

# 花椰菜小孢子培養技術之研究

夏奇鈺<sup>1,\*</sup> 陳威臣<sup>2</sup> 曹進義<sup>3</sup> 周宜玫<sup>4</sup> 林子凱<sup>5</sup>

## 摘要

夏奇鈺、陳威臣、曹進義、周宜玫、林子凱。2017。花椰菜小孢子培養技術之研究。台灣農業研究 66(2):94-104。

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) 是台灣的重要蔬菜，但有關花椰菜小孢子培養的研究甚少。本研究以台灣花椰菜商業一代雜交品種 (F<sub>1</sub>) 為材料，測試各品種小孢子培養之反應，並建立胚誘導及胚發芽所需條件，生產雙單倍體 (doubled haploid; DH) 植株作為培育純系之用。花椰菜 8 個 F<sub>1</sub> 品種之小孢子於不同批次，以相同接種濃度 ( $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup>) 培養於 NLN-13 培養液中，並以 32°C 分別處理 1 d 或 3 d，8 品種中以「農友極早生」及「慶農 S-65」有較高之胚形成率，而「慶農 H-42」、「慶農 H-46」及「農友嬌雪」則未有胚形成。「農友極早生」以含有 13% 蔗糖之全量及半量 NLN 鹽類濃度培養基與 32°C 處理時間 (1、2 及 3 d) 組合進行複因子試驗，結果顯示 32°C 處理時間、培養基鹽類濃度以及兩者間之交互效應影響皆極為顯著 ( $P < 0.01$ )，其中以 1/2 NLN-13 培養基配合 32°C 處理 1 d 可獲得 12.0 胚/皿最高。將「農友極早生」及「慶農 S-65」小孢子培養而來之子葉期胚繼代於 B5 培養基中培養 4 wk，發現僅有少數胚正常發芽 (2.1% 及 4%)，多數胚未能正常生長且伴隨有二次再生組織長出，將未正常發芽之培植體依其形態分類後，先繼代於含有 BA 之培養基中預培養 1 wk，再繼代於不含生長調節劑之培養基中培養 4 wk，結果兩品種皆以胚軸上長有再生組織之培植體有最高之小苗分化率，分別為「農友極早生」的 66.7%，及「慶農 S-65」的 86.9%。以流式細胞儀檢測「農友極早生」及「慶農 S-65」出瓶小苗之染色體倍體數，兩品種之 2 倍體比率分別為 58.8% 及 56.3%，DH 植株比例皆超過 50%。

關鍵詞：花椰菜、小孢子、雙單倍體。

## 前言

台灣蔬菜種苗產業從早期接受國外種子公司委託採種開始逐漸發展，在採種技術成熟後遂開發自有品種，目前國內蔬菜種苗業者在花椰菜擁有許多廣受市場歡迎的優良品種，不僅供應台灣農民所需，並外銷至鄰近的亞熱帶國家與中國大陸 (Lo *et al.* 2012)。蔬菜育種是具有高度技術門檻的產業，市場上對於種子純度及其耐候、抗病等特性的改進，有相當高的

要求，業者不但要堅守品質，還必須不斷推陳出新，方能在競爭劇烈的市場中保有一席之地 (Wang *et al.* 2012)。一代雜交品種 (F<sub>1</sub>) 因具有雜種優勢及高整齊度的特性而廣受農民歡迎，在生產 F1 種子的育種流程中，純系親本的育成扮演了舉足輕重的角色，一般同質純系親本的育成需時 6-8 年，但若作物具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提高，成為新品種育成首要克服的瓶頸。十字花科作物具有自交不親和性，以傳統自交

投稿日期：2016 年 10 月 13 日；接受日期：2016 年 3 月 18 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

方式育成純系，在人力及時間上投入的成本較高，若要快速因應市場變化推出新品種，必須提高純系親本育成之效率。

花藥培養是在離體 (*in vitro*) 狀態下對花藥進行人工培養，透過培養環境的變化達到改變花粉發育途徑的目的，亦即誘導花粉由原本配子體發育路徑轉為孢子體發育，並長成單倍體植株，過程中小孢子或直接分化為胚，或先形成癒傷組織再發育成胚。花藥培養的目的除了獲得單倍體作為隱性基因選拔之用外，主要在獲得染色體倍加的同質雙單倍體 (doubled haploid; DH)，DH 一般可藉由秋水仙素 (colchicine) 處理單倍體植株獲得，或於組織培養過程中藉由染色體自然倍加而產生。自交作物之 DH 可直接固定成為純系品種，省去 5–6 代自交的時間；異交作物之 DH 則可作為培育  $F_1$  品種之純系親本，或利用 DH 具有遺傳同質性的特性作為測試親。綜合言之，經由花藥培養獲得 DH 應用在育種上，不僅可縮短育種年限，並能提高選拔效率 (Forster & Thomas 2005)。

蕓苔屬 (*Brassica*) 植物的單倍體最早由 Thomas & Wenzel (1975) 自大油菜 *Brassica napus* 以及 Keller *et al.* (1975) 自小油菜 *Brassica campestris* 的花藥成功培養出來；但 Lichter (1982) 發展出油菜小孢子培養技術後，大多數蕓苔屬蔬菜皆改採小孢子培養以獲得 DH 植株，原因是從小花蕾中取出花藥非常耗費人力，每人每日可取得的花藥數量相當有限；反之，每個花藥中含有數以萬計的小孢子，只需簡單的壓擠動作即可將數量可觀的小孢子自花蕾中釋放出來。花藥培養的另一缺點是小孢子位於花藥之內，難以觀察其再生細胞的來源，再生植株有可能來自於花藥壁組織而非小孢子 (Ferrie & Caswell 2011)。此外，許多花藥培養經由癒傷組織間接再生的過程，提高了遺傳變異產生的可能性；反觀小孢子培養，在培養初期即已清楚的將其他體細胞加以排除，再生植株明確發育自小孢子。以蕓苔屬植物為例，小孢子的再生路徑為直接發育為胚，降低了遺傳變異發生的機率。更進一步比較小孢子培養與花藥培養而來的再生族群，顯示前者染

色體倍體數的差異化較小亦為其優點。因此，雖然小孢子培養的操作技術較高、過程較繁複，配合試驗所需的儀器設備亦較多，但以油菜為例，小孢子培養的效率達花藥培養的 10 倍，目前十字花科蔬菜 DH 的育成大都採用小孢子培養，原因即在此 (Custers 2003)。

十字花科蔬菜是台灣非常重要之蔬菜，相關栽培及育種之研究相當豐富，但有關花藥培養的研究則甚少 (Chang *et al.* 1996)，小孢子培養技術更付之闕如，亟需學研單位積極投入並迎頭趕上。本研究以台灣花椰菜商業  $F_1$  為材料，測試各品種之小孢子培養反應，並建立胚誘導及發芽所需之條件，生產 DH 植株作為純系之用，加速  $F_1$  品種之育成。

## 材料與方法

花椰菜商業  $F_1$  種子分別為購自慶農種苗有限公司 (Ching Long Seed Co., Ltd., Tainan, Taiwan) 的「H-37」、「H-42」、「H-46」、「M-45」、「S-65」，欣樺種苗貿易有限公司 (Singflow Seed Trading Co., Ltd., Tainan, Taiwan) 的「旭雪」以及農友種苗 (Known-you Seed Co., Ltd., Kaohsiung, Taiwan) 的「嬌雪」、「極早生」等品種。將種子播種於泥炭土與蛭石 1:1 混合介質中，種子發芽 3 wk 後，假植至含有相同介質的 3 寸盆中，待花椰菜苗本葉達 4–5 片時，定植於 10 寸盆中，置於日/夜溫 20°C/10°C、光照 16 h、光照強度為 85 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 之人工氣候室內生長至開花。生長期間每週施用 1 次 1 g L<sup>-1</sup> 花寶 2 號 (N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 20 : 20 : 20) 液肥，花芽分化後改施濃度相同之花寶 3 號 (N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 10 : 30 : 20) 液肥。

分離小孢子之操作流程修改自 Custers (2003)。剪下小花序進行小花蕾分級，若未特別註明則是以 3–4 mm 長度之小花蕾進行消毒。取 16 朵消毒好之花蕾，以針筒推進器加壓，將小孢子由花藥囊內釋出，加入 B5-13 (B5 基本鹽類添加 13% 蔗糖) 培養液後，並以 37 μm 濾網過濾，重複壓迫花蕾、過濾動作，將濾液收集於離心瓶，共約 8 mL。將 3 批次濾液收集於同一離心管，並定量至 25 mL，放入預冷至 4°C 離心機，以 100× g 離心 6 min 後

取出。將上清液吸除後，加入 10 mL B5-13 液體培養基，重複上述離心動作 2 次，最後加入 10 mL NLN-13 (NLN 基本鹽類添加 13% 蔗糖) 或 1/2 NLN 液體培養基搖勻，製作懸浮液。取 10  $\mu$ L 懸浮液以血球計數器計算小孢子數，並依實際濃度加入適量之 1/2 NLN-13 或 NLN 培養液，將小孢子懸浮濃度調整至  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup>。取 5 mL 懸浮液置入 6 cm 培養皿，每皿並加入 0.1 mL 活性碳溶液，活性碳溶液之配製為 1 g 活性碳與 0.5 g agarose (Sigma type IX) 溶於 100 mL 水中，並經高壓滅菌後備用。培養皿以石蜡膜 (parafilm) 加封後，置於 32°C 恆溫箱，暗培養 24–72 h 後，移至 25°C 黑暗中，靜置培養 2 wk，之後將培養皿移至光照下，以 60 rpm 震盪培養，直到幼胚分化，幼胚發育至子葉期時進行繼代。

將「農友極早生」之子葉期胚逢機接至 MSD1、MSD2 與 MSB 培養基中培養，每皿接種 20 個子葉期胚為 1 重複，1 wk 後將胚繼代至 MSS 培養基中，繼續培養 4 wk 後調查發芽率；另外將子葉期小胚繼代於裝有 MSG 培養基之 250 mL 三角瓶中培養，每瓶接種 20 個子葉期胚為 1 重複，培養 5 wk 後調查發芽率。以上 4 種處理每 1 處理共 11 重複，調查完後將已抽葉之芽體繼代至 MSS 發根培養基。培養基皆以 MS 基本鹽類 (Murashige & Skoog 1962) 為基本培養基，其中 MSD1 添加 20 g L<sup>-1</sup> 蔗糖、2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 及 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA、8.0 g L<sup>-1</sup> Bacto agar。MSD2 培養基與 MSD1 培養基配方相同，但生長調節劑更改為 0.2 mg L<sup>-1</sup> BA 及 0.2 mg L<sup>-1</sup> IAA。MSB 培養基相同於 MSD1，但額外添加 2.0 mg L<sup>-1</sup> zeatin，且以 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA 取代 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA。MSG 培養基添加 10 g L<sup>-1</sup> 蔗糖、10 g L<sup>-1</sup> 葡萄糖、0.5 g L<sup>-1</sup> 活性碳及 10 g L<sup>-1</sup> Bacto agar。發根之 MSS 培養基則添加 10 g L<sup>-1</sup> 蔗糖、10 g L<sup>-1</sup> Bacto agar。培養基配製完成後，在高壓滅菌前調整 pH 為 5.8。

將「農友極早生」及「慶農 S-65」之子葉期胚接種至 B5 固體培養基中培養 4 wk，將正常發芽之培植體繼代至不含生長素之 MSA 培養基外，其他形態之培植體先繼代至 MSD1 (「農

友極早生」)、MSB (「慶農 S-65」) 培養基中培養 1 wk 後，再繼代至 MSS 培養基，於 4 wk 後調查存活數與抽芽數。MSA 培養基為 MS 基本鹽類添加 20 g L<sup>-1</sup> 蔗糖與 10 g L<sup>-1</sup> Bacto agar。

流式細胞儀檢測方法：切取馴化成活小植株之第 1 片成熟葉約 1 cm<sup>2</sup>，加入 0.2 mL UV CyStain Precise T Kit 之萃取緩衝液 (Partec, Germany)，以刀片將組織切碎，再添加 0.8 mL UV CyStain Precise T Kit 之染色液後過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (Ploidy Analyzer, Partec PA, Germany) 檢測。每個芽體取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 2,500 個。

DNA 之萃取與 PCR 反應：取參試植株約 5 mm 直徑的葉圓片置於 PCR tube 中，加入 100  $\mu$ L 植物 DNA 萃取試劑 QuickExtract™ (Epicentre Co., Ltd.) 後，依據試劑套組之操作程序進行 DNA 萃取。PCR 反應使用的分子標誌 “G317”，其引子 (primers) 主要依據阿拉伯芥基因 “At5g01160” 之外顯子 (exon) 區域 DNA 序列進行設計，經測試該分子標誌於參試品種慶農 S-65 中可擴增出異質結合 (Heterozygous) 之條帶。PCR 反應總體積為 15  $\mu$ L，內含 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>，0.25 mM dNTP，0.2 mM each primer，3  $\mu$ L genomic DNA 及 1.0 units Taq polymerase (Invitrogen Co., Ltd.)。反應溫度條件為 94°C 5 min 後進入循環 40 次的溫度反應 (94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 60 s)，最後以 72°C 5 min 結束，PCR 產物以 2% agarose 進行電泳分析，再以 SYBR Safe (Invitrogen Co., Ltd.) 染劑染色照相。

## 結果與討論

十字花科作物自油菜 (*Brassica napus* L.) 小孢子培養以高溫逆境 (heat shock) 處理成功提高胚誘導率後 (Keller *et al.* 1987)，大幅提高了小孢子培養的成功率；培養基則以 Lichter (1982) 與 Takahata & Keller (1991) 改良自 Nitsch & Nitsch (1967) 培養基之 NLN 培養基添加 13% 蔗糖 (NLN-13) 最為常用。薺苔屬花椰菜的小孢子培養與油菜相比，其誘導率較

低，為提高小孢子培養的成功率，必須針對花椰菜不同品種的培養條件加以修正。小孢子培養成功誘導 DH 之效率受到許多因子影響，例如培植體來源 (基因型、植株生長與開花環境、小孢子發育時期)、培養基組成 (基本鹽類、植物激素、碳源)、培養條件 (溫度處理) 等因素。逆境處理被認為是改變花粉發育途徑的重要因子 (Smykal 2000)，溫度逆境對一些花藥 (小孢子) 培養反應低的品種有一定增進之效果。蕓苔屬植物一般以 32°C 高溫逆境處理 1-3 d 最常被使用 (Ferrie 2003)。本試驗執行之策略為以國內種苗公司生產之 F<sub>1</sub> 品種為試驗材料，首先進行品種反應篩選，利用相同的培養條件來確認花椰菜不同品種的小孢子培養反應，再以反應較佳的品種為材料，改進小孢子培養之效率。

將 8 個商業 F<sub>1</sub> 品種以  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup> 小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，並分別以高溫 32°C 處理 1 d 及 3 d (表 1)。以 32°C 處理 1 d 的 5 個品種中，以「農友極早生」獲得 45 個胚，平均 7.5 胚/皿最高，其次為「欣樺旭雪」及「慶農 H-37」；32°C 處理 3 d 的 4 個品種中，以「慶農 S-65」以及「農友極早生」獲得較高之胚數，平均胚數分別為 24.8 胚/皿及 15.8 胚/皿，其次為「慶農 M-45」；在 32°C 兩種處理時間中皆未見胚形成的品種，分別是「慶農 H-42」、「慶農 H-46」及「農友嬌雪」。

8 個品種中僅「農友極早生」分別以 32°C 處理 1 d 及 3 d，結果顯示每皿平均胚數以 3 d 處理組較高。因為生長箱空間的限制，各品种植株係分批於不同的時間種植，開花後並以相同條件進行小孢子培養試驗，雖然植株生長環境條件相同，但各批次植株本身的生長狀態卻不盡相同，可能因此影響小孢子的再生表現。惟上述篩選結果仍可明顯看出不同品種間小孢子培養反應的差異性，顯示品種之基因型是影響小孢子培養成功與否的重要因子。

根據上述試驗結果，以小孢子培養反應較佳的品種「農友極早生」為材料，以取自同一植株、同一批次之小孢子測試 32°C 處理 1 d 及 3 d 對胚形成的影響，接種濃度同為  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup>，但培養液改為 1/2 NLN-13，結果如表 2 所示。以 32°C 處理 1 d 組獲得平均 35.5 胚/皿較高，總胚數達 888 個，明顯高於處理 3 天組之 1.6 胚/皿。此外 32°C 處理 1 d 組在第 1 次取胚 (4 wk) 後繼續震盪培養 3 d，發現培養液中仍持續有幼胚發育，加總 2 次獲得的總胚數達 888 個；但 32°C 處理 3 d 組在第 1 次取胚後雖然採取相同之震盪培養，卻未再有新胚產生。

「農友極早生」在上述兩試驗中對於 32°C 處理時間的表現並不一致 (表 1 及表 2)，但因上述兩試驗中使用之小孢子培養液並不相同 (分別為 NLN 與 1/2 NLN)，因此進一步以全量

表 1. 不同花椰菜 F<sub>1</sub> 品種以 32°C 溫度處理不同天數對小孢子胚誘導的影響。

Table 1. Culiflower F<sub>1</sub> hybrids and effect of 32°C treated duration treatments on embryo induction of microspore culture<sup>z</sup>.

Cultivar <sup>y</sup>	Duration of 32°C (d)	No. petri dish with		
		embryos/total petri dish	Total embryos	Embryos/petri dish
Chinglong H-37	1	1/10	3	0.3
Chinglong H-42	1	0/5	0	0.0
Chinglong H-46	1	0/14	0	0.0
Singflow Bright snow (旭雪)	1	1/21	25	1.2
Known-you Farmers extra early (極早生)	1	6/6	45	7.5
Known-you Farmers extra early	3	5/12	189	15.8
Known-you Charming snow (嬌雪)	3	0/14	0	0.0
Chinglong M-45	3	6/27	8	0.3
Chinglong S-65	3	8/11	273	24.8

<sup>z</sup> Microspore culture medium was NLN-13 with  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup>.

<sup>y</sup> Chinglong (慶農); Singflow (欣樺); Known-you (農友).

NLN 與 1/2 NLN 兩種培養基以及 32°C 三種處理時間之組合進行複因子試驗，結果如表 3 所示。試驗因子影響順序依序為 32°C 處理時間、培養基濃度以及兩者之交感效應，3 項因子之影響皆為極顯著 ( $P < 0.01$ )。6 個處理中以 1/2 NLN 培養基配合 32°C 處理 1 d，可獲得 12.0 胚/皿最高，其次為同樣 1/2 NLN 培養基配合 32°C 處理 2 d 以及全量 NLN 配合 32°C 處理 1 d 組，平均可獲得 8.6–8.8 胚/皿。NLN-13 培養基是油菜小孢子培養最常使用的培養基配方，但蕓苔屬之不同蔬菜及其品種針對 NLN 培養基中主要鹽類的濃度或蔗糖濃度常有不同的表現 (Ferrie *et al.* 1999; Tinaoana *et al.* 2013)。複因子試驗結果顯示，除了高溫處理的影響，培養基以及兩者間之交感作用皆顯著影響小孢子的胚形成率，這也合理解釋了表 1 及表 2 兩試驗結果的不同。花椰菜「農友極早生」以 1/2 NLN 培養基培養，利用 32°C 高溫處理 1 d 或

2 d，以及在 NLN 培養基中以 32°C 高溫處理 1 d，皆具有較高的胚誘導率。

小孢子在液態培養基中誘導發育為胚，幼胚發育至子葉期後被繼代至固態培養基中繼續培養，並觀察子葉期胚發芽的比率，結果如表 4 所示。胚發芽率在 4 種培養基中以添加有葡萄糖之 MSG 最差，子葉期胚在 MSG 培養基中沒有生長現象，並逐漸褐化死亡。子葉期胚在 MSD1 培養基中雖然有 3.5% 存活率，但發芽比例為 0%；接種在 MSD2 與 MSB 培養基中之胚存活率相近，但胚培植體於 MSB 培養基中的發芽率較高。比較 4 種發芽培養基，MSD1 與 MSD2 主要的差別在 BA 濃度以及 auxin 的種類及濃度，但較高濃度之 BA 並未能提高發芽率，且 NAA 與 IAA 相較，較不利於胚的發育。MSD1 與 MSB 相較，顯示 zeatin 本身或是其具有提高 BA 效能的協同作用，進而提高胚發芽比率。本試驗之 MSB 培

表 2. 花椰菜「農友極早生」小孢子以 32°C 處理不同天數對胚誘導之影響。

Table 2. Effect of treated duration at 32°C on embryo induction of microspore culture from cauliflower 'Known-you Farmers extra early'<sup>z</sup>.

Duration of 32°C (d)	No. petri dish with embryos/total petri dish	Total embryos	Embryos/petri dish
1	25/25	888 <sup>y</sup>	35.5 ± 8.0 a <sup>x</sup>
3	18/25	40	1.6 ± 1.8 b

<sup>z</sup> Microspore culture medium was 1/2 NLN-13 with  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup>.

<sup>y</sup> A total of 888 embryos were collected with 517 embryos from the first collection and 371 embryos from the second collection.

<sup>x</sup> Means with different letter(s) in the same column are significantly different ( $P < 0.01$ ) by LSD test.

表 3. 培養基鹽類濃度及高溫處理天數對花椰菜「農友極早生」小孢子培養胚形成之影響。

Table 3. The effect of NLN salt strength and duration of 32°C treatment on embryo induction of microspore culture from cauliflower 'Known-you Farmers extra early'.

Medium	Duration of 32°C (d)	Embryos/petri dish
½ NLN-13	1	12.0 ± 2.55 a <sup>z</sup>
½ NLN-13	2	8.8 ± 3.77 a
½ NLN-13	3	4.6 ± 3.85 b
NLN-13	1	8.6 ± 1.14 a
NLN-13	2	0.0 ± 0.00 c
NLN-13	3	3.8 ± 2.77 b
Medium		**
Duration of 32°C		**
Medium × Duration of 32°C		**

<sup>z</sup> Means with different letter(s) in the same column are significantly different ( $P < 0.01$ ) by LSD test.

\*\*significant at  $P < 0.01$ .

表 4. 花椰菜「農友極早生」由小孢子發育而來之子葉期胚於不同培養基中發芽之情形。

**Table 4.** The effect of culture media on germination of cotyledonary embryos derived from microspores of cauliflower 'Known-you Farmers extra early'.

Medium <sup>z</sup>	Cultured embryos	Survival embryos (%)	Shoot germination (%)
MSD1-MSS	230	3.5	0.00
MSD2-MSS	230	5.2	1.74
MSB-MSS	230	5.7	2.61
MSG	230	0.0	0.00

<sup>z</sup> MSD1-MS basal salts supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA, and 8.0 g L<sup>-1</sup> bacto agar. MSD2-MS basal salts supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 0.2 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.2 mg L<sup>-1</sup> IAA, and 8.0 g L<sup>-1</sup> bacto agar. MSB-MS basal salts supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA, 2.0 mg L<sup>-1</sup> zeatin, 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA, and 8.0 g L<sup>-1</sup> bacto agar. MSG-MS basal salts supplemented with 10 g L<sup>-1</sup> sucrose, 10 g L<sup>-1</sup> glucose, 0.5 g L<sup>-1</sup> active charcoal, and 10 g L<sup>-1</sup> bacto agar. MSS-MS basal salts supplemented with 10 g L<sup>-1</sup> sucrose and 10 g L<sup>-1</sup> bacto agar.

養基與 Gu *et al.* (2014b) 發表之發芽培養基，除了以 8 g L<sup>-1</sup> Bacto agar 取代 0.4% low gelling agarose 不同外，使用相同之生長調節劑及濃度，但本試驗「農友極早生」之胚發芽率僅為 2.61%。而 Gu *et al.* (2014b) 報告中測試之 16 品種中僅 1 品種未發芽，其餘 15 品種之發芽率從 19.5–82.4%，皆較本試驗為高。推測其可能原因，一為本試驗使用 cis-zeatin 而非 trans-zeatin，二者在效能上可能有差異；二為 Gu *et al.* (2014b) 在花苔發育的早期即予疏除，減少花蕾間營養之競爭，提供小孢子較佳的營養生長，並影響之後胚發芽的能力。此外，Gu *et al.* (2014a) 在黑芥 *B. nigra* 的研究中指出，子葉期早期之胚對生長調節劑的反應較為敏感，檢視本試驗繼代培養之胚皆屬於成

熟之子葉期胚，推測因此對生長調節劑反應表現出差異。

以「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種於 NLN-13 培養液中培養並經 32°C 處理 3 d 所得之子葉期胚進行胚發芽試驗。「農友極早生」共 146 個子葉期胚繼代於 B5 培養基中，1 mo 後僅有少數胚 (3 個) 發育為正常芽體，發芽率為 2.1%；「慶農 S-65」總共繼代 225 個子葉期胚，具正常葉培植體共 9 株，發芽率為 4%。觀察大多數的子葉期胚未能正常抽芽，而是發育為伸長之胚軸、圓筒狀葉、伸長之胚根、維持子葉狀之胚以及胚軸上長出再生組織等各種形態 (圖 1)。Gu *et al.* (2014a) 在 *B. nigra* 的研究中指出，除了正常再生之植株外，於子葉及胚軸表皮細胞上發現有二次胚 (secondary



圖 1. 「農友極早生」小孢子培養。不同發育階段之小孢子胚 (A)，子葉期胚於 B5 培養基中發育為不同型態之組織 (B)，以及芽體發根 (C)。

**Fig. 1.** Microspore culture of cauliflower 'Known-you Farmers extra early'. Embryos in various developmental stages (A), various types of tissues derived from cotyledonary embryos cultured on B5 medium (B), and rooting of germinated shoot (C).

embryo) 長出。本試驗同樣顯示在子葉及胚軸表皮細胞上有各種再生組織長出，但觀察為器官再生 (organogenesis)，並非二次體胚的發生。將這些於 B5 培養基中發育之組織先依其形態加以分類，再繼代於含有 BA 之培養基中短暫培養 1 wk，再次繼代於不含生長調節劑之培養基中，經 4 wk 培養後調查培植體之存活率以及長出正常葉片小苗之比例 (表 5 及表 6)。「農友極早生」保持胚形態之培植體以及僅胚根伸長之培植體，兩者在繼代後皆未能繼續生長，反而褐化死亡。胚軸伸長之培植體以及具有圓筒狀葉之培植體，在繼代後僅 11.1–16.7% 培植體存活，且僅有 1 個圓筒狀葉之培植體 (3.3%) 發育為小苗。為數最多的胚軸上具有再生組織的培植體，在繼代後存活率達 73.1%，發育為小苗的比率亦達 66.7%。

「慶農 S-65」總共繼代 225 個子葉期胚，具正常葉培植體共 9 株，但有 1 株死亡，抽苗率為 88.9%。保持子葉期胚之培植體雖然存活率低，僅 31%，但 29 個胚中有 4 個胚發育為小苗，抽苗率有 13.8%。胚根伸長之培植體，在繼代後全部褐化死亡。胚軸伸長的 45 個培植體僅 24 個胚存活，但全部長成小苗，抽苗率為 53.3%。圓筒狀葉培植體繼代後培植體存活率達 66.7%，且全數發育為小苗。胚軸上具有再生組織的培植體，經繼代後存活率達 86.9%，且全數發育為小苗，是各形態培植體中抽芽率最高者 (圖 1)。

本試驗中使用之兩品種其子葉期胚於 B5 培養基上僅少數直接發育為正常芽體，大多數的胚未能正常發芽，而是發育為各種形態之組織，將這些組織依其形態加以分類，其中占最

表 5. 花椰菜「農友極早生」子葉期胚於 B5 培養基分化為不同形態之培植體經繼代培養後發芽之情形。

Table 5. Shoot germination of various explants derived from cotyledonary embryos of 'Known-you Farmers extra early' cultured on B5 medium<sup>z</sup>.

Type of explants	No. of cultured explants	% Survival (No. of explants)	% Shoot regeneration (No. of plants)
Normal plant	3	100.0 (3)	100.0 (3)
Cotyledonary embryo	9	0.0 (0)	0.0 (0)
Radicle tissue	8	0.0 (0)	0.0 (0)
Hypocotyl tissue	18	11.1 (2)	0.0 (0)
Leaf tissue	30	16.7 (5)	3.3 (1)
Hypocotyl with regenerated tissue	78	73.1 (57)	66.7 (52)
Total no.	146	45.9 (67)	38.4 (56)

<sup>z</sup> Explants were cultured on MSD1 medium-MS basal salts supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA, and 8.0 g L<sup>-1</sup> bacto agar, for 1 wk before subculturing to the hormone-free MS medium for another 4-wk culturing.

表 6. 花椰菜「慶農 S-65」子葉期胚於 B5 培養基分化為不同形態之培植體經繼代培養後發芽之情形。

Table 6. Shoot germination of various explants derived from cotyledonary embryos of 'Chinglong S-65' cultured on B5 medium<sup>z</sup>.

Type of explants	No. of cultured explants	% Survival (No. of explants)	% Shoot regeneration (No. of plants)
Normal plant	9	88.9 (8)	88.9 (8)
Cotyledonary embryo	29	31.0 (9)	13.8 (4)
Radicle tissue	20	0.0 (0)	0.0 (0)
Hypocotyl tissue	45	53.3 (24)	53.3 (24)
Leaf tissue	15	66.7 (10)	66.7 (10)
Hypocotyl with regenerated tissue	107	86.9 (93)	86.9 (93)
Total no.	225	64.0 (144)	61.8 (139)

<sup>z</sup> Explants were cultured on MSB-MS basal salts supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA, 2.0 mg L<sup>-1</sup> zeatin, 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA, and 8.0 g L<sup>-1</sup> bacto agar, for 1 wk before subculturing to the hormone-free MS medium for another 4-wk culturing.

高比例者為伸長之胚軸且其上長有二次再生組織的培植體，將此種培植體繼代於含有 cytokinin 類之培養基中 7-10 d 後，再次繼代於不含生長調節劑的 MS 基本培養基中，大多數的培植體皆能發育為正常芽體，顯示特定形態之培植體仍具有極高之再生能力。

比較「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種子葉期胚直接發育為小苗之表現 (2.1%、4.0%)，以「慶農 S-65」較佳，顯示子葉期胚發育為小苗的發芽率在各品種間存有差異。兩品種在第 1 次繼代的 B5 培養基中長出之培植體，在含有生長調節劑之培養基中短暫培養後，再次繼代於不含生長調節劑之培養基中培養，兩品種之發芽率分別為 38.4% (56 株/146 胚) 及 61.8% (139 株/225 胚)，同樣以「慶農 S-65」抽芽率較「農友極早生」為高，除了品種差異影響外，推測 MSB 培養基較 MSD1 培

養基對芽體再生有較佳之促進作用亦可能為原因之一。本試驗方法與 Gu *et al.* (2014b) 相較，雖然增加了 1 次 B5 培養基培養的時間，但其發表之「慶農 S-65」的發芽率僅 33.6%，而本試驗「慶農 S-65」之總發芽數可達 61.8%，表示將子葉期胚先繼代於不含生長調節劑之培養基中，有助於提高胚對於再生培養基的適當反應，在持續培養後表現出較高之發芽率。

取「慶農 S-65」馴化成活之植株共 16 株的葉片，以流式細胞儀檢測染色體倍體數 (圖 2)，其中 5 株為單倍體占 31.3%，9 株為 2 倍體占 56.3%，4 倍體及其他倍數體各 1 株，分別占 6.3%。「農友極早生」共檢測 17 株，其中 5.9% 為單倍體，58.8% 為 2 倍體，35.3% 為 4 倍體。一般而言由小孢子培養而來之再生植株具有一定比率染色體倍加之情形，自然倍加之機制推測一為染色體複製後未分開，二為

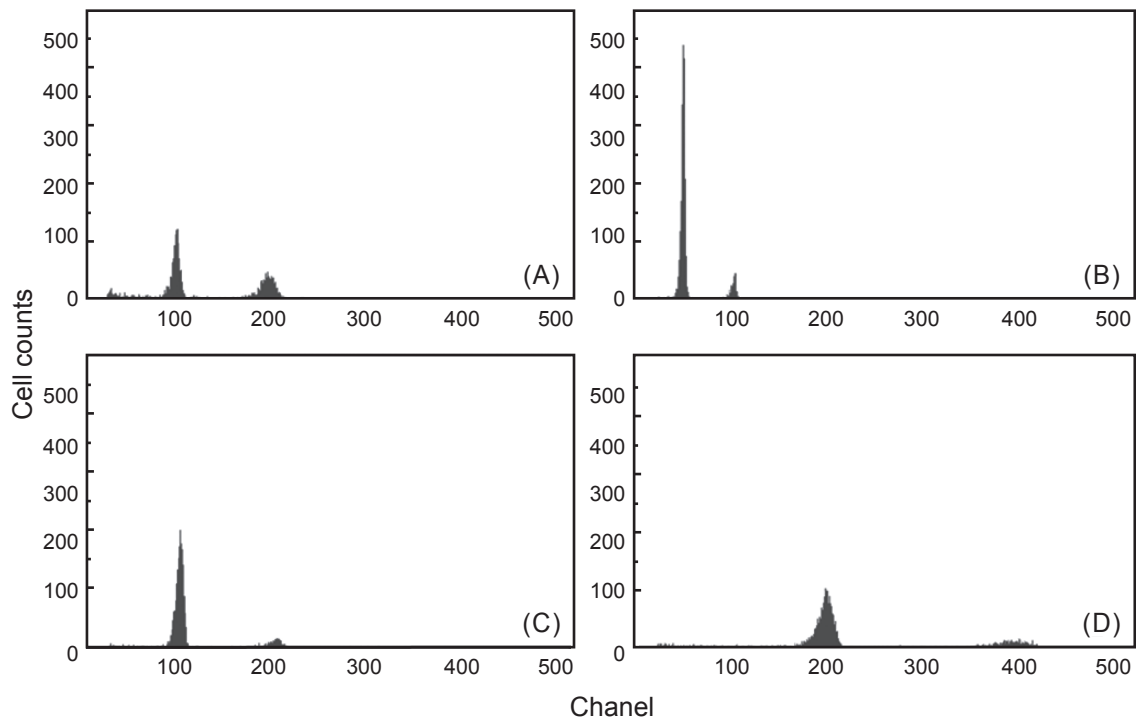


圖 2. 「慶農 S-65」小孢子培養而來之植株以流式細胞儀檢測之倍體數表現圖譜。二倍體之  $F_1$  植株 (A)，小孢子發育而來之單倍體植株 (B)，雙單倍體植株 (C) 及四倍體植株 (D)。

Fig. 2. Ploidy expression of microspore-derived plant of cauliflower 'Chinglong S-65' by flow cytometry.  $F_1$  microspore donor plant (A), haploid plant (B), doubled haploid plant (C), and tetraploid plant (D) derived from microspore culture.

細胞分裂後分隔膜未發育，造成兩細胞的融合 (fusion)，皆能造成細胞染色體之倍加 (Aionesei *et al.* 2005)。本研究利用可擴增出異質結合 (Heterozygous) 條帶之共顯性分子標誌，逐一檢測  $F_1$  供試植株、小孢子培養分化而來之 2 倍體及單倍體植株。圖 3 中顯示  $F_1$  植株為異質結合體，而小孢子培養分化而來之 2 倍體及單倍體植株皆為同質結合體，證明小孢子培養分化而來之 2 倍體，並非由體細胞分化而來之異質結合體，而是同質結合之 DH。Gu *et al.* (2014b) 使用「慶農 S-65」作為小孢子培養材料，其再生植株染色體倍體數的表現分別為單倍體 8.2%，2 倍體 32.7%，4 倍體 36.7%。本試驗中「慶農 S-65」之單倍體比率為 31.3%、2 倍體為 56.3%，可作育種利用之 2 倍體表現方面較其為佳。「慶農 S-65」與「農友極早生」兩品種小孢子培養之再生植株其 DH 比率皆超過 50%，可以不考慮施用秋水仙素進行染色體之倍加 (表 7)。

## 結論

小孢子培養誘導同質雙單元體之形成受基因型影響大，同一物種之不同品種於相同培養條件下的反應並不相同，為提高培養成功率必須針對各品種所需之培養條件加以改進。

「農友極早生」及「慶農 S-65」兩品種是參試的 8 個品種中反應較佳者，「農友極早生」以 1/2 NLN-13 為小孢子培養液、接種濃度  $4 \times 10^4$  microspores  $\text{mL}^{-1}$ ，於 32°C 處理 1 d 的培養條件下，可獲得 12.0–35.5 胚/皿。小孢子發育而來之子葉期胚先於 B5 培養基中培養，再短暫繼代於含有生長調節劑的誘導培養基中培養 1 wk，可以獲得 66.7% 之發芽率，出瓶成活植株中，2 倍體占 58.8%。「慶農 S-65」以相同方式培養發芽率更達 86.9%，出瓶成活植株中，2 倍體占 56.3%。本研究建立之花椰菜小孢子培養方法可以作為花椰菜品種生產 DH 植株參考之用，但因各品種間表現差異大，培養

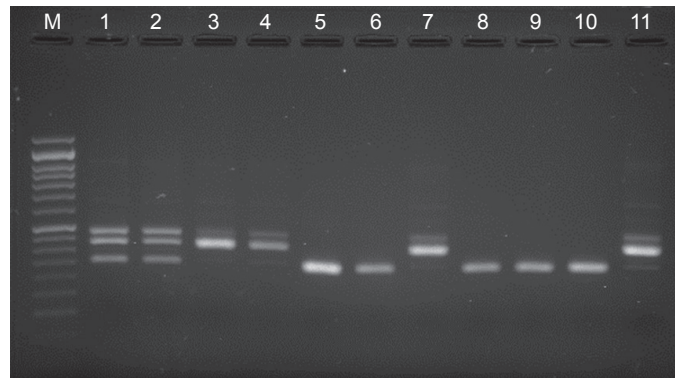


圖 3. 「慶農 S-65」小孢子培養而來之植株以共顯性分子標誌進行聚合酶鏈鎖反應檢測同質結合性。M：100 bp DNA 標準標幟，行 1–2： $F_1$  植株，行 3–9：雙單倍體植株，行 10–11：單倍體植株。

Fig. 3. Results of polymerase chain reaction using co-dominant marker for heterozygosity detection of microspore-derived plants from cauliflower 'Chinglong S-65'. M: 100 bp DNA marker, line 1–2:  $F_1$  microspore donor plant, microspore-derived plants, line 3–9: doubled haploid, line 10–11: haploid.

表 7. 花椰菜「慶農 S-65」及「農友極早生」小孢子再生植株以流式細胞儀檢測倍體數之表現。

Table 7. Ploidy level of microspore derived plants from cauliflower 'Chinglong S-65' and 'Known-you Farmers extra early'.

Cultivar	No. of tested plants	% Ploidy level			
		C	2C	4C	Others
Ching Long S-65	16	31.3	56.3	6.2	6.2
Known-you Farmers extra early	17	5.9	58.8	35.3	0.0

條件仍有改善的空間，期望未來小孢子培養技術能更廣泛應用在花椰菜的不同品種，加速育種流程之進行。

## 引用文獻

- Aionesei, T., A. Touraev, and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. p.11–34. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56-Haploid in Crop Improvement.* (Palmer, C. E., W. A. Keller, and K. J. Kasha, eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. 318 pp.
- Chang, Y. M., P. C. Liou, and C. H. Hsiao. 1996. Anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and broccoli (*B. oleracea* L. var. *italic*) I. Varieties, developmental stages and cultural medium relation with regeneration. *J. Agric. Res. China* 45:35–46.
- Custers, J. B. M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). p.185–193. *in: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- Ferrie, A. 2003. Microspore culture in *Brassica* species. p.205–215. *in: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual.* (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- Ferrie, A. M. R., D. C. Taylor, S. L. MacKenzie, and W. A. Keller. 1999. Microspore embryogenesis of high sn-2 erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:79–84.
- Ferrie, A. M. R. and K. L. Caswell. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 104:301–309.
- Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25:57–88.
- Gu, H., X. Sheng, Z. Zhao, H. Yu, and J. Wang. 2014a. Initiation and development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica nigra*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 50:534–540.
- Gu, H., Z. Zhao, X. Sheng, H. Yu, and J. Wang. 2014b. Efficient doubled haploid production in microspore culture of loose-curd cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Euphytica* 195:467–475.
- Keller, W. A., P. G. Arnison, and B. J. Cardy. 1987. Haploids from gametophytic cells- Recent development and future prospects. p.223–241. *in: Plant Tissue and Cell Culture.* (Green C. E., D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer, eds.) Alan R. Liss, Inc. New York. 599 pp.
- Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacaopra. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* 17:655–666.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:427–434.
- Lo, H. L., S. P. Lee, X. P. Chen, D. L. Cai, J. N. Lin, S. T. Wang, K. S. Chen, and Y. W. Yang. 2012. Studies on genetic variation among commercial cultivars and parental lines of cauliflower in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 61:285–297.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nitsch, C. and J. P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* 72:355–370.
- Smykal, P. 2000. Pollen embryogenesis: The stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biol. Plant* 43:481–489.
- Takahata, Y. and W. A. Keller. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassic oleracea* L. *Plant Sci.* 74:235–242.
- Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzücht.* 74:77–81.
- Tinaoana, C. M., Prisecaru, C. Brezeanu, and M. Brezeanu. 2013. Effect of carbohydrate type on the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. *Romanian Biotechnol. Lett.* 18:8677–8684.
- Wang, S. T., S. H. Hseu, K. S. Chen, C. C. Chiou, S. P. Li, C. Y. Lin, H. L. Lo, J. N. Lin, M. M. Hsu, and C. F. Hong. 2012. Adjusting breeding strategies of cruciferous vegetable to match challenges of climate change. p.135–152. *in: Proceedings of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change.* Special Publication of TARI, No. 156, Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan.

## Studies on Microspore Culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L.

Chi-Ni Hsia<sup>1,\*</sup>, Uei-Chern Chen<sup>2</sup>, Chin-Yi Tsao<sup>3</sup>, Yi-Mei Chou<sup>4</sup>, and Tzu-Kai Lin<sup>5</sup>

### Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, Y. M. Chou, and T. K. Lin. 2017. Studies on microspore culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. J. Taiwan Agric. Res. 66(2):94-104.

*Brassica oleracea* var. *botrytis* is one of the most important vegetables in the world. However, very few studies on cauliflower microspore culture were conducted in Taiwan. The objective of this study was to establish a microspore culture system- an efficient technique to produce inbred lines for breeding elite F<sub>1</sub> hybrids, starting from cultivar screening for embryogenesis and followed by modifying conditions for germination of microspore-derived embryos. Microspores were inoculated with  $4 \times 10^4$  microspores mL<sup>-1</sup> in a NLN-13 medium, then incubated at 32°C for 1- or 3-day. A total of 8 commercial F<sub>1</sub> hybrids were surveyed. Among them, 'Chinglong S-65' and 'Known-you Farmers extra early' had the highest embryogenesis response. However, there were 3 cultivars were found without any embryo. A multiple factor experiment using two culture media in combination with three duration treatments at 32°C was further conducted using 'Known-you Farmers extra early'. The effect of 32°C treated duration, medium salt strength, and their interactions were all significant ( $P < 0.01$ ) on embryogenesis. Among six treatments, 1/2 NLN medium in combination with 1-day culturing at 32°C had the highest embryogenesis with 12.0 embryos/petri dish. Low germination rates of 2.1% and 4.0% for 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were obtained, respectively, from microspore-derived embryos cultured directly on a hormone-free B5 medium for 4-week. Various types of tissues derived from cotyledonary embryos were subcultured consistently on a BA containing medium for 1-week preculture before on the hormone-free medium for another 5 weeks culturing. Higher shoot germination rates of 66.7% and 86.9% for 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were observed, respectively, from the particular type of explant-elongated hypocotyl tissues with secondary organogenesis. Ploidy level of regenerated plants from 'Known-you Farmers extra early' and 'Chinglong S-65' were analyzed using flow cytometer, and diploid rate of 58.8% and 56.3% were obtained, respectively.

**Key words:** Cauliflower, Microspore, Doubled haploid.

---

Received: October 13, 2016; Accepted: March 18, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.