

## 麒麟花種間雜交之胚拯救

吳俊瑤<sup>1)</sup> 朱建鏞<sup>2)</sup>

關鍵字：胚培養、授粉後天數、培養基、癒傷組織

**摘要：**本試驗以麒麟花 *Euphorbia milii* 'Olympus'和'Supo Roek'兩品種與 *E. geroldii* 原生種進行種間雜交，期能選出無刺且開花性佳之麒麟花。

'Olympus'或'Supo Roek'和 *E. geroldii* 的雜交易早期落果。從胚培養試驗發現，以授粉後第 7 天的胚，培養在含 1/4 MS 鹽類濃度之培養基中有較佳的胚根伸長率。'Olympus'和 *E. geroldii* 以授粉後第 3 天的胚，培養在全量 MS 培養基有較佳的癒傷組織率。'Supo Roek'和 *E. geroldii* 以授粉後第 6 天的胚，培養在 1/4 MS 鹽類濃度之培養基，或以授粉後第 8 天的胚，培養在 1/2 MS 鹽類濃度之培養基有較佳的癒傷組織率。

本試驗在'Olympus'和 *E. geroldii* 胚培養實驗中，透過胚直接萌發成植株的方式共獲得 24 株後代，而在'Supo Roek'和 *E. geroldii* 胚培養實驗中，共獲得 32 株後代，其中 29 株是透過胚直接萌發成植株，另外 3 株是透過癒傷組織誘導再生出的植株。

### 前 言

麒麟花(*E. milii* Des Moulins)多刺且生性強健極為耐旱，花期長且具觀賞價值。近年盆花市場由泰國引進許多大花麒麟花品種，也逐漸受到消費者喜愛。麒麟花色彩豐富且容易栽培，深具做為盆花潛力，但是多刺的特性也讓國人難以普遍接受。但以麒麟花之無刺近緣種進行種間雜交時，因早期落果而無法得到後代，所以本文藉由胚拯救的方式進行育種，希望開發新的無刺品種，以提高麒麟花在市場的接受度。

---

1) 國立中興大學園藝系碩士班學生。

2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

## 材料與方法

### 一、育種材料

試驗材料為 *Euphorbia milii* 'Olympus' 和 *Euphorbia milii* 'Supo Roek' 兩品種以及原生種 *E. geroldii*。所有材料均栽培於台中縣霧峰鄉中興大學園藝試驗場之遮雨棚下。

### 二、花器發育與植株形態之觀察

自 2007 年 6 月起至 2008 年 6 月，在台中縣霧峰地區自然日長下，調查 'Olympus'、'Supo Roek' 和 *E. geroldii* 的花期與植株性狀。

### 三、胚培養

取 *E. geroldii* 當日成熟之新鮮花粉分別授於麒麟花 'Olympus' 與 'Supo Roek' 當日成熟之柱頭上授粉。授粉後分別在第 3 到第 8 天期間，每天將子房取下，以 1% 次氯酸鈉溶液震盪消毒 3 分鐘，再以無菌水沖洗 3 次，然後在無菌操作台裡將未熟種子取下，培養於裝有 10ml 培養基的試管中 (2.5cm×15cm；直徑×長度)。培養基含全量、1/2 或 1/4 之 MS 配方 (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma Chemical, Mo., U. S. A.)，30 g/l 之蔗糖 (台糖細粒特砂) 以及 9 g/l 之 Difco Bacto-agar。培養基經 0.1 N 之 NaOH 或 HCl 調整 pH 值為  $5.7 \pm 0.1$  後，置入殺菌釜中以  $121^{\circ}\text{C}$ ，蒸氣壓  $1.1 \text{ kg/cm}^2$ ，滅菌 15 分鐘。

取下培養的未熟種子先進行暗培養，約兩個星期後未熟種子會陸續發芽，當胚根伸出達 1 mm 長後，移至光照環境 (旭光 FL40D/38，提供光子流密度  $5 \pm 2 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ )。光週期為明期 16 小時，暗期 8 小時，培養室溫度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

經 1 個月培養後，調查胚萌發或產生癒傷組織的情形。癒傷組織另再繼代於誘導培養基以誘導芽體再生，誘導培養基成分為 1/4 MS 配方、8 mg/l 之 BA (6-benzylamino purine)、30 g/l 之蔗糖、2 g/l 之活性碳 (Carcoal, Sigma)、9 g/l 之 Difco Bacto-agar、pH 值  $5.7 \pm 0.1$ 。待植株長至 1 cm 高後，移出瓶外種植於 2 吋黑軟盆，初期栽培於遮蔭 50% 的環境下，待小苗再長出新葉後移至正常光照環境栽培。

除性狀調查分離比外，試驗設計採完全逢機設計 (completely randomized design)，試驗數據利用 CoStat 6.1 軟體 (CoHort software, Minneapolis, USA) 以鄧肯氏多變域分析 (Duncan's multiple range test) 比較 5% 差異顯著性。

## 結 果

### 一、花器發育與植株形態之觀察

所有材料在台中縣霧峰地區自然日長下均全年開花。開花時雌蕊先端成束隨著成熟而逐漸分離。此時柱頭膨大並產生黏液，而苞葉的顏色也會隨著開花後逐漸加深，腺體也會開始分泌蜜液。柱頭約有三天可以接受花粉，而後便褐化萎縮。雄蕊隨即從次苞 (bracteole)

抽出。雄蕊頂端二裂，各具一個花藥，花藥乾燥後會開裂，花粉附著於花藥上。雌蕊在接受花粉後會再集結成束，約一週後可以觀察到子房撐開次苞(圖 1)。

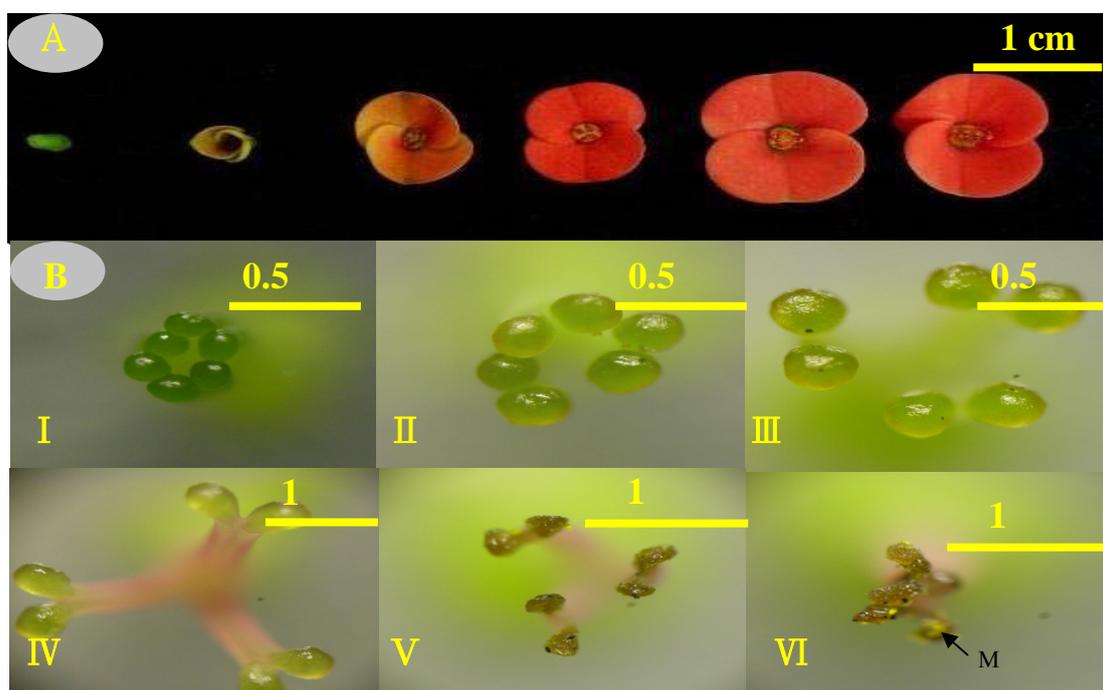


圖 1. (A)*E. milii* 'Olympus'花序之發育階段和相對階段。(B)雌花柱頭和雄花的形態。[ I ] 苞葉未開。[ II ] 苞葉初開。[ III ] 苞葉開始著色。[ IV ] 雌蕊成熟。[ V ] 柱頭萎縮。[ VI ] 雄花(M)盛開。柱頭隨著時間會逐漸膨大並分泌黏液，直到 IV達到成熟，此時花柱會轉變成紅色。

Fig. 1. (A)The development of *E. milii* 'Olympus' cyathium and relatively. (B)Different development stage of stigmas and male flowwes. ( I)bracts closed ( II)bracts just opened(III) bracts color visible ( IV ) pistil matured ( V ) stigmas withered(VI) male flowers(M) anthesis. Stigmas excrete mucilage with time. At stage IV, stigmas matured and style turned red color.

## 二、胚培養

*E. milii* 'Olympus' 為母本與 *E. geroldii* 雜交後，分別於授粉後第三天到授粉後第八天取胚，並培養在全量 MS 培養基。經胚培養後一個月後，胚根伸長的比例分別為 0%、9.1%、36.4%、9.1%、16.7% 或 25%；而癒傷組織形成率分別為 37.5%、9.1%、27.3%、9.1%、8.3% 或 25%。培養於 1/2MS 鹽類濃度的培養基，經胚培養後一個月後，胚根伸長的比例分別為 11.1%、11.1%、10%、15.4%、33.3% 或 50%；而授粉後第三天或授粉後六天取胚，其癒傷組織形成率分別為 11.1% 或 15.4%，而其餘處理均沒有生成癒傷組織。培養在 1/4MS 鹽類濃度的培養基，經胚培養後一個月後，胚根伸長的比例分別為 0%、12.5%、23.1%、33.3%、56.5% 或 26.3%；而於授粉後第五天到第八天取胚，其癒傷組織形成率分別為 23.1%、25%、8.7% 或 15.8%，而其餘處理均沒有產生癒傷組織(圖 2、圖 3、圖 4.A)。在'Olympus'和 *E. geroldii* 胚培養實驗中，透過胚直接萌發成植株的方式獲得 24 株後代。

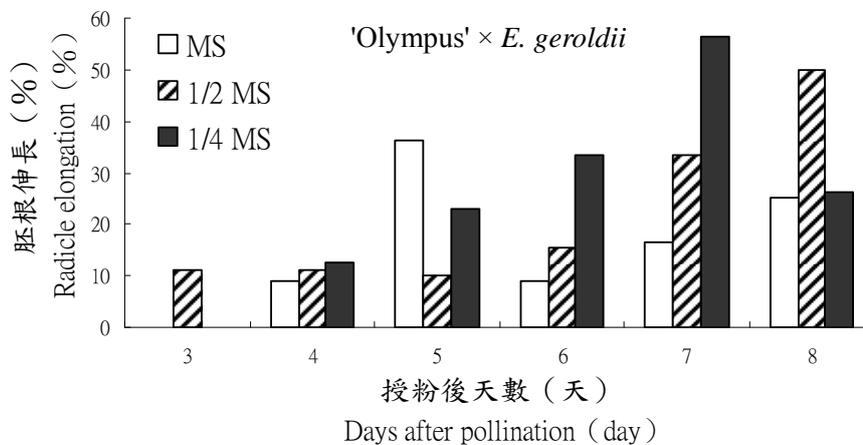


圖 2. MS 配方濃度與授粉後天數對麒麟花'Olympus' × *E. geroldii* 胚培養之胚根伸長的影響。  
Fig. 2. The effect of MS strength and days after pollination to radicle elongation in embryo culture of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii*

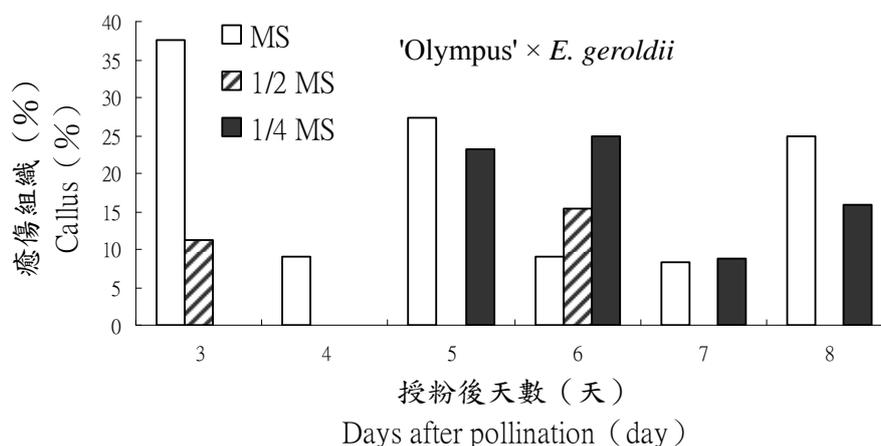


圖 3. MS 配方濃度與授粉後天數對麒麟花'Olympus' × *E. geroldii* 胚培養之癒傷組織形成的影響。

Fig. 3. Effect of MS strength and days after pollination on callus formation in embryo culture of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii*

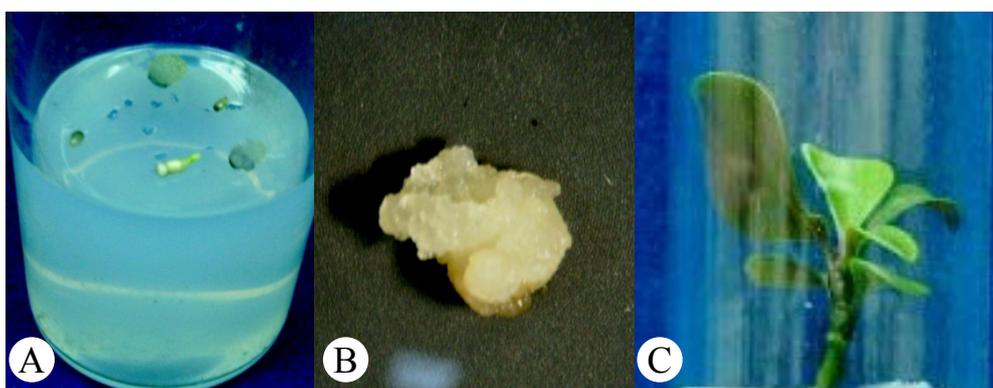


圖 4. *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* 之胚培養。(A)培養後 1 個月後，胚萌發與生成癒傷組織(B)白色鬆散之癒傷組織(C)即將移出的幼苗。

Fig. 4. Embryo culture of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii*. (A)embryos germinated and formed callus after one month. (B)white and loose callus. (C)plantlet ready for *ex vitro* culture.

*E. milii* 'Supo Roek'為母本與 *E. geroldii* 雜交後，分別取授粉後第三天到第八天的胚，培養在全量 MS 培養基，經胚培養後一個月後，在授粉後第三天、第七天或第八天取胚的處理，其胚根伸長的比例分別為 11.8%、25.0%或 16.7%，其餘處理則沒有胚根伸長的現象；而在授粉後第七天或第八天取胚，其癒傷組織形成率分別為 8.3%或 16.6%，其餘處理均沒有生成癒傷組織。另外分別於授粉後第三天、第四天、第六天或第七天取胚，培養於 1/2MS 鹽類濃度的培養基，經胚培養後一個月後，其胚根伸長的比例分別為 5.9%、5.9%、8.3%或 5.38%，而在授粉後第五天及第六天均沒有胚根伸長的現象；授粉後第三天、第五天、第六天或第八天取胚，其癒傷組織形成率分別為 11.8%、19.1%、16.7%或 30.8%，其餘處理均沒有生成癒傷組織。將授粉後第三天、第七天或第八天的胚，培養在 1/4MS 鹽類濃度的培養基，經胚培養後一個月後，胚根伸長的比例分別為 9.4%、27.8%或 54.5%，而在授粉後第四天、第五天及第六天均沒有胚根伸長的現象；而授粉後第三天、第五天、第六天、第七天或第八天取胚，其癒傷組織形成率分別為 18.1%、22.2%、30.8%、5.6%或 9.1%，其餘處理沒有產生癒傷組織(圖 5、圖 6、圖 7A)。

在'Supo Roek'和 *E. geroldii* 胚培養實驗中共獲得 32 株後代，其中 29 株是透過胚直接萌發成植株，另外 3 株是透過癒傷組織誘導再生出的植株。

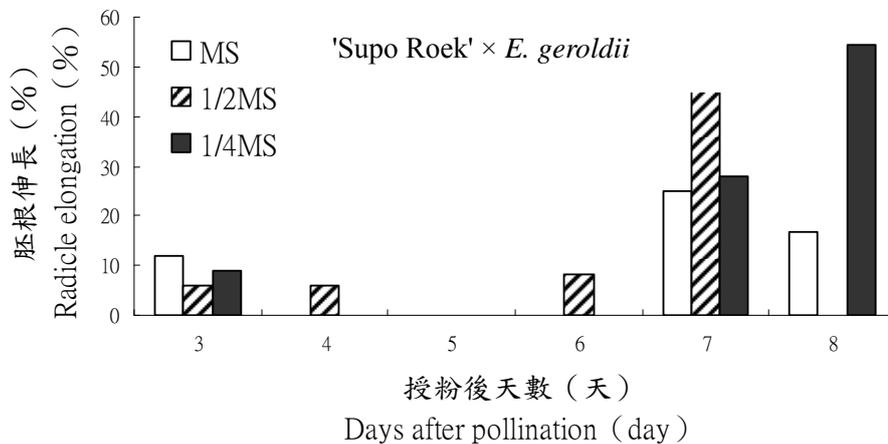


圖 5. MS 配方濃度與授粉後天數對麒麟花'Supo Roek' × *E. geroldii* 胚培養之胚根伸長的影響。

Fig. 5. Effect of MS strength and days after pollination to radicle elongation on embryo culture of *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*

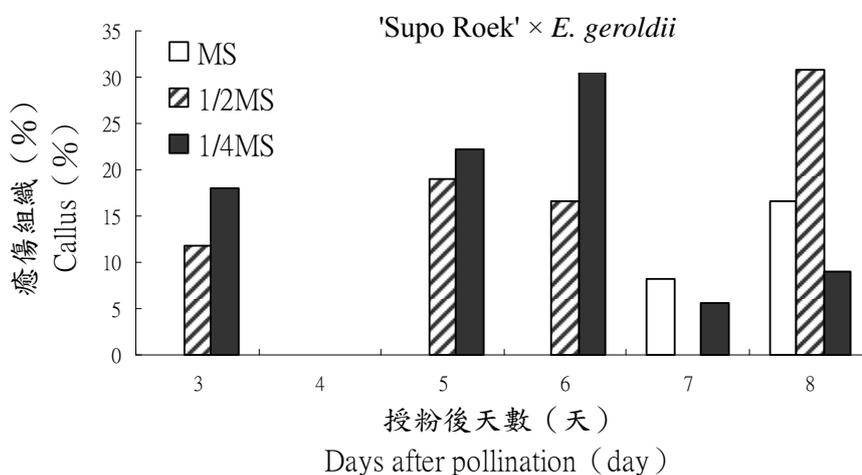


圖 6. MS 配方濃度與授粉後天數對麒麟花'Supo Roek' × *E. geroldii* 胚培養之癒傷組織形成的影響。

Fig. 6. The effect of MS strength and days after pollination to callus formation in embryo culture of *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*

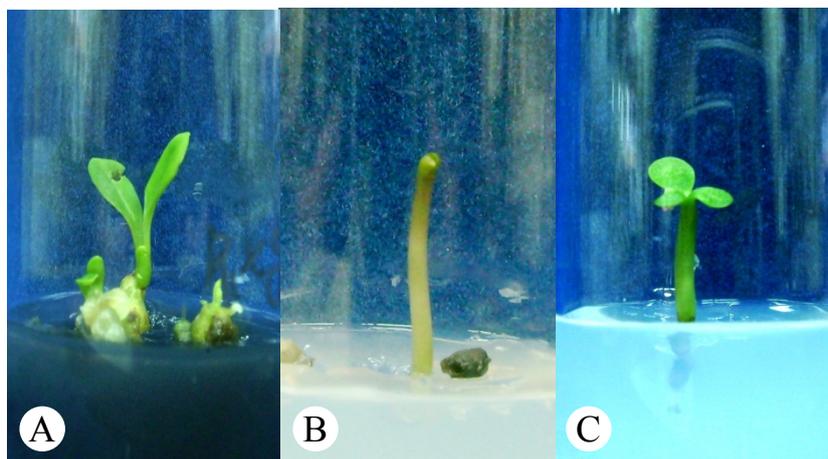


圖 7. *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*。(A)將癒傷組織培養於誘導培養基後芽體再生 (B)子葉正常開展 (C)子葉受到胚乳限制。

Fig. 7. Embryo culture of *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*. (A)shoots generation from callus. (B)expansion of cotyledons. (C)cotyledons limited by endosperm.

## 討 論

胚的發育依形態可分為球胚期、心形期、魚雷期與子葉期，從球形期到心形期中期。胚的發育所需的生長調節物質仰賴母體提供，但從心形期晚期開始，胚開始製造生長所需的生長調節物質，而不依賴母體的生長調節物質(Raghavan and Torrey, 1963)。因此胚培養以簡單的培養基培養即可成活。而在胚培養的培養中，胚的成活率通常隨著胚的成熟度增加而提高(Bridgen, 1994; Carimi *et al.*, 1998)，而以受精後剛發育的胚為材料，培養在合適的環境和培養基中，也可以得到高比率的成苗率(Tukey, 1933)。本試驗 *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* 雜交組合的胚培養中，在授粉後第三天或第四天胚根伸長率均低於 15%，而授粉後五天的胚，其胚根伸長率開始有明顯的增加；而授粉後第七天或第八天胚根伸長率最高(圖 2)。另外 *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii* 雜交組合的胚，在授粉後第三天到第六天的胚根伸長率均低於 15%，授粉後第七天及第八天胚根伸長率可超過 15%(圖 5)。本試驗的結果與 Bridgen(1994)和 Carimi *et al.*(1998)的結果相同。在 *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* 雜交組合的胚培養中，必須要到授粉後第五天起始有較佳的胚成活率，而果實在授粉後第 14 天時掉落，表示延遲取胚的時機也許可以再提高胚的成活率；在 *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii* 雜交組合的胚培養中，必須到了第七天胚的成活率才有明顯的提升，但是果實在授粉後第 10 天時落果，所以應該尋求合適的培養基配方與培養環境，才有助於提高胚的成活率。在 *Leucadendron* 種間雜交胚拯救實驗中發現，較幼小的胚比較容易生成癒傷組織而非萌芽(Liu *et al.*, 2006)，但在本實驗中並沒有發現這樣的趨勢，可能是 *Leucadendron* 的植物種子發育緩慢，需要數月到一年的時間，而麒麟花則僅需 30 天左右便成熟，因此本試驗的胚較為成熟，所以癒傷組織的形成主要還是受到操作傷害的影響較大。

在百合胚培養實驗中，授粉後三天的胚在低鹽類濃度的培養基中有較佳的胚萌發率，學者表示可能與 NH<sub>4</sub> 和 NO<sub>3</sub> 濃度有關(Ikeda *et al.*, 2003)；文心蘭成熟度 158 日的種子，培養於 1/4、1/3、1/2MS 鹽類濃度培養基，發芽率皆高於培養在全量 MS 鹽類濃度培養基(易, 2001)。本試驗兩個雜交組合均以 1/4MS 鹽類濃度的培養基有較高的胚根伸長率，而全量 MS 鹽類濃度的培養基則有最低的胚根伸長率。

樟子松的胚培養實驗中，較高的鹽類濃度較易使胚產生癒傷組織(董、彭, 2005)。而培養麒麟花(*E. milli* 'Olympus')花序在全量 MS 培養基可以產生最多的癒傷組織(卜, 2008)。在本試驗中 *E. milli* 'Olympus' × *E. geroldii* 雜交組合，在全量 MS 鹽類濃度培養基有最高的癒傷組織形成率，這顯示較高的鹽類濃度會促進產生癒傷組織(圖 3)。但是在 *E. milli* 'Supo Roek' × *E. geroldii* 雜交組合中，反而以 1/2MS 及 1/4MS 鹽類濃度的培養基有最高的癒傷組織形成率(圖 6)，顯示不同雜交組合胚培養，有其最合適的癒傷組織形成鹽類濃度，不一定在較高濃度的鹽類培養基有較佳的癒傷組織形成。

培植體褐化的發生可分為兩種形式，一是由於細胞因環境逆境造成細胞程式化死亡或自然壞死，二是酚類物質氧化後所產生的醜對細胞造成毒害(徐等, 1997)。本試驗誘導出

的癒傷組織為鬆散的細胞團，當生長到一定程度後會開始褐化並有分化出根的趨勢，若將癒傷組織繼代於不含生長調節劑的培養基，可以得到相同白色鬆散的癒傷組織，所以應該是細胞產生的有毒物質導致癒傷組織褐化。細胞分裂素常被使用在植物組織培養，它可以促進地上部地形成(Tomsone, 2007)。活性炭可以吸附植物產生的有害物質，在丁香屬(*Syringa*)植物胚拯救的培養基中，添加活性炭可以促進胚的萌發與生長，而添加低濃度的細胞分裂素可以提高胚的萌發率(周等, 2003)。本實驗癒傷組織有分化出根的趨勢，推測是由於細胞產生過多的 auxin 所致，而將癒傷組織培養於含有活性炭與細胞分裂素的培養基中，癒傷組織會轉變成產生綠色且結實的細胞團(圖 4D)，但只有少數的癒傷組織可以成功誘導出芽體(圖 7D)。尋找較合適的培養基配方，應該可以提高癒傷組織再生芽體的比例，但經由癒傷組織得到雜種後代需花費較久的時間，應該還是以提高胚萌發率較能有效的得到雜交後代。

### 參 考 文 獻

- 卜莎蒂。2008。麒麟花利用花序培植體之微體繁殖。中興大學碩士論文。p.26。
- 周莉、羅鳳霞、代力民。2003。丁香(*Syringa* L.)種間雜交幼胚離體培養研究。應用生態學報 14: 382-386。
- 易美秀。2001。蘭科植物無菌發芽之研究。試驗研究暨推展論文發表會論文摘要。台中區農業改良場特刊第 49 號。行政院農委會台中區農業改良場 編印。p.65-66。
- 徐振彪、傅作申、原亞萍、杜娟、張新生、田立國、賈玉峰和母秋華。1997。植物組織培養過程中的褐化現象。雜糧作物 1: 55-56。
- 董麗芬、彭麗萍。2005。培养基對樟子松胚不定芽增殖影響的研究。西北林學院學報 20 (2): 93-95。
- Bridgen, M.P.1994. A review of plant embryo culture. Hortscience. 29: 1243–1246.
- Carimi, F., F. Pasquale, A.M. Puglia,. 1998. In vitro rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. Plant Breeding 117: 261–266.
- Ikeda, N., Y. Niimi, and D. S. Han. 2003. Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. Plant Tiss. Cult. Lett. 73: 159-166.
- Liu, H., G. Yan and R. Sedgley. 2006. Interspecific hybridization in the genus *Leucadendron* through embryo rescue. Sou. Afr. J. Bot. 72: 416–420.
- Raghavan, V. and J. G. Torrey . 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. Am. J. Bot. 50: 540–551.

Tomšone, S., A. Galeniece, A. Akere, G. Priede, and L. Zira. 2007. In vitro propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars. *Biologija* 53: 28-31.

Tukery, H. B. 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hered.* 24: 7-12.

## Embryo Rescue of Interspecific Hybrids in 'Crown of Thorns'

Gi-Iau Wu<sup>1)</sup> Chien-Young Chu<sup>2)</sup>

Key words: Embryo culture, Days after pollination, Medium, callus

### Summary

*Euphorbia milii* 'Olympus' and 'Supo Roek' and *E. geroldii* were crossed for developing thornless 'crown of thorns'. In the crossing of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* and *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*, we found the fruits dropped before maturing. The immature embryos of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* and *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii* were taken from ovaries after 7 days of crossing and could be rescued on the medium containing 1/4 MS formula. The radical elongation was better. The immature embryos of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* were taken from ovaries after 3 days of crossing and could be rescued on the medium containing MS formula. The callus developed better. The immature embryos of *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii* were taken from ovaries after 6 or 8 days of crossing and could be rescued on the medium containing 1/4MS or 1/2MS formula. The callus developed better.

Twenty four progenies of *E. milii* 'Olympus' × *E. geroldii* were got through embryo developed directly. In *E. milii* 'Supo Roek' × *E. geroldii*, 32 progenies grew up. There were 29 progenies developed from embryo directly and there were 3 progenies from callus regeneration.

---

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

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

