

## 葫蘆科作物單倍體植株培養 及其染色體倍加

林葦庭<sup>1</sup>、廖玉珠<sup>2</sup>、張珈錡<sup>3</sup>

### 一、前言

葫蘆科作物在傳統育種需要六到八年的自花授粉才能獲得同質基因的純系(Gemes Juhasz *et al.*, 2002)，利用育成雙單倍體植株(double haploid lines, DHL)可以大幅度縮短育種時間。然而依據 Claveria 等人(2005)、Dolcet-Sanjuan 等人(2006)及 Galazka 等人(2013)研究報導指出葫蘆科作物育成雙單倍體植株利用輻射處理後花粉進行人工授粉，所得到胚生成植株染色體為雙單倍體機率非常低。本篇介紹葫蘆科作物主要育成單倍體植株方式及其染色體倍加方法。

### 二、葫蘆科作物單倍體之誘導方法

葫蘆科作物單倍體植株育成技術發展於1950年代，在1958年Swaminathan和Singh從X-ray處理後種子成功獲得第一棵葫蘆科作物之單倍體植株，接續也以未授粉子房培養獲得夏南瓜(*Cucurbita pepo*)單倍體植株(Dumas de Valux and Chambonnet, 1986)。到了1980年代發展花藥培養企圖獲得冬南瓜(*C. maxima*)、中國南瓜(*C. moschata*)、夏南瓜(*C. pepo*)、絲瓜(*Luffa cylindrica*)、*Trichosanthes dioica* Roxb之單倍體植株，

但僅得到2N植株或者無法再生植株之胚及癒傷組織(Kumar *et al.*, 1984 和 Shail and Robinson, 1987)。2013年Galazka等人將過去20年葫蘆科作物之單倍體誘導相關報導彙整成表一，以下將逐一介紹目前主要誘導單倍體植株方法。

#### (一) 輻射處理花粉進行人工授粉：

透過輻射處理花粉進行人工授粉，再取種子進行胚拯救是目前成功獲得葫蘆科作物單倍體植株最主要途徑之一(Galazka *et al.*, 2013)。輻射花粉育成單倍體植株成功與否，受培植體之基因型和活力、輻射劑量、授粉的季節、胚拯救技術等因子影響，近幾年的研究著重在基因型及輻射劑量的探討。

基因型對單倍體誘導的影響，會因作物不同有些差異，在甜瓜將父母本互相交換，對單倍體的誘導有顯著影響(Ficcadenti *et al.*, 1995)，但以黃瓜27種不同的品系進行研究，證明不同的基因型對單倍體的誘導率沒有很大差別(Caglar *et al.*, 1996)。

輻射劑量是成功誘導單倍體的關鍵因素，多以臨界致死量或半致死劑量做為適宜劑量標準。葫蘆科作物常用輻射源為鈷( $Co^{60}$ )產生之 $\gamma$ 射線，因其有良好組織穿透力、高誘導突變率、低殺傷力等優點(Kurtar and Balkaya, 2010)。黃瓜適用之劑量為100~900 Gy，其中以200~300 Gy輻射時單倍體誘導率最高(Niemirowicz *et al.*, 1989)；

<sup>1</sup> 種苗改良繁殖場繁殖技術課 前聘用助理

<sup>2</sup> 種苗改良繁殖場繁殖技術課 援外技士

<sup>3</sup> 種苗改良繁殖場繁殖技術課 助理研究員

Lotfi *et al.*, 1999; Przyborowski *et al.*, 1994) ; 西瓜常用之劑量為 200~300 Gy (Przyborowski *et al.*, 1994; Sari *et al.*, 1994) ; 甜瓜是 500~2500 Gy (Sauton *et al.*, 1987) ; 南瓜有效劑量則較低為 25~50 Gy (Kurtar *et al.*, 2002)。

## (二) 胚珠及子房培養：

相較於輻射處理後花粉進行人工授粉，未授粉之胚珠及子房培養獲得葫蘆科之單倍體例子較少，僅有黃瓜、甜瓜及夏南瓜等作物(Galazka *et al.*, 2013)。胚珠及子房培養育成單倍體植株成功與否，受培植體胚發展階段、培養基組成和預處理之溫度等因子影響。

胚發展階段選擇往往是單倍體誘導成功與否的關鍵，黃瓜雌配子體的組織學研究指出，發展的晚期階段對於胚胎誘導是最適合的，在多數的報導中也得到證實(Gemes Juhasz *et al.*, 2002; Dumas de Vaultx, 1985; Metwally *et al.*, 1998)。

不同的培養基組成誘導出植株效率也不盡相同，Metwally 等人(1998)使用MS培養基添加 1-5 ppm 的 2,4-D 與 3% 蔗糖，Xie 等人(2006)使用 N6 培養基添加 2,4-D、NAA、BA ; Gemes Juhasz 等人(2002)研究出一種 CBM medium (添加 0.02 ppm thidiazuron 和 4% 蔗糖)，為現在主要誘導葫蘆科的培養基之一。

以高溫或低溫度進行預處理方面，Metwally 等人(1998)指出在溫度預處理後之夏南瓜單倍體誘導相較於未處理誘導率較佳。Gemes Juhasz 等人(2002)發現利用高溫(28 或 35 )處理黃瓜子房會增加植物體內 Thidiazuron 濃度，進而大幅增加胚胎

及植株獲得之數目。

## (三) 花藥培養：

葫蘆科作物透過孤雄生殖(androgenesis) 途徑獲得單倍體植株較為困難，在黃瓜、西瓜、甜瓜、夏南瓜研究中多形成癒傷組織，僅有少數的單倍體植株(Lazarte and Sasser, 1982; Dryanovska and Ilieva, 1983; Xue *et al.*, 1983; Shail and Robinson, 1987)。花藥及花粉培養育成單倍體植株成功與否，受培植體基因型、小孢子發育時期、培養基組成和預處理之溫度等因子影響。

在過去十年黃瓜的花藥培養研究報告指出，最適合做為花藥培養之小孢子發育時期為中至晚單核邊緣時期(mid to late uninucleate stage)。Ashok Kumar 等人(2003)研究指出經過兩天低溫處理之花藥可提高至 54.4% 的單倍體與二倍體植株再生率。相似的結果在 Xie 等人(2005)、Ashok Kumar 等人(2004) 也獲得證實，更進一步的探討培養基的組成，添加不同來源的醣類(蔗糖，麥芽糖，葡萄糖和果糖)、氨基酸(谷氨酰胺，甘氨酸，精氨酸，天冬酰胺和半胱氨酸)和多胺(腐胺和亞精胺)，顯示放置添加 0.44 ppm 2,4-D、0.22 ppm BA 及 8.5 % 蔗糖、29 ppm 亞精胺酸之 B5 培養基中，每個花藥平均成功獲得約再生 1.6 個癒傷組織和 1.35 株苗。

## 三、葫蘆科作物單倍體之染色體倍加方法

在葫蘆科作物研究中取得再生雙單倍體植株機率較低，以往皆藉由單倍體植株進行染色體複製後獲得。常用之染色體倍加方法為處理秋水仙素(Caglar and Abak, 1997; Nikolova and Niemirowicz-Szczytt, 1996; Sari and Abak, 1996; Yetisir and Sari,

2003), Caglar和Abak(1997)研究指出秋水仙素濃度和處理時間影響黃瓜單倍體染色體倍加效率,以 0.5%秋水仙素溶液浸泡 4 小時,植株可提高至 60%之染色體倍加率。

Niemirowicz-Szczytt 等人(1995)研究指出,利用黃瓜單倍體植株之葉片作為培植體,不須加任何染色體倍加藥劑即可自然誘發染色體倍加,在Sztangret-Wisniewska 等人(2006)研究更顯示此方法比秋水仙素處理倍加效率更好。

## 四、結論

葫蘆科作物第一個單倍體植株生成於 1950 年代,到目前為止葫蘆科家族中大多數種品種(如黃瓜、南瓜、甜瓜和西瓜等經濟作物)中已成功獲得其單倍體和雙單倍體

植株。但儘管這些雙單倍體做為育種純系父母本可縮短育種年限,但因雙單倍體獲得機率低,目前使用雙單倍體植株進行育種的資料相對較少。利用輻射處理後花粉人工授粉所得之單倍體植株是目前主流方式,多數報導不斷優化此法並將它規劃於育種當中。相較於前者,胚珠、子房及近期研究學者專注之花藥培養所獲得植株較為困難,需要進一步研究。經由輻射處理花粉人工授粉後獲得的植物主要是單倍體,而胚珠、子房和花藥培養可同時誘導出單倍體、雙單倍體甚至多倍體、非整倍體、混合體植株。在染色體倍加技術的報導中,主要以處理秋水仙素之間接倍加方法的應用較多,但黃瓜研究中單倍體植株葉片直接再生植株之染色體倍加方法也是可行的。

表一、葫蘆科作物不同誘導單倍體途徑之誘導結果

| 作物                          | 方法       | 結果                             | 文獻  |
|-----------------------------|----------|--------------------------------|---|
| 西瓜<br>( <i>C. lanatus</i> ) | 花藥培養     | 植株                             | Li <i>et al.</i> , 2008   |
|                             |          | 單倍體植株                          | Xue <i>et al.</i> , 1983  |
|                             | 輻射處理花粉授粉 | 單倍體植株                          | Gürsöz <i>et al.</i> , 1991; Sari <i>et al.</i> , 1994  |
| 甜瓜<br>( <i>C. melo</i> )    | 胚珠或子房培養  | 植株                             | Lofti <i>et al.</i> , 2003  |
|                             |          | 二倍體植株、單倍體植株、多倍體植株              | Ficcadenti <i>et al.</i> , 1999   |
|                             | 輻射處理花粉授粉 | 單倍體植株                          | Sauton and Dumas de Vaulx, 1987, 1988; Sauton, 1988; Cuny <i>et al.</i> , 1993; Ficcadenti <i>et al.</i> , 1995; Yanmaz <i>et al.</i> , 1999; Lim and Earle, 2008; Godbole and Murthy, 2012 ; Sari <i>et al.</i> , 2010 |
|                             |          | 二倍體植株、單倍體植株、多倍體植株              | Lofti <i>et al.</i> , 2003; Ari <i>et al.</i> , 2010  |
| 黃瓜<br>( <i>C. sativus</i> ) | 花藥培養     | 癒傷組織                           | Xie <i>et al.</i> , 2005; Suprunova and Shmykova, 2008; Abd El-Maksoud <i>et al.</i> , 2009   |
|                             |          | 植株                             | Lazarte and Sasser, 1982;   |
|                             |          | 二倍體植株、單倍體植株、雙單倍體植株、多倍體植株、四倍體植株 | Ashok Kumar <i>et al.</i> , 2003, 2004; Ashok Kumar and Murthy, 2004  |
|                             | 胚珠或子房培養  | 胚                              | Gemes Juhasz <i>et al.</i> , 1997   |
|                             |          | 植物                             | Suprunova and Shmykova, 2008  |
|                             |          | 單倍體植株、雙單倍體植株                   | Dirks, 1996 (patent)  |
|                             |          | 單倍體植株、雙單倍體植株、多倍體植株             | Gemes Juhasz <i>et al.</i> , 2002   |
|                             |          | 二倍體植株、單倍體植株、雙單倍體植株、四倍體植株       | Diao <i>et al.</i> , 2009   |

表一、葫蘆科作物不同誘導單倍體途徑之誘導結果

| 作物                                      | 方法              | 結果                                   | 文獻   |
|---|-----------------|--------------------------------------|--|
| 黃瓜<br>( <i>C. sativus</i> )             | 花粉培養            | 癒傷組織                                 | Suprunova and Shmykova, 2008   |
|   |                 | 植株                                   | Zhan <i>et al.</i> , 2009  |
|   |                 | 單倍體植株、<br>雙單倍體植株、                    | Chen <i>et al.</i> , 2008 (patent)   |
|   | 輻射處理花粉授粉        | 單倍體植株                                | Truong-Andre, 1988; Sauton, 1989; Przyborowski and Niemirowicz-Szczytt, 1992; Niemirowicz-Szczytt <i>et al.</i> , 1995; Çağlar and Abak, 1996 a, b, 1999 a, b; Faris <i>et al.</i> , 1999; Lofti <i>et al.</i> , 1999; Niemirowicz-Szczytt <i>et al.</i> , 2001; Claveria <i>et al.</i> , 2005; Dolcet-Sanjuan <i>et al.</i> , 2006; Sztangret-Wisniewska <i>et al.</i> , 2006; Lofti and Salehi, 2008 |
|   |                 | 非整倍體植株、<br>單倍體植株                     | Przyborowski and Niemirowicz-Szczytt, 1994   |
|   |                 | 非整倍體植株、<br>二倍體植株、<br>單倍體植株           | Niemirowicz-Szczytt and Dumas de Vaulx, 1989   |
|   | 二倍體植株、<br>單倍體植株 | Le Deunff and Sauton, 1994           |  |
| 冬南瓜<br>( <i>C. maxima</i> )             | 花藥培養            | 癒傷組織                                 | Shail and Robinson, 1987   |
|   | 輻射處理花粉授粉        | 單倍體植株                                | Kurtar and Balkaya, 2010   |
| 南瓜<br>( <i>C. moschata</i> )            | 花藥培養            | 癒傷組織                                 | Shail and Robinson, 1987   |
|   | 胚珠或子房培養         | 胚                                    | Kwack and Fujieda, 1988  |
|   | 輻射處理花粉授粉        | 單倍體植株                                | Kurtar <i>et al.</i> , 2009  |
| 夏南瓜<br>( <i>C. pepo</i> )               | 花藥培養            | 植株                                   | Shail and Robinson, 1987   |
|   |                 | 非整倍體植株、<br>二倍體植株、<br>單倍體植株           | Mohamed and Refaei, 2004   |
|   |                 | 二倍體植株、<br>單倍體植株                      | Metwally <i>et al.</i> , 1998  |
|   | 胚珠或子房培養         | 癒傷組織                                 | Shail and Robinson, 1987   |
|   |                 | 植株                                   | Xie <i>et al.</i> , 2006   |
|   |                 | 單倍體植株                                | Dumas de Vaulx and Chambonnet, 1986; Gémes Juhász <i>et al.</i> , 1997;  |
|   |                 | 二倍體植株、<br>單倍體植株                      | Metwally <i>et al.</i> , 1998 a; Shalaby, 2007   |
|   |                 | 非整倍體植株、<br>二倍體植株、<br>單倍體植株、<br>多倍體植株 | Chambonnet and Dumas de Vaulx, 1985  |
|   |                 | 輻射處理花粉授粉                             | 單倍體植株  |
| 絲瓜<br>( <i>L. cylindrical</i> )         | 花藥培養            | 二倍體胚、<br>單倍體胚                        | Kumar, 1984  |
| bitter melon<br>( <i>M. charantia</i> ) | 花藥培養            | 癒傷組織                                 | Tang <i>et al.</i> , 2012  |
| pointed gourd<br>( <i>T. dioica</i> )   | 花藥培養            | 二倍體胚                                 | Kumar, 1984  |

(Galazka *et al.*, 2013)