

十字花科蕓苔屬植物 利用小孢子培養 育成純系親本簡介

農試所生技組 夏奇銳 陳威臣 曹進義

一、前言

在生產 F_1 種子的育種流程中，純系親本的育成扮演了相當重要的角色，一般同質純系親本的育成需時6-8年，若加上有自交不親和性以及自交弱勢等障礙，則自交純系育成的難度更高。十字花科(*Brassicaceae* or *Cruciferae*)蕓苔屬(*Brassica*)植物超過150種，其中許多是重要的蔬菜及油料作物，因此任何能改進蕓苔屬植物育種流程的技術，對該植物而言是一小步，對整個產業而言則是一大步的躍進，油菜小孢子培養育成雙單元體(Doubled haploid, DH)純系親本技術的開發即為一例。

二、花藥培養與小孢子培養之比較

利用花藥培養獲得單倍體(haploid)或雙單元體純系親本的技術，過去已成功的應用於小麥、大麥、黑麥、水稻等禾本科植物，利用此法也成功推出了許多商

業品種，其優點為只需雜交一代而非六代的時間，即可獲得100%的同質純系作為育種親本，節省了純系親本育成所需的時間，更提高了親本同質性的純度。蕓苔屬植物最早的單倍體由Keller(1975)自小油菜*B. campestris*以及Thomas and Wenzel(1975)自大油菜*B. napus*的花藥成功培養出來；但從1982年Lichter發展出油菜小孢子培養技術後，大多數蕓苔屬植物皆改採用小孢子培養，原因是從小花蕾中取出花藥加以培養是一項非常耗費人力的工作，每人每日操作可得的花藥數相當有限；反之，每個花藥中含有數以萬計個小孢子，只要簡單的壓擠動作即可將為數眾多的小孢子自花蕾中釋放出來，每日可處理的花蕾數則是花藥培養的十數倍，兩相比較，效率之高下不言而喻。花藥培養的另一缺點是小孢子位於花藥之內，花藥培養獲得的再生植株，有時為經由癒傷組織而來，再生的來源有可能為體細胞（如花藥壁），且經由癒傷組織的再生過程亦提高了遺傳變異的可能性；反觀小孢子培養，因培養時已清楚排除體細胞的存在，再生植株來源因此非常明確。更進一步比較由小孢子培養與花藥培養而來的再生族

作者：夏奇銳研究員
連絡電話：04-23317327

群，可以發現前者染色體倍體數的差異化較小是其優點。以操作技術而言，小孢子培養過程雖然較花藥培養需要多一點的操作步驟，但在熟悉操作後則無此問題。以油菜為例，小孢子培養的效率是花藥培養的10倍，除了小孢子數量眾多之外，一些影響小孢子發育的因子可以精確的篩選也是原因，例如使用梯度離心(gradient centrifugation)選別特定發育階段的小孢子，以及培養密度的調整等，這些都是讓小孢子培養的胚形成(embryogenesis)率得以提高的原因。

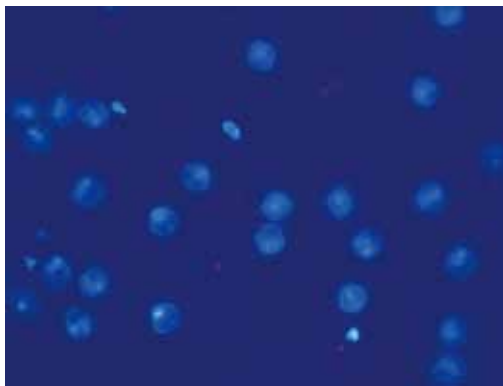
三、小孢子培養流程

小孢子培養的成功與否從母體植株生長狀態開始，以及操作流程中的每一個步驟皆不能輕忽，流程中包括母體植株的栽培、收集花蕾、取出小孢子、小孢子培養、胚形成以及染色體倍加處理等步驟，以下藉由小孢子培養的流程，逐一來看各種影響雙單元體育成的因子。

1. 供試植株的遺傳特性及生長環境：一些研究顯示小孢子之胚發育能力可能只由少數的基因控制，因此不同品種甚至單株間具有很大的差異性(genotype dependent)，選擇一些小孢子胚誘導反應良好的品種加以雜交，可以提高雜交後代小孢子培養成功的比率。供試植株生長的环境必

須條件良好且穩定，因此最好於人工光源室、生長箱或溫室環境中生長，尤其在花芽誘導與花粉發育期間的溫度變化，對於開花的數量以及小孢子發育品質有很大的影響。整體而言，低溫環境能促進蕓苔屬植物的開花品質，進而提高小孢子培養的成功率。

2. 小孢子發育階段：一般認為單核中晚期到雙核早期的小孢子是最適合培養的時期（圖一），由於小孢子發育時期需經過染色後於顯微鏡下觀察方能確認，在實務操作上則可藉由花蕾的大小、花冠與花藥長度的比值等，作為取樣的間接指標。例如*B. carinata*最佳之花蕾大小為2.5-3.0 mm，但因不同品種之花蕾外觀存在有差異，研究人員有必要針對個別品種建立資料。此外不同發育時期之小孢子可利用梯度溶液藉由離心處理區分開來。
3. 預培養：相對於提供開花植株最佳的生長環境與花芽分化的環境，小孢子培養在胚誘導的過程中則需施予一些逆境處理，用意在于扭轉原本配子體發育路徑轉向孢子體發育。一般蕓苔屬



圖一、花椰菜開花株（左）及其小孢子發育階段-處於單核靠邊期之小孢子（右）。（照片來源-農試所生技組組織培養研究室）

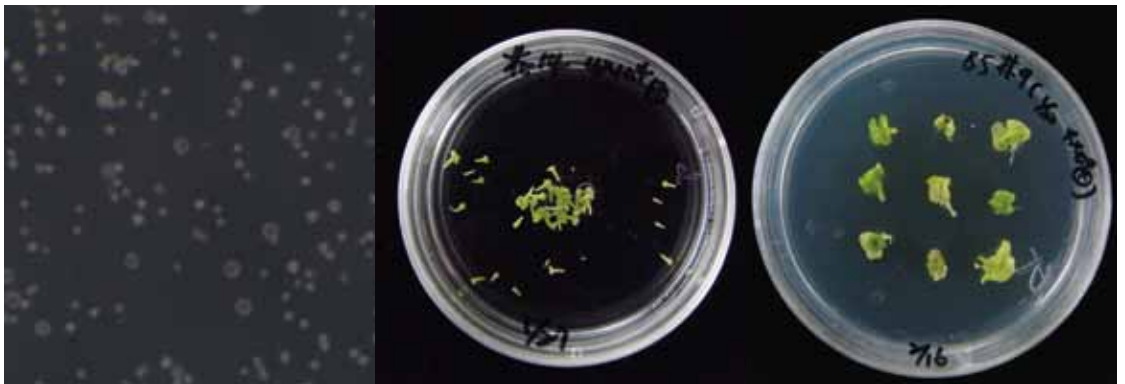


植物小孢子培養最常使用的逆境處理為高溫(heat shock)，溫度為30-35℃，處理時間1-3天，之後再恢復於25℃培養。研究顯示高溫逆境會影響染色體分裂時微管體(microtubule)的分佈，讓原本營養核、生殖核大小不均的分裂，趨向於大小平均的體細胞分裂，因而有利於孢子體發育；同樣也會影響微管體功能的還有秋水仙素處理，因此在小孢子培養初期如施予秋水仙素處理，也會有與高溫逆境處理相同的效果。

4. 培養基：蕁苔屬植物最常使用的小孢子培養基改良自Nitch and Nitch (1967) 鹽類配方並添加胺基酸如麩醯胺酸(l-glutamin)、絲胺酸(l-serine)的NLN液體培養基，蔗糖濃度在8-17%，pH值在5.8-6.6之間，常用之蔗糖濃度為13%，pH值為6.1或6.2。一般而言，在適當的培養基中，接種2-3天後即可觀察到小孢子開始分裂，接種3週後肉眼即可見不同發育時期的胚體逐漸

形成(圖二)。幼胚發育為植物體的再生培養基一般以固態之B5或MS培養基培養為主，以發育至子葉期的體胚進行繼代其再生的比率最高。以*B. oleracea*為例，其胚成功發育為植株的比率約在35-70%之間。幼胚亦可藉由培養基中添加ABA、適度乾燥以及低溫(4℃, 6-12 hr)等處理來提高其再生比率，此外添加少量生長調節劑亦有助於提高體胚再生成為正常植株的比例。

5. 染色體倍加處理：通常小孢子培養獲得的再生植株包含單倍體及二倍體，也就是說在小孢子培養的過程中，染色體有機會自然倍加成為雙單元體，但如果自然倍加率太低(如低於50%)，則需輔以秋水仙素處理，以人工方式誘導染色體倍加。秋水仙素處理的時機可以選在小孢子高溫處理時加入低濃度的秋水仙素共培養數天、或在後期將胚體及再生小苗培養於含有秋水仙素培養基中一段時間，以及利用再生植株的根部短暫浸泡秋水仙



圖二、花椰菜小孢子懸浮培養之胚發育過程。由左至右為小孢子懸浮培養、不同發育階段之胚體及子葉期胚。(照片來源-農試所生技組組織培養研究室)

素(0.1-0.2%, 2-6 hr)等方式來達成。

6. 再生植株的染色體倍體數檢測：早期再生植株的染色體通常以根尖染色加以確認，相當耗費人力，因此亦有以表皮細胞上之氣孔保衛細胞的大小以及其中葉綠體數目作為間接確認之方法，近年來流式細胞儀(Flow cytometer)的使用，大大提高了染色體倍體數檢測的效率，讓大量再生植株之倍體數篩選工作得以快速準確的完成。
7. 植株園藝性狀及稔性觀察：一般而言，單倍體植株較為瘦小且不易栽培，雙單元體的生長表現則與一般二倍體相似，因此田間種植最重要的觀察在於植株是否具有稔性，畢竟獲得雙單元體的目的在作為育種親本之用，如果植株不具稔性，則其利用性降低。此外在園藝性狀方面，雙單元體特別有利於隱性基因的篩選，可以在當代即確認隱性性狀的有無與優劣。

四、結語

影響小孢子培養的因子眾多，各個研究室的操作流程或許因此有些差異，但基本上已建立出可行的作業流程，這讓想要進行蕓苔屬植物小孢子培養的研究學者省去許多摸索的時間。除此之外，游離小孢子是研究小孢子發育以及胚再生的最好材料，小孢子發育而來的胚則是進行基因轉殖、突變選拔以及生化、生理及遺傳研究最佳的材料。總體來看，小孢子培養除了具有產業應用性

之外，也是跨領域研究的最佳媒介，其利用性相當令人期待。

五、參考文獻

- Babbar, S. B., P. K. Agarwal, S. Sahay, and S. S. Bhojwani. 2004. Isolated microspore culture of Brassica: an experimental tool for developmental studies and crop improvement. *Indian J. Biotech.* 2: 203-208.
- Ferrie, A. M. R., and K. L. Caswell. 2010. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 104:301-309.
- Gik-Humanes, J. and F. Barro. 2009. Production of doubled haploids in Brassica. In: Touraev, A., B.P. Forster and S.M. Jain (eds.) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 65-73.
- Möllers, C. and M.C.M. Iqbal. 2009. Doubled haploids in breeding winter oilseed rape. In: Touraev, A., B. P. Forster, and S. M. Jain (eds.) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 161-170.
- Da Silva Dias J. C. 2003. Protocol for broccoli microspore culture. In: Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko (eds.) *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 195-204.