

毛豆花藥培養癒合組織之切片觀察及繼代培養¹

韓青梅 陳庚鳳 洪啓善²

摘 要

毛豆之花藥具有四個花粉囊，花粉囊相連處具有結締組織。毛豆花藥所產生之癒合組織經切片觀察結果得知，花藥培養形成之癒合組織除由花粉細胞增殖產生外，其他細胞如花藥壁或結締組織細胞均可增殖。因此癒合組織由何種細胞增殖而來目前從外表無法判定其來源，但由切片觀察獲知早期形成之癒合組織大多來自於體細胞，而花粉細胞形成之癒合組織出現較晚。如欲確定癒合組織之來源，尚待未來誘導成植株後以檢查根尖染色體判定之。癒合組織之繼代培養以MS基本培養基搭配5mg/L Kinetin、0.05mg/L IAA、CW 150ml最適宜。

關鍵詞：毛豆、花藥癒合組織、繼代培養、石蠟切片。

前 言

利用花藥組織培養誘發單元體植物是為最直接之方法(陳、張,1974)，經染色體加倍後可成為一固定之品系，直接提供育種選拔之材料，在育種方面具有實用性與發展潛力(蔡,1986)。然因分化成植株之比率不高(陳、張,1974)在實用上尚有很大差距，若能解決此一難題，達成量產之目標，必可直接提供品種改良之用。毛豆實為大豆，過去有關花藥組織培養之研究報告不多，據尹光初等(1982)報告採用變動的B5培養基，成功誘致大豆花藥單元體植株。Ivers等(1974)以Nitschs或Miller培養基，只誘起芽體並未形成單元體植株，因此大豆花藥培養目前並無穩定之技術可資遵循。本場於民國八十一年開始進行毛豆栽培品種高雄2號及高雄3號之花藥培養，目前已經建立癒合組織形成之體制，為了瞭解癒合組織源自於何種細胞，又如何維持癒合組織之活力以利再生，故而進行癒合組織之石蠟切片觀察及繼代培養最適培養基與培養時期之研究。

-
1. 本試驗承行政院農業委員會經費補助，謹致謝忱。
 2. 台灣省高雄區農業改良場助理研究員、副研究員及約僱員。

材料與方法

一、供試材料：培養高雄二號及高雄三號花葯產生之癒合組織。

二、實施方法：

(一)石蠟切片觀察：將材料利用石蠟切片法製成永久片觀察其發育情形，石蠟切片法之步驟如下：

1. 樣品→FAA固定4小時(配合抽氣1小時)。
2. 50%乙醇洗3次。
3. TBA—系列脫水。
4. 滲蠟：60~65°C烘箱內操作，將小蠟塊以 3~5次加入，最後一次加入蠟塊經 2小時後打開瓶蓋，令瓶內第三級丁醇全部蒸發。
5. 埋蠟：將瓶內之材料和液狀蠟倒入模型內，置於冷水中快速冷卻凝固成蠟塊。
6. 切片：切片厚度10 μ 。
7. 展片：蠟帶放於載玻片上展開於46°C之hot plate 上乾燥1~3天。
8. 染色和脫水：經一系列之染色和脫水。
9. 滴巴爾森液覆上蓋玻片。

(二)癒合組織之繼代培養：毛豆花葯培養產生之癒合組織，繼代培養於MS、N6、B5等不同培養基，並搭配2,4-D、Kinetin、IAA等植物生長調節劑，觀察其生育情形。

結果與討論

一、石蠟切片觀察：

毛豆之花葯經石蠟切片觀察得知有四個花葯囊，花葯囊相連處有維管束組織，稱之為結締組織(connective tissue)，花葯壁由兩層細胞組成，花葯囊內之花粉大而圓，充滿活力(圖1-A)。培養一星期之花葯，其花粉細胞仍然大而圓有活力(圖1-B)，培養3星期白化死亡之花葯，經石蠟切片觀察結果得知，花葯壁細胞稍有增殖後就不再增生，花葯囊內之花粉細胞大多變形為多角形，已失去活力，故白化而死亡(圖1-C)。培養3星期之花葯，未白化死亡者已長出癒合組織，經石蠟切片觀察之結果發現癒合組織均由結締組織細胞之增殖產生，花葯囊因受擠壓變成一小空間，內部花粉細胞因無法分裂，且得不到養分，以致變形而失去活力，此所生成之癒合組織大部分來自體細胞(圖1-D)。培養4星期之花葯，經石蠟切片觀察結果發現，由花葯壁之細胞及結締組織細胞共同發育成癒合組織，花葯囊受擠壓變小，囊內之花粉細胞變形死亡而無法分裂(圖2-A)。亦有由花葯囊之細胞壁細胞增殖，而花葯囊受擠壓變形，內部之花粉細胞無養分供應變形死亡(圖2-B)，此等癒合組織均屬於體細胞形成，圖2-C左邊花葯囊內之花粉細胞分裂突破花葯壁後長出癒合

組織，而右邊之花藥囊內之花粉粒則未發育形成空腔。培養5星期之花藥，經石蠟切片觀察結果發現，花藥囊內之花粉細胞正常分裂而形成之癒合組織已經突破花藥囊壁生長(圖2-D)。由以上之切片觀察結果得知，花藥培養所誘導之癒合組織有些是由花藥壁與結締組織細胞形成，有些為花粉細胞增殖形成，而此種癒合組織正是我們所希望者，但花藥內各種細胞均有機會增殖為癒合組織，無法由外表判定其來源為花粉細胞或花藥體細胞。故需待未來誘導成植株後以檢查根尖染色體判定之。但由以上之形態切片觀察可獲知早期出現之癒合組織，大多數為體細胞形成，而花粉細胞形成之癒合組織一般出現較晚，此與尹氏等(1982)之試驗報告相同。

二、癒合組織之繼代培養：

毛豆花藥培養產生之癒合組織生長約4星期後，必須行繼代培養以維持活力，否則即會產生褐化、萎縮之現象，究竟以何種培養基為繼代培養最適宜之培養基，本場進行了一系列之試驗。其結果由表1得知，在相同之MS基本鹽類分別添加1、5、10、15 mg/L 四種濃度之2,4-D，培養2-3星期後，全部褐變而死亡。因此得知植物生長調節劑2,4-D，其濃度無論高低(1~15mg/L)對毛豆花藥培養誘導產生之癒合組織，行繼代培養時均不適宜。雖然2,4-D在許多植物之花藥培養，尤其是水稻，為誘發癒合組織最重要之植物生長調節劑(陳1980，蔡1986)，但對毛豆花藥癒合組織之繼代培養表現較差。接著又以N6、B5及MS三種培養基分別加入5 mg/L Kinetin、0.05mg/L IAA及150ml/L椰子水(CW)，進行毛豆癒合組織繼代培養。由表2結果得知，在N6培養基下，全部褐變而死亡，在B5培養基下呈現黃色，組織鬆軟，雖可存活但不會增殖。在MS培養基下，不但癒合組織呈現鮮綠色、組織緊密、活力旺盛且會增殖。因此毛豆花藥癒合組織之繼代培養以MS培養基搭配Kinetin 5 mg/L、IAA 0.05mg/L 及椰子水(CW) 150ml/L，且以每4星期培養一次為最適宜。

表1. MS基本鹽類搭配不同濃度之2,4-D對毛豆花葯癒合組織繼代培養之影響

Table 1. Effect of medium on the subculture of anther callus of vegetable soybean.

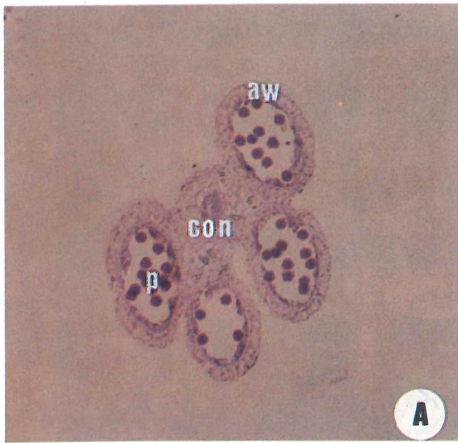
基本鹽類	植物生長調節劑			癒合組織生育情形	
	2.4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	IAA (mg/L)	高雄 2 號	高雄 3 號
MS	1	0	0	褐化死亡	褐化死亡
MS	5	0	0	"	"
MS	10	0	0	"	"
MS	15	0	0	"	"

表2. 不同之培養基搭配相同之植物生長調節劑對毛豆花葯癒合組織繼代培養之影響

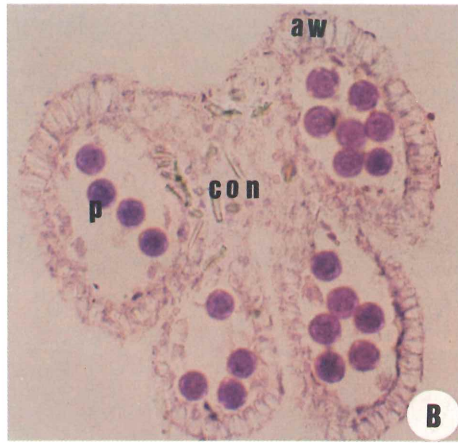
Table 2. Effect of media on the subculture of anther callus of vegetable soybean.

基本鹽類	植物生長調節劑			癒合組織生育情形	
	Kinetin (mg/L)	IAA (mg/L)	C.W (ml/L)	高雄 2 號	高雄 3 號
N6	5	0.05	150	褐化死亡	褐化死亡
B5	5	0.05	150	黃色，組織鬆軟，雖能存活不增殖	黃色，組織鬆軟，雖能存活不增殖
PT*	5	0.05	150	鮮綠色，組織緊密，會增殖	鮮綠色，組織緊密，會增殖

* PT: 基本鹽類為MS配方。



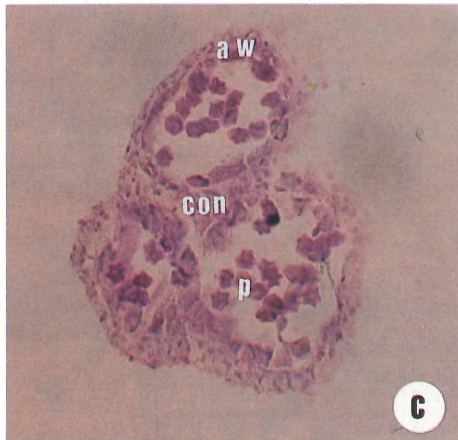
A: 未培養前之花藥切片
An anther before culture (100 X)



B: 培養一週之花藥切片
Anther after 1 week in culture (200 X)

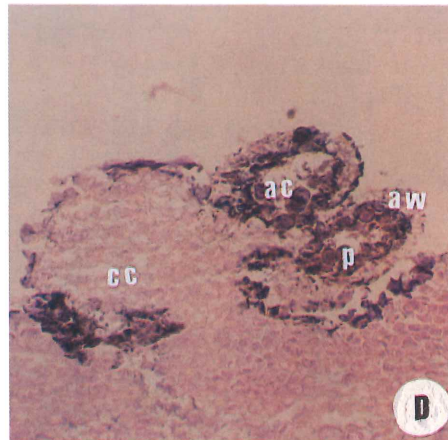
con: 結締組織 (connective tissue)
aw : 花藥壁細胞 (anther wall)
p : 花粉 (pollen)

con: 結締組織 (connective tissue)
aw : 花藥壁細胞 (anther wall)
p : 花粉 (pollen)



C: 培養三週白化死亡之花藥切片
White and dead anther after
3 weeks in culture (200 X)

con: 結締組織 (connective tissue)
aw : 花藥壁細胞 (anther wall)
p : 花粉 (pollen)



D: 培養三週之切片
Anther after 3 weeks in culture (100 X)

cc : 結締組織長出之癒合組織
(callus of connective tissue)
aw : 花藥壁細胞 (anther wall)
p : 花粉 (pollen)
ac : 花粉囊 (anther sac)

圖1. 毛豆花藥培養三週內各時期之解剖觀察

Fig.1 Anatomy observation on the third week in anther culture of vegetable soybean by paraffin section method.

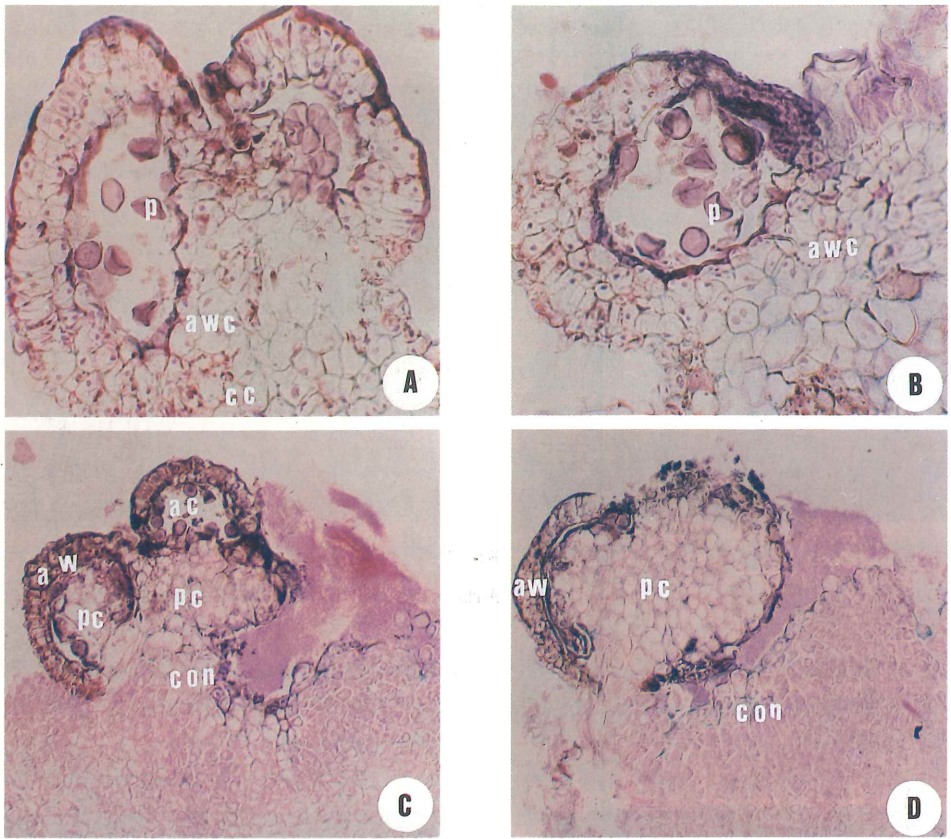


圖2. 毛豆花藥培養第四、五週之解剖觀察

Fig.2 Anatomy observation on anther culture of vegetable soybean during growth forth and fifth week by paraffin section method.

- A: 培養四週之切片，花藥壁及結締組織長出癒合組織之情形
 Callus formed from anther wall and connective tissue after 4 weeks in culture. (400 X)
 cc: 結締組織長出之癒合組織 (callus of connective tissue)
 awc: 花藥壁癒合組織 (anther wall callus)
 p: 花粉 (pollen)
- B: 培養四週之切片，花藥壁細胞長出癒合組織之情形
 Callus formed from anther wall after 4 weeks in culture. (400 X)
 awc: 花藥壁癒合組織 (anther wall callus)
 p: 花粉 (pollen)
- C: 培養四週之切片，左邊花藥囊內花粉細胞長出癒合組織，右邊則未發育之情形
 Callus formed from pollen cell of left anther sac, but right's undivided after 4 weeks in culture. (100X)
 aw: 花藥壁細胞 (anther wall)
 pc: 花粉癒合組織 (pollen callus)
 con: 結締組織 (connective tissue)
- D: 培養五週之切片，花藥囊內花粉細胞長出癒合組織之情形
 Callus formed from pollen cell after 5 weeks in culture. (200 X)
 aw: 花藥壁細胞 (anther wall)
 pc: 花粉癒合組織 (pollen callus)
 con: 結締組織 (connective tissue)

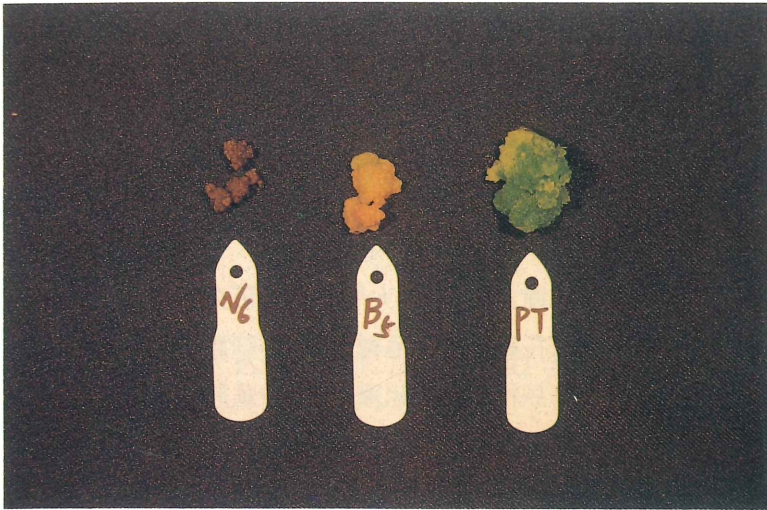


圖3. 不同培養基對毛豆花藥癒合組織繼代培養之影響
Fig.3 Effect of media on the subculture of anther callus of vegetable soybean.



圖4. 毛豆花藥癒合組織繼代培養於 PT 培養基之情形
Fig.4 A anther callus of vegetable soybean subculture in PT medium.

參考文獻

1. 尹光初、朱之根、徐振、陳力、李學湛、柴風雲. 1982. 大豆花粉植株的誘導及其雄核發育的研究. 大豆科學 1 : 69-75.
2. 陳其昌、張顯. 1974. 花藥培養與單原體育種. 科學農業 22 : 95-103.
3. 陳榮銳. 1980. 水稻癒合組織之誘導及其分化的組織學研究. 中央研究院植物研究所專刊第四號 p. 5-14.
4. 廖芳心. 1981. 蘆筍之花藥培養. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
5. 蔡新聲. 1986. 禾本科作物之花藥培養與品種改良. 中華農學會報新 134 : 1-23.
6. 戴國興、鄭隨和. 1990. 栽培豆科作物之組織培養. 中華農學會報新 149 : 42-52.
7. Iver, D. R., R. C. Palmer and W. R. Fehr 1974. Anther culture in soybean. Crop Sic. 14 : 891-893.
8. Tang, W. F., T. S. Lin, and C. S. Cheng, 1973. Effect of Kintein and auxin on the callus formation of anther culture of soybean. Agriculture Association of China New 83:1-7.