

孤挺花幼花序器內培養之體胚發生

洪志忠¹⁾ 王才義²⁾

關鍵字：幼花序、體胚形成

摘要：本研究以孤挺花兩個品種(*Hippeastrum hybridum* Hort. cvs. 'Apple Blossom', 'Lemon Lime')為材料，藉由不同培植體、植物生長調節劑組合及培養環境等方法，探討孤挺花不定芽再生、癒傷組織、體胚形成及再生植株獲得的過程。以總花序長 15 cm 及培植體正置最能誘導癒傷組織及不定芽形成。以小花梗培植體以 2 mg/l NAA 及 4 mg/l BA 對'Lemon Lime'品種誘導得到 6.89 個最多。體胚形成及植株再生方面，0.0.1-0.1 mg/l TDZ 能使胚性癒傷組織形成體胚率達 73.33%最高。

前 言

孤挺花為多年生草本熱帶球根花卉，為石蒜科孤挺花屬鱗莖類球根 (王，1995)，約有 80 幾個種(Huely *et al.*, 1992)。從 1799 年由 Mr. Johnson 交配出第一株交配種'Johnsonii'後，經過二百年來的交配育種，目前有登錄之品種有 800 多種，成為極受歡迎的園藝作物 (Veronica, 2004)。植物組織培養證實了植物細胞分化全能性的理論：不同部位的植物活細胞都有發育完整植物的潛力(黃與劉，1987)。藉由環境和內在因素的調控誘導植物分化，瓶內體胚發生提供了一種獨特且可用來展現生理、細胞和分子發育可塑性的方式。為因應未來新品種商業初期種苗供應及利用基因轉殖以創造新花色及特性之多樣性需求，亟需建立經由花序培養增殖大量種苗及經由癒傷組織、體胚形成再生植株的系統。本研究期藉由不同培植體、植物生長調節劑組合及培養環境等方法，來探討孤挺花之癒傷組織、體胚形成及再生的過程，以建立一個完善的植株再生系統。

1) 國立中興大學園藝學系碩士班學生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

材料及方法

一、試驗材料

本研究所採用之孤挺花品種取自中興大學精密溫室內容器栽培之孤挺花('Apple Blossom'及'Lemon Lime')，孤挺花定植於 25 cm 盆中，置於精密溫室內的滾動植床上，定期施肥與管理，提供實驗所需要的培植體來源。球根抽苔時切取花序備用，花序表面消毒 30 秒、於無菌下用 0.5% 次氯酸鈉溶液消毒 15 分鐘，清洗 3 次無菌水後切開總苞取出子房及小花梗培植體，橫切成 8-10 mm 的圓薄片備用。

二、培養基製備

1/2MS 固體培養基(Murashige and Skoog, 1962)添加 30 g/l 的蔗糖，試驗所添加的植物生長調節劑有： α -naphthaleneacetic acid (NAA)、6-benzylamino purine (BA)、N-phenyl-N' 1,2,3- thidiazol- 5-ylurea (TDZ)：Sigma Chemical, Mo., U.S.A。每一玻璃試管 (3 cm \times 10 cm) 注入 10 ml 的培養基，每一 125 ml 三角瓶注入 25 ml 培養基，培養基 pH 調整至 5.5-5.7 後利用滅菌釜 121°C 滅菌 20 分鐘。

三、培養環境條件

培養室內溫度維持在 25 \pm 2°C，以台灣東亞牌晝白日光燈為光源 (FL40D/38)，光合作用光子流 (photosynthetic photon flux density, PPF) 控制在 40-50 μ mol m⁻² s⁻¹，所有培養之光週期皆為明期 16 小時，暗期 8 小時。

四、試驗方法

(一) 花序成熟度對孤挺花培植體再生之影響

選取不同成熟度孤挺花 'Apple Blossom' 的總花序，成熟度定義為抽苔長 5 cm、15 cm、25 cm、苞片初開及第一朵花盛開等 5 等級，成熟度代號分別為：I、II、III、IV、V。小花梗及子房培植體接種於含 1 mg/l BA、1 mg/l NAA 的固體培養基。

(二) 培植體放置方式對培植體再生之影響

將孤挺花 'Apple Blossom' 抽苔 15 cm 長的花序切取下來，取出總苞裡的子房、小花梗及花被培植體分別以正置及倒置方法接種於含 1 mg/l BA、1 mg/l NAA 的固體培養基中。

(三) 生長調節劑對培植體再生之影響

將孤挺花 'Lemon Lime' 抽苔 15 cm 長的花序切取下來，取出總苞裡的子房及小花梗培植體正置接種於添加不同濃度 NAA (0、1、2 mg/l) 及 BA (0、1、2、4 mg/l) 濃度的固體培養基中。

以上實驗各處理每試管接種 2 培植體，共 10 重複。暗培養 4 週後移至光期，繼代至相同培養基，8 週後調查培植體膨大率、癒傷組織形成率、芽體形成數、根形成率及褐化率。

(四) NAA 及 TDZ 對癒傷組織體胚發生之影響

將 'Lemon Lime' 小花梗衍生之鬆散的癒傷組織接種於含不同濃度的 NAA (0、0.25、

0.5mg/l)及 TDZ (0.01、0.1、1 mg/l)的固體培養基中。各處理每三角瓶接種 0.2 g 胚性癒傷組織團，10 重複。12 週後調查培植體發根率、體胚形成率及褐化率。

(五) 組織學的檢定

將不同發育階段的體胚及叢生芽體以 FAA (Foemalin : Acetic acid : 50%alcohol=5 : 5 : 90)抽氣固定，以 50%酒精沖洗三次，再以 TBA (tert-butylalcohol)做序列脫水後，進行滲臘、包埋，將包埋材料的臘塊固定於台木上，以手動式旋轉切片機做 15 μ m 厚的連續臘帶，再黏貼於載玻片上經乾燥、脫臘、脫水，並以 Safranin O 與 Fast green 雙重染色之後，以封片膠(Euparal)封片，經 40°C 烘乾後，製成永久片，於光學顯微鏡下觀察及拍照。

五、統計分析

試驗採完全逢機設計 (Complete Randomized Design)，所得數據以變方分析 (Analysis of Variance) 測試顯著性，並進行最小顯著性差異測試 (Least Significant Difference Test ; LSD)，分析比較各處理之差異。

結 果

一、花序成熟度對孤挺花培植體增殖之影響

不同成熟度的‘Apple Blossom’小花梗及子房培植體型態發生如表 1 所示。培植體培養後的癒傷組織形成率在成熟度 I 表現最好，成熟度提高到 V 時，褐化率達百分之百。膨大率在 I、II、III 組中都是 100%，但隨著成熟度的增加，膨大率在 V 組裡只剩下 42% (子房)及 12% (小花梗)，V 等級多數培植體沒有膨大，培養 2 週後開始褐化死亡。芽體形成數子房培植體為 2.88 個，小花梗培植體為 3.22 個。

二、培植體放置方式對孤挺花培植體再生之影響

不同孤挺花‘Apple Blossom’花器培植體型態發生如表 2 所示。比較三種培植體再生效果顯示，花被培植體的癒傷組織形成率及褐化率在三種培植體中最高，不管是正置(86.67%)或是倒置(93.33%)。芽體再生數上，小花梗培植體再生數最多;分別為 3.2 個(正置)、1.45 個(倒置)。在癒傷組織誘導效果上，子房及小花梗培植體是倒置效果優於正置。芽體誘導數方面，子房及小花梗培植體皆為正置效果優於倒置。褐化率在子房及小花梗培植體的表現上，雖然倒置皆比正置來的高，但在統計上並無顯著性的差異。

三、生長調節劑對花器培植體再生之影響

‘Lemon Lime’子房培植體在對照組及施用 1 mg/l BA 情況下，觀察到培植體輕微褐化狀況，在其他處理組中則沒有褐化情形的發生。單獨或混和施用 NAA 及 BA 都能使癒傷組織發生，效果最好的是 2 mg/l NAA 配合 4mg/l BA (61.11%)。在膨大率方面，對照組有 88.89%的膨大率。芽體數(4.61)在最高濃度生長調節劑下表現最好。觀察根的形成，生長調節劑沒有太大的效果，最高只有 16.67% (表 3)。

表 1. 花序成熟度對孤挺花‘Apple Blossom’子房及花梗培植體形態發生上的影響
 Table 1. Effect of inflorescences maturity on morphogenesis from ovaries and pedicels of *Hippeastrum* ‘Apple Blossom’^z

Inflorescence maturity	Calli Formation (%)	Browning (%)	Protuberance formation (%)	No. of Bulblets / explant
Ovary				
I ^y	44	0	100	2.8a ^x
II	36	0	100	2.4b
III	30	6	100	1.8c
IV	6	88	66	0.2d
V	0	100	42	0 d
Pedicel				
I	88	0	100	3.2a
II	76	0	100	2.9a
III	74	10	100	1.8c
IV	12	80	44	0.4d
V	0	100	12	0.1d

z: Basal medium: 1/2MS with 1mg/l BA and 1mg/l NAA, 3% sucrose, 0.8% Difco-Bacto agar. Culture duration was 56 days.

y: Maturity I : 花序抽長 5cm ; Maturity II : 花序抽長 15cm ; Maturity III : 花序抽長 25cm ; Maturity IV : 苞片初開 ; Maturity V : 第一朵花盛開

x: Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

‘Lemon Lime’ 小花梗培植體以不同濃度生長調節劑刺激型態的發生，在褐化情形方面觀察到，在對照組有最明顯(16.67%)褐化情形，其他處理幾乎沒有褐化的發生。癒傷組織形成隨著處理濃度上升而增加，以 2 mg/l NAA 配合 4 mg/l BA 處理組效果最好(61.11%)。所有培植體皆有膨大的情形，單獨施用 BA，對於芽體及誘導即有效果，再加入 NAA 之後，促進效果增加倍，最好的處理是 2 mg/l NAA 配合 4 mg/l BA，芽體數為 6.89 個。生長調節劑對根的形成效果有限，只有零星幾個處理有反應(表 4)。

表 2. 放置方式對孤挺花‘Apple Blossom’幼花序培植體形態發生上的影響

Table 2. Effect of explant orientation on morphogenesis from immature inflorescence of *Hippeastrum* ‘Apple Blossom’^z

Explant orientataion		Browning (%)	Calli Formation (%)	No. of Bubbles / explant
Ovary	Normal	6.7	36.7 ^y	2.8a
	Inverted	13.3	53.3	0.8c
Pedicel	Normal	0	73.3	3.2a
	Inverted	13.3	90	1.5b
Perianth	Normal	33.7	86.7	0.2c
	Inverted	43.3	93.3	0c

z: Basal medium : 1/2MS with 1mg/l BA and 1mg/l NAA, 3% sucrose, 0.8% Difco-Bacto agar. Culture duration was 56 days.

y: Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

四、NAA 及 TDZ 對癒傷組織體胚發生之影響

將‘Lemon Lime’品種小花梗衍生之鬆散癒傷組織接種於含不同濃度的 NAA (0、0.25、0.5mg/l) 及 TDZ (0.01、0.1、1 mg/l) 的誘導培養基中。胚性癒傷組織培養在僅含有 TDZ 的培養基中有高體胚形成率，特別是在 0.01 及 0.1 mg/l TDZ 濃度下，體胚誘導率為 73.33%，提高 TDZ 或是增加 NAA 的含量對體胚形成助益很少。在根的形成上，高濃度的 TDZ 會促使根的形成，再加入 NAA 之後效果更為明顯，在 0.5 mg/l NAA 及 TDZ 0.1 mg/l 濃度下根的形成率達 93.33%，是所有處理裡面最高的。褐化率也是在 NAA 0.5 及 TDZ 0.1 mg/l 處理下最高(40%) (表 5)

五、組織學觀察

孤挺花‘Lemon Lime’品種體胚進行石蠟切片觀察上，可觀察到發育後期的球形胚(圖 1A)組織中具有明顯的兩極構造。另外取小花梗培植體進行石蠟切片觀察培植體的型態發生，小花梗培植體會由表皮細胞直接分化出芽體及叢生芽體(圖 1B)。

表 3. NAA 與 BA 對孤挺花‘Lemon Lime’子房培植體形態發生上的影響

Table 3. Effect of NAA and BA on morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum* ‘Lemon Lime’

Treatment ^z (mg/l)		Browning (%)	Calli Formation (%)	Protuberance formation (%)	No. of bulblets/ explant	Root formation (%)
NAA	BA					
0	0	5.5	22.2	88.8	0.9d ^y	0
0	1	5.5	27.7	88.8	1.4cd	0
0	2	0	22.2	100	2.8c	0
0	4	0	38.8	100	3.3ab	0
1	0	0	33.3	100	1.8d	5.5
1	1	0	44.4	100	0.6d	0
1	2	0	33.3	100	2.8b	16.6
1	4	0	50	100	2.9b	16.6
2	0	0	27.7	100	3.2b	5.5
2	1	0	33.3	100	4.2a	5.5
2	2	0	33.3	100	3.9a	0
2	4	0	61.1	94.44	4.6a	11.1

z: Ovaries explants were precultured on 1/2MS medium supplemented with NAA and BA for 4weeks and transferred on the same medium for 4weeks.

y: Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

討 論

實驗中，成熟度 I 的子房及小花梗培植體，癒傷組織形成率、芽體形成數在五種成熟度中表現皆最好(表 1)，隨著組織成熟度增加，再生效率下降，褐化反應增多，成熟度達第五階級時沒有再生反應。本實驗與 Ran 及 Simpson (2005)以抽長 5cm 的君子蘭總花序培養能誘導芽體的再生，長度高於 5cm 者無再生反應，及百合水仙以 1.5cm 未成熟花序培養比起成熟花序有更好的芽體再生及胚性癒傷組織誘導能力 (Martha *et al.*, 2006)的結果一致。

培植體的選取與再生潛力有相對的關係，而擺置方式更會因其在採穗株上的位置、年齡而改變內生荷爾蒙的運移而影響再生的結果。實驗結果中顯示，不論培植體種類，培植體皆以正置培養能促進不定芽生長，倒置能誘發癒傷組織形成(表 2)。實驗結果與水仙花 (Chen and Ziv, 2005)、野生仙客來 (Karam and Al-Majathoub, 2000)相同。一般認為，生長素

表 4. NAA 與 BA 對孤挺花‘Lemon Lime’花梗培植體形態發生上的影響

Table 4. Effects of NAA and BA on morphogenesis from pedicels of *Hippeastrum* ‘Lemon Lime’

Treatment ^z (mg/l)		Browning (%)	Calli formation (%)	Protuberance formation (%)	No. of bulblets/ explant	Root formation (%)
NAA	BA					
0	0	16.6	16.6	94.4 ^y	0.1d	0
0	1	5.5	16.6	88.8	1.6d	0
0	2	0	22.2	100	1.4d	0
0	4	0	22.2	100	1.3d	0
1	0	0	27.7	100	3.8c	0
1	1	0	44.4	100	4.7b	0
1	2	0	50	100	4.4bc	0
1	4	0	44.4	94.4	5.3ab	5.5
2	0	0	38.8	100	3.4cd	0
2	1	0	27.7	100	4.7b	5.5
2	2	0	44.4	100	5.4ab	5.5
2	4	0	61.1	100	6.9a	0a

z: Pedicels explants were precultured on 1/2MS medium supplemented with NAA and BA for 4 weeks and transferred on the same medium for 4 weeks.

y: means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

的運移是極性運輸，若培植體為倒置，培植體從培養基吸收生長素的效率則不理想。因此，倒置培植體內細胞分裂素及生長素的比例就會改變，因而影響到再生結果。

Hutchinson 等人(1997)認為，癒傷組織誘導期間生長素的存在，為大部分單子葉植物植株再生的必要條件之一，單獨使用或與細胞分裂素並施，才能使培植體繼續發育。百合水仙‘Yellow King’的 1.5 cm 未成熟花序培養在 2 mg/l BA 及 2 mg/l NAA 下，可以誘導具有分化能力的癒傷組織，且能再生植株(Martha *et al.*, 2006)。由表 3 及表 4 可以觀察到，單獨施用 NAA 誘導芽體形成時，培植體能不經癒傷組織直接形成芽體。小花梗培植體形成的芽體數有 6.89 個(表 4)。實驗結果 Huang 等人(2005 a,b)培養孤挺花子房及小花梗培植體，觀察到 1mg/l NAA 配合 5 mg/l BA 下，能形成最多的芽體的結果類似。

表 5. NAA 及 TDZ 對孤挺花 'Lemon Lime' 癒傷組織再生體胚之影響

Table 5. Effect of NAA and TDZ on somatic embryogenesis from calli of *Hippeastrum* 'Lemon Lime'.

Treatment ^z (mg/l)		Somatic embryogenesis (%)	Root formatin (%)	Browning (%)
NAA	TDZ			
0	0.01	73.3 ^y	26.6	0
	0.1	73.3	26.6	6.6
	1	33.3	60	33.3
0.25	0.01	13.3	86.6	6.6
	0.1	20	73.3	20
	1	13.3	80	20
0.5	0.01	20	80	26.6
	0.1	6.6	93.3	33.3
	1	13.3	93.3	40

z: NAA/TDZ, calli explants were precultured on 1/2MS medium supplemented with NAA and TDZ in the dark for 4weeks and transfered on the same medium in the light for 8 weeks.

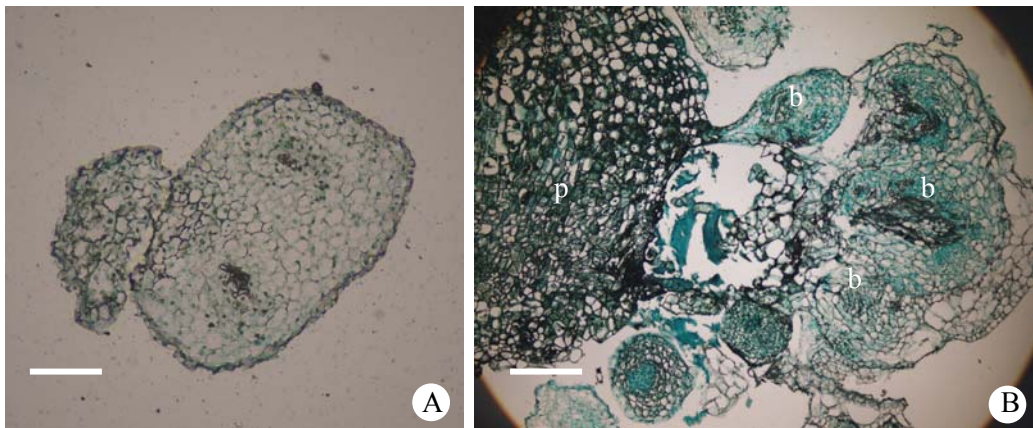


圖 1.孤挺花 'Lemon Lime' 之體胚形態切片。

Fig.1. The embryoid morphological development of *Hippeastrum* 'Lemon Lime'

A：球形胚末期。維管束系呈現封閉狀，且不與原培植體的維管束相連接。(Bar = 0.6 mm)

B：小花梗培植體於表面產生散生芽體。(Bar = 1.0 mm)

b：buds, p：pedicel

孤挺花 'Lemon Lime' 外觀鬆散癒傷組織培養在含有 TDZ (0.01-0.1 mg/l) 的 MS 培養基中體胚形成率為 73.33%，但併施 NAA 後效果下降(表 5)。Tuong Huan 等人(2004)利用 NAA 及 TDZ 誘導蕙蘭體胚形成，觀察到 0.01-0.1 mg/l TDZ 可以促進體胚形成，而併施 NAA 且隨濃度提高，體胚形成效果不佳。而仙客來葉片培養在含 TDZ 之培養基，觀察到細胞質中核糖體及多核糖體含量高於 BA 培養者，表示 TDZ 能促進蛋白質合成及細胞活性(Karam and Al-Majathoub, 2000)。表 5 中觀察到，施用 NAA 對於體胚的形成沒有明顯的作用，與 Junaid 等人(2006)實驗結果類似。

參 考 文 獻

- 王才義。1995。孤挺花。台灣農家要覽 農作篇(二)。豐年社。pp. 609-610。
- 黃怡君、劉麗飛。1987。植物體胚形成的研究與應用。科學農業。35(11,12):297-303。
- Chen J. and M. Ziv. 2005. The effects of starch metabolism and regeneration potentials of Twin-scales and inflorescence stem explants of *Narcissus tazetta*. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.* 41:816-821.
- Huang, C. L., K. C. Chang, and H. Okubo. 2005a. *In Vitro* Morphogenesis from Pedicels of *Hippeastrum hybridum*. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University.* 50:19-25.
- Huang, C. L., K. C. Chang, and H. Okubo. 2005b. *In Vitro* Morphogenesis from Ovaries of *Hippeastrum hybridum*. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University.* 50:27-33.
- Huely, A., M. Gruffiths, and M. Levy.(Eds.)1992. *Hippeastrum*. *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening.* Vol. 4. p570-573. Macmilla Press, London.
- Hutchinson, M. J., S. Senaratna, J. M. Tsujita, and, and P. J. Saxeian. 1997. Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47:293-297.
- Junaid, A., A. Mujib, M. A. Bhat, and M. P. Sharma. 2006. Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 84:325-332.
- Karam, N. S. and M. Al-Majathoub. 2000. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. *Sci. Hort.* 86:323-333.
- Martha, E., Pedraza-Santos, M. C. Lopez-Peralta, V. A. Gonzalez-Hernandez, and P. Sanchez Garcia. 2006. *In vitro* regeneration of *Alstroemeria* cv. 'Yellow King' by direct organogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 84:189-198

- Murashige, T. and F. Shoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Seabrook, J. E. A. and B. G. Cumming. 1977. The *in vitro* propagation of amaryllis (*Hippeastrum* spp. hybrids). *In Vitro.*13:831-836.
- Tuong Huan, L. V., T. Takamura, and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci.* 150:1443-1449.
- Ran, Y. and S. Simpson. 2005. *In vitro* propagation of the genus *Clivia*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*81:239-242.
- Veronica, M. R. 2004. *Hippeastrum* the gardener's amaryllis. Royal Horticultural Society. 44pp.

Somatic Embryogenesis from Cultured Developing Inflorescence of *Hippeastrum In Vitro*

Jhih- Jhong Hong ¹⁾ Tsai-Yih Wang ²⁾

Key words: Inflorescence, Somatic embryogenesis

Summary

To establish an efficient plant regeneration system, this study is to investigate the effects of explants, plant growth regulators and condition on including adventitious shoots, callus, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Hippeastrum* 'Apple Blossom' and 'Lemon Lime',.

The explants of maturity I, II and explant orientation normal can induce callus and adventitious shoot formation. The best result was found in that 'Lemon Lime' pedicel explant formation 6.89 adventitious shoots in medium containing 2 mg/l NAA and 4 mg/l BA. To induce embryogenic calli and somatic embryogenesis, TDZ 0.0.1-0.1 mg/l could induce the somatic embryo from embryogenic calli.

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

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

