

# 甘藍小孢子培養影響因子之優化研究

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

## 摘要

夏奇鈺、陳威臣、曹進義、林子凱、紀銘坤。2020。甘藍小孢子培養影響因子之優化研究。台灣農業研究 69(3):227–240。

甘藍是台灣最重要的葉菜類蔬菜，本研究之旨在提高甘藍小孢子培養技術的效率，用以建構甘藍雙單倍體 (doubled-haploid; DH) 生產系統，加速甘藍育種流程。篩選市售甘藍共 14 個栽培種，其中 13 個栽培種之小孢子在培養後具有胚分化反應，以取自 2.50–3.50 mm 大小花蕾具有高於或等於 3.51–4.50 mm 大小花蕾之胚分化率，其中以「金春」和「新威」栽培種的胚分化率最高，分別為 15.89 及 10.17 個胚/皿。比較 NLN [Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981)] 培養液中鹽類濃度及活性炭與瓊脂醣懸浮液組成對於「金春」和「新威」甘藍小孢子胚分化率的影響，兩栽培種皆以 1/2 NLN 較全量 NLN 培養液為佳，但活性炭與瓊脂醣懸浮液處理間則不具顯著差異。比較「金春」和「新威」甘藍小孢子在含有 13% 蔗糖或麥芽糖之培養液中培養，或先以含有 16% 蔗糖之培養液培養 2 d 後，再將蔗糖濃度降至 10% 繼續培養，共 3 種處理，結果顯示兩栽培種皆以含 13% 蔗糖處理可獲得最高之胚分化率。比較 32°C 及 35°C 高溫處理 1 d 後，再分別於 22°C 或 25°C 中靜置培養對「新威」小孢子胚分化的影響，結果顯示僅第一階段高溫處理的影響效果顯著，其中以 32°C 處理 1 d 再續以 25°C 培養可獲得之胚數最高，為每皿 14.00 個胚。在胚發芽率方面，「新威」甘藍的子葉期胚經 4°C 脫水 1 wk 後，接種於含有 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜的培養基中，發芽率可達 91.81%；但「金春」使用相同處理之發芽率僅 27.77%。將 4°C 脫水 1 wk 後之「金春」小孢子胚接種於含有不同濃度洋菜的培養基中於室溫培養，結果顯示 10–16 g L<sup>-1</sup> 洋菜未能提高「金春」之發芽率；但若將小孢子胚先接種於 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜培養基，同時置於 4°C 培養 1 wk，之後移至室溫繼續培養，可將「金春」之發芽率提高至 94.00%。以流式細胞儀分析「金春」和「新威」甘藍的 DH 植株比例，分別為 53.4% 和 12.5%，顯示不同栽培種小孢子胚染色體之自然倍加比率差異大。

**關鍵詞：**甘藍、小孢子胚分化、雙單倍體。

## 前言

甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) 原產於地中海沿岸，由不結球野生甘藍演化而來。根據農糧署統計資料，2018 年甘藍的種植面積為 8,339 ha，僅次於竹筍，總產值達 56.24 億元，為全台蔬菜產品之冠 (Council of Agriculture 2019)。台灣目前栽培最多的甘藍品種為 1954

年自日本引進的「初秋」，至今已超過 60 餘年。「初秋」口感佳但不耐高溫，且易感染黑腐病和軟腐病，然多年來市場上並未出現足以取代「初秋」角色之新品種，部分原因在於台灣的甘藍育種存有許多客觀障礙，如夏季炎熱但冬季平地低溫不足，植株不易自然開花，必須以適度成熟的植株經 2 個月春化處理後才能抽苔開花。此外，甘藍為異交作物，具有自交

投稿日期：2020 年 2 月 14 日；接受日期：2020 年 6 月 30 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> 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>5</sup> 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

不親和性，為了生產一代雜交種 ( $F_1$ ) 所需之自交系，必須透過人工蕾期授粉克服自交障礙，在經過 6–8 代自交培育後才能作為試交評估之用。因此，如何縮短育種所需時間並提高選種效率及降低育種成本，乃是甘藍育種亟需改進的方向。

同質雙單倍體 (doubled-haploid; DH) 係指單倍體細胞在自然狀態或經由人工處理後，染色體倍加，形成具有同質基因型的植株。DH 植株因其等位基因具有同質性，是遺傳上 100% 的純系，因此可取代自交系作為  $F_1$  生產所需之親本，縮短  $F_1$  育成所需之時間，並提高田間選拔的效率 (Forster & Thomas 2005)。獲得 DH 植株的方法依作物別而有差異 (Germanà 2011)，十字花科芸薹屬 (*Brassica*) 作物利用培養未成熟花粉 (小孢子) 生產 DH 植株之技術已臻成熟，值得我們善加利用以改進甘藍育種效率 (Babbar *et al.* 2004; Ferrie & Caswell 2011)。

甘藍是台灣目前最重要的葉用蔬菜，但其育種困難度遠高於其他甘藍類 (*B. oleracea*) 蔬菜。本研究擬將過去在青花菜與花椰菜所建立的小孢子培養技術 (Hsia *et al.* 2017a, 2017b)，應用於甘藍之小孢子培養，並對影響甘藍小孢子培養效率的各種關鍵因子加以測試，藉以提高甘藍 DH 的育成效率，縮短甘藍自交系育成所需的時間，加快甘藍新品種的育成速度。

## 材料與方法

### 供試材料與栽培管理

供試甘藍栽培種分別為購自瀧井種苗 (Takii Seed Co., Ltd., Taichung City, Taiwan) 的「初秋」(‘K-Y Cross’)、農友種苗公司 (Known-you Seed Co., Ltd., Kaohsiung City, Taiwan) 的「綠秋」(‘Green Autumn’) 與「高峰」(‘Tops’)，豐田種子行 (Po Yu Trading Co., Ltd., Kaohsiung City, Taiwan) 的「大華」(‘Da Hua’)、「大吉」(‘Da Ji’)、「大樂」(‘Da Le’)、「大利」(‘Da Li’)、「新威」(‘Shin Wei’)、「夏天」(‘Summer’)、「大福」(‘Da Fu’) 與「金春」(‘Jin Chuen’)、稼

穡種子公司 (Suntech Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「夏安」(‘Tropical Angel’)、欣樺種苗公司 (Sing-Flow Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「台中 1 號」(‘Taichung 1’) 以及宇辰農業生物科技公司 (Your Chain Seed Co., Ltd., Tainan City, Taiwan) 的「台中 2 號」(‘Taichung 2’)，共 14 個栽培種。將甘藍種子播於 104 孔穴盤中，於日/夜溫 26°C/20°C、自然光照之精密溫室內栽培 4 wk 後，將小苗移植至 18 cm 硬盆。於相同環境中繼續栽培 8 wk 後，將盆栽移入 6°C 春化處理生長箱中栽培 60 d。再將植株移入日/夜溫 25°C/20°C、光照 12 h 生長箱中繼續栽培至開花，並於花蕾生長至適當大小時剪取使用。甘藍於 18 cm 硬盆生長期間，每週施用一次 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) 肥料，春化處理後改施濃度相同的花寶 3 號 1 g L<sup>-1</sup> (N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 10 : 30 : 20) 肥料。

### 小孢子培養

小孢子分離之流程修改自 Custers (2003)，實際操作流程同 Hsia *et al.* (2017b) 方法。將小孢子懸浮液濃度調整至每毫升含  $4 \times 10^4$  個小孢子，以 55 mm × 15 mm 培養皿每皿分裝 5 mL，並以石蠟膜加封。置於 32°C 培養箱中，以黑暗培養 24 h，再移至 25°C 於黑暗中靜置培養 2 wk 後，將培養皿移至水平迴轉式震盪器，以 60 rpm 震盪培養，每日照光 14 h，光照強度為 30.3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。小孢子分化生長至子葉期後，將小胚取出，調查每皿產生之胚數。

### NLN 鹽類濃度與活性炭懸浮液組成對小孢子胚分化之影響

配製活性炭 (activated charcoal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 與低熔點瓊脂醣 (low gelling agarose, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 不同比例混合之懸浮液，分別為 A (2% 活性炭, 1% 瓊脂醣)、B (2% 活性炭, 2% 瓊脂醣) 及 C (1% 活性炭, 2% 瓊脂醣)。配製含全量及半量 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) 鹽類濃度之培養液 (Lichter 1981)，並添加 13% 蔗糖 (代號分別為 NLN 與 1/2 NLN)。取甘藍「新威」與「金春」

2.50–3.50 mm 大小之花蕾，將分離後之小孢子分別以 NLN 或 1/2 NLN 培養液調製如上述之懸浮液，每皿 5 mL 懸浮液加入 0.1 mL 活性炭與瓊脂醴之混合液，小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

### 不同醣類及其濃度對甘藍小孢子胚分化的影響

小孢子分別取自「新威」2.50–3.50 mm 花蕾及「金春」3.51–4.50 mm 花蕾，分別培養於添加 13% 蔗糖或 13% 麥芽糖的 1/2 NLN 培養液中，或先於含有 16% 蔗糖的 1/2 NLN 培養液中培養 2 d 後，進行離心。將原培養液更換為含 10% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液後繼續培養，共 3 種處理。小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

### 二階段溫度處理對胚分化的影響

取自「新威」之 2.50–4.50 mm 花蕾依上述方法調製小孢子懸浮液，並分裝於培養皿，將培養皿分別置入 32°C 和 35°C 培養箱中，於黑暗下培養 1 d。將不同溫度處理之培養皿取出後，各自分成 2 組，分別置於 22°C 和 25°C 培養箱中，於黑暗下繼續培養 2 wk。之後小孢子培養方法及產胚調查同前所述。

### 洋菜濃度對小孢子胚發芽的影響

於含有 20 g L<sup>-1</sup> 蔗糖之 B5 鹽類基本培養基中 (Gamborg *et al.* 1968)，分別添加 10、12、14 和 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜 (Bacto agar, BD, Baltimore, MD, USA) 配製發芽培養基。將胚軸長約 1–2 mm 之子葉期胚從培養液中取出，放入鋪有乾燥濾紙之 55 mm × 15 mm 培養皿中，於 4°C 黑暗下進行 1 wk 脫水處理。將脫水胚取出後，接種於上述含有不同濃度洋菜的 B5 鹽類培養基 (Gamborg *et al.* 1968)，培養 4 wk 後記錄小孢子胚的發芽率。

### 發芽前處理對子葉期胚發芽之影響

將胚軸長約 1–2 mm 之子葉期胚自培養液中取出，分別進行 3 種前處理：(1) 將胚直接接種於發芽培養基中，置於 25°C 下培養作為對照組；(2) 將胚先放入鋪有乾燥濾紙之 55

mm × 15 mm 培養皿，置於 4°C 黑暗環境下進行 1 wk 脫水處理後，再接種於發芽培養基，在 25°C 下培養；(3) 將胚直接接種於發芽培養基中，於 4°C 黑暗環境下培養 1 wk 後，再移至 25°C 下繼續培養。發芽培養基為 B5 鹽類培養基添加 20 g L<sup>-1</sup> 蔗糖與 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜。胚發芽率皆於 25°C 培養 4 wk 後調查，並同時切取芽體繼代至含有 MS 鹽類 (Murashige & Skoog 1962) 之固體培養基中進行發根培養。

### 染色體倍體性檢測

切取瓶內或出瓶植株之完全展開葉約 1 cm<sup>2</sup> 大小，加入 CyStain UV Precise P Kit (Partec, Görlitz, Germany) 0.2 mL 萃取緩衝液，以刀片將葉片組織細切後，再添加 0.8 mL 染色液。以 30 μm 過濾網過濾，濾液靜置 3 min 後，以流式細胞儀 (ploidy analyzer, Partec, Görlitz, Germany) 檢測染色體之倍體數。每一葉片取樣 2 次，每一樣品檢測之細胞核數為 5,000 個。染色體倍數判別係與孢子供體植株之葉片作為 2 倍體比較。

### 統計分析方法

試驗採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行 analysis of variance (ANOVA) 變方分析。若處理間差異顯著 ( $P < 0.05$ )，則利用 least significant difference (LSD) test 比較各處理平均值間之差異。

## 結果

### 不同栽培種及其花蕾大小對小孢子胚分化之影響

比較取自 14 個甘藍栽培種之 2 種不同大小花蕾中所含的小孢子量及其胚分化率 (胚數/皿)，結果如表 1 所示。其中，栽培種、花蕾大小及兩因子交感作用對於胚分化率的影響，皆達極顯著標準 ( $P < 0.01$ )。14 個甘藍栽培種不論是取自 2.50–3.50 mm 或是 3.51–4.50 mm 花蕾，每蕾平均小孢子數最少者為「大樂」之

表 1. 不同甘藍栽培種及其花蕾大小對誘導小孢子胚形成之影響。

Table 1. Effect of cabbage cultivar and its bud size on induction of microspore embryogenesis<sup>2</sup>.

Cultivar (栽培種名)	Bud size (mm)	Microspores/bud	Embryos/petri dish
‘Jin Chuen’ (「金春」)	2.50–3.50	$1.06 \times 10^5$	$15.89 \pm 7.67 a^y$
	3.51–4.50	$1.46 \times 10^5$	$10.90 \pm 4.31 a$
‘Shin Wei’ (「新威」)	2.50–3.50	$1.33 \times 10^5$	$10.17 \pm 3.43 a$
	3.51–4.50	$1.38 \times 10^5$	$2.83 \pm 3.06 b$
‘Summer’ (「夏天」)	2.50–3.50	$0.92 \times 10^5$	$5.30 \pm 3.20 a$
	3.51–4.50	$0.63 \times 10^5$	$0.33 \pm 0.52 b$
‘Da Fu’ (「大福」)	2.50–3.50	$0.63 \times 10^5$	$4.83 \pm 1.60 a$
	3.51–4.50	$0.33 \times 10^5$	$0.86 \pm 0.90 b$
‘Tropical Angel’ (「夏安」)	2.50–3.50	$1.13 \times 10^5$	$1.11 \pm 0.81 a$
	3.51–4.50	$1.07 \times 10^5$	$1.18 \pm 0.81 a$
‘K-Y Cross’ (「初秋」)	2.50–3.50	$1.34 \times 10^5$	$1.00 \pm 1.12 a$
	3.51–4.50	$1.64 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 b$
‘Da Hua’ (「大華」)	2.50–3.50	$0.98 \times 10^5$	$0.19 \pm 0.40 b$
	3.51–4.50	$1.15 \times 10^5$	$1.00 \pm 0.73 a$
‘Tops’ (「高峰」)	2.50–3.50	$1.19 \times 10^5$	$0.70 \pm 0.56 a$
	3.51–4.50	$1.29 \times 10^5$	$0.13 \pm 0.34 b$
‘Da Le’ (「大樂」)	2.50–3.50	$0.27 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 a$
	3.51–4.50	$1.37 \times 10^5$	$0.63 \pm 0.96 a$
‘Da Li’ (「大利」)	2.50–3.50	$0.61 \times 10^5$	$0.31 \pm 0.60 a$
	3.51–4.50	$0.64 \times 10^5$	$0.53 \pm 0.52 a$
‘Taichung 2’ (「台中 2 號」)	2.50–3.50	$0.64 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 a$
	3.51–4.50	$0.81 \times 10^5$	$0.50 \pm 0.86 a$
‘Taichung 1’ (「台中 1 號」)	2.50–3.50	$0.84 \times 10^5$	$0.05 \pm 0.22 a$
	3.51–4.50	$0.96 \times 10^5$	$0.35 \pm 1.46 a$
‘Da Ji’ (「大吉」)	2.50–3.50	$0.97 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 a$
	3.51–4.50	$1.04 \times 10^5$	$0.25 \pm 0.46 a$
‘Green Autumn’ (「綠秋」)	2.50–3.50	$0.76 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 a$
	3.51–4.50	$0.92 \times 10^5$	$0.00 \pm 0.00 a$
Cultivar			**
Bud size			**
Cultivar × bud size			**

<sup>2</sup> Microspores were cultured in the 1/2 NLN-13 medium with  $4 \times 10^4$  microspores per mL.

<sup>y</sup> Means with different letters in the same cultivar are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

\*\*Significant at 0.01 level.

$0.27 \times 10^5$  個小孢子/蕾；最多者為「初秋」之  $1.64 \times 10^5$  個小孢子/蕾。每蕾平均小孢子數最高與最低之栽培種相差達 6.1 倍，圖 1 為「初秋」小孢子培養至獲得 DH 馴化苗之情形。以顯微鏡觀察 14 個甘藍栽培種的花粉，顯示各

栽培種的花粉發育正常並無敗育現象(資料未顯示)。比較取自不同大小花蕾內小孢子數之多寡，各栽培種中大多以 3.51–4.50 mm 花蕾具有較高之平均小孢子數，只有「夏天」、「大福」、「夏安」3 個栽培種以取自 2.50–3.50 mm

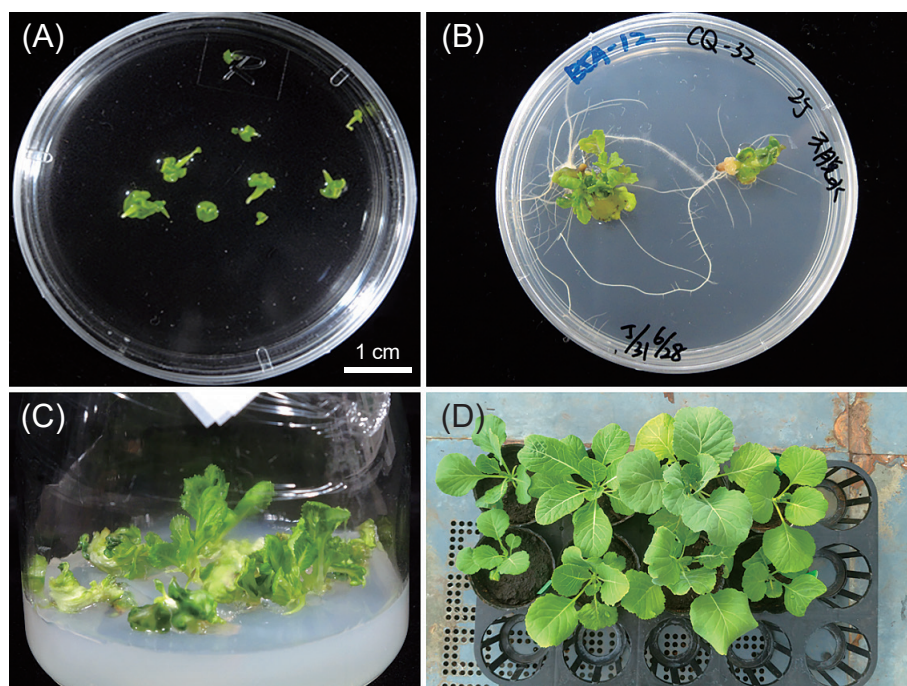


圖 1. 甘藍「初秋」小孢子培養獲得雙單倍體 (A) 子葉期胚；(B) 子葉期胚發芽；(C) 芽體生長；及 (D) 出瓶馴化後之雙單體小苗。

Fig. 1. Microspore culture of cabbage 'K-Y Cross' (A) cotyledonary embryos; (B) germination of embryos; (C) growth of shoots; and (D) acclimated DH plantlets.

花蕾具有較高之平均小孢子數/蕾。比較各栽培種取自不同大小花蕾的胚分化率，結果顯示在 14 個栽培種中有 13 個以取自 2.50–3.50 mm 花蕾其胚分化率優於或等於 3.51–4.50 mm 花蕾，其中僅 1 個栽培種「大華」顯示取自 3.51–4.50 mm 花蕾者有較高的胚分化率。上述 14 個栽培種中，以「金春」和「新威」的小孢子胚分化率最高，取自 2.50–3.50 mm 花蕾每皿分化之胚數在 10.17–15.89 之間，因此後續各項影響因子的優化試驗皆以這兩個栽培種進行。

#### NLN 鹽類濃度與活性炭懸浮液組成對小孢子胚分化之影響

十字花科作物小孢子培養最常使用之培養基為 NLN 鹽類配方 (Nitsch & Nitsch 1967)。本研究比較 1/2 或全量 NLN 培養液中分別加入活性炭與瓊脂懸浮液以不同比例混合之懸浮液。表 2 顯示參試之 2 因子中，以 NLN 鹽類濃度

對「金春」和「新威」的小孢子胚分化率具有極顯著之影響 ( $P < 0.01$ )，但不同比例混合之活性炭與瓊脂懸浮液及其與前者間的交感則無顯著影響。NLN 鹽類濃度在兩栽培種中皆以 1/2 較全量為佳，「金春」和「新威」在 1/2 NLN 培養液中的胚分化率，分別為 10.50–13.20 胚/皿和 6.67–10.60 胚/皿，顯著高於在全量 NLN 培養液中的 0.00–1.67 胚/皿和 4.29–7.00 胚/皿。

#### 不同醣類及其濃度對甘藍小孢子胚分化的影響

以取自「金春」和「新威」甘藍不同大小花蕾所分離出的小孢子，分別置於含有 13% 蔗糖或 13% 麥芽糖的 1/2 NLN 培養液中培養，以及先以 16% 蔗糖培養 2 d 再以 10% 蔗糖繼續培養。此 3 種處理對不同大小花蕾之小孢子胚分化的影響結果顯示，花蕾大小及不同醣類及其濃度處理對兩栽培種皆有顯著影響，但

表 2. 培養液 NLN 鹽類濃度與活性炭懸浮液組成對 2 種甘藍栽培種小孢子胚形成之影響。

**Table 2.** Effect of salt strength of NLN medium and charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis of two cabbage cultivars<sup>z</sup>.

Salt strength of medium	Charcoal suspension <sup>y</sup>	Embryos/petri dish	
		'Jin Chuen' (「金春」)	'Shin Wei' (「新威」)
1/2 NLN	A	10.50 ± 5.07 a <sup>x</sup>	10.17 ± 3.43 a
	B	12.80 ± 3.77 a	10.60 ± 3.21 a
	C	13.20 ± 2.77 a	6.67 ± 1.03 ab
NLN	A	1.67 ± 1.75 b	7.00 ± 4.18 ab
	B	0.83 ± 0.75 b	4.29 ± 3.55 b
	C	0.00 ± 0.00 b	5.40 ± 2.97 b
Medium		**	**
Charcoal		NS	NS
Medium × charcoal		NS	NS

<sup>z</sup> NLN: Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981). Microspores were inoculated with  $4 \times 10^4$  microspores per mL.

<sup>y</sup> A: 2% charcoal + 1% agarose; B: 2% charcoal + 2% agarose; and C: 1% charcoal + 2% agarose.

<sup>x</sup> Means with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

\*\*Significant at 0.01 level; NS: non significant.

兩因子間之交互效應僅「新威」達到顯著水準(表 3)。兩栽培種皆以取自 2.50–3.50 mm 花蕾較 3.51–4.50 mm 花蕾具有較高之胚分化率。醣類處理中，兩栽培種皆以 13% 蔗糖表現最佳，13% 麥芽糖以及蔗糖 2 階段處理其次，但後 2 處理間的差異不顯著。6 個處理中以取自 2.50–3.50 mm 花蕾之小孢子培養於含有 13% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液具有最高的胚分化率，

「金春」和「新威」平均每皿分別產生 15.89 個和 17.50 個胚。

### 二階段溫度處理對「新威」甘藍胚分化的影響

取「新威」小孢子於 32°C 或 35°C 高溫培養 1 d 後，將相同溫度處理之樣品分成 2 組，分別置於 22°C 和 25°C 進行 2 wk 培養，結果如表 4

表 3. 醣類及其濃度與花蕾大小對 2 種甘藍栽培種小孢子胚形成之影響。

**Table 3.** Effect of carbohydrate type and its concentration on microspore embryogenesis of two cabbage cultivars in two bud sizes<sup>z</sup>.

Bud size (mm)	Carbohydrate treatment	Embryos/petri dish	
		'Jin Chuen' (「金春」)	'Shin Wei' (「新威」)
2.50–3.50	13% sucrose	15.89 ± 7.67 a <sup>y</sup>	17.50 ± 3.78 a
	13% maltose	0.75 ± 0.89 c	0.50 ± 0.55 bc
	16% sucrose 2 d + 10% sucrose	0.13 ± 0.35 c	0.00 ± 0.00 c
3.51–4.50	13% sucrose	10.90 ± 4.31 b	4.00 ± 4.24 b
	13% maltose	0.00 ± 0.00 c	1.33 ± 1.53 bc
	16% sucrose 2 d + 10% sucrose	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
Bud size		*	**
Carbohydrate		**	**
Bud size × carbohydrate		NS	**

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

<sup>y</sup> Means with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

\*Significant at 0.05 level; \*\*significant at 0.01 level; NS: non significant.

表 4. 二階段溫度組合處理對「新威」甘藍小孢子培養胚分化之影響。

Table 4. Effect of two stage temperature treatments on microspore embryogenesis of 'Shin Wei' cabbage<sup>z</sup>.

	Temperature (°C) <sup>y</sup>		Embryos/petri dish
	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	
32		22	8.75 ± 1.71 b <sup>x</sup>
		25	14.00 ± 5.48 a
35		22	1.33 ± 0.58 c
		25	2.00 ± 1.41 c
1 <sup>st</sup> stage			**
2 <sup>nd</sup> stage			NS
1 <sup>st</sup> × 2 <sup>nd</sup> stage			NS

<sup>z</sup> Microspores were cultured in the 1/2 NLN medium with  $4 \times 10^4$  microspores per mL.

<sup>y</sup> Microspores were cultured at 1<sup>st</sup> temperature for 1 d in the dark followed by at 2<sup>nd</sup> temperature for 2 wk.

<sup>x</sup> Means with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

\*\*Significant at 0.01 level; NS: non significant.

所示。第一階段之高溫處理對小孢子的胚分化有極顯著的影響，第二階段培養溫度及其與第一階段高溫處理的交互效應影響皆不顯著。比較高溫處理間，以 32°C 較 35°C 有較高的胚分化率，4 個處理中則以 32°C 培養 1 d 後接續以 25°C 培養 2 wk 可獲得 14.00 胚/皿為最高。

### 洋菜濃度對小孢子胚發芽的影響

將「新威」和「金春」長至子葉期的胚取出，

移至鋪有濾紙的培養皿中，於 4°C 脫水 1 wk，再接種至發芽培養基中進行發芽，結果如表 5 所示。「新威」胚發芽率可達 91.81%，但「金春」發芽率僅 27.77%，在相同條件下 2 品種的胚發芽率差異明顯。

為提高「金春」的發芽率，將 4°C 脫水處理後的子葉期胚接種於添加 10、12、14 和 16 g L<sup>-1</sup> 濃度洋菜之培養基中培養，結果如表 6 所示。發芽培養基之洋菜濃度對「金春」子葉期胚的

表 5. 兩個甘藍栽培種之小孢子子葉期胚在 B5A-16 培養基中發芽之情形。

Table 5. Germination of microspore-derived cotyledonary embryos of two cabbage cultivars on the B5A-16 medium<sup>z</sup>.

Cultivar	Tested embryo	Germinated embryo	Germination rate (%)
'Jin Chuen' (「金春」)	99	26	27.77 ± 22.23
'Shin Wei' (「新威」)	252	231	91.81 ± 9.42

<sup>z</sup> Cotyledonary embryos were put into a petri dish with filter paper at 4°C for 1 wk dehydration before subculturing into the germination medium B5A-16. B5A-16 medium contained 20 g L<sup>-1</sup> sucrose and 16 g L<sup>-1</sup> Bacto agar in the B5 salt medium.

表 6. 發芽培養基中之洋菜濃度對甘藍「金春」子葉期胚發芽之影響。

Table 6. Effect of agar concentration in the medium on cotyledonary embryo germination of 'Jin Chuen' cabbage<sup>z</sup>.

Agar (g L <sup>-1</sup> )	Tested embryo	Survival rate (%)	Germination rate (%)
10	40	52.50 ± 9.57 a <sup>y</sup>	17.50 ± 12.58 a <sup>y</sup>
12	40	27.50 ± 12.58 ab	20.00 ± 8.16 a
14	37	41.08 ± 41.46 ab	17.50 ± 23.63 a
16	30	10.00 ± 17.32 b	3.33 ± 5.77 a

<sup>z</sup> Cotyledonary embryos were put into a petri dish with filter paper at 4°C for 1 wk dehydration before subculturing into the germination medium.

<sup>y</sup> Means with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

發芽率並無顯著影響，於 10–14 g L<sup>-1</sup> 洋菜濃度，發芽率介於 17.50–20.00% 之間，洋菜濃度提高至 16 g L<sup>-1</sup> 時，發芽率降至 3.33%，但 4 種濃度間的差異並不顯著。相反的，不同濃度洋菜對子葉期胚的成活率則具有顯著影響，以 10 g L<sup>-1</sup> 最佳，成活率可達 52.50%。洋菜濃度提高到 16 g L<sup>-1</sup> 時，成活率明顯降低至 10.00%，且高濃度洋菜 (14–16 g L<sup>-1</sup>) 處理之機差較高。

### 發芽前處理對子葉期胚發芽之影響

將「金春」子葉期胚自培養液中取出，進行 3 種前處理，一為直接將子葉期胚接種於發芽培養基置於 25°C 中持續培養之對照組；二為直接接種胚於發芽培養基，但先於 4°C 培養 1 wk；三為先將子葉期胚置於鋪有濾紙之培養皿中，於 4°C 中脫水 1 wk。第一及第二處理在 4°C 培養 1 wk 後，皆同樣移至 25°C 下繼續培養，結果顯示如表 7。3 種處理中，以子葉期胚接種於發芽培養基並於 4°C 培養 1 wk 後再移至 25°C 培養的發芽率最高，達 94.00%。直接培養於 25°C 及於 4°C 濾紙脫水 1 wk 後再將發芽培養基移至 25°C 中培養的發芽率，分別為 35.56% 與 16.67%，後 2 處理間差異不顯著，但與前一處理間有顯著差異。

表 7. 不同發芽前處理對「金春」甘藍子葉期胚發芽之影響。

**Table 7.** Effect of various pre-treatments on cotyledonary embryo germination of 'Jin Chuen' cabbage<sup>z</sup>.

Pre-treatment	Tested embryos	Germination rate (%)
25°C	26	35.56 ± 33.55 b <sup>y</sup>
4°C filter paper dry for 1 wk	30	16.67 ± 20.82 b
4°C for 1 wk	42	94.00 ± 5.48 a

<sup>z</sup> Cotyledonary embryos were subcultured on the germination medium directly and cultured at 25°C; or were put into a petri dish with or without filter paper at 4°C for 1 wk dehydration before subculturing on the germination medium. Germination medium of B5A-16 contained 20 g L<sup>-1</sup> sucrose and 16 g L<sup>-1</sup> Bacto agar in the B5 salt medium.

<sup>y</sup> Means with different letters in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by least significant difference (LSD) test.

表 8. 以流式細胞儀檢測「金春」和「新威」甘藍小孢子再生植株的倍體數表現。

**Table 8.** Ploidy level of microspore-derived plants of cabbage 'Jin Chuen' and 'Shin Wei' analyzed by flow cytometry.

Cultivar	No. of analyzed plants	Ploidy level (%)			
		C	2C	4C	Others <sup>z</sup>
'Jin Chuen' (「金春」)	34	14.7	53.4	5.9	23.5
'Shin Wei' (「新威」)	120	75.8	12.5	2.5	9.2

<sup>z</sup> Others include 3C and chimera plants.

以流式細胞儀檢測「金春」與「新威」出瓶苗株的染色體倍體數，「金春」甘藍共檢測 34 株，DH 植株占有出瓶苗株達 53.4% (表 8)。「新威」甘藍檢測 120 株出瓶苗，DH 植株僅占 12.5%，高達 75.8% 為單倍體。

## 討論

蕓薹屬蔬菜的單倍體植株最早是從大油菜 (*Brassica napus*) 和小油菜 (*Brassica campestris*) 的花藥培養中所獲得 (Keller *et al.* 1975; Thomas & Wenzel 1975)。自 Lichter (1982) 以大油菜發展出游離小孢子培養技術後，不僅效率較花藥培養提高，且再生植株來自於體細胞的疑慮得以降低，小孢子培養技術從此被廣泛應用於十字花科作物 DH 的生產 (Pratap *et al.* 2009)。十字花科甘藍類 (*Brassica oleracea* L.) 包括有甘藍、花椰菜和青花菜等重要的蔬菜，其小孢子培養方法大都沿用油菜所建立之方法，並加以修正改進 (Custers 2003)；但甘藍類蔬菜利用小孢子生產 DH 植株的效率，一般而言不如油菜，所遭遇的障礙主要可歸納為：小孢子胚分化率低、小孢子胚的發芽率低以及 DH 植株比例偏低等三項。其中，影響甘藍類蔬菜小孢子胚分化率的因子可細分為：

品種基因型、開花溫度、小孢子的發育階段及小孢子培養條件等 (Ahmadi *et al.* 2012)。Pratap *et al.* (2009) 指出植株於有利開花的溫度中栽培，可提高小孢子的胚分化率。由於本研究中所使用的甘藍植株於春化處理後均栽培於生長箱中，在溫度方面受到精準的控制，降低了植株在開花階段受到環境溫度的影響。在基因型影響方面，學者對於青花菜小孢子培養的研究指出，小孢子的胚分化特性可能由少數基因所控制，致使不同物種或不同品種的小孢子胚分化率差異很大 (Da Silva Dias 2001)。改善之道包括消極的篩選品種及積極的將胚分化低反應品種與高反應品種進行雜交改進，但後法所需之時間與人力較多 (Touraev *et al.* 1997; Shariatpanahi *et al.* 2006; García *et al.* 2017)。本研究依據前期於花椰菜與青花菜所建立之小孢子培養技術，將其應用於市售甘藍栽培種之小孢子培養 (Hsia *et al.* 2017a, 2017b)，除對市售甘藍栽培種的小孢子胚誘導反應進行瞭解外，同時也對影響甘藍小孢子培養的各項關鍵因子加以改進。

根據本研究 14 個甘藍栽培種的小孢子培養結果 (表 1)，不同栽培種其每一花蕾中所含的平均小孢子量介於  $0.27\text{--}1.64 \times 10^5$  個，同一栽培種中不同大小花蕾所含的小孢子數則差異不大；但不同栽培種每一花蕾中所含的小孢子數則具有明顯差異，推測每一花蕾中所含的小孢子數為各栽培種之特性。過去的研究常以每一花蕾所得之胚數來比較胚分化率，但小孢子培養過程常因消毒不完全或操作不當，導致部分材料污染必須丟棄，因此不易以原始使用之花朵數作為最後比較之基準 (Gu *et al.* 2003)。相反的，因每一培養皿中均使用相同數量之小孢子接種 ( $4 \times 10^4$  個/mL  $\times$  5 mL)，因此可直接以未受污染的皿數中所獲得之平均胚數 (平均胚數/皿) 來比較，更能具體表達各栽培種以每一個小孢子為單位對胚誘導反應的比例。依據 14 個甘藍栽培種之胚分化率，將其分為三群，胚分化率最高之一群 ( $> 4.0$  胚/皿) 共有 4 栽培種占 28.6%，其中以「金春」與「新威」具有較高之小孢子量 ( $1.06\text{--}1.46 \times 10^5$  個)，但「夏天」與「大福」之小孢子量 ( $0.33\text{--}0.92 \times$

$10^5$  個) 在 14 栽培種中則偏低，顯示每一花蕾中所含之小孢子數與其胚分化率並未具直接關聯性 (表 1)。第二群栽培種其每皿平均胚分化率介於  $0.05\text{--}4.00$  胚/皿之間，共 9 個栽培種占 64.3%。第三群為兩種花蕾大小均無出胚反應的栽培種，僅有「綠秋」1 個栽培種占 7.1%。總體而言，14 個栽培種中有 13 個具有胚分化反應，亦即本研究甘藍栽培種之小孢子中高達 92.9% 具有胚分化的反應，但大多數栽培種的胚分化率偏低，顯示必須對影響甘藍小孢子胚分化的各項關鍵因子加以優化。

選擇適當發育階段的小孢子作為培養材料，是影響胚分化的重要因子之一，過去之研究多數認為，小孢子介於單核晚期到雙核早期之間的發育階段，是最適合培養的時期 (Bhowmik *et al.* 2011)。小孢子發育階段的判別，除了進行細胞染色並以顯微鏡進行觀察外，還可藉助梯度離心法分離小孢子，以及藉由流式細胞儀分析瞭解小孢子發育階段的分布比例等；但在實務操作上，以依據花蕾長度作為判別標準最常被採用 (Takahata *et al.* 1993)。本試驗將甘藍花蕾長度分為  $2.50\text{--}3.50$  mm 和  $3.51\text{--}4.50$  mm 兩種大小進行試驗。結果顯示在 14 個栽培種中，僅有 1 個栽培種「大華」其  $3.51\text{--}4.50$  mm 花蕾較  $2.50\text{--}3.50$  mm 花蕾具有顯著較高的胚分化率，其他 13 個甘藍栽培種則皆以取自  $2.50\text{--}3.50$  mm 花蕾具有較高或相近的胚分化率。推測  $2.50\text{--}3.50$  mm 長度之花蕾內可能含有較高比例適合培養時期之小孢子，因此有利於胚分化的表現。Bhowmik *et al.* (2011) 以 4 個大油菜 (*B. napus*) 品種 (系) 進行花蕾分級試驗，4 個品種 (系) 之最佳出胚花蕾大小分別有  $2.0\text{--}2.4$ 、 $2.5\text{--}2.9$  及  $3.5\text{--}3.9$  mm，顯見同種但不同基因型間其最適培養之花蕾大小存有差異。Prem *et al.* (2008) 以 3 種芥菜 (*Brassica juncea*) 進行 2 種大小花蕾 ( $2.50\text{--}3.00$  與  $3.05\text{--}3.50$  mm) 之小孢子培養，結果顯示小孢子的胚分化與基因型有關，且基因型與花蕾大小有顯著的交感作用。推測基因型不止影響花蕾的生長快慢，並影響花蕾內小孢子於每一發育階段停留的時間，最終導致某一特定大小的花蕾含有較高比例之發育階段適

合培養的小孢子。本研究中亦顯示有相同之結果，亦即栽培種、花蕾大小以及這兩因子間의 交互作用對胚分化率皆有顯著影響 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

影響小孢子胚分化率的第三個因子為小孢子的培養條件，包括小孢子培養過程中使用的培養基組成、溫度處理、糖濃度處理以及其他添加物等 (Simmonds & Keller 1999)。十字花科蔬菜自油菜建立小孢子培養方法後，大多採用 1/2 或全量 NLN 基本鹽類配方作為小孢子培養液 (Nitsch & Nitsch 1967)。但甘藍類作物不同種或栽培種對於 NLN 鹽類濃度的反應並非完全相同，Da Silva Dias (2001) 比較 1/2 及全量 NLN，以及 Na *et al.* (2011) 比較 1/4、1/2、全量及 2 倍量 NLN 對青花菜小孢子培養的影響，上述兩研究的結果皆顯示以 1/2 NLN 表現最佳。本研究結果亦顯示，「金春」和「新威」兩栽培種使用 1/2 較全量 NLN 具有明顯較高的胚分化率 (表 2)。此外，在活性炭與瓊脂醣懸浮液製作比例方面，本研究使用之 3 種比例組成對胚分化的影響程度差異並不顯著 (表 2)。Gland *et al.* (1988) 指出活性炭在小孢子培養過程中，可吸附一些抑制胚分化或發育的有害物質，有助於胚的正常生長但不會提高胚數。但因直接施用活性炭會對小孢子產生不利的影響，因此發展出以瓊脂醣包覆活性炭的施用方法，避免活性炭直接接觸小孢子，但仍保有吸附不良物質的功能。Da Silva Dias (1999) 於青花菜、花椰菜及葡萄牙甘藍 (*B. oleracea* var. *costata*) 小孢子培養的研究指出，添加活性炭對於 3 種蔬菜的胚分化皆有明顯之提升作用。本研究中 A 組合活性炭與瓊脂醣使用之比例和 Da Silva Dias (1999) 相同 (活性炭：瓊脂醣 = 1.0 : 0.5)，但使用量增加 (2.0 g : 1.0 g vs. 1.0 g : 0.5 g)，B 組合 (2 g : 2 g) 在活性炭與瓊脂醣之施用量及比例上皆增加，C 組合 (1 g : 2 g) 則只在瓊脂醣施用量增加。本研究結果顯示，2 個栽培種以 3 種活性炭與瓊脂醣懸浮液處理之間，胚分化的表現皆無差異 (表 2)，推測 3 種處理中之活性炭與瓊脂醣施用量已能滿足小孢子培養所需，因此增加用量並未產生促進之效果。

培養液中添加之醣類種類及其濃度除提

供小孢子營養外，同時影響培養液滲透壓的改變。蔗糖是十字花科作物小孢子培養最常用的一種醣類 (Abraha *et al.* 2008)，但也有報告指出麥芽糖具有更佳的培養效果 (Cristea *et al.* 2013)。Ferrie & Keller (2007) 則以 polyethylene glycol (PEG) 代替蔗糖進行油菜小孢子培養的研究，指出滲透壓是誘導小孢子分化的最主要因素，營養需求則是胚發育後期所需。本研究中使用之 13% 蔗糖與 13% 麥芽糖雖提供相近的滲透壓，但對「金春」和「新威」甘藍的胚形成率而言，13% 蔗糖明顯較 13% 麥芽糖為佳，此結果與大多數使用蔗糖的研究相同，但與 Cristea *et al.* (2013) 所稱麥芽糖優於蔗糖的結果相左。此外，在小白菜 (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) 小孢子培養的研究中顯示，培養初期施以短期較高濃度之蔗糖 (> 13%)，而後將蔗糖濃度予以降低，更能提高小孢子培養之胚形成率 (Lionneton *et al.* 2001)。本研究中，小孢子亦以 16% 蔗糖培養 2 d 後再降至 10% 蔗糖處理，並未能提高胚分化率 (表 3)。推測蔗糖濃度與處理時間的組合仍有改進空間，但實務操作上若蔗糖濃度分為 2 階段處理，則必須增加一次離心步驟，污染的風險亦可能因此而提高。

利用高溫逆境處理誘導小孢子分化，是油菜小孢子培養成功的關鍵因子 (Lichter 1982)。Simmonds & Keller (1999) 觀察到高溫逆境會影響染色體複製分離時微管體的分布，使行使配子體分化路徑的小孢子其細胞內之營養核與生殖核，因高溫逆境的影響由原本不對稱分裂轉為對稱式分裂，從而有利於孢子體的分化。對十字花科作物小孢子的誘導分化而言，一般以 30–35°C 處理 1–3 d 後再恢復到室溫培養，可促使小孢子進入胚分化途徑 (Da Silva Dias 2001; Ferrie 2003)，但是依物種及栽培種的不同，小孢子處理最佳的溫度及處理時間仍需加以調整。表 4 結果顯示對「新威」甘藍之小孢子胚分化而言，第一階段高溫處理的影響明顯高於第二階段靜置溫度，因此未來溫度處理會選擇以微調第一階段高溫為主，可對胚分化產生較顯著的提升效果。

小孢子胚分化至子葉期階段時，培養液中之營養已不足以支應胚繼續生長與發育，此

時需將胚取出繼代到固體培養基中，以利後續之發芽。一般子葉期胚之自然發芽比例偏低，以甘藍類而言，胚發芽率在 35–70% 之間 (Babbar *et al.* 2004)。本研究結果顯示，「新威」甘藍子葉期胚的發芽率可達 91.81%，但相同條件下「金春」的發芽率卻僅 27.77% (表 5)，顯示不同栽培種其小孢子胚發芽條件存有很大的差異。對於發芽率偏低的品種，必須藉由各種處理藉以提高其發芽率。過去的研究顯示，子葉期胚利用低溫、脫水或切除子葉等處理有助提高其發芽率 (Gu *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006)。依據本研究在青花菜與花椰菜所建立之小孢子培養技術 (Hsia *et al.* 2017a, 2017b)，將「金春」子葉期胚置於乾燥濾紙上，於 4°C 脫水 1 wk 後，再將胚接種於含有不同濃度洋菜之發芽培養基中，促進甘藍發芽 (表 5)。一般而言，培養基中的洋菜濃度越高，培養基中可用之游離水分越少，因此培植體在高滲透壓培養基中亦具有脫水的效果。本研究顯示「金春」甘藍子葉期胚在含有 10–16 g L<sup>-1</sup> 濃度洋菜之培養基中，發芽率介於 3.33–20.00% 間，但各處理間在統計上的差異並不顯著，原因與各處理內的機差值過大有關 (表 6)。觀察洋菜之濃度不僅影響子葉期胚的發芽率，更影響子葉期胚的成活率，當洋菜濃度增至 16 g L<sup>-1</sup> 時，子葉期胚的成活率明顯下降，發芽率亦隨之降低。因此，如果只計算成活胚的發芽率 (發芽胚/成活胚)，則可看出以 12 g L<sup>-1</sup> 處理之 72.72% 發芽率較其他 3 處理 (33.33–42.59%) 之發芽率為高。但若以全體胚數來計算時，則發其芽率只有 20.00%，足見培養基中洋菜濃度對子葉期胚的發芽率與成活率的影響應一併考量 (表 6)。Takahashi *et al.* (2012) 以油菜 (*B. rapa*) 之子葉期胚進行發芽研究，結果顯示子葉期胚在含有 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜之培養基較 8 g L<sup>-1</sup> 有較高之發芽率，且胚於加有濾紙之 8 g L<sup>-1</sup> 洋菜培養基中亦較相同洋菜濃度但未加濾紙者為佳，顯示脫水處理有助於胚發芽。本研究與上述研究不同之處在於先將子葉期胚置於濾紙上，在 4°C 脫水 1 wk 後，再接種於不同濃度洋菜之發芽培養基，結果顯示洋菜濃度增至 16 g L<sup>-1</sup> 不僅影響成活率，也會降低發芽率 (表 6)。推測本研究中多重逆境組合 (4°C 低溫、脫水、高

滲透壓培養基) 雖有利於促進發芽，但卻不利於子葉期胚的成活與生長；而將「金春」子葉期胚直接接種於發芽培養基上於 4°C 中培養 1 wk 後，再移至 25°C 環境下培養，發芽率可提高到 94% (表 7)，顯著高於先在 4°C 置濾紙脫水組或 25°C 之對照組，顯示適當而非過度之逆境處理方有助「金春」子葉期胚的發芽。「金春」在調整逆境條件後之發芽率與「新威」(91.8%) 相近，但觀察發芽胚之後續生長有生長停滯現象，根據之前洋菜濃度試驗的觀察，推測此一現象可能與發芽培養基中洋菜濃度過高 (16 g L<sup>-1</sup>) 不利芽體的後續生長有關。遂將發芽培養基內洋菜濃度降低至 12 g L<sup>-1</sup> 合併 4°C 處理培養 1 wk，發現對「金春」之胚發芽及後續芽體生長具有改善的效果 (資料未顯示)。

小孢子培養過程中，自然產生 2N 植株比率的高低是影響 DH 生產系統效率的重要因子。由小孢子胚分化而來的植株理論上應為單倍體，但由於小孢子培養過程中染色體複製後未分開，或是細胞分裂後隔板未發育，使兩細胞融合等現象發生，導致染色體自然倍加 (Aionesei *et al.* 2005)。由於染色體自然倍加過程係自然發生，因此不同品種在小孢子培養過程中產生 DH 的機率並不相同，例如青花菜 'Marathon' 其 DH 比例達 78%，遠高於其他青花菜品種 (Farnham 1998)；但若個別品種小孢子培養產生 DH 的比例偏低，則需進行人工染色體倍加處理，例如以秋水仙素處理來提高 DH 比例。表 8 顯示「金春」小孢子分化為 DH 的比率為 53.4%；而「新威」DH 僅 12.5%，比率偏低，因此後續將進行秋水仙素處理以提高其 DH 植株比例，結果將另為文詳述之。

綜合本研究結果，針對市售共 14 個甘藍栽培種進行小孢子培養，其中 13 個栽培種有胚分化反應，胚分化率介於 0.05–15.89 個胚/皿之間，但多數栽培種之胚分化率偏低，需進一步優化培養條件。選取其中反應較佳 2 栽培種，就影響小孢子胚分化的重要因子進一步測試，包括花蕾大小 (代表小孢子發育階段)、NLN 鹽類濃度、不同醣類及其濃度，以及高溫逆境處理等。結果顯示，以取自 2.50–3.50 mm 大小之花蕾，培養在含有 13% 蔗糖之 1/2 NLN 培養液中其胚分化最佳，高溫逆境處理

則以 32°C 處理 1 d 後，再於 25°C 中培養對「新威」小孢子胚分化較佳。此外，在子葉期胚發芽方面，「新威」子葉期胚經 4°C 脫水 1 wk 後，接種於含有 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜的培養基中，發芽率可達 91.81%；相同條件下「金春」之胚發芽率僅 27.77%。經過調整後將「金春」小孢子胚接種在 16 g L<sup>-1</sup> 洋菜培養基上，置 4°C 培養 1 wk 後移至室溫培養，發芽率可提高至 94.00%。以流式細胞儀分析「金春」和「新威」DH 植株之比例，分別為 53.4% 和 12.5%，顯示不同栽培種之小孢子胚自然倍加比率差異大。本研究之結果可提高目前甘藍小孢子之培養效率，有助未來利用小孢子培養平台生產 DH，加速甘藍育種目標的達成。

## 誌謝

本研究係執行行政院農委會 107 農科-7.6.5-農-C1(1) 計畫之成果。本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助審閱，特此申謝。

## 引用文獻

- Abraha, E., M. Klíma, M. Vyvadilová, and M. Bechyně. 2008. Effectiveness of selected antimetabolic agents in microspore culture for *Brassica carinata* doubled haploid production. *Agricultura Tropica et Subtropica* 41:137–149.
- Ahmadi, B., K. Alizadeh, and J. A. Teixeira da Silva. 2012. Enhanced regeneration of haploid plantlets from microspores of *Brassica napus* L. using bleomycin, PCIB, and phytohormones. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109:525–533. doi:10.1007/s11240-012-0119-8
- Aionesei, T., A. Touraev, and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. p.11–34. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 56-Haploids in Crop Improvement II.* (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. Bhowmik. 2004. Isolated microspore culture of *Brassica*: An experimental tool for developmental studies and crop improvement. *Indian J. Biotechnol.* 3:185–202.
- Bhowmik, P., J. Dirpaul, P. Polowick, and A. M. R. Ferrie. 2011. A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106:359–362. doi:10.1007/s11240-010-9913-3
- Council of Agriculture. 2019. Agricultural statistics yearbook 2018. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx> (visit on 01/09/2019) (in Chinese)
- Cristea, T. O., P. Maria, B. Creola, and B. Marian. 2013. Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at *Brassica oleracea* L. *Romanian Biotechnol. Lett.* 18:8677–8684.
- 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 Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- Da Silva Dias, J. C. 1999. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. *Euphytica* 108:65–69. doi:10.1023/A:1003634030835
- Da Silva Dias, J. C. 2001. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. *Euphytica* 119:389–394. doi:10.1023/A:1017563915319
- 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. Hort. Sci.* 123:73–77. doi:10.21273/JASHS.123.1.73
- Ferrie, A. M. R. 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 Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- Ferrie, A. M. R. and W. A. Keller. 2007. Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the *Brassicaceae*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:348–355. doi:10.1007/s11627-007-9053-6
- 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. Organ Cult.* 104:301–309. doi:10.1007/s11240-010-9800-y
- Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed. Rev.* 25:57–88. doi:10.1002/9780470650301.ch3
- 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. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5

- García, C. C., M. Nepi, and E. Pacini. 2017. It is a matter of timing: Asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms- A review. *Protoplasma* 254:57–73. doi:10.1007/s00709-016-0950-6
- Germanà, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.* 30:839–857. doi:10.1007/s00299-011-1061-7
- Gland, A., R. Lichter, and H. Schweiger. 1988. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. *J. Plant Physiol.* 132:613–617. doi:10.1016/S0176-1617(88)80264-5
- Gu, H. H., W. J. Zhou, and P. Hagberg. 2003. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Euphytica* 134:239–245. doi:10.1023/B:EUPH.0000004945.01455.6d
- Gu, H. H., P. Hagberg, and W. J. Zhou. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regul.* 42:137–143. doi:10.1023/B:GROW.00000017488.29181.fa
- Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, Y. M. Chou, and T. K. Lin. 2017a. Studies on microspore culture of *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. *J. Agric. Res. Taiwan* 66:94–104. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06602.02
- Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, and Y. M. Chou. 2017b. Development of microspore embryogenesis and plant regeneration of *Brassica oleracea* var. *italica*. *J. Agric. Res. Taiwan* 66:184–192. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.02
- 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. doi:10.1139/g75-081
- Lichter, R. 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol.* 103:229–237. doi:10.1016/S0044-328X(81)80155-9
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:427–434. doi:10.1016/S0044-328X(82)80040-8
- Lionneton, E., W. Beuret, C. Delaitre, S. Ochatt, and M. Rancillac. 2001. Improved microspore culture and doubled-haploid plant regeneration in the brown condiment mustard (*Brassica juncea*). *Plant Cell Rep.* 20:126–130. doi:10.1007/s002990000292
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Na, H., G. Hwang, J. H. Kwak, M. K. Yoon, and C. Chun. 2011. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) according to nutritional and environmental conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 10:12535–12541. doi:10.5897/AJB10.1287
- 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. doi:10.1007/BF00390146
- 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 Press. New York, NY. 385 pp. doi:10.1201/9781420086096.ch15
- Prem, D., K. Gupta, G. Sarkar, and A. Agnihotri. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93:269–282. doi:10.1007/s11240-008-9373-1
- Shariatpanahi, M. E., U. Bal, E. Heberle-Bors, and A. Touraev. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127:519–534. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00675.x
- 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. doi:10.1007/s004250050573
- Takahashi, Y., S. Yokoi, and Y. Takahata. 2012. Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. *Plant Biotechnol. Rep.* 6:297–304. doi:10.1007/s11816-012-0224-5
- Takahata, Y., Y. Takani, and N. Kaizuma. 1993. Determination of microspore population to obtain high frequency embryogenesis in broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Plant Tissue Cult. Lett.* 10:49–53.
- Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzuchtg* 74:77–81.
- Touraev, A., O. Vicente, and E. Heberle-Bors. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* 2:297–302. doi:10.1016/S1360-1385(97)89951-7
- Zhang, G. Q., D. Q. Zhang, G. X. Tang, Y. He, and W. J. Zhou. 2006. Plant development from microspore-derived embryos in oilseed rape as affected by chilling, desiccation and cotyledon excision. *Biol. Plant.* 50:180–186. doi:10.1007/s10535-006-0004-6

# Optimization of Affecting Factors on Microspore Culture in Cabbage

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

## Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, T. K. Lin, and M. K. Chi. 2020. Optimization of affecting factors on microspore culture in cabbage. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(3):227–240.

Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) is the most important leafy vegetable in Taiwan. In order to shorten breeding process of F<sub>1</sub> cabbage, an optimized protocol on microspore culture to produce doubled-haploid (DH) lines has been established in this study. Microspores derived from bud with size of 2.50–3.50 mm or 3.51–4.50 mm were compared. Results showed that the smaller-sized buds had either better than or equal to that of the larger-sized buds on embryogenesis among 14 screened cultivars. The results also showed that 13 out of 14 cultivars responded to embryogenesis induction. Moreover, among them ‘Jin Chuen’ and ‘Shin Wei’ had the highest microspore embryogenesis with 15.89 embryos/petridish and 10.17 embryos/petridish, respectively. An experiment testing 1/2 or full strength NLN salt medium in combination with active charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis was conducted using cv. ‘Jin Chuen’ and ‘Shin Wei’. The results showed that 1/2 NLN was superior to full strength NLN [Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter (1981)] on microspore embryogenesis in both cultivars. However, no significant effect of charcoal-agarose suspension on microspore embryogenesis was shown. Types of carbohydrate and its concentration in the microspore medium were tested on microspore embryogenesis including either using 13% sucrose or 13% maltose for 4-wk culture interval, or using 16% sucrose for 2 d culturing before changing to 10% sucrose culturing for the rest of time on embryogenesis. The highest embryogenesis rate was found by using 13% sucrose for all culture interval on both cultivars. Two stages temperature treatments on microspore embryogenesis were also investigated by culturing microspores in the first stage at either 32°C or 35°C for 1 d followed by culturing either at 22°C or 25°C for 2 wk. The results showed that only the high temperature in the first stage had significant effect on embryogenesis and the highest embryogenesis was observed by 1 d culturing at 32°C following at 25°C for the rest culturing time. A high embryo germination rate of 91.81% was obtained from ‘Shin Wei’ by desiccating cotyledon stage embryos on a filter paper at 4°C for 1 wk before subculturing onto the B5 medium containing 16% agar (B5A-16) for germination. However, a low germination rate of 27.77% was obtained from ‘Jin Chuen’ by using the same treatment and no improvement on the germination rate was found by increasing agar concentration in the germination medium from 10% to 16%. An improved high germination rate up to 94.00% was obtained on ‘Jin Chuen’ by directly culturing embryos on the B5A-16 medium without filter paper desiccation at 4°C for 1 wk before moving to 25°C. Ploidy levels of microspore derived plants were analyzed using flow cytometry and DH rates of 53.4% and 12.5% were obtained for ‘Jin Chuen’ and ‘Shin Wei’, respectively.

**Key words:** *Brassica oleracea*. var. *capitata*, Microspore embryogenesis, Doubled haploid.

---

Received: February 14, 2020; Accepted: June 30, 2020.

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

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

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

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

<sup>4</sup> Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

<sup>5</sup> Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.