

# 利用單一培養步驟誘導胡瓜體胚形成之研究

黃柄龍 蔡奇助<sup>1</sup>

## 摘要

本試驗之主要目的為探討以單一培養步驟(one-step)直接誘導胡瓜組織產生具高度胚分化能力癒合組織(embryogenic callus)培養模式，建立應用生物技術改造品種特性之組織培養再生系統。經胡瓜各組織培養反應顯示，只有子葉培植體在含 2mg/l 2,4-D、0.5mg/l NAA、0.5mg/l BA 及 9%蔗糖的 MS 培養基上，可由誘導的癒合組織直接產生體胚，其體胚形成能力約為 65%，可於單一癒合組織表層產生 1-20 個數目不等的已萌芽或未萌芽體胚。已萌芽的體胚經 1mg/l BA 培養，可進一步生長，再生成一完整的植株。

關鍵語：胡瓜、體胚形成、組織培養

## 前言

胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 為本省重要的蔬菜來源，每年田間栽培的瓜園常因受到病毒感染而造成嚴重危害。目前已知夏南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 是瓜類最猖獗的病毒之一，可危害胡瓜等多種瓜類作物，造成葉片嚴重嵌紋甚至萎凋，果實產生輪點或畸形，幼株受感染而無法開花結果，影響產量、品質甚鉅<sup>(1)</sup>。植物病毒病害目前尚無防治藥劑可使用，利用病毒鞘蛋白質基因 (CP gene) 轉殖，誘導具抗病性之品種為目前較有效的防治方法，近年來已有不少成功的例子<sup>(7,20)</sup>。而適當的組織培養系統更可提高基因轉殖效率，因此建立胡瓜組織培養再生系統，是進行基因轉殖的首要步驟。文獻指出，胡瓜組織培養可以器官或體胚發生的方式增殖，不過其誘導率均相當的低<sup>(21,23,24)</sup>；同時，培養過程均需得採用二個步驟 (two-step)<sup>(17)</sup>，三個步驟 (three-step)<sup>(22)</sup>，甚至使用杯狀濾紙橋或雙層培養 (double-layer culture) 等繁殖的方法<sup>(18)</sup>方可誘導體胚產生或使胚萌發，增加工作負荷。Chen 等人<sup>(14)</sup>利用木瓜根段培植體成功地以單一步驟的方式形成體胚分化及植株的再生；部分菊花小花培養也以同樣的方式完成<sup>(2,7)</sup>。因此本試驗之目的即為探討利用同一培養基誘導胡瓜各組織培植體直接產生癒合組織、體胚分化及體

---

<sup>1</sup>行政院農業委員會高雄區農業改良場助理、助理研究員。

<sup>2</sup>審查委員：廖麗貞所長，國立高雄師範大學生物科學研究所。

胚萌發，單一步驟培養的可能性，建立省工、高頻度癒合組織體胚形成模式，作為利用生物技術進行品種改良之參考。

## 材料與方法

本試驗所使用之胡瓜材料係農友種苗公司生產的大胡瓜雜交種。首先將種子以含 0.1% Tween 20 及 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 溶液，激烈振盪進行表面消毒 10 分鐘，以無菌水沖洗 3 次後，播種於含有 0.4mg/l Thiamine·HCl 0.5mg/l Pyridoxine·HCl 0.5mg/l Nicotinic acid、100mg/l Myo-Inositol 2.0mg/l Glycine、2% Sucrose 及 0.8% Merck agar 之 MS<sup>(19)</sup> 固體培養基 (pH=5.5)，待無菌實生苗株高約 6~7cm 時，將根、莖、子葉、第一本葉切成為長 4~5mm 之片段做為培植體，置於溫度 25±1℃，光強度 1,750 lux，每日 16 小時之光照環境下培養，進行以下的試驗。

### 一、不同植物生長調節劑濃度組合對直接誘導具體胚分化能力癒合組織之影響

將各部分器官培植體，培養於含 0.4mg/l Thiamine·HCl 0.5mg/l Pyridoxine·HCl 0.5mg/l Nicotinic acid、100mg/l Myo-Inositol 2.0mg/l Glycine、3% Sucrose 及 0.25% 水晶洋菜 (Gelrite) 的 MS 基本鹽類固體培養基 (pH=5.8)，利用 2mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)，配合 0.5mg/l NAA (naphthaleneacetic acid) 0.5mg/l kinetin 及 0.5mg/l BA (6-benzyladenine) 等數種不同植物生長調節劑 (plant growth regulator, PGRs) 組合之誘導培養基培養，2 週後調查癒合組織大小、質地色澤及胚狀體分化情形。

### 二、不同蔗糖濃度對直接誘導子葉產生具高度胚形成能力癒合組織之影響

碳水化合物濃度影響細胞生長及分化，高濃度蔗糖處理可誘導植株的再生<sup>(3)</sup>，同時可提高水稻等花藥培養之癒合組織植株再生率<sup>(13)</sup>。利用前述試驗結果，將子葉培植體切成長×寬為 6×5mm 大小，培養於含有 0.4mg/l Thiamine·HCl 0.5mg/l Pyridoxine·HCl 0.5mg/l Nicotinic acid、100mg/l Myo-Inositol 2.0mg/l Glycine、0.25% 水晶洋菜及 2mg/l 2,4-D、0.5mg/l NAA 0.5mg/l BA 的 MS 固體培養基中 (pH=5.8)，配合 3%、6%、9% 等不同濃度蔗糖處理，每一濃度處理 50 個子葉培植體，重複試驗二次，每週觀察癒合組織誘導率及形成體胚分化情形。

### 三、子葉培植體上下表皮接觸培養基對體胚誘導之影響

胡瓜子葉培植體可以經由逆分化形成癒合組織，由內部或外圍細胞再分化，形成體胚，是為間接體胚形成；然而體胚的誘導也可以由培植體

之細胞及細胞群，不經逆分化，直接產生擬胚 (embryoid)<sup>(2)</sup>。將子葉培植體分切成長×寬為 6×5mm 大小，並將上、下表皮分別朝下貼觸植床，本試驗採用前述試驗結果中可以單一步驟培養方式直接誘導具體胚分化能力癒合組織之培養基組成份，即含有 0.4mg/l Thiamine·HCl、0.5mg/l Pyridoxine·HCl、0.5mg/l Nicotinic acid、100mg/l Myo-Inositol、2.0mg/l Glycine、0.25%水晶洋菜、2mg/l 2,4-D、0.5mg/l NAA、0.5mg/l BA 及 9% 蔗糖的 MS 固體培養基 (pH=5.8)。探討子葉培植體不經逆分化途徑，直接形成體胚之可能性。

#### 四、子葉體胚形成之組織切片觀察：

在誘導體胚形成初期，最先分化之胚狀體與增殖之癒合組織外表形態以肉眼觀察極為類似，不易區別；利用植物組織石蠟切片觀察其細胞內部構造，可早期區分體胚之分化是為直接體胚形成，抑或經由逆分化之癒合組織再分化之間接體胚形成。本試驗組織切片技術係修改自蔡之方法<sup>(6)</sup>，其步驟如下：癒合組織以 FAA 固定液固定至少 12 小時 (配合真空抽氣 30 分鐘，直到樣品沈至瓶底且無氣泡冒出為止)；接著以 50% 乙醇清洗 3 次，再利用三級丁醇 (t-butanol) 與乙醇 (ethanol) 一系列混合液 (TBA-series) 進行組織脫水；之後於 55-58℃ 烘箱內操作，進行滲蠟，滲蠟至少隔夜，待三級丁醇完全揮發，更換一次新蠟。繼續滲蠟 3 天後進行埋蠟。切片厚度 8-9 μm，以 1% 藏紅 (safranin) 染色 3 小時，0.5% Fast-green 染色 5 分鐘後，以 Merck Entellen 膠封片，於光學顯微鏡下觀察及照相紀錄。

## 結 果

### 一、不同植物生長調節劑濃度組合對直接誘導具體胚分化能力癒合組織之影響

胡瓜癒合組織極易由根、莖、子葉、本葉等各部位培植體誘導產生，培養 2 週後即可見由切口處形成，不過，各種癒合組織的大小、質地、色澤等差異極大。由表一結果顯示，添加 2mg/l 2,4-D、0.5mg/l BA 及 0.5mg/l NAA (或不含) 較適合作為癒合組織誘導的培養基，莖、子葉、本葉等培植體較根容易形成癒合組織；但只添加 2mg/l 2,4-D 及 0.5mg/l BA 所誘得的癒合組織呈黃綠色至綠色之緻密結構，並有許多細根分化產生，只有在同時含有 0.5mg/l NAA 的培養基中，才可由子葉及本葉誘導產生大量鵝黃色且鬆軟的癒合組織。體胚分化只發生在含有 2mg/l 2,4-D、0.5mg/l NAA 及 0.5mg/l BA 組合之 MS 固體培養基中，培養 5 週後，由子葉培植體癒合組織的表層分化形成數顆圓體狀之胚原體，顯示此處

理較有可能誘得具體胚分化能力的癒合組織。

表 1. 不同植物生長調節劑組合對胡瓜不同部位培植體癒合組織誘導及體胚分化之影響

Table 1. Effects of different PGRs on callus inducing and somatic embryogenesis of different cucumber explants culture

Explants	PGRs combine (mg/l)				
	2,4-D 2 NAA 0.5	2,4-D 2 kinetin 0.5	2,4-D 2 BA 0.5	2,4-D 2 NAA 0.5 BA 0.5	2,4-D 2 NAA 0.5 kinetin 0.5
Root	+ <sup>a</sup> (yellow)	+(yellow green)	++(yellow green) (rooting)	NR	NR
Stem	++(green)	+(yellow)	+++ (yellow green)	NR	+(green)
Cotyledon	NR <sup>b</sup>	NR	NR	+++ (light yellow)(E <sup>b</sup> )	++(green)
Leaf	+(yellow white)	+(yellow)	++(green) (rooting)	+++ (light yellow)	+(green)

a.degree of callus inducing : 0, not visible ; +, on the cut surface ; ++, localized ;  
+++ , abundant.

b.E, embryogenesis ; NR, no reaction.

## 二、不同蔗糖濃度對直接誘導子葉產生具高度胚形成能力癒合組織之影響

本試驗結果發現，含有 3%、6%、9% 蔗糖濃度之培養基均極易誘導子葉培植體產生癒合組織，其誘導率皆達 100%；不過，經由 3% 或 6% 蔗糖處理者，癒合組織由培植體切口兩側形成，質地較緻密堅硬，各有約 70% 及 100% 的癒合組織有短細根長出，但二者均無體胚之分化。9% 蔗糖濃度之誘導培養基處理者，65% 的癒合組織呈鵝黃色，質地鬆軟，並於表層分化形成 1~20 個數目不等之胚狀體（圖 1A）因此，含有 0.4mg/l Thiamine·HCl 0.5mg/l Pyridoxine·HCl 0.5mg/l Nicotinic acid、100mg/l Myo-Inositol 2.0mg/l Glycine 0.25% 水晶洋菜、2mg/l 2,4-D 0.5mg/l NAA、0.5mg/l BA 及 9% 蔗糖的 MS 固體培養基，為誘導子葉培植體產生具體胚分化能力癒合組織之最適培養基，可以單一步驟的培養方式直接誘導胡瓜分化產生體胚。

## 三、子葉培植體上下表皮接觸培養基對體胚誘導之影響

將胡瓜子葉接種於上述誘導具體胚分化能力癒合組織之最適培養基中，當子葉培植體下表皮朝下接觸植床，結果誘得上表皮產生細胞團大

之鵝黃色質地鬆軟的癒合組織，並於表面形成體胚分化（圖 1A）；當子葉上表皮朝下培養，使具較多氣孔之下表皮朝上，則培植體捲曲變形，癒合組織形成量少，直接由內部及外圍細胞或氣孔部位分化形成體胚（圖 1B）。二種培養方式誘得的體胚均可在不需轉換培養基的情形下，使體胚萌發（圖 1C），隨即移植至僅含 1mg/l BA 之 MS 固體培養基中，可使萌發的體胚進一步生長，展葉（圖 1D），形成一完整的植株。

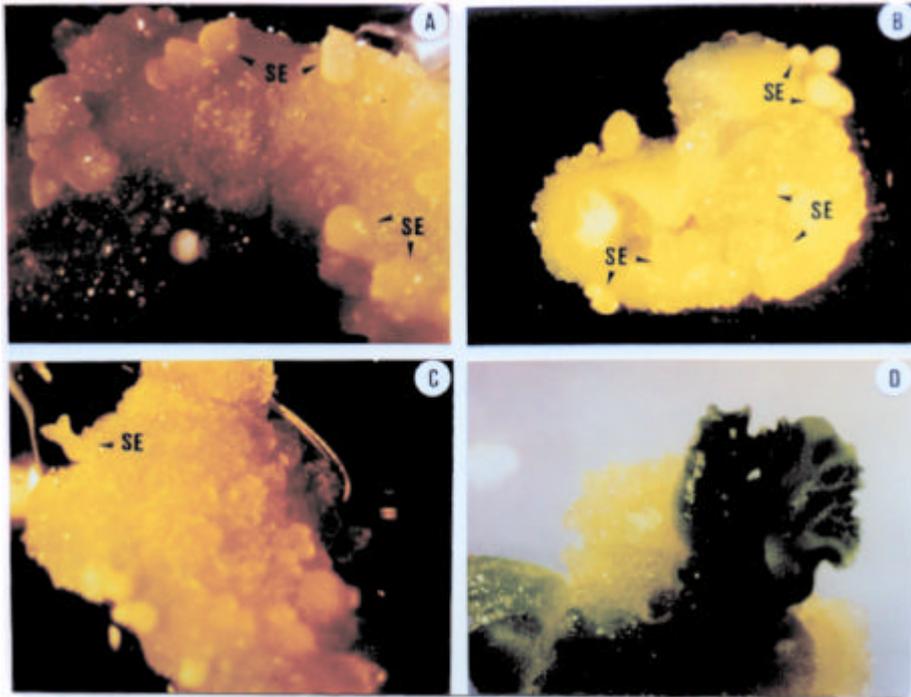


圖 1. 利用單一培養基誘導胡瓜子葉培植體產生癒合組織、體胚分化及植株再生

(A)經癒合組織之間接體胚(SE)形成 (B)不經癒合組織之直接體胚形成 (C)體胚的成熟及萌發 (D)具有葉片之發育良好的體胚苗

Fig 1. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of cucumber by using the one step culture medium

(A)Indirect somatic embryogenesis derived from cotyledon callus. (B)Direct somatic embryogenesis on the surface of cotyledon explant. (C)Somatic embryos (SE) could mature and germinate at the same medium. (D)A shoot with well developed leaf and hypocotyl.

#### 四、子葉體胚形成之組織切片觀察：

利用最適培養基誘導子葉培植體產生具高度胚分化能力癒合組織間接形成體胚或直接產生體胚，其培養過程中培植體細胞之變化由石蠟切片觀察得知，體胚由細胞團大之癒合組織表層產生（圖 2A,B）；當子葉上表皮朝下接觸植床培養，體胚由捲曲變形之下表皮面直接分化形成，不需經過逆分化之癒合組織階段（圖 2C,D）。

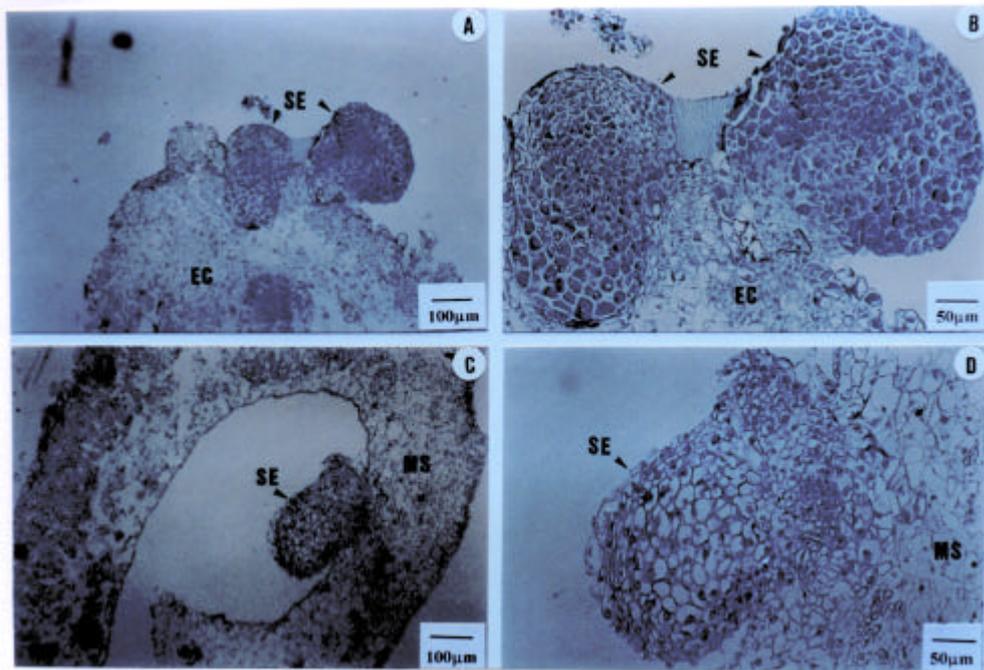


圖 2. 胡瓜體胚形成切片觀察

(A)(B)體胚(SE)經由癒合組織(EC)的表層產生(C)(D)體胚由葉肉組織(MS)形成  
 Fig 2. The observation of cucumber embryogenesis by paraffin thin section  
 (A)(B) Somatic embryos(SE) derived from the surface of cotyledon callus(EC).  
 (C)(D) Somatic embryos directly derived from the mesophyll tissue(MS) of cotyledon explant.

## 討 論

胡瓜利用不同的組織或器官，來誘導癒合組織及其植株再分化之能力，已見於部分的報告中<sup>(9,10,11,12,25)</sup>。然而，並無報告指出，可以單一培養基之一個步驟培養方式，直接誘導胡瓜體胚之產生。試驗顯示，根、莖、子葉、本葉均極易誘導癒合組織，不過僅有子葉培植體可形成體胚之分化，這與 Lou<sup>(17)</sup> 及 Rebecca<sup>(22)</sup> 等人同樣利用子葉材料，經轉換至分化培養基後，再誘導體胚分化之最終結果一致。但本試驗並無法重複 Levis<sup>(15)</sup> 等人利用幼莖及 Meira<sup>(18)</sup> 等以胚軸誘得體胚分化，推測差異的原因可能為：(1) 品種的不同：因為其是利用 'Carolina' 及 'Delilah' 品種，而本研究使用的材料為農友種苗公司生產的一代雜交品種，由於品種間差異大，可能產生不同的培養結果；(2) 前述研究並未指出莖段及胚軸在誘導癒合組織及體胚分化效果上的詳細數字，因此無法就其與本試驗品種做進一步的比較，以了解其誘導率及差異性。由此可知，具體胚分化能力之癒合組織的誘導，除了與培養基成分有關外，並和所使用的培植體有相當大的關連。

而在探討以單一步驟培養直接誘導胡瓜產生體胚分化能力之癒合組織的最適培養基方面，2mg/l 2,4-D 配合 0.5mg/l NAA 及 0.5mg/l BA 的效果較配合單獨的 NAA、kinetin、BA 或 NAA 與 kinetin 組合的效果佳；本試驗發現 NAA 與 BA 等植物生長調節劑的組合，較 NAA 與 kinetin 的組合易於形成癒合組織，此現象與 Litz 和 Conover<sup>(16)</sup>之結果相似。

高濃度的蔗糖處理會影響細胞生長或分化，並可誘導植株之再生<sup>(3)</sup>，本試驗將蔗糖濃度提高至 9% 時，較 3% 及 6% 處理者有較好的體胚誘導率；不過，DeBruijne 等人<sup>(14)</sup>則認為低濃度的蔗糖處理攸關木瓜體胚之分化與否。可能是因為物種的不同，才有如此大的差異性存在。

胡瓜培植體在體胚形成過程中，可能出現高頻率的不正常胚或死胚，同時再逆分化成癒合組織的比率亦相當高<sup>(9,10)</sup>，與木瓜行組織培養時，常於基部形成癒合組織的情形類似<sup>(4)</sup>，這也許是因為植物體不易吸收培養基內之營養所致<sup>(5)</sup>。本研究也曾遭遇相同的問題，除了企圖改進營養成分及培養方式外，萌發的體胚儘速移植至成長培養基，或許可以加以改善，同時，這亦正是本試驗極需再克服的問題。

## 誌 謝

本研究承本場生物技術研究室鍾素銘、顏屏合等多位同仁協助試驗，謹致謝忱。

## 參考文獻

1. 吳鳳儀、許秀惠、黃秋雄. 1994. 台灣瓜類作物之病毒. 瓜類作物保護技術研討會專刊. P. 159-167.
2. 陳榮五、黃勝忠、許謙信、陳彥睿. 1996. 花卉組織培養實用技術手冊. 台灣省台中區農業改良場編印.
3. 黃文理. 1998. 滲透壓誘導水稻癒合組織植株再生過程中碳水化合物代謝之研究. 台大農藝系博士論文.
4. 黃柄龍. 1992. 木瓜不同物種之組織培養與染色體倍加方法之研究. 中國文化大學生物科技研究所碩士論文.
5. 楊居成. 1988. 木瓜及番茄幼莖組織培養再生植株. 中興理工學報. 25: 93-108.
6. 蔡淑華. 1975. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書有限公司出版. 台北.
7. 歐貞君. 2000. 菊花原生質體培養與基因轉殖系統之建立. 國立高雄師範大

學生物科學研究所碩士論文.

8. Beachy, R. N. 1990. Coat protein mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. hytopathol.* 28: 451-474.
9. Bergervoet, J. H. W., F. van der Mark, and J. B. M. Custers. 1989. Organogenesis versus embryogenesis from long-term suspension cultures of cucumber( *Cucumis sativus* L. ) . *Plant Cell Rpt.* 8: 116-119.
10. Cade, R. M., T. C. Wehner, and F. A. Blazich. 1990. Somatic embryos derived from cotyledons of cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 691-696.
11. Chee, P. P. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *HortScience* 25: 792-793.
12. Chee, P. P. and D. M. Tricoli. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Rpt.* 7: 274-277.
13. Chen, C. C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Sci.* 18: 905-906.
14. Chen, M. H., P. J. Wang, and E. Maeda. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *Plant Cell Reports* 6: 348-351.
15. Levis, W. H. and O. L. Chambliss. 1979. In vitro propagation of *Cucumis sativus* L. *HortScience* 14(1): 22-23.
16. Litz, R. E. and R. A. Conover. 1978. In vitro propagation of papaya. *HortScience* 13(3): 241-242.
17. Lou, H. and S. Kako. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cucumber. *HortScience* 29(8): 906-909.
18. Meira, Z. and G. Gadas. 1986. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber( *Cucumis sativus* L. ) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Science* 47: 115-122.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
20. Nelson, R. S., S. M. McCormick, X. Delannay, P. Dube, J. Layton, E. J. Aderson, M. Kaniewska, R. Porsch, R. B. Horsch, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco virus. *Bio/Technology* 6: 403-490.

21. Novak, F. J. and M. Dolezelova. 1982. Hormone control of growth and differentiation in the in vitro cultured tissue of cucumber (*Cucumis sativus* L. ). *Biologia* 37: 283-290.
22. Rebecca, M. C., T. C. Wehner, and F. A. Blazich. 1990. Somatic embryos derived from cotyledons of cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(4): 691-696.
23. Sekioka, T. T. and J. S. Tanaka. 1981. Differentiation in callus cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L. ). *HortScience* 16: 451.(Abstract)
24. Wehner, T. C. and R. D. Locy. 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. *HortScience* 16: 759-760.
25. Ziv, M. and G. Gadasi. 1986. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L. ) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Sci.* 47: 115-122.

# Direct somatic embryogenesis in cucumber by using one-step culture method

Ping-Lung Huang and Chi-Chu Tsai<sup>1</sup>

## Abstract

The cotyledon explants of cucumber cultured in MS medium containing 2mg/l 2,4-D, 0.5mg/l NAA, 0.5mg/l BA and 9% sucrose could produce somatic embryo derived from the induced callus by one step culture. The frequency of somatic embryo induction was about 65%. It could produce 1–20 germinated or ungerminated somatic embryos per callus derived from the surface layer of calli after cultured in above medium. The germinated somatic embryos could develop into intact plants after treatment with 1mg/l BA in culture.

Key words: *Cucumis sativus* L., Somatic embryogenesis, Tissue culture

---

<sup>1</sup>Assistant and assistant researcher, Kaohsiung District Agricultural Improvement Station, Council of Agriculture, Pingtung, Taiwan, R.O.C.