

台灣香蕉研究所

Taiwan Banana Research Institute

904 屏東縣九如鄉玉泉村榮泉街1號

TEL : (08) 7392111~3

FAX : 08-739059

中國園藝(J.Chinese Soc. Hort .Sci.)43(3):260~268, 1997.

## 香蕉花藥癒合組織的誘導<sup>1</sup>

### Callus Induction from *Musa* Anthers

鄧澄欣 李淑英 黃美金<sup>2</sup>

by

Ching-Yan Tang, Shu-Ying Lee and Mei-Jin Hwang

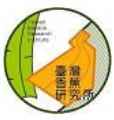
中國園藝第四十三卷第三期抽印本

中華民國八十六年九月

Reprinted from

Journal of The Chinese Society for Horticultural Science

Vol. 43. No. 3, September 1996



## 香蕉花藥癒合組織的誘導

### Callus Induction from *Musa* Anthers

鄧澄欣 李淑英 黃美金<sup>2</sup>

by

Ching-Yan Tang, Shu-Ying Lee and Mei-Jin Hwang

關鍵字：香蕉、花藥培養、癒合組織、植物生長素

Key Words : banana, *Musa*, anther culture, callus induction, auxins, picloram, dicamba

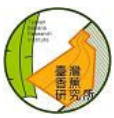
摘要：本研究探討不同品種，培養基及植物生長素對香蕉花藥培養癒合組織誘導的影響。試驗結果摘要如下：

1. 香蕉花藥培養癒合組織分初生及次生兩種。初生癒合組織在接種後三至五星期出現，發生頻率可達 50 %，為膨鬆不規則細胞團，不久即褐化。次生癒合組織在接種後四至五個月發生，發生頻率較低，約 1~3 %，為細小緊密、黃白色細胞團，較具分生潛力。
2. 在測試的八個品種中，初生癒合組織的發生頻率以 AA 基因型的 Pisang Lilin (29.4 %) 及 Pisang Mas (14.4 %) 最高，其次為具 A 基因組約二或四倍體的栽培種，而具 B 基因組的品種 (Ney Poovan 及 *M. balbisiana*) 最低。
3. 比較不同培養基，以 M 及 B5 誘導初生癒合組織的效果比 MS 為佳，若以 0.2 % 水晶洋菜代替洋菜為凝固劑，有促進癒合組織發生的效果。
4. 加添植物生長素有促進初生及次生癒合組織誘導的作用。於 N6 培養基中添加 2mg/l picloram 或 dicamba，次生癒合組織的發生率分別為 3.5 及 3.3 % 比 2, 4 D (0.08 %) 及 NAA (0.0 %) 為佳。癒合組織的器官分化有待進一步研究。

1. 本研究承蒙行政院農業委員會(82 科技-2.2-糧-49(2))及國家科學委員會(NSC84-2321-B-079-002)研究經費補助，謹此致謝。This research was financially supported by the Council of Agriculture and the National Science Council, Executive Yuen, R.O.C.

2. 台灣香蕉研究所研究員、助理員及約僱員。Research Fellow, research assistant and cotract technician, respectively. Taiwan Banana Research Institute, P.O.Box 18, Chiuju, Pingtung, Taiwan, R.O.C.

3. 本文於民國 86 年 1 月 22 日收到。Date received for publication : Jan. 22, 1997.



## 前言

利用花藥培養誘導單倍體，再經染色體加倍，成為同質雙單元體之育種途徑雖在其他作物多有應用，但在香蕉應用之可行性，必須先由花藥培養之研究開始。香蕉栽培種多為二倍體，傳統雜交育種方法比兩倍體作物更複雜、更困難。在國外經多年研究，育成之新品種寥寥可數<sup>(15,19)</sup>。再者，育成的優良雜交種均為煮食蕉或具有 B 基因組的鮮食蕉。至於在國際市場中佔最重要地位的華蕉栽培種，仍未有突破性的進展。因此，採用新科技可望打破香蕉育種之瓶頸，提供香蕉育種的新途徑<sup>(5,17)</sup>。台灣香蕉研究所近年來利用組織培養產生的體營養系變異，進行香蕉抗黃葉病選種，育成耐病品種「台蕉一號」，開創香蕉品種改良的新途徑<sup>(3)</sup>。以香蕉花藥培養，選拔單倍體，進而培育單倍體細胞系，再利用細胞融合，可望成為香蕉雜交育種的新途徑。

香蕉的花藥培養報導不多。台灣香蕉研究所曾於 1983~84 年間選用 16 個香蕉品系進行試驗，包括二倍體及三倍體，接種約一萬多個花藥<sup>(2)</sup>。除谷關野生蕉的花藥在含 1ppm BA 及 2,4-D 之 MS 培養基有出現少量癒合組織外，其他處理的花藥均變黑死亡。

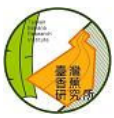
近年來，國外也曾進行香蕉花藥培養試驗。Pons (1989) 曾報導以兩倍體野生蕉及四倍體雜交種為材料，在 20°C 處理 6 小時後，接種於 N6 基本培養基，培養 42 天後，在含少量 dicamba 及 kinetin 的培養基中出現癒合組織<sup>(14)</sup>。Perea-Dallos (1993) 以三個兩倍體香蕉進行試驗，選用單核期花藥，培養基為 MS，加添 casein hydrolysate，蔗糖 (6%) 及不同濃度的 dicamba (5 至 25  $\mu$ m)，並在 28°C，黑暗中進行培養。經 26 天培養，癒合組織開始出現，但數天後即褐化，雖加添活性炭，褐化情形未見改善<sup>(13)</sup>。

本研究探討不同香蕉品種，培養基及植物生長素對香蕉花藥癒合組織誘導的影響，研擬發展香蕉育種新途徑的可行性。

## 材料與方法

### 一、培植體的處理：

供試驗用的香蕉品種共十個，包括 Pisang Lilin (AA)、Pisang Mas (AA)、Figue Sucree (AA)、SH3142 (AA)、*Musa acuminata* (AA)、Gros Michel (AAA)、Golden Beauty (AAAA)、Tu8 (AAAA)、Ney Poovan (AB) 及 *Musa balbisiana* (BB)。所有品種均在本所農場種植。於抽穗開花後，切採雄花花苞作為試驗材料。新鮮花苞切採後，以報紙包裹，置於 13°C 低溫作預處理七天後，以 70% 酒精進行表面消毒，剖除數層苞片後，在無菌箱中繼續剖開苞片，並取小花藥進行鏡檢，確定為單核期花藥後，將同期之花藥接種於高溫滅菌後的半固態培養基中。



## 二、培養基：

本試驗所用之基本培養基（無機及有機成份）包括 MS<sup>(12)</sup>、N6<sup>(9)</sup>及 B5<sup>(10)</sup>。為觀察癒合組織誘導的效果，採用的植物生長素包括：IAA (3-indoleacetic acid)、NAA (1-naphthaleneacetic acid)、2, 4-D (2, 4 dichlorophenoxyacetic acid)、picloram (4-amino-3, 5, 6-trichloro picolinic acid) 及 dicamba (3, 6-dichloro-o-anisic acid)，用量為每公升 0.2 至 4 mg。除特別註明外，每公升培養基均加添 2 mg kinetin 及 60g 蔗糖。為了解不同凝固劑的影響，分別加入 0.7 % Difco Bactoagar (洋菜) 或 0.2 % 水晶洋菜 (Kelco Gelrite)。培養基之 pH 於滅菌前均調至 5.7，然後進行高壓 (1.01 kg/cm<sup>2</sup>) 高溫 (121°C) 滅菌 15 分鐘。所有試驗均在 95x45 mm 玻璃容器或 15x90 mm 無菌塑膠培養皿中進行。

## 三、培養環境：

接種後，置於黑暗中進行培養，溫度為 27 ± 1°C。兩星期後開始檢查花藥變化情形，其後每星期記錄癒合組織發生率，並以解剖顯微鏡進行檢查拍照記錄。

## 結果

### 一、癒合組織的形成：

單核期花藥接種於半固態培養基，經培養兩星期後，大部分有伸長及膨大現象，部分花藥自柄端或傷口處出現褐化情形。三星期後，大部分花藥漸漸褐化，唯部分花藥開始明顯膨大，並長出白色膨鬆的初生癒合組織。癒合組織有從花藥頂端或從花藥中部發生。經培養五星期後，癒合組織繼續增大，大部份出現黃白色膨鬆組織 (圖 1A)，少數呈白色絲狀或黃白色透明水晶狀細胞團。經培養八個星期後，初生癒合組織均呈現褐化。

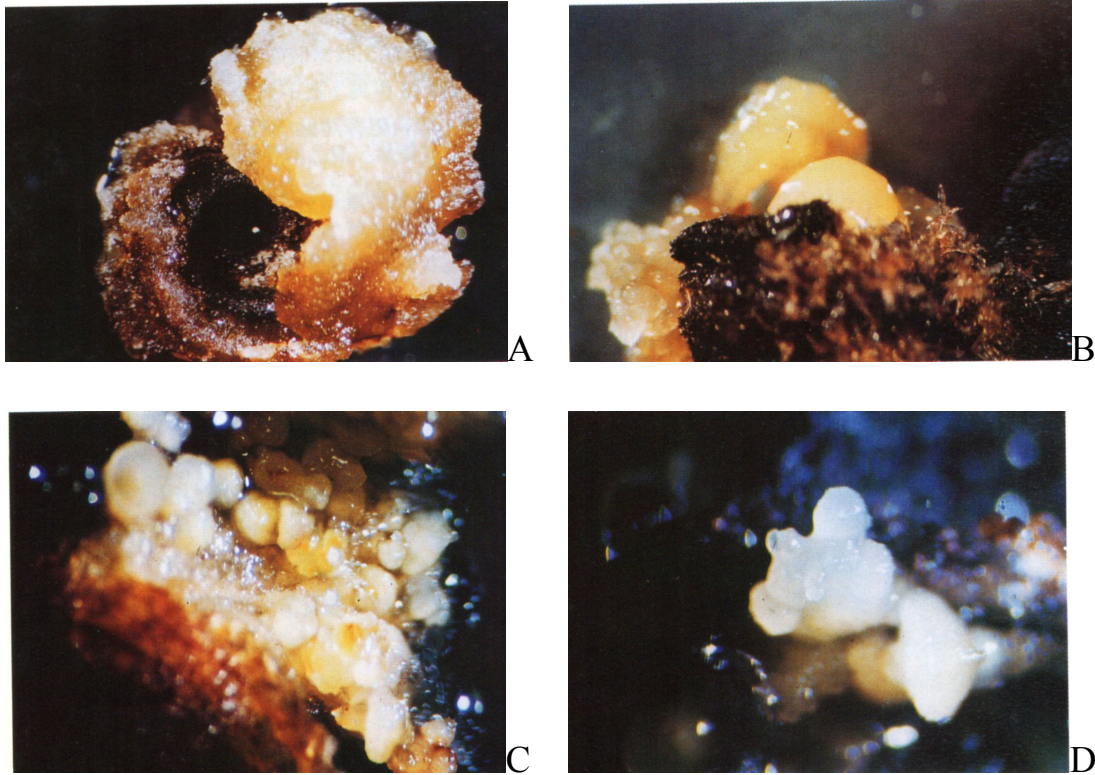
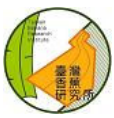


圖 1. 香蕉花藥癒合組織發生情形

Fig. 1. Development of callus from anthers of Pisang Mas.

- A. Soft and friable primary callus developed from anther after 3-5 weeks in culture (6X).
- B. Secondary callus with yellowish white and solid cell mass developed from blackened anthers after 4-5 months in culture (10X).
- C. Mass of globular secondary calli from anther (10X).
- D. Secondary calli with embryo-like structure developed from anther (10X).

在後期試驗中，按種的花藥繼續置於黑暗中培養。三到四個月後，在兩倍體栽培種（Pisang Mas 及 Pisang Lilin）之黑色花藥壁或已褐化的初生癒合組織中，出現少量黃白色，較緊密的次生癒合組織。這些次生癒合組織的形狀及生長情況有很大的差異：一些次生癒合組織呈半圓豆球狀緊密組織（圖 1B）；另一些則生長快速，呈細小細胞團，再集合為較大的癒合組織（圖 1C）；又一些癒合組織呈體胚形狀（圖 1D）。這些癒合組織維持生活力約三至四星期，便漸褐化，最後蛙黑而死亡。部分癒合組織曾移於分化培養基（不具植物生長素的 MS 培養基）中，均漸褐化死亡，未能誘導器官分化。



二、品種間初生癒合組織發生之差異：

以 MS 基本培養基加添 BA (2m/l) 及 NAA (4m/l) 進行比較八個品種/栽培種 (表 1) 發生初生癒合組織的情況。每品種接種花藥數約 300~400 個。初生癒合組織發生率以兩倍體栽培種 Pisang Lilin (29.4 %) 及 Pisang Mas (14.4 %) 為最高；其次為二或四倍體栽培種 Tu8 (12.7 %)、Gros Michel (8.7 %) 及 “Goden Beauty” (4.1 %)；最低為 AA 兩倍體野生種 *Musa acuminata* (1.9 %) 及 AB 雜交種 Ney Poovan (1.5 %)。而 BB 兩倍體野生種 *Musa balbisiana* 的花藥沒有產生任何癒合組織，具有 B 基因組的品種，初生癒合組織發生率均偏低。

三、不同培養基對初生癒合組織誘導的影響：

本試驗包含三個子試驗 (表 2)：試驗 A 比較兩種基本培養基 (MS+4mg/l NAA 及 N6+1.2mg/l picloram) 分別在洋菜或水晶洋菜中對誘導癒合組織的影響。參試品種與表一相同。在四個處理中，以 N6 基本鹽類加上 1.2m/l picloram 及水晶洋菜的培養基，誘導初生癒合組織達 46.4 % (表 2)，其誘導能力最高。比較不同凝固劑，含水晶洋菜的培養基之誘導率為 31.1 %，比含洋菜誘導率 (3.8 %) 高。若比較 MS (含 4mg/l NAA) 及 N6 (含 1.2m/l picloram) 基本培養基，則以後者 (26.2 %) 比前者 (8.8 %) 為佳，但其效果因所含之生長素不同，而不能確立。

表 1. 香蕉品種對花藥初生癒合組織誘導的影響

Table 1. Effect of *Musa* varieties on the induction of primary (1<sup>o</sup>) callus from banana anthers.

Variety/cultivar	Genotype	No. of anthers cultured	% of anthers forming 1 <sup>o</sup> callus <sup>x</sup>
Pisang Lilin	AA	367	29.4
Pisang Mas	AA	348	14.4
<i>M. acuminata</i>	AA	413	1.9
Gros Michel	AAA	389	8.7
Tu8	AAAA	393	12.7
Golden Beauty	AAAA	370	4.1
Ney Poovan	AB	346	1.1
<i>M. balbisiana</i>	BB	417	0.0

x Medium : MS basic salts with 2mg/l kinetin, 4mg/l NAA and 0.7 % Difco Bacto agar. Record was made after 6 weeks of culture.

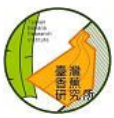


表 2. 不同培養基對香蕉花藥初生癒合組織誘導的影響

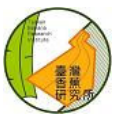
Table 1. Effect of culture media on the induction of primary (1°) callus from banana anthers.

Experiment <sup>x</sup>	Basal medium	Gelling agent	NAA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Picloram (mg/l)	No. of anthers cultured	% of anthers forming 1° callus
A	MS	Agar	4	0	0	1,511	1.7
		Gelrite	4	0	0	1,532	15.9
	N6	Agar	0	0	1.2	1,521	6.0
		Gelrite	0	0	1.2	1,642	46.4
B	N6	Agar	4	0	0	420	6.9
		Gelrite	4	0	0	420	18.8
		Agar	0	0	1.2	395	24.6
		Gelrite	0	0	1.2	420	32.6
C	N6	Agar	4	0	0	379	27.4
	B5	Gelrite	4	0	0	367	27.4
	MS	Agar	4	0	0	379	9.3
	MS	Gelrite	0	0.4	0	369	42.3

<sup>x</sup> All media contained 2 mg/l kinetin, 0.7 % Difco Bactoagar or 0.2 % gelrite. Varieties used in Exp. A were the same as those in Table 1; in Exp. B were Pisang Lilin, SH3142 and *M. acuminata*; in Exp. C were Pisang Lilin, Pisang Mas and Figue Sucree. Record was made after 6 weeks of culture.

試驗 B 以 N6 比為基本培養基，比較洋菜及水晶洋菜在不同植物生長素（4mg/l NAA 及 1.2 mg/l picloram）中的影響；並以兩倍體栽培種（AA）Pisang Lilin, SH3142 及 *Musa acuminata* 為試驗材料。其結果與試驗 A 相同。含水晶洋菜的培養基對初生癒合組織的誘導率（25.7%）比含洋菜者（15.7%）為高。同時，此試驗證明含 1.2mg/l picloram 有效地增加初生癒合組織的發生，其誘導率（25.7%）比含 4mg/l NAA 培養基者（15.7%）為高。

試驗 C 包括四個處理：B5、N6、MS 基本培養基並加添 NAA（4mg/l），另一處理以 MS 為基本培養基，加添 0.4mg/l 2,4-D 代替 NAA。試驗材料為兩倍體的 Pisang Mas, Pisang Lilin 及 Figue Sucree。結果顯示三種基本培養基在相同條件下，以 N6 及 B5 對初生癒合組織的誘導效果均比 MS 高；若以 MS 為基本培養基，加入 0.4mg/l 2,4-D 有促進誘導初生癒合組織效果，其效果比含 4mg/l NAA 者為佳。綜合三個子試驗的結果，加添較強的植物生長素（Picloram 及 2,4-D）及水晶洋菜對初生癒合組織的誘導有顯著效果。



四、不同植物生長素對香蕉花藥初生及次生癒合組織誘導的影響：

為進一步了解不同植物生長素對香蕉花藥培養的影響，乃以 N6 基本培養基，分別添加 NAA (4mg/l)，picloram (2mg/l)，dicamba (2mg/l) 及 2,4-D (2mg/l) 進行比較試驗。所採用的品種為 Pisang Mas，接種之花藥數為 3,349 個。結果見表 3。六星期後，初生癒合組織的平均發生率為 37.6 %。比較四種植物生長素的效果，初生癒合組織在含 dicamba 的培養基，其誘導率最高 (52.5 %)，其次為 picloram (45.0 %) 及 2,4-D (43.2 %)，而 NAA 誘導率最低 (9.97 %)。

初生癒合組織出現約一個月後，逐漸褐化。繼續置於黑暗中培養，於二至四個月後，在褐化的初生癒合組織或黑色的花藥壁出現少量質地緊密，呈顆粒狀的次生癒合組織。其出現頻率隨所用之培養基有所差異：在含 picloram 的培養基，其誘導率 (3.5 %) 最高，其次為由 camba (3.3 %)，2 之 4-D (0.08 %) 又次之，而含 NAA 的培養基則沒有次生癒合組織的發生。可見 picloram 及由 camba 在誘導次生癒合組織有明顯效果。

表 3. 不同植物生長素對 Pisang Mas 花藥初生及次生癒合組織誘導的影響

Table 3. Effect of auxins on the induction of primary (1°) and secondary (2°) callus from anthers of Pisang Mas.

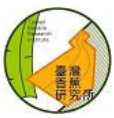
Auxin <sup>x</sup>	No. of anthers cultured	% of anthers forming 1° callus <sup>y</sup>	% of anthers forming 1° callus <sup>z</sup>
NAA (4mg/l)	831	9.97	0.00
2,4D (2mg/l)	840	43.18	0.08
Picloram (2mg/l)	838	45.04	3.52
Dicamba (2mg/l)	840	52.50	3.30
小計/平均	3,349	37.67	1.73

<sup>x</sup> All media containing N6 basal salts with 2mg/l kinetin, 6 % sucrose and 0.2 % gelrite.

<sup>y</sup> Cumulative ~equencies after 6 weeks of culture.

<sup>z</sup> Cumulative ~equencies after 5 months of culture.





## 討論

從本研究的結果，顯示香蕉花藥培養在合適的基本培養基及植物生長素的誘導下，先後出現兩種不同的癒合組織。首先出現為黃白色膨鬆細胞團，稱之為初生癒合組織。這些初生癒合組織發生時間在接種後三至五星期，發生頻率高；同時，生長迅速，呈不規則形狀，不久即呈褐化，失去生活力。估計初生癒合組織可能由化藥壁體細胞發育而成，因組織鬆散，缺乏再生能力；並且，為單倍體的可能性不高，與花藥培養誘導單倍體的目標不符。當花藥及初生癒合組織逐漸褐化，再經二至四個月的培養，出現細小白色緊密的次生癒合組織，發生頻率約為1~3%。這種階段性癒合組織的發生，在花藥培養中不常發現。這些次生癒合組織的來源可能是從舊有的初生癒合組織再發育而成，也可能是從花藥內部的雄孢子細胞轉變而成。若為後者，形成單倍體組織的可能性較高，有待進一步探討。

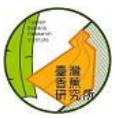
有關影響花藥培養的文獻不少<sup>(1,4,8,16)</sup>，重要的因素包括：1.花粉發育時期；2.預處理方式；3.培養基及4.作物基因型等。這些因素相互作用，不同作物效果互異。故必須按作物情況個別研究，尋找花藥培養的最佳方法。本研究顯示不同香蕉品種，在產生初生及次生癒合組織的能力有明顯差異。其中屬AA基因型的Pisang Mas及Pisang Lilin發生癒合組織均比其他品種為高。可見在誘導香蕉花藥癒合組織，品種的選擇有一定的影響。

癒合組織的發生與培養基的成分有密切關係。在含相同的植物生長素，MS培養基的誘導能力最差，N6及B5的誘導力較佳。若以水晶洋菜為培養基的凝固劑，更能促進癒合組織的發生。本試驗進一步證明加添植物生長素有增加癒合組織的發生，以picloram及dicamba誘導效果最佳，其次為2,4-D，NAA最差。因此，綜合本研究結果，以水晶洋菜為凝固劑的M培養基，加添適量的picloram或dicamba，可提高香蕉花藥癒合組織的誘導。本試驗的結果與Huang及Chi<sup>(11)</sup>的結果一致。她們以香蕉營養組織進行癒合組織誘導試驗，證明picloram為強效的植物生長激素，水晶洋菜可減低植物組織在試管中的褐化，兩者均有利於香蕉癒合組織的誘導。

Bakry在1993及1994曾報導以兩倍體野生蕉*Musa acuminata* ssp. *Burmannica* cv Long Tavoy進行花藥培養<sup>(6,7)</sup>。在每公升含0.4 mg IAA及1mg BAP的MS培養基中，接種後35天，獲得一個細小而緊密的癒合組織，並成功地分化成植株。經染色體檢查及同功異構酶(GOT及EST)分析，證明為來自花粉的同源雙倍體，這是香蕉花藥培養成功的首先報導。惜有關方法及過程未有詳細敘述，發生頻率亦低。因此，有關香蕉花藥培養雖未有重大進展，但從現有之資料顯示，透過花藥癒合組織的誘導，獲取單倍體植株作為香蕉育種新途徑，值得深入研究。

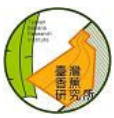
## 誌謝

本研究部分試驗由李國輝先生及吳雅文小姐協助進行，謹此致謝。



### 參考文獻

1. 陳其昌. 1988. 花藥培養的一些基本問題. 園藝作物組織培養之應用研討會專集. 國立台灣大學園藝編印. P. 19-25.
2. 孫櫻芳. 1984. 植物組織培養技術應用於果樹之改良—香蕉花藥培養. 農委會研究報告. 台灣香蕉研究所. P. 9.
3. 黃新川、柯文雄、趙治平. 1992. 香蕉抗黃葉病品種之選育及防治成果. 病蟲害非農藥防治技術研討會專刊. p. 259-280.
4. 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.
5. 鄧澄欣、黃新川、李倩雲. 1991. 香蕉品種改良的新途徑. 中國園藝 37:129-140.
6. Bakry, F., R. Haicour, J. P. Horry, R. Megia, and L. Rossignol 1993. Application of Biotechnologies to Banana Breeding. In : Proceedings of the Workshop on Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement. INIBAP, Montpellier. p.52-62.
7. Ba F., J. Horry, and F. Kerbellec. 1994. Androgenesis in the banana. In: C. Teisson (ed.) In vitro Culture of Tropical Plants CIRAD, Montpellier. p.57-59.
8. Chen, C. C., H. S. Tsay, and C. R. Huang. 1986. Rice ( *Oryza sativa* L.) factors affecting androgenesis. In : Y. P S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2: Crops I. Spring-Verley, Berlin. p.123-138.
9. Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, D. C. Yin, and C. Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18:659-668.
10. Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
11. Huang, L. C. and D. L. Chi. 1988. Pivotal roles of picloram and gelrite in banana callus culture. *Environmental and Experimental Botany* 28:249-258.
12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
13. Perea-Dallos, M. 1993. Contribution to the study of banana anther culture. In: Proceedings of the Workshop on Biotechnology Application for Banana and Plantain Improvement. INIBAP, Montpellier. p.159-162.
14. Pens, S. 1989. Contribution to the study of callus induction from *Musa* anthers (Abs.). Congress Cientifico Nacional, 6, Panama. p.21.
15. Rowe, P. R. and F. E. Resales. 1993. Breeding cooking bananas for areas with marginal growing conditions. In: Proceedings of the Workshop on Biotechnology Application for Banana and Plantain Improvement. INIBAP, Montpellier. p.128-138.
16. Sangwan, R S. and B. S. Sangwan-Norrel. 1990. Anther and pollen culture. In: S. S. Bhojwani (ed.) *Plant tissue Culture: Application and Limitations*. Elsevier, Amsterdam. p.220-241.
17. Stover, R H. and I. W. Buddenhagen. 1986. Banana breeding: polyploidy, disease resistance and productivity. *Fruits* 41:175-191.



18. Tsay, H. S., S. H. Miao, and J. M. Widholm. 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from Maize anther culture. *J. Plant Physiol.* 126:33-40.
19. Vuylesteke, D. R., R. Swennen, and R. Ortiz. 1993. Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* 65:33-42.

### Summary

The objectives of this study are to investigate the effect of banana varieties, culture media and growth regulators on the callus induction from *Musa* anther. The following is summary of the results :

1. Two types of calli, namely primary callus and secondary callus were induced from banana anther culture. Primary calli appeared about three to five weeks after culture. They occurred at a high frequency (upto 50 %) as soft, yellowish white, friable cell masses which soon turned brown. Secondary calli were found at a low frequency (1-3 %) five to six months after culture. These were small, solid and yellowish white cell mass of various shapes with higher potential of differentiation.

2. Among 8 *Musa* varieties tested, the frequency of primary callus formation were highest in diploid cultivars, Pisang Lilin (29.4 %) and Pisang Mas (14.4 %), followed by triploid (AAA) and tetraploid (AAAA) genotypes and in varieties containing the B genome (including Ney Poovan and *Musa balbisiana*) were the lowest.

3. In comparing different basic media, it was found that the effect on induction of primary callus in medium with basic salts of N6 and B5 was better than MS. The use of gelrite (0.2 %) instead of agar as solidifying agent gave better results in callus induction.

4. Addition of auxins to culture media could also increase the frequencies of primary and secondary callus formation. The frequencies of secondary callus in N6 medium with 2 mg/l picloram or dicamba were 3.5 and 3.3 %, respectively, and was higher than that of 2,4D (0.08 %) and NAA (0.0 %). Organogenesis from calli was not observed in this study and requires further investigation.