

三倍體葡萄胚珠培養之研究

蔡孟佑¹⁾ 陳京城²⁾

關鍵字：胚珠培養、三倍體、葡萄

摘要：本研究以二倍體`貝利 A`與四倍體`巨峰`葡萄為材料，測試自交與相互雜交之胚珠離體培養之適當的取胚珠時間與培養條件，調查不同培養條件下之胚珠萌芽率。試驗結果顯示`貝利 A`葡萄自交胚珠在花後 9 周以液態培養基在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時下培養 37 天後進行縱切刻傷處理，之後再以固態培養基培養 60 天後之胚珠萌芽率可達 100%，而`巨峰`葡萄在相同培養條件下之胚珠萌芽率也可達 63.3%。而以`貝利 A`葡萄為母本與`巨峰`雜交之胚珠，於花後 7 周以固態培養基在 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時下培養 51 天後進行縱切刻傷處理，之後繼續培養 60 天之胚珠萌芽率為 10%。而以`巨峰`葡萄為母本與`貝利 A`雜交之胚珠在相同培養條件下之胚珠萌芽率可達 60%。

前 言

葡萄是世界上最重要的經濟果樹之一，目前世界上鮮食葡萄主要以無子品種為主，無子葡萄無論用於鮮食、製乾與製罐，在國際市場一直深受消費者青睞(Notsuka *et al.*, 2001)。而增加葡萄栽培品種多樣化，可提升葡萄生產價值，因此，選育優良的無子葡萄新品種已成為現今葡萄育種的重要目標之一(Wan *et al.*, 2008)。台灣目前經濟栽培品種以`巨峰`為主，而無子葡萄品種只有`Himrod Seedless` (喜樂葡萄)有小面積栽培，因此，選育適合台灣栽培的無子葡萄品種是國內葡萄育種必須努力的目標。

無子葡萄大致上可分為兩類，第一種為單為結果型(parthenocarpy)，如`Black Corinth` 葡萄，此類品種不需經過受精作用也能生產果實。第二種為略精結果型(stenospermocarpy)，此類品種需要經受精作用，但是胚珠早期夭折產生小核或軟核的果

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

實，也被視為無子，如`Thompson Seedless`葡萄，而目前無子葡萄育種主要是利用略精結果型的葡萄品種(Ledbetter and Ramming, 1989)。

雜交育種是產生無子新品種常用的方式，但是正常雜交方法培育難度很高，一是用兩個無子葡萄品種相互雜交，但是經常無法得到正常發育的種子；二是以無子品種作為父本與有子品種進行雜交，但是後代出現無子的機率低，一般只有 10~15% (Loomis and Weinberger, 1979)，故以正常雜交育種選育無子葡萄新品種進展較為緩慢。如果無子葡萄之間或與有子葡萄相互雜交，然後對尚未敗育的雜交胚進行胚拯救，促使其繼續發育，並獲得植株，則可提高成功率。胚培養技術是在人工控制的條件下，選擇適宜的培養基及培養環境條件，可解決種胚不能正常發育的問題(Reed, 2005)。

三倍體葡種也是獲得新的無子葡萄的方法之一，常用培育三倍體葡萄品種的方式為二倍體與四倍體相互雜交形成三倍體後代(Yamashita *et al.*, 1998)，但是三倍體葡萄胚培養的萌芽率與存活率低為目前面臨之主要問題，為了增加三倍體葡萄育種的效率，本研究以二倍體`貝利 A`葡萄與四倍體`巨峰`葡萄相互雜交，尋找適當取胚時期與培養條件，以獲得較高的萌芽率與存活率，做為未來三倍體無子葡萄育種之參考。

材料與方法

試驗一、液態培養與不同處理條件對葡萄胚珠培養之影響

一、植物材料

本試驗材料為位於台中縣霧峰鄉之國立中興大學園藝試驗場葡萄中心所栽種的`貝利 A`(`Muscat Bailey A`)與`巨峰`(`Kyoho`)葡萄自交與相互雜交授粉後，採其不同周數之果實進行胚珠培養試驗。

二、試驗方法

方法一、自交胚珠培養

1. 胚珠齡

分別採取開花後 8、9 周之果實，果實表面先以 70%酒精擦拭，再以 1%次氯酸鈉(sodium hypochlorite)加入 1-2 滴 Tween 20 進行表面消毒 15 分鐘，然後在無菌操作台以無菌水沖洗 3 次後，以滅菌後之鑷子與解剖刀將果實剖開，並取出胚珠，之後將胚珠培養於生長培養基中。每處理 3 重複，每重複培養 10 個胚珠。

2. 培養基

(1) 生長培養基(固態培養基)

培養基為 1/2 MSMO (Murashige and Skoog basal salt with minimal organics, Sigma)、2 μM GA3 (gibberellic acid, Sigma)、10 μM IAA (indole-3-butyric acid, Sigma)、400 ppm 水解酪蛋白(casein hydrolysate)、3%蔗糖、200 ppm 活性碳(activated carbon)及 0.8%瓊脂(agar)，

滅菌前將培養基之 pH 值調至 5.8。其中 IAA、GA 及水解酪蛋白於培養基經過高溫高壓滅菌後(121°C, 1.2 kg cm⁻², 20 分鐘)，等溫度降至 50°C 以下，再以 0.22 μm 過濾膜(Millex, Minipore)過濾加至培養基中。胚珠培養基本條件為光強度 2500-3000 Lux，光周期 16/8 小時，溫度 26±1°C。

(2)液態培養基

液態培養基除了不加 agar 之外，其餘成份與固態培養基相同。

(3)成苗培養基

培養基為 1/2 MSMO、2 ppm IBA (indole-3-butyric acid, Sigma)、3%蔗糖、200 ppm 活性碳及 0.8%瓊脂。

3.處理方式

a.對照組，以固態培養基持續培養，培養溫度為 26±1°C，光周期 16/8 小時。

b.液態培養基培養至花後 100 天(花後 8 周與 9 周之胚珠分別培養 44 天與 37 天)，移至固態培養基繼續培養，培養溫度為 26±1°C，光周期 16/8 小時。

c.固態培養基培養至花後 100 天，接著於低溫 6±1°C 下遮光培養 60 天，再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

d.液態培養基培養至花後 100 天，接著於低溫 6±1°C 下以固態培養基遮光培養 60 天，再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

e.固態培養基培養至花後 100 天，再進行刻傷處理，再移至新的固態培養基繼續培養，培養溫度為 26±1°C 及光周期 16/8 小時。

f.液態培養基培養至花後 100 天，再進行刻傷處理，並移至新的固態培養基繼續培養，培養溫度為 26±1°C，光周期 16/8 小時。

g.固態培養基培養至花後 100 天進行刻傷處理，接著於低溫 6±1°C 下遮光培養 60 天，再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

h.液態培養基培養至花後 100 天，再進行刻傷處理，接著於低溫 6±1°C 下以固態培養基遮光培養 60 天，再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

低溫與刻傷處理前先更換培養基並除去胚珠表面之 callus，並於花後 160 天至 220 天記錄以上 8 種處理方式之胚珠萌芽率。

方法二、雜交胚珠培養(2011 年 9 月進行雜交授粉)

1.胚珠齡

於雜交授粉後 7 周之果實，取果實內之胚珠進行培養，每處理 4 重複，每重複 5 個胚珠。

2.培養基

同試驗一之培養基配方

3.處理方式

a.液態培養基培養至花後 100 天，接著於低溫 6±1°C 下以固態培養基遮光培養 60 天，

再移回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時繼續培養。

b. 液態培養基培養至花後 100 天之後進行刻傷處理，再移至固態培養基繼續培養，培養溫度為 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 16/8 小時。

c. 固態培養至花後 100 天之後進行刻傷處理，接著移至新的固態培養基繼續培養，培養溫度為 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 16/8 小時。

d. 固態培養至花後 100 天之後，接著於低溫 $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下遮光培養 60 天，再移回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時。

低溫與刻傷處理前先更換培養基並除去胚珠表面之 callus，並於花後 160 天至 220 天記錄以上 4 種處理方式之胚珠萌芽率。

試驗二、不同取胚時期與處理條件對葡萄胚珠培養之影響

一、植物材料

本試驗材料為位於台中縣霧峰鄉之國立中興大學園藝試驗場葡萄中心所栽種的`貝利 A'與`巨峰葡萄相互雜交授粉後，採其不同周數之果實進行胚珠培養試驗。

二、試驗方法

雜交胚珠培養(2011 年 4 月進行雜交授粉)

1. 胚珠齡

在雜交授粉後 6 及 7 周，取果實內之胚珠進行培養，每處理 3 重複，每重複 15 個胚珠。

2. 培養基

同試驗一之培養基配方

3. 處理方式

A. 刻傷處理

(1) 以固態培養基培養 50 天後進行刻傷處理，並用顯微鏡觀察記錄胚發育形態，培養條件為 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 16/8 小時。接著於低溫 $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下遮光培養 60 天，再移回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時繼續培養。刻傷處理乃以胚珠的胚軸為中心，取兩側邊緣處，以滅菌過之解剖刀從一側縱剖使其露出胚。並於取胚後 130 天與 150 天調查胚珠萌芽率。

(2) 先以液態培養基培養 7 天後，移至固態培養基培養 50 天後進行刻傷處理，並用顯微鏡觀察記錄胚發育型態，培養溫度為 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 16/8 小時。接著於低溫 $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下遮光培養 60 天，再移回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時繼續培養。並於取胚後 130 天與 150 天調查胚珠萌芽率。

B. 低溫處理

處理包括下列 4 種：

(1) 先以液態培養基培養 7 天後，移至固態培養基培養 50 天，培養溫度為 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光周期 16/8 小時。接著於低溫 $6\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下遮光培養 60 天，再移回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 及光周期 16/8 小時繼續培養。

(2)先以先以液態培養基培養 7 天後,移至固態培養基遮光培養 50 天,培養溫度為 26±1 °C。接著於低溫 6±1°C 遮光培養 60 天,再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

(3)固態培養基培養 50 天,培養溫度為 26±1°C,光周期 16/8 小時。接著於低溫 6±1 °C 遮光培養 60 天,再移回 26±1°C 及光周期為 16/8 小時繼續培養。

(4)固態培養基遮光培養 50 天,培養溫度為 26±1°C。接著於低溫 6±1°C 下遮光培養 60 天,再移回 26±1°C 及光周期 16/8 小時繼續培養。

於固態培養基培養 50 天後記錄以上 4 種處理方式培養之胚珠癒傷組織誘導率,然後除去胚珠表面之 callus 後移至新的培養基,於低溫 6±1°C 下培養 60 天後,更換新的培養基再移回 26±1°C 繼續培養。並於取胚後 130 天與 150 天調查胚珠萌芽率。

結 果

二倍體`貝利 A`葡萄花後 8、9 周之自交胚珠分別於不同培養條件下培養至花後 100 天觀察胚發育情形,發現花後 8 周胚珠無液態前處理組之敗育胚與魚雷胚比率分別為 1.7% 與 53.3%,而花後 9 周胚珠無液態前處理之敗育胚與魚雷胚比率分別為 1.7%與 63.3% (表 1)。在培養到花後 160 天後發現`貝利 A`葡萄花後 8 周胚珠對照組萌芽率為 6.7%,而 8 周之胚珠經液態培養基培養至花後 100 天後經刻傷處理再培養至花後 160 天之胚珠萌芽率可達 80%,而花後 9 周之胚珠於相同條件下之胚珠萌芽率為 100% (表 2)。

表 1. 不同發育階段之`貝利 A`胚珠內胚發育之情形

Table 1. Embryo development in `Muscat Bailey A` ovules harvested at different stages of development.

Treatment ^z	Ovule age	Percentage of various embryo (%)			
		Aborted	Globular	Heart-shaped	Torpedo-shaped
Solid	8 WAB ^y	1.7±4.1 ^x	31.7±11.7	13.3±12.1	53.3±12.1
Liquid	8 WAB	1.7±4.1	13.3±5.2	33.3±13.7	50.0±15.5
Solid	9 WAB	1.7±4.1	11.7±7.5	23.3±13.7	63.3±13.7
Liquid	9 WAB	1.7±4.1	15.0±5.5	18.3±13.3	65.0±13.8

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium.

^y WAB: weeks after blooming. The embryo were checked on the day of ovule age equal to 100 days after blooming.

^x Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment.

表 2. 培養條件對不同發育階段的`貝利 A`胚珠離體培養萌芽率之影響

Table 2. Effect of *in vitro* culture conditions on germination rate of `Muscat Bailey A` ovules harvested at different stages of development.

Medium	Treatment ^z		Ovule age ^y	Cumulative percentage of ovule germination (%) ^x			
	Cut	LT		160days	180days	200days	220days
Solid	No	No	8WAB	6.7±5.8c ^w	6.7±5.8c	10.0±0.0c	16.7±5.8c
Liquid	No	No	8WAB	10.0±10.0c	26.7±11.6bc	30.0±17.3bc	36.7±15.3bc
Solid	No	Yes	8WAB	0.0±0.0c	23.3±23.1c	23.3±23.1bc	33.3±20.8bc
Liquid	No	Yes	8WAB	0.0±0.0c	0.0±0.0c	26.7±11.6bc	26.7±11.6bc
Solid	Yes	No	8WAB	73.3±15.3ab	73.3±15.3ab	73.3±15.3b	73.3±15.3ab
Liquid	Yes	No	8WAB	80.0±10.0ab	80.0±10.0ab	80.0±10.0ab	80.0±10.0ab
Solid	Yes	Yes	8WAB	0.0±0.0c	60.0±10.0b	60.0±10.0b	60.0±10.0b
Liquid	Yes	Yes	8WAB	60.0±10.0b	60.0±10.0b	60.0±10.0b	60.0±10.0b
Solid	No	No	9WAB	3.3±5.8c	13.3±11.6	30.0±26.5bc	30.0±26.5bc
Liquid	No	No	9WAB	36.7±23.1b	43.3±20.8bc	50.0±30.0bc	50.0±30.0bc
Solid	No	Yes	9WAB	0.0±0.0c	63.3±5.8b	73.3±5.8b	76.7±5.8ab
Liquid	No	Yes	9WAB	0.0±0.0c	70.0±34.6ab	70.0±34.6a	70.0±34.6ab
Solid	Yes	No	9WAB	93.3±5.8a	93.3±5.8ab	93.3±5.8	93.3±5.8ab
Liquid	Yes	No	9WAB	100±0.0a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
Solid	Yes	Yes	9WAB	93.3±11.6a	96.7±5.8ab	96.7±5.77a	96.7±5.8ab
Liquid	Yes	Yes	9WAB	0.0±0.0c	90.0±17.3ab	90.0±17.3ab	90.0±17.3ab

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium. Cut: after cultured to 100 days after blooming, the ovule was cut longitudinally. LT: ovules were incubated at 6±1°C for 60 days.

^y WAB: weeks after blooming.

^x The percentage of ovule germination = (the number of ovule germinated / the total number of ovule cultured) × 100 %. Ovules were cultured to the ovule age was equal to 220 days after blooming.

^w Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment. Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

四倍體`巨峰`葡萄花後 8、9 周之自交胚珠分別於不同培養條件下培養至花後 100 天觀察胚發育情形，發現花後 8、9 周之胚珠無論何種處理之敗育胚皆為 0%，而花後 9 周胚珠無液態前處理之魚雷胚比率為 51.7%，相同周數下液態前處理之魚雷胚比率為 66.7% (表 3)。在培養到花後 160 天後發現`巨峰`葡萄花後 8 周胚珠對照組胚珠皆不萌芽，而 8 周之胚珠於固態培養基培養至花後 100 天後經刻傷處理後再培養至花後 160 天之胚珠萌芽率可達 53.3%，花後 9 周之胚珠於相同條件下之胚珠萌芽率為 30% (表 4)。

表 3. 不同發育階段之`巨峰`胚珠內胚發育之情形

Table 3. Embryo development in `Kyoho` ovules harvested at different stages of development.

Treatment ^z	Ovule age ^y	Aborted	Globular	Heart-shaped	Torpedo-shaped
Solid	8 WAB	0.0±0.0 ^x	13.3±12.1	31.7±16.0	55.0±8.4
Liquid	8 WAB	0.0±0.0	10.0±8.9	28.3±7.5	61.7±9.8
Solid	9 WAB	0.0±0.0	13.3±12.1	35.0±10.5	51.7±7.5
Liquid	9 WAB	0.0±0.0	10.0±11.0	23.3±15.1	66.7±16.3

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium. The embryos were checked on the day of ovule age equal to 100 days after blooming.

^y WAB: weeks after blooming.

^x Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment.

二倍體`貝利 A`與`巨峰`雜交授粉後，以花後 7 周之胚珠分別於不同培養條件下培養，在花後 100 天觀察胚發育情形，發現花後 7 周固態培養基培養的胚珠沒有敗育胚，液態培養基培養的胚珠之敗育胚比率為 5%，而固態培養基與液態培養基培養的魚雷比率分別為 50%與 60% (表 5)。在培養至花後 160 天後，發現`貝利 A`與`巨峰`雜交花後 7 周的胚珠經液態培養基培養至花後 100 天後經刻傷處理再培養至花後 160 天之萌芽率可達 35%，而固態培養基之處理萌芽率較低為 10% (表 6)。`巨峰`與`貝利 A`雜交在固態培養基下培養，發現花後 7 周之敗育胚與魚雷胚分別為 13.3%與 46.7% (表 5)。在培養至花後 160 天後，發現花後 7 周`巨峰`與`貝利 A`雜交胚珠經固態培養基培養至花後 100 天經刻傷處理再培養至花後 160 天之萌芽率較高可達 60%，而經固態培養基培養再低溫處理之胚珠皆不萌芽，直到花後 220 天胚珠萌芽率才達 40% (表 6)。

表 4. 培養條件對不同發育階段的`巨峰`胚珠離體培養萌芽率之影響

Table 4. Effect of in vitro culture conditions on germination rate of `Kyoho` ovules harvested at different stages of development.

Treatment ^z			Ovule age	Cumulative percentage of ovule germination ^x (%)			
Medium	Cut	LT		160days	180days	200days	220days
Solid	No	No	8WAB ^y	0.0±0.0b ^w	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b
Liquid	No	No	8WAB	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b
Solid	No	Yes	8WAB	0.0±0.0b	0.0±0.0b	3.3±5.8b	3.3±5.8b
Liquid	No	Yes	8WAB	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b
Solid	Yes	No	8WAB	53.3±11.6a	53.3±11.6a	53.3±11.6a	53.3±11.6a
Liquid	Yes	No	8WAB	40.0±36.1ab	40.0±36.1ab	53.3±45.1a	53.3±45.1a
Solid	Yes	Yes	8WAB	0.0±0.0b	60.0±26.5a	63.3±20.8a	63.3±20.8a
Liquid	Yes	Yes	8WAB	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b
Solid	No	No	9WAB	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b	0.0±0.0b
Liquid	No	No	9WAB	3.3±5.8b	3.3±5.8b	3.3±5.8b	3.3±5.8b
Solid	No	Yes	9WAB	0.0±0.0b	6.7±11.6b	6.7±11.6b	6.7±11.6b
Liquid	No	Yes	9WAB	0.0±0.0b	16.7±15.3b	30.0±20.0ab	30.0±20.0ab
Solid	Yes	No	9WAB	30.0±17.3ab	30.0±17.3ab	30.0±17.3ab	30.0±17.3ab
Liquid	Yes	No	9WAB	63.3±15.2a	63.3±15.3a	63.3±15.3a	63.3±15.3a
Solid	Yes	Yes	9WAB	0.0±0.0b	16.7±15.3b	30.0±10.0ab	30.0±10.0ab
Liquid	Yes	Yes	9WAB	0.0±0.0b	20.0±20.0ab	26.7±30.6ab	26.7±30.6ab

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium. Cut: after cultured to 100 days after blooming, the ovule was cut longitudinally. LT: ovules were incubated at 6±1°C for 60days.

^y WAB: weeks after blooming.

^x The percentage of ovule germination = (the number of ovule germinated / the total number of ovule cultured) × 100 %. Ovules were cultured to the ovule age was equal to 220 days after blooming.

^w Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment. Means in the same column followed by the same letter were not significantly different at the 5% level by the LSD test.

表 5. 不同雜交組合的胚珠培養在不同培養基內之胚發育情形

Table 5. Developmental stages of embryo in ovules of different hybrid combinations cultured in different medium.

Cross	Treatment ^z	Aborted	Globular	Heart-shaped	Torpedo-shaped
BaileyA	Solid	0.0±0.0 ^y	20.0±0.0	30.0±11.6	50.0±11.6
×					
Kyoho	Liquid	5.0±10.0	20.0±16.3	15.0±10.0	60.0±16.3
Kyoho	Solid	13.3±11.6	20.0±0.0	20.0±20.0	46.7±23.1
×					
BaileyA					

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium. All treatments were maintained at 26 ± 1 °C with photoperiod of 16/8 (light/dark) hours. The ovules were harvested for incubation at 7 weeks after pollination. The embryo was checked on the day of ovule age was equal to 100 days after blooming.

^y Mean ± SD. Five ovules per replicate, 4 replicates per treatment.

表 6. 培養條件對不同雜交組合的胚珠萌芽率之影響

Table 6. Effect of in vitro culture conditions on germination rate of different hybrid combinations.

Cross	Treatment ^z			Cumulative percentage of ovule germination ^y (%)			
	Medium	Cut	LT	160days	180days	200days	220days
BaileyA	Solid	Yes	No	10.0±11.5b ^x	10.0±11.5b	15.0±10.0b	15.0±10.0b
	Liquid	Yes	No	35.0±10.0ab	35.0±10.0ab	35.0±10.0ab	35.0±10.0ab
×							
	Kyoho	Solid	No	Yes	0.0±0.0b	25.0±25.2b	25.0±25.2ab
Liquid		No	Yes	0.0±0.0b	25.0±25.2b	25.0±25.2ab	25.0±25.2ab
Kyoho	Solid	Yes	No	60.0±16.3a	60.0±16.3a	60.0±16.3a	60.0±16.3a
×							
BaileyA	Solid	No	Yes	0.0±0.0b	20.0±0.0b	40.0±16.3ab	40.0±16.3ab

^z Solid: cultured in solid medium. Liquid: cultured in liquid medium. Cut: after cultured to 100 days after blooming, the ovule was cut longitudinally. LT: ovule were incubated at 6±1 °C for 60 days. The ovules were harvested for incubation at 7 weeks after pollination.

^y The percentage of ovule germination = (the number of ovule germinated / the total number of ovule cultured) × 100 %. Ovules were cultured to the ovule age equal to 220 days after blooming.

^x Mean ± SD. Five ovules per replicate, 4 replicates per treatment.

二倍體`貝利 A`與`巨峰`雜交授粉後，以花後 6、7 周之胚珠分別於不同前處理後移至固態培養基觀察胚發育情形，發現花後 6 周無液態前處理組之胚珠之敗育胚、球形胚與魚雷胚比率分別為 33.3%、56.7%與 0%，而花後 7 周胚珠無液態前處理之敗育胚、球形胚與魚雷胚比率分別為 3.3%、16.7%與 36.7% (表 7)。在總培養天數 150 天後發現`巨峰`葡萄花後 6 周胚珠不論是否刻傷均沒有萌芽，而 7 周之胚珠經刻傷及低溫處理後培養至 150 天胚珠萌芽率可達 23.3% (表 8)。

表 7、不同發育階段之`貝利 A`雜交`巨峰`胚珠內胚發育之情形

Table 7. Embryo development of `Muscat Bailey A' × `Kyoho' ovules harvested at different stages of development.

Liquid medium pretreatment ^z	Ovule age	Percentage of various embryo (%)			
		Aborted	Globular	Heart-shaped	Torpedo-shaped
No	6WAB ^y	33.3±5.8 ^x	56.7±11.6	10.0±10.0	0.0±0.0
Yes	6WAB	20.0±0.0	46.7±5.8	33.3±5.8	0.0±0.0
No	7WAB	3.3±5.8	16.7±5.8	43.3±5.8	36.7±5.8
Yes	7WAB	10.0±10.0	40.0±0.0	26.7±5.8	23.3±5.8

^z Yes: cultured in liquid medium for 7 days and then transferred to solid medium for 50 days. No: cultured in solid medium for 50 days. All treatments were maintained at 26 ± 1°C with photoperiod of 16/8 (light/dark) hours.

^y WAB: weeks after blooming.

^x Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment.

表 8、培養條件不同發育階段的`貝利 A`雜交`巨峰`胚珠離體培養萌芽率之影響

Table 8. Effect of in vitro culture conditions on germination rate of `Muscat Bailey A` × `Kyoho` ovules harvested at different stages of development.

Liquid medium pretreatment ^z	Treatment ^y		Ovule age	Cumulative percentage of ovule germination (%) ^w	
	Light	Cut		130days	150days
No	Yes	No	6WAB ^x	0.0±0.0 ^v	0.0±0.0
No	No	No	6WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
No	Yes	Yes	6WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
Yes	Yes	No	6WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
Yes	No	No	6WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
Yes	Yes	Yes	6WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
No	Yes	No	7WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
No	No	No	7WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
No	Yes	Yes	7WAB	16.7±15.3	23.3±20.8
Yes	Yes	No	7WAB	0.0±0.0	2.1±3.6
Yes	No	No	7WAB	0.0±0.0	0.0±0.0
Yes	Yes	Yes	7WAB	6.7±11.6	6.7±11.6

^z Yes: cultured in liquid medium for 7 days and then transferred to solid medium for 50 days. No: cultured in solid medium for 50 days.

^y Light yes: cultured with photoperiod 16/8 (light/dark) hours. Light no: cultured in the dark. Cut yes: after cultured in solid medium (pretreatment) for 50 days, the ovules was cut longitudinally and then incubated at 6±1°C for 60 days in the dark before transferring back to room temperature (26±1°C) . Cut no: the ovules were not cut.

^x WAB: weeks after blooming.

^w The percentage of ovule germination = (the number of ovule germinated / the total number of ovule cultured) × 100 %. Ovules were cultured for a total of 150 days.

^v Mean ± SD. Ten ovules per replicate, 3 replicates per treatment for cut treatments. Fifteen ovules per replicate, 3 replicates per treatment for other treatments.

討 論

正常授粉受精的葡萄胚的發育依序經過合子胚、球形胚、心形胚、魚雷形胚、子葉形胚，但是由於三倍體種子生理因素之影響會使胚發育中斷停止發育，導致果實沒有種子而形成無子葡萄，但是能藉由胚拯救技術獲得植株。本研究發現花後 6 周的`貝利 A`雜交`巨峰`葡萄胚珠皆未萌芽，花後 7 周的雜交胚珠經過刻傷處理後之萌芽率為 23.3% (表 8)。余等(1992)觀察`小珍珠`和`紅寶石`兩個無子葡萄品種的胚發育，發現早熟的`小珍珠`於花後 40 天胚已發育到成熟胚，到花後 50 天胚和胚乳就已經開始敗育，而晚熟的`紅寶石`到花後 70 天胚仍尚未敗育。

胚珠齡在三倍體無子葡萄的胚培養上為一關鍵重要因子，不同雜交組合最適當的取胚珠時間也有所不同。離體培養一般而言必須在胚開始敗育之前進行取胚珠的動作，太早或過晚皆無法使其順利萌芽獲得植株(Yang *et al.*, 2007)。以`貝利 A`雜交`巨峰`的胚珠適合培養的胚珠齡大約在花後 7 周，花後 6 周的胚珠不論經過什麼處理皆不能讓胚珠萌芽(表 8)，Gray 等 (1990)觀察到在花後 10 天或 60-70 天取出的葡萄胚珠比較容易褐化或胚珠裡面並無胚乳，而花後 40 或 60 天取胚的胚珠比起花後 20 天取胚的胚恢復率與萌芽率高。因此取胚珠之時期太早，因胚發育成熟度不夠很難培養成功，而取胚珠時期太晚則因胚已經敗育，萌芽率也會降低(劉等, 2006)。而不同的雜交組合也會影響胚珠萌芽率，Yamashita (1998)以數種二倍體與四倍體的相互雜交，觀察到四倍體為母本雜交二倍體萌芽率最高。本研究也發現以二倍體`貝利 A`為母本雜交四倍體`巨峰`之萌芽率顯著低於以`巨峰`為母本之處理 (表 6)。

不同季節雜交授粉可能也會影響胚珠培養的胚珠發育與萌芽率，本研究觀察胚珠發育情形，發現於 4 月雜交之`貝利 A`雜交`巨峰`花後 7 周雜交胚珠在固態培養基培養 50 天之球形胚與魚雷胚分別為 16.7%與 36.7% (表 7)，而於 9 月雜交者之球形胚與魚雷胚分別為 20%與 50% (表 5)，因此於 9 月進行雜交授之胚珠其發育速率較於 4 月授粉者快。而許(2010)之研究中也指出以`貝利 A`雜交`巨峰`在 9 月著果之胚珠初期發育速度較快，胚珠的萌芽率也高於 4 月著果之胚珠。本研究在 9 月以`貝利 A`與`巨峰`雜交之胚珠萌芽率為 30% (表 6)，高於在 4 月也是以花後 7 周進行胚培養所得的萌芽率 23.3% (表 8)。

參考文獻

- 余旦華、張磊、薛菊萍、趙改榮。1992。早熟和四倍體胚培養的研究。果樹科學 1: 1-7。
- 許怡萱。2010。無子葡萄選育技術之研究。國立中興大學園藝學系碩士論文。
- 劉海琳、尚忠海、崔玲華、廖康、陳力耕。2006。葡萄幼胚培養技術的研究(II)接種時間及處理方法對胚培養的影響。河南科學 24: 844 -848。
- Gray, D. J., J. A. Mortensen, and C. M. Benton. 1990. Ovule culture to obtain progeny from

- hybrid seedless bunch grapes. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 115:1019-1024.
- Ledbetter, C. A. and D. W. Ramming. 1989. Seedlessness in grapes. *Hortic. Rev.* 11:159-184.
- Loomis, N. H. and J. H. Weinberger. 1979. Inheritance studies of seedlessness in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104:181-184.
- Notsuka, K., T. Tsuru, and M. Shiraishi. 2001. Seedless-seedless grape hybridization *via* in-ovulo embryo culture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70:7-15.
- Reed, S. M. 2005. Embryo rescue. *Plant Biol.* 40:235-239.
- Wan, Y., H. Schwaninger, D. Li, C. J. Simon, Y. Wang, and C. Zhang. 2008. A review of taxonomic research on Chinese wild grapes. *Vitis* 47:81-88.
- Yamashita, H., I. Shigehapa, and T. Haniuda. 1998. Production of triploid grapes by in ovulo embryo culture. *Vitis* 37:113-117.
- Yang, D., W. Li, S. Li, X. Yang, J. Wu, and Z. Cao. 2007. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regul.* 51:63-71.

Studies on Ovule Culture of Triploid Grapes

Meng-You Tsai ¹⁾ Ching-Cheng Chen ²⁾

Key words: ovule culture, triploid, grapevine.

Summary

The ovules of self-pollination and reciprocal crosses between diploid 'Muscat Bailey A' and tetraploid 'Kyoho' grapes were harvested at different stages of development. The effects of different in vitro culture conditions on ovule germination rates were investigated. Ovules of 'Muscat Bailey A' grapes were harvested 9 weeks after blooming and were cultured in liquid medium at $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ with photoperiod 16/8 (light/dark) hours for 37 days before cut longitudinally. The ovules were then cultured in solid medium for another 60 days and the final germination rate was 100%. The ovules of 'Kyoho' grapes were cultured in the same condition and had a germination rate of 63.3%. 'Muscat Bailey A' \times 'Kyoho' ovules were harvested 7 weeks after blooming and were cultured at $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ with photoperiod 16/8 (light/dark) hours for 51 days. The ovules were then cut longitudinally and incubated for another 60 days, and the final germination rate was 10%. Ovules of 'Kyoho' \times 'Muscat Bailey A' were cultured in the same culture conditions and had a germination rate of 60%.

1) Graduate Student in Master Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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