + 1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 培養七天後誘導癒傷組織, 再繼代至無生長調節劑的培養基中有最佳的小植株生成率 (Cai *et al.*, 2015), 獼猴桃屬 (*Actinidia*) 植物種間雜交胚珠培養, 於球形胚及心臟形胚以前不添加任何生長調節劑, 可有最佳胚珠存活率 (Hirsch, 2001), 而於印度、非洲與新幾內亞地區鳳仙花屬種間雜交中的 66 個組合採用 $1\text{mg L}^{-1} \text{ NAA}$ 混合 $1\text{mg L}^{-1} \text{ BA}$ 成功使 38 個組合的胚珠萌芽 (Arsumi, 1985), 採用同樣的生長調節劑濃度組合於黃花鳳仙花與非洲鳳仙花 'Accent rose' 種間雜交胚培養, 胚珠於 20 天內全數褐化 (王, 2010), 由以上結果得知, 使用生長調節劑的種類、比例隨不同物種、不同雜交組合有極大的差異 (Sharma *et al.*, 1996), 在鮭紅色非洲鳳仙與黃花鳳仙子房培養上, 或許以 Auxin 高於 BA 的比例再進行微調並減短繼代時間, 有助提升成功率。

培養過程中子房內的胚株褐化、敗育情形多由柱頭端往基部部位進行, 推測可能為次氯酸鈉滅菌消毒後未切除受傷的部位所致; 試驗中採用子房培養之方式雖然子房皆有出現膨大, 但往往內部胚珠已開始敗育, 在未來研究中採用胚珠培養, 或是胚珠連同胎座培養會更有利於觀察及紀錄。

致 謝

試驗期間感謝森林系 廖學儀學長協助雪霸國家公園觀霧園區原生鳳仙花植株調查並提供許多植株生長習性的資訊; 感謝台中改良場埔里分場研究員 洪惠娟學姐協助蒐集試驗所需的台灣原生鳳仙花種質材料, 使試驗得以順利進行, 在此表示謝忱。

參 考 文 獻

王一霖。2010。鳳仙花屬植物之種間雜交障礙。國立台灣大學園藝學系研究所碩士論文。pp. 37、91。

- 王丹菲、代漢萍、雷家軍。2006。百合種間雜種胚離體培養研究。北方園藝 4: 157-159。
- 陳錦木、李窓明、葉德銘。2011。台灣花壇植物現況與展望。綠色城市與花卉產業國際研討會論文集。國立台灣大學園藝學系編印。pp. 154-167。
- 蔡淑華。1975。植物組織切片技術綱要。茂昌圖書有限公司。72 pp.。
- 蕭詩馨。1999。台灣產鳳仙花屬(鳳仙花科)植物同功酶變異之研究。國立台灣大學植物學研究所碩士論文。75 pp.。
- 顧亞東、張華麗、張西西。2011。非洲鳳仙花粉萌發條件及花粉活力研究。北方園藝 6: 65-67。
- Arsumi, T. 1980. *In vitro* culture of embryos and ovules of certain in compatible selfs and crosses among *Impatiens* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 629-631.
- Arsumi, T. 1985. Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 273-276.
- Baskin, C. C. and J. M. Baskin. 2005. Underdeveloped embryos in dwarf seeds and implications for assignment to dormancy class. Seed Sci. Res. 15(4): 357-360.
- Brewbaker, J. L. and H. K. Beyoung. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50(9): 859-865.
- Cai, M., K. Wang, L. Luo, H. T. Pan, and Q. X. Zhang. 2015. Production of interspecific hybrids between *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea arborescens* via ovary culture. HortScience 50(12): 1765-1769.
- Fischer, E. 2004. Balsaminaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). Families and Genera of Vascular Plants, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 20-25.
- Grey, W. C. 1983. A survey on *Impatiens* in cultivation. Plantsman 5: 86-102.
- Grubor, K. I., M. A. Stephen, and F. Larrey. 1998. Comparative morphological study of zygotic and microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. as revealed by scanning electron microscopy. Ann. Bot. 82: 157-165.
- Hirsch, A. M., R. Testolin, S. Brown, J. Chat, D. Fortune, J. M. Bureau, and D. D. Nay. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). Plant Cell Rep. 20: 508-516.
- Huang, T. C. 1977. Balsaminaceae. In: H. L. Li, T. S. Liu, T. C. Hung, T. Koyama, and C. E. Devol (eds.). Flora of Taiwan v. 3 Angiospermae. Epoch, Taipei, Taiwan. pp. 599-604.
- Johriand, B. M. and I. K. Vasil. 1961. Physiology pollen. Bot. Rev. 27(3): 325-337.
- Kulawiec, M., E. Teske, and R. Snieszko. 1996. The selfcompatibility in *Impatiens balsamina* (a long day variety). Acta. Soc. Bot. Pol. 65(1-2): 107-109.
- Liu, W., X. Chen, G. Liu, Q. Liang, T. He, and J. Feng. 2007. Interspecific hybridization of *Prunus persica* with *P. armeniaca* and *P. salicina* using embryo rescue. Plant Cell Tiss. Org

- 88(3): 289-299.
- Raghavan, V. and P. S. Srivastava. 1982. Embryo culture. In: B. M. Johri (ed.). Experimental embryology of vascular plants. Springer Verlag. Berlin. pp. 195-230
- Roper, A. C., H. Lutken, B. Christensen, K. Boutilier, K. K. Petersen, and R. Muller. 2015. Production of interspecific *Campanula* hybrids by ovule culture: exploring the effect of ovule isolation time. *Euphytica* 203: 643-657.
- Sharama, D. R., R. Kaur, and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants – A review. *Euphytica* 89: 325-337.
- Shemske, D. W. 1978. Evolution of reproductive characteristics in *Impatiens* (Balsaminaceae): the significance of cleistogamy and chasmogamy. *Ecology* 59(3): 596-613.
- Uchneat, M. S. 2007. *Impatiens: Impatiens wallerana*, In: N. O. Anderson (ed.). Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21 centry. Springer. Dordrecht. Netherland. pp. 277-299.
- Waller, D. M. 1983. Differences in fitniss between seedlings derived from cleistogamous and chasmogamous flowers in *Impatiens capensis*. *Evolution*. 38(2): 427-440.

Interspecies Hybridization Barriers of *Impatiens* and Ovary culture

Ting-Yu Lin ¹⁾ Ching-An Chiu ²⁾ Chen Chang ³⁾

Key words: *Impatiens walleriana* · *Impatiens tayemonii* · *Impatiens devolii*

Summary

The flower characters or color of native *Impatiens* in Taiwan is distinctive. The purpose of this research was tried to use *Impatiens devolii* and *I. tayemonii* as pollen parent to hybride with *I. walleriana* which was the important winter bedding plants in Taiwan. For *I. devolii*, during the period of initial flower bloom, the stigma will grow and reach into the anther. However, the stamen of *I. tayemonii* and *I. walleriana* will fall off and then pistil mature. The capsules which used *I. walleriana* 'Accent' salmon and white color to cross with *I. tayemonii* and *I. walleriana* were dropped, after the flowers pollinated four to six days. Anatomical pictures showed that the embryo sacs were empty after the flowers pollinated eight days. In some case, after eight days could find global embryo but in these embryo sacs had no endosperm. Using different ratio of plant growth regulators to conduct ovary culture, the browning will slow down if using $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In the future, fine tuning the concentration of this ratio and shorting the subculture time should be the methods which we can try.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Forestry, National Chung Hsing University.

Associate research fellow and adjunct division chief, Research and Development Division, Experimental Forest/Department of Forestry, National Chung Hsing University.

3) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Corresponding author.

