

青花菜小孢子培養之胚誘導及胚發芽條件建立

夏奇鈺^{1,*} 陳威臣² 曹進義³ 周宜玫⁴

摘要

夏奇鈺、陳威臣、曹進義、周宜玫。2017。青花菜小孢子培養之胚誘導及胚發芽條件建立。台灣農業研究 66(3):184–192。

十字花科之青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 是營養價值很高的蔬菜，本研究以台灣青花菜商業一代雜交品種 (F_1) 為材料，測試不同 F_1 之小孢子培養反應，並建立小孢子之胚誘導及胚發芽所需條件，用以生產雙單倍體 (doubled haploid; DH) 植株作為培育純系之用。利用 5 種 F_1 青花菜以每毫升含有 4×10^4 個小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，並以 32°C 處理 1 d，其中 3 品種有胚形成，2 品種未有反應，胚誘導率以「慶農 B-45」最高。比較取自「農友天綠」不同長度花蕾之小孢子，結果顯示取自 4.0–5.0 mm 長度花蕾之小孢子，平均可獲得 17.1 個胚/皿，顯著較取自 3.0–3.9 mm 長度花蕾之 7.0 胚/皿為高 ($P < 0.01$)。「慶農 B-45」以含有 13% 蔗糖之 NLN 培養基 (全量及半量鹽類濃度) 與 32°C 處理時間 (1、2 及 3 d) 組合進行小孢子培養。結果顯示以全量 NLN 培養基在 32°C 處理 1 d 獲得 6.9 胚/皿最高。將「慶農 B-75」子葉期胚施以 1–5 d 之脫水配合溫度處理，處理後之胚先接種於含有生長調節劑之固態培養基預培養 1 wk，再繼代於不含生長調節劑之培養基中培養 4 wk 後，調查胚發芽之比率。結果顯示子葉期胚於 25°C 以濾紙脫水 1 d 或於 4°C 以濾紙脫水 1–5 d 皆有助提高發芽率 (35.0–48.3%)。將「慶農 B-75」由小孢子發育而來之 23 株小苗以流式細胞儀檢測其染色體倍體性，結果顯示 DH 及單倍體之比率分別為 60.9% 及 34.8%。DH 植株之比率超過 60%，有助於育種實務上之利用。

關鍵詞：青花菜、胚分化、雙單倍體。

前言

青花菜 (*Brassica oleracea* var. *italica*) 是十字花科蕓苔屬甘藍種中的重要蔬菜，因富含營養素是現代人極佳的保健蔬菜。青花菜以高品質之一代雜交種 (F_1) 最受消費者青睞，在生產 F_1 的育種流程中，自交系親本的培育需時 6–8 yr，且青花菜具有自交不親和性及自交弱勢，純系親本的培育相對困難，不利於新品種的快速育成。台灣的環境高溫多溼，對於抗病、耐熱等特性的篩選具有先天優勢，若能發展出更高效率的純系育成技術，因應市場及氣

候環境之快速變化不斷推陳出新，才能在競爭劇烈的種苗市場中占有一席之地 (Wang *et al.* 2011)。

小孢子培養是在離體 (*in vitro*) 條件下對未成熟的花粉進行人工培養，小孢子受到培養環境之影響，由原本配子體分化轉為孢子體分化，並發育形成胚。小孢子培養過程中除了獲得單倍體植株外，一般有一定比率之小孢子會在分化的過程中發生染色體自然倍加的情形，亦可經由人為之染色體倍加處理讓單倍體成為 2 倍體，這些由單倍體倍加而來之 2 倍體，是遺傳上的同質結合體，稱為雙單倍體 (doubled

投稿日期：2016 年 3 月 16 日；接受日期：2016 年 4 月 15 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

³ 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。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

haploid; DH)，也是育種上所稱的純系。小孢子培養可以在任何育種世代實施，將基因型立即固定成為同質結合體，具有加速純系育成之優點 (Forster & Thomas 2005)。

蕓苔屬植物的單倍體最早由 Keller *et al.* (1975) 自小油菜 *Brassica campestris* 以及 Thomas & Wenzel (1975) 自大油菜 *Brassica napus* 的花藥培養出來；但從 Lichter (1982) 發展出油菜小孢子培養技術後，大多數蕓苔屬植物皆改採小孢子培養，原因是游離培養之小孢子為單細胞，其分化不受體細胞之干擾，且具有數量上之優勢，在效率上遠遠超過花藥培養。目前小孢子培養技術已純熟應用於育種流程，加速了許多十字花科蔬菜新品種之育成 (Ferrie & Caswell 2011)。

青花菜小孢子的研究最早見於 Takahata & Keller (1991)，與油菜相較，青花菜的小孢子培養難度較高 (Da Silva Dias 2003)。台灣在十字花科花藥培養的研究甚少 (Chang *et al.* 1996)，小孢子培養技術的建立更付之闕如，學研界宜加快研發的腳步，並協助種苗產業將此一技術實際應用於青花菜育種流程。本研究以台灣青花菜商業 F_1 栽培種為材料，建立小孢子培養在胚誘導以及胚發芽所需之條件，並以流式細胞儀檢測再生植株之染色體倍體性，作為生產 DH 植株及加速純系親本育成之參考。

材料與方法

青花菜 F_1 品種之種子分別購自慶農種苗 (Chinglong Seed Co., Taiwan) 的「B-45」、 「B-75」，欣樺種苗 (Singflow Seed Co., Taiwan) 的「BR1210」以及農友種苗 (Known-you Seed Co., Taiwan) 的「清華」、「清華 3 號」、「綠王」、「天綠」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 4 wk 後假植至相同介質的 3 寸盆中，經 4 wk 培養後定植於 9 寸盆中。植株於恆溫 24°C、光照 16 h、光照強度為 $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之精密溫室內生長至開花。生長期間每週施用一次 1 g L^{-1} 花寶 2 號 (20 N-20 P_2O_5 -20 K_2O) 液肥，花芽分化後改施相同濃度之花寶 3 號 (10 N-30 P_2O_5 -20 K_2O) 液肥。

小孢子培養

分離小孢子之操作流程修改自 Custers (2003)。將花蕾依長度分級，若未註明花蕾長度，則小孢子取自 3–4 mm 長度之花蕾。取 16 朵消毒後之花蕾以針筒推進器加壓，將小孢子由花藥囊內釋出，加入 2 mL 之 B5 培養基配方 (Gamborg *et al.* 1968) 添加 13% 蔗糖 (B5-13) 培養液後以 $37 \mu\text{m}$ 濾網過濾，重複壓迫花蕾、過濾動作，將共約 8 mL 濾液收集於離心瓶。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 之離心機以 $100\times g$ 離心 6 min，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 或 1/2 NLN 鹽類配方 (Nitsch & Nitsch 1967)，添加 13% 蔗糖之液體培養基 (以下簡稱 NLN-13 或 1/2 NLN-13) 搖勻製作懸浮液。取 $10 \mu\text{L}$ 懸浮液以血球計數器於顯微鏡下計算小孢子數，並據此推算小孢子懸浮液之實際濃度。加入適量之 1/2 NLN-13 或 NLN-13 培養液，將懸浮濃度調整至每毫升含 4×10^4 個小孢子。取 5 mL 懸浮液加入直徑 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 parafilm™ 加封後置於 32°C 恆溫箱中培養 1–3 d 後，移至 25°C 黑暗中靜置培養 2 wk，再將培養皿移至 $34.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照下，以 60 rpm 震盪培養直到幼胚分化，幼胚發育至子葉期後進行發芽促進處理。

促進子葉期胚發芽之前處理

將子葉期小胚直接繼代至 MSB2 固體培養基 (對照組)，或切除子葉後繼代於相同培養基置於 25°C 光照下培養；或將小胚放入置有濾紙之直徑 9 cm 培養皿，分別置於 25°C 或 4°C 黑暗中進行 1、3 及 5 d 脫水處理，之後同樣繼代於 MSB2 培養基中培養；或將小胚直接種於 MSB2 培養基並置於 4°C 黑暗中培養 1、3 或 5 d 後移至 25°C 光照環境下培養。培養容器為直徑 9 cm 培養皿內含 25 mL MSB2 培養基。MSB2 培養基組成為 MS 基本鹽類 (Murashige & Skoog 1962)、 20 g L^{-1} 蔗糖、 9 g L^{-1} 的 Bac-

to agar, 並添加 2.0 mg L^{-1} zeatin、 2.0 mg L^{-1} 6-苯甲基腺嘌呤 (N6-benzyladenine, BA) 及 0.1 mg L^{-1} 吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA)。每皿接種 10 個小胚，每一處理共接種 10 皿。上述所有胚培植體均於 MSB2 培養基中培養 1 wk 後，繼代至不含生長調節劑之 MS 培養基中繼續培養 3 wk，再進行抽芽率調查。

染色體倍體性檢測

切取出瓶成活小植株之第 1 片成熟葉約 1 cm^2 ，加入 CyStain UV Precise P Kit (Partec, Germany) 0.2 mL 萃取緩衝液，以刀片將組織切碎後再添加 0.8 mL 染色液後過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (Ploidy Analyzer, Partec, Germany) 檢測染色體之倍體性。每一葉片取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 2,500 個。

結果

取自 5 種青花菜 F_1 之小孢子以 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 小孢子濃度接種於 NLN-13 培養液中，以 32°C 處理 1 d 後置於黑暗中靜置培養 2 wk，移

至震盪培養繼續 2 wk 後調查產胚結果，如表 1 所示。5 種青花菜 F_1 因花蕾數及花粉量不同，因此接種之總皿數不同，但各皿之小孢子接種濃度相同。5 種 F_1 中有 3 種具有胚反應，以「慶農 B-45」平均每皿 5.43 個胚最高，其次為「欣樺 BR1210」及「農友天綠」。共有 2 品種未產生胚，分別為「農友清華」及「農友清華 3 號」。

取自「農友天綠」同一植株之花蕾，花蕾長度分別為 3.0–3.9 mm 及 4.0–5.0 mm，小孢子以 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 濃度接種於 NLN-13 培養液，並於 32°C 處理 1 d，胚誘導結果如表 2 所示。取自花蕾長度 3.0–3.9 mm 之小孢子，平均可獲得 7.0 胚/皿，而取自 4–5.0 mm 花蕾長度之小孢子，平均可獲得 17.1 胚/皿，兩處理間的差異極為顯著 ($P < 0.01$)。

「農友天綠」以 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 濃度接種於 NLN-13 培養液，比較 32°C 處理 1、2 及 3 d 對胚誘導之影響如表 3 所示。「農友天綠」在 3 種處理時間所得之平均胚數介於僅 8.3–11.4/皿之間，以 2 d 處理組最高，但各處理間的差異並不顯著。此外，在小孢子培養 4 wk 後，進行第 1 次產胚數調查，調查子葉期胚之個數；

表 1. 青花菜 F_1 雜交種對小孢子胚形成之影響。

Table 1. Effect of broccoli F_1 hybrid on microspore embryogenesis^z.

Cultivar ^y	No. petri dish with embryo/total petri dish	Total embryo	Embryo/petri dish
Chinglong B-45	13/14	76	5.43
Singflow BR1210	5/51	5	0.10
Known-you			
Tender Green (天綠)	2/60	5	0.08
Known-you Ching Hua (清華)	0/5	0	0.00
Known-you Ching Hua No. 3 (清華 3 號)	0/5	0	0.00

^z Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores mL^{-1} .

^y Chinglong (慶農), Singflow (欣樺), Known-you (農友).

表 2. 青花菜「農友天綠」取自不同長度花蕾之小孢子對胚誘導之影響。

Table 2. Effect of microspores taken from flower buds in various lengths on embryo induction of broccoli 'Known-you Tender Green'^z.

Bud length (mm)	Total petri dish	Embryos/petri dish
3.0–3.9	17	$7.0 \pm 3.9 \text{ b}^y$
4.0–5.0	12	$17.1 \pm 13.5 \text{ a}$

^z Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores mL^{-1} in the NLN-13 medium and treated at 32°C for 1 d.

^y Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.01$) by LSD test.

再經 1 wk 培養後，將後續長出之胚記錄為第 2 次胚。在表 3 中顯示總產胚數及第 1 次產胚數以 32°C 處理 2 d 者最高，第 2 次產胚數則以處理 3 d 組較高，但因各皿間之產胚數差異大，造成各處理間之差異在統計上並不顯著。

以「慶農 B-45」進行 NLN 鹽類濃度 (全量及半量) 以及 32°C 溫度處理時間 (1、2 及 3 d) 組合之複因子試驗，結果如表 4 所示。培養基、高溫處理時間以及兩者之交感對總出胚數的影響皆不顯著。6 個處理中以全量 NLN 培養基配合 32°C 處理 1 d 獲得 6.9 胚/皿最高，最低者為全量 NLN 培養基配合 32°C 處理 3 d 的 3.1 胚/皿，其餘各組則介於 4.2–6.4 胚/皿之間。將獲得之胚依長度細分為大於 4 mm (多數介於 4–6 mm 之間) 或小於 4 mm (多數介於 2–3.9 mm 之間) 兩種分開計算。在大胚 (4–6 mm) 方面，培養基、高溫處理時間兩因子各別之影響

皆不顯著，但兩者間之交感對大胚數的影響顯著，結果仍以全量 NLN 培養基配合 32°C 處理 1 d 獲得 5.5 胚/皿最高，其餘各組合除 NLN 培養基配合 32°C 處理 3 d 之 1.4 胚/皿較低外，各處理之大胚數介於 3.0–3.6 胚/皿之間；在小胚 (2–3.9 mm) 方面，培養基、高溫處理時間以及兩因子間交感對小胚數的影響皆不顯著，除 1/2 NLN 培養基配合 32°C 處理 3 d 之 2.8 胚/皿較高外，其餘各處理組合介於 1.2–1.9/皿之間。

以「慶農 B-75」小孢子培養於 1/2 NLN-13 培養液經 32°C 處理 2 d，總共接種 31 皿，獲得 665 個胚，每皿平均胚數達 21.5 個 (資料未顯示)。以前述所得之子葉期胚進行促進發芽之脫水與溫度組合試驗，處理後之胚先於含有 BA 及 zeatin 之固態芽體誘導培養基中預培養 1 wk，再繼代於 MS 基本培養基中培養 3

表 3. 以 32°C 溫度處理青花菜「農友天綠」小孢子不同天數對胚誘導之影響。

Table 3. Effect of microspore culture at 32°C with various duration on embryo induction of broccoli 'Known-you Tender Green'^z.

32°C (d)	No. petri dish with embryo/total petri dishes	Embryo/petri dish	1 st Embryo/petri dish ^y	2 nd Embryo/petri dish ^y
1	11/16	8.3 ± 11.1 a	5.8 ± 8.0 a	2.6 ± 3.7 a
2	12/14	11.4 ± 9.6 a	8.8 ± 8.5 a	2.6 ± 2.6 a
3	12/13	9.3 ± 9.9 a	5.9 ± 7.8 a	3.4 ± 4.1 a

^z Microspore were inoculated with 4×10^4 microspores mL⁻¹ in the NLN-13

^y 1st and 2nd embryos were collected separately after 4-wk and 5-wk culturing, respectively.

表 4. 培養基及高溫處理時間對青花菜「慶農 B-45」小孢子胚誘導之影響。

Table 4. Effect of NLN salt strength in combination with various duration at 32°C on embryo induction of broccoli 'Chinglong B-45' microspores.

Medium	32°C (d)	Embryo/petri dish	Big embryo/petri dish ^z	Small embryo/petri dish ^y
½ NLN-13	1	5.1 ± 5.0 ab ^x	3.3 ± 2.9 ab	1.8 ± 2.5 ab
½ NLN-13	2	4.2 ± 4.7 ab	3.0 ± 3.5 ab	1.2 ± 1.6 b
½ NLN-13	3	6.4 ± 4.5 ab	3.6 ± 3.3 ab	2.8 ± 2.2 a
NLN-13	1	6.9 ± 2.3 a	5.5 ± 3.0 a	1.4 ± 1.4 ab
NLN-13	2	5.0 ± 2.0 ab	3.1 ± 1.5 ab	1.9 ± 1.4 ab
NLN-13	3	3.1 ± 2.4 b	1.4 ± 2.2 b	1.7 ± 1.3 ab
Medium		NS	NS	NS
Duration of 32°C		NS	NS	NS
Medium × Duration of 32°C		NS	*	NS

^z Length of big embryos = 4–6 mm

^y Length of small embryos = 2–3.9 mm

^x Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

* significant at $P < 0.05$

wk 後調查抽芽率 (表 5)。結果顯示，未經任何處理之對照組平均每皿抽芽率僅 1.7%；切除子葉有助於抽芽率提升，每皿抽芽率提高為 18.3%；將子葉期胚置於以濾紙上在 25°C 下進行 1–3 d 脫水處理，之後與對照組進行相同之繼代培養，3 種脫水時間中以脫水 1 d 者效果最佳，平均每皿抽芽率達 46.7%，但於 25°C 下脫水超過 1 d (3 或 5 d) 會造成胚體嚴重失水，導致成活胚數減少；於 4°C 低溫下同樣進行濾紙脫水處理，結果顯示隨著脫水天數增加，有助於抽芽率之提升，但處理 1–5 d 間的抽芽率差異不顯著，每皿抽芽率介於 35.0–48.3% 之間；同樣於 4°C 低溫但未經濾紙脫水處理之胚 (直接於培養基上培養)，平均每皿抽芽率在 18.3–25.0% 之間。

將「慶農 B-75」小孢子培養發育而來之植株，取其葉片以流式細胞儀檢測染色體倍體數，結果如圖 1 所示。總共檢測 23 株，其中有 8 株為單倍體占 34.8%，14 株為 2 倍體占 60.9%，1 株為 4 倍體占 4.3%。

討論

十字花科作物的小孢子培養，自油菜

開始已建立有相當充實的研究基礎 (Lichter 1982)，高效率之油菜小孢子培養技術已成功育成了許多新品種 (Ferrie & Caswell 2011)。同為芸苔屬的青花菜與油菜相較，青花菜小孢子的胚誘導率較低 (Takahata & Keller 1991)。本試驗以台灣市售青花菜 F_1 為材料，利用相同的培養條件測試不同 F_1 青花菜小孢子培養之反應，因生長箱空間之限制，各品種係分批

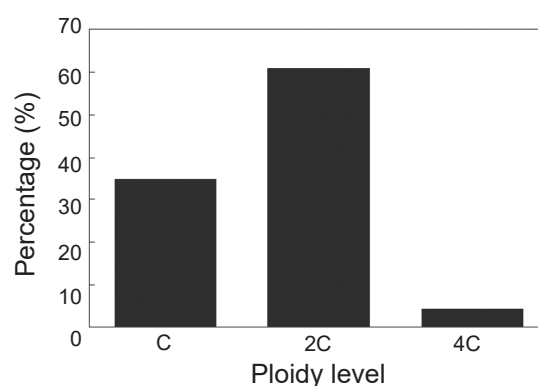


圖 1. 以流式細胞儀檢測青花菜「慶農 B-75」小孢子再生植株之倍體性及其比例。

Fig. 1. Ploidy level and its percentage from microspores derived plants of broccoli 'Chinglong B-75' as determined by flow cytometry.

表 5. 青花菜「慶農 B-75」子葉期胚以溫度、脫水處理對促進抽芽之影響。

Table 5. Effect of desiccation in combination with temperature treatments on shoot germination of cotyledonary embryos derived from microspore of broccoli 'Chinglong B-75'^z.

Treatment	No. embryo	Shoot germination (%)
25°C	60	1.7 ± 4.1 e ^y
25°C cutting cotyledon	60	18.3 ± 17.2 cde
25°C filter dry 1d	60	46.7 ± 22.5 a
25°C filter dry 3d	60	16.7 ± 40.8 e
25°C filter dry 5d	60	6.7 ± 16.3 de
4°C filter dry 1d	60	35.0 ± 10.5 abc
4°C filter dry 3d	60	36.7 ± 19.7 ab
4°C filter dry 5d	60	48.3 ± 11.7 a
4°C 1d	60	20.0 ± 6.3 bcd
4°C 3d	60	18.3 ± 16.0 cde
4°C 5d	60	25.0 ± 18.7 bc

^z Embryos were first cultured on MSB2 medium for 1-wk followed by 4-wk culturing on a hormone-free MS medium. MSB2 medium- MS basal salts supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose, 2.0 mg L⁻¹, BA, 2.0 mg L⁻¹ zeatin, 0.1 mg L⁻¹ IAA, and 9.0 g L⁻¹ Bacto agar.

^y Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.015$) by LSD test.

種植並於生長箱內誘導花芽分化，再以相同之培養條件進行小孢子培養，各品種之反應不一。但同一品種在不同培養條件下仍有相似的胚誘導反應，亦即高反應品種在不同條件下仍比低反應品種有較多的胚形成，顯示品種基因型是影響小孢子培養成功與否之重要因子。

影響十字花科雙單元體誘導，最重要的3個步驟分別為胚誘導、胚發育成苗以及DH的比例。其中，影響胚誘導的因子，包括(1)供試植株的基因型及生長環境：一些研究顯示小孢子體胚發育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(Da Silva Dias 2001)。此外，供試植株生長的環境，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之品質有很大的影響。在本試驗中因為環控栽培空間的限制，各品種係分批播種及種植，雖然生長環境條件相似，但各批次植株的生長狀態可能有差異，雖然小孢子以相同條件進行培養，但因母體植株生理狀態的不同，推測有可能因此影響小孢子的表現，造成產胚數的差異。綜合表1中各F₁小孢子胚誘導的表現來看亦明顯不同，表1中「農友清華」及「農友清華3號」之花蕾經加壓、過濾及離心後之小孢子數量極少，因此雖然以相同濃度接種，但其接種皿數相對減少。觀察其花藥發現有萎縮、短小的現象，推測小孢子量少，可能與花藥發育不完全有相關。

影響因子(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，由於小孢子發育時期需經染色於顯微鏡下觀察方能確認，在實務操作上必須藉由花蕾的大小、花冠與花藥長度的比值等外觀性狀作為取樣的指標，其中以花蕾的長度最常作為小孢子發育階段指標之用。綜觀十字花科甘藍類蔬菜如花椰菜、青花菜或甘藍小孢子培養，取樣之花蕾大小大多介於2.5–4.0 mm之間，本試驗大都採3.0–4.0 mm長度之花蕾，但在青花菜試驗中曾發現放寬取樣大小(大於3.5 mm)，其小孢子的產胚率反而有較佳之表現(資料未列)。因此，進行不同花蕾長度之比較試驗，將花蕾長度取樣大小放寬到4.0–5.0 mm。在表2中顯示，青花菜「農友天綠」小孢子取自長度4.0–5.0 mm花蕾，較取自3.0–3.9

mm長度之花蕾有較高之產胚率，表示針對個別品種有必要建立花蕾外觀與小孢子發育階段之相關資料。此外，對於花芽誘導環境對花蕾發育的影響亦應一併考慮，有前人研究指出，生長箱內穩定之低溫有助小花蕾發育變慢，因此較大之花蕾反而更吻合小孢子培養所需之發育階段(Pratap *et al.* 2009)。本試驗青花菜植株於24°C恆溫之精密溫室中生長至開花，推測恆定之溫度助於小花蕾持續發育，並與有較大之花蕾外觀有關。

影響因子(3)小孢子培養條件：相對於提供開花植株最佳的生長環境與花芽分化的環境，以得到最佳品質之小孢子，在誘導小孢子進行胚發育的過程中，則需施予一些逆境處理，用意在於改變原本配子體發育路徑轉向孢子體發育。研究顯示，高溫逆境會影響染色體分裂時微管體(microtubule)的分布，讓正常狀態下呈現大小不均的營養核與生殖核分裂，趨向於大小平均的體細胞分裂，因而有利於孢子體發育(Simmonds & Keller 1999)。一般蕈苔屬植物小孢子培養最常使用的逆境處理為高溫(heat shock)，溫度逆境對一些花藥培養反應較低的品種有增進之效果，使用之溫度一般為30–35°C，處理時間1–3 d，之後再恢復於25°C培養(Ferrie 2003)。在表3中「農友天綠」以32°C處理1–3 d對胚誘導之影響差異並不顯著，雖然2 d處理組每皿之平均胚數較高，在產胚表現上亦較為整齊(多數為大胚)，但因同一處理各皿間之產胚數差異大，處理機差大導致處理間的差異並不顯著。此外，在處理3 d組發現其總胚數較處理2 d組減少，推測延長高溫處理時間從1 d至2 d有助胚的誘導，但處理時間延長至3 d，從2次胚數增加的結果來看，表示高溫處理時間過長可能造成胚的延遲發育。從表3結果來看，推測「農友天綠」小孢子胚形成的主要影響仍在於品種本身，但適當的溫度處理天數雖可以小幅改善產胚數。

影響因子(4)培養基：蕈苔屬植物最常使用的小孢子培養基改良自Nitsch & Nitsch(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。NLN-13 培養基是油菜小孢子培養最常用的培養基配方，但萇苔屬中不同種蔬菜對於 NLN 鹽類濃度及蔗糖濃度有不同的反應 (Custers 2003)。Da Silva Dias (2001) 以 10 種青花菜進行試驗，指出 32.5°C 處理 1 d 較處理 2 d 為佳，且使用 1/2 NLN 對於一些高反應品種較使用全量 NLN 有更佳之效果。在表 4 中「慶農 B-45」以全量及半量 NLN-13 配合 32°C 處理 1-3 d 進行複因子試驗，雖然結果顯示各處理因子及其交感對總胚數/皿之影響差異並不顯著，但若將胚依大小區分來看，發現在大胚方面，培養基與高溫處理時間的交感作用對大胚數的影響顯著。以全量 NLN 培養基配合 32°C 處理 1 d 獲得 5.5 胚/皿最高，但延長高溫處理時間至 3 d，則以 1/2NLN 培養基有較高之小胚數，顯示低鹽培養基中延長高溫處理時間對於阻礙胚發育的影響較小。

由小孢子發育而來的胚與體胚 (somatic embryo) 發育過程相似，經過圓形胚、心型胚、魚雷型胚後發育成為子葉期胚，小孢子發育至子葉期後，將從液體培養基繼代至固體培養基中培養，胚在發芽及發根後成為完整之植株。但有別於一般體胚具有高抽芽率之特性，小孢子發育而來之胚，培養於不含生長調節劑的培養基中分化成為小苗的比率偏低。一般而言，小孢子接種 3 wk 後肉眼即可見到各種發育時期的胚逐漸形成，將子葉期胚取出繼代至固態之 B5 或 MS 培養基培養，以甘藍種 (*B. oleracea*) 為例，體胚成功發育為植株的比率約在 35-70% 之間 (Babbar *et al.* 2004)。體胚亦可藉由培養基中添加 ABA (abscisic acid)、適度脫水、低溫 (4°C) 以及添加少量生長調節劑來提高成苗之比率 (Hansen 2000)。從表 5 總共 11 種促進胚發芽的處理結果來看，切除子葉、脫水、低溫皆有助於提高胚的抽芽率，其中以脫水處理對抽芽率的提高效果最佳。以溫度合併脫水處理來看，雖然 25°C 溫度下脫水 1 d 抽芽率達 46.7%，但在 25°C 溫度下延長脫水時間超過 1 d 即會對胚體造成傷害；而以 4°C 低溫配合脫水處理 1-5 d 皆有助胚抽芽率之提高，顯示 4°C 低溫配合脫水處理具有較穩定之抽芽促進效果，抽芽率在 35.0-48.3% 之間，符合一般對 *B. oleracea* 抽芽率之預期。

小孢子培養除作為形態發生研究之用外，主要作為快速培育純系之工具。由小孢子而來之植株，理論上應為單倍體，但實際上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，二為細胞分裂後分隔膜未發育，造成兩細胞的融合 (fusion)，二者皆能造成細胞染色體之倍加 (Aionesei *et al.* 2005)。以育種為目的的小孢子培養，主要在獲得同質結合具有稔性之 2 倍體 (DH) 植株，因此再生小苗的倍體性表現，關係到實務上是否需要進一步實施染色體倍加處理。影響小孢子植株倍體性表現的主要因子，包括 (1) 材料之基因型、(2) 小孢子的發育階段、(3) 培養的方法與條件。Takahata & Keller (1991) 使用青花菜小孢子培養獲得數百個再生植株，其中有超過 80% 是單倍體，但 Farnham (1998) 使用 6 個青花菜品種中，平均有 53-56% 是 2 倍體，表現最好之 'Marathon' 品種，2 倍體比率高達 78%。Da Silva Dias (2003) 之青花菜小孢子培養，其中自然倍加之 2 倍體比率為 43-88%，並建議 2 倍體比率高於 60% 以上者毋須進行染色體倍加處理。本試驗以「慶農 B-75」小孢子培養獲得之 23 株小苗進行流式細胞儀檢測，2 倍體之比率最高，達 60.9%；其次為單倍體之 34.8% 及 4 倍體之 4.3%，顯示「慶農 B-75」在小孢子培養過程中染色體自然倍加率高，DH 植株比率超過 60%，並不需要藉助秋水仙素處理即可獲得相當高比率之同質雙單元體，有助於育種實務上之利用。

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.
- 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. Biotechnol.* 3:185-202.
- Chang, Y. M., P. C. Liou, and C. H. Hsiao. 1996. Anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *cap-*

- itata*) and broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) I. Varieties, developmental stages and cultural medium relation with regeneration. J. Agric. Res. China 45:35–46. (in Chinese with English abstract)
- 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 Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.
- Da Silva Dias, J. C. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica 119:389–394.
- Da Silva Dias, J. C. 2003. Protocol for broccoli microspore culture. p.195–204. in: Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. (Maluszynski, M., K. J. Kasha, B. P. Forster, and I. Szarejko, eds.) Kluwer Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.
- Farnham, M. W. 1998. Doubled-haploid broccoli production using anther culture: Effect of anther source and seed set characteristics of derived lines. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 123:73–77.
- Ferrie, A. 2003. Microspore culture of *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 Academic. Dordrecht, Netherlands. 428 pp.
- 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 Tissue Organ 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.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.
- Hansen, M. 2000. ABA treatment and desiccation of microspore-derived embryos of cabbage (*Brassica Oleracea* ssp. *capitata* L.) improves plant development. J. Plant Physiol. 156:164–167.
- Keller, W. A., T. Rajhathy, and J. Lacapra. 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.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue 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.
- Pratap, A., S. K. Gupta, and Y. Takahata. 2009. Microsporangogenesis and haploidy breeding. p.293–307. in: Biology and Breeding of Crucifers. (Gupta, S. K., ed.) CRC. New York. 385 pp.
- Simmonds, D. H. and W. A. Keller. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. Planta 208:383–391.
- Takahata, Y. and W. A. Keller. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Sci. 74:235–242.
- Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuecht. 74:77–81.
- 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, C. F. Hong, L. C. Chang, and P. H. Chen. 2011. Adjusting breeding strategies of cruciferous vegetable to match challenges of climate change. p.135–152. in: Proceeding of the Workshop on Crop Breeding and Management of Agricultural Environment for Coping with Climate Change. (Wu, D. H., M. T. Lu, T. H. Tseng, Y. T. Wang, and C. L. Hsiao, eds.) Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan. 214 pp. (in Chinese with English abstract)

Development of Microspore Embryogenesis and Plant Regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*

Chi-Ni Hsia^{1,*}, Uei-Chern Chen², Chin-Yi Tsao³, and Yi-Mei Chou⁴

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and Y. M. Chou. 2017. Development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*. *J. Taiwan Agric. Res.* 66(3):184–192.

Brassica oleracea var. *italica* is an important vegetable in the world with rich nutrition for human health. The objective of this study was to establish a microspore culture system using elite broccoli F₁ hybrids from Taiwan to produce doubled-haploid (DH) lines for breeding purpose. Microspores taken from 5 commercial F₁ hybrids were surveyed for embryogenesis. Microspores were inoculated with 4×10^4 microspores/mL into NLN-13 medium in combination with a heat shock treatment at 32°C for 1 d before moving to 25°C for culturing. Embryo induction was found derived from 3 out of 5 cultivars, among them ‘Chinglong B-45’ had the highest embryogenesis rate. However, two cultivars were found without any embryogenesis. Microspores of ‘Known-you Tender green’ were taken from two different bud lengths for embryogenesis. A higher embryo induction rate (17.1 embryos/petri dish) was obtained from 4.0–5.0 mm length of bud than that of from 3.0–3.9 mm length of bud (7.0 embryos/petri dish). An experiment using two culture media in combination with three durations at 32°C was conducted using ‘Chinglong B-45’. Among six treatments, NLN medium with 1-d culturing at 32°C had the highest embryogenesis with 6.9 embryos/petri dish. Various stress treatments were conducted using cotyledonary embryos derived from ‘Chinglong B-75’ to improve germination. Treated embryos were precultured on the hormone containing medium for 1-week followed by 4 wk culturing on a hormone-free medium for shoot germination. A low shoot germination rate of 1.7% was obtained from the control which was without any stress treatment. In contrast, shoot germination rate of 46.7% and 48.3% were obtained from filter paper dry treatments at either 25°C for 1 d or at 4°C for 5 d, respectively. Ploidy levels were analyzed using flow cytometry for a total of 23 microspores derived plants of ‘Chinglong B-75’. Rates of 34.8% and 60.9% were obtained for haploid and diploid, respectively. A high DH production rate of 60% derived from the microspore culture would facilitate breeding program in practice.

Key words: Broccoli, Embryogenesis, Doubled haploid.

Received: March 16, 2016; Accepted: April 15, 2016.

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

¹ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.