

花椰菜雙單倍體誘變平台建立

夏奇鈺¹ 陳威臣² 許秀惠³ 林楨祐⁴ 曹進義⁵ 林子凱^{6,*}

摘要

夏奇鈺、陳威臣、許秀惠、林楨祐、曹進義、林子凱。2021。花椰菜雙單倍體誘變平台建立。台灣農業研究 70(3):182–195。

本研究採用雙單倍體 (doubled haploid; DH) 作為小孢子供體，於小孢子培養過程中施以誘變處理，建立花椰菜雙單倍體誘變平台。誘變處理包括以紫外光 (ultraviolet; UV) 處理 4 個不同結球天數花椰菜 DH 品系之小孢子，DH 品系源自「慶農 S-65」小孢子培養；以及利用 ethyl methanesulphonate (EMS) 處理上述 UV 試驗所得之小孢子胚，並將上述兩誘變處理所得 DH 植株種植於田間，觀察誘變株發育階段的變化。此外，又以 EMS 處理「慶農 S-65」花蕾並取其內小孢子進行培養，比較不同濃度處理對小孢子胚分化之影響。誘變結果顯示，以 UV 處理小孢子 10 s 及 20 s，4 個 DH 品系之胚分化率為其對照組的 23.9–65.1%，但 2 種光照時間處理的差異不顯著。接續觀察經 UV 處理之小孢子胚發芽率，結果顯示有不同程度之下降，為其對照組之 50.9–78.8%。DH32 之小孢子經 UV 處理後長出之胚，接續以 0.125–0.500% EMS 震盪處理 10 min，小孢子胚之發芽率降為對照組的 36.4–56.8%，但 3 個 EMS 濃度處理間差異不顯著。取「慶農 S-65」花蕾以 0.025–0.100% EMS 以靜置浸泡或添加 Tween 20 加震盪方式處理 5 min 或 10 min，結果顯示 2 種處理時間之胚分化率皆以 0.025% EMS 為最高。但採用震盪處理時，胚分化率會因處理濃度或時間延長而明顯下降。將 4 個不同結球天數 DH 品系單誘變小孢子 (UV 處理) 及利用雙誘變 (UV 處理小孢子 + EMS 處理小孢子胚) 所得之 DH 誘變株與其對照植株定植田間，於栽培 84 d 後調查 DH 誘變株之發育階段並比較與對照組之差異。綜合而言，誘變株發育階段之改變以提前發育比例較延後者為高，可作為未來預測誘變方向之參考。本誘變平台以 DH 品系為供體於小孢子培養過程中進行誘變處理獲得 DH 誘變株，除可縮短誘變育種時間並提高選拔效率外，DH 具有高度一致性之特性則有助於突變體之辨識。

關鍵詞：花椰菜、小孢子培養、雙單倍體、單倍體誘變。

前言

花椰菜原產歐洲地中海沿岸地區，喜冷涼乾燥之氣候，在台灣的種植面積約 3,055 ha，年產量 68,515 Mg，產值超過新台幣 19 億元，是台灣重要的蔬菜作物 (Council of Agriculture 2019)。成功的育種取決於豐富的遺傳多樣性及有效的篩選方法，傳統育種一般藉由引

入新的遺傳組合來達到創造變異的目的。但許多作物在人類長期選種下，遺傳多樣性已大量流失，加上原生地的快速消失，多樣性種原的取得變得愈來愈困難。如何持續創造新的變異用以迎戰氣候變遷的挑戰，成為育種者必須嚴肅面對的問題。利用人為處理誘發植物遺傳物質如染色體、DNA 產生改變，稱之為人工誘變，其發生比例較自然產生之突變高出許

投稿日期：2020 年 11 月 26 日；接受日期：2021 年 3 月 26 日。

* 通訊作者：kai@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 農委會農業試驗所鳳山園藝試驗分所植物保護系研究員兼系主任。台灣 高雄市。

⁴ 農委會農業試驗所鳳山園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。

⁵ 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。

⁶ 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。

多，育種者利用人工誘變產生突變體，進而利用這些突變種原促進遺傳基因重組、擴大遺傳變異、創造新種質，作為新品種育成的捷徑 (Predieri 2001)。人工誘變一般可分為物理法及化學藥劑誘變，物理誘變是利用各種輻射能量的傳遞來加速突變率，電磁輻射如 X 射線、 γ 射線、紫外線，粒子輻射如 α 射線、 β 射線及離子束等 (Broertjes & van Harten 2013)。化學誘變劑常用的有烷化劑，如甲基磺酸甲酯 (methyl methanesulfonate; MMS)、甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulphonate; EMS)、硫酸二甲酯 (dimethyl sulfate; DMS) 2-環氧丙烷、乙炔亞胺 (ethyleneimine; EI)，核酸鹼基類似物則有 5-溴尿嘧啶 (5-bromouracil; 5-BU)、5-氟尿嘧啶、5-溴脫氧尿嘧啶核苷，以及其他如疊氮化鈉 (NaN_3) 與抗生素等 (Pathirana 2011)。人工誘變雖可提高突變率，但突變株的選拔需要經過一定之代數。若以種子 (M_0) 進行誘變，栽培至性狀選拔階段後選出突變株 (M_1)，此時通常只有少數顯性突變可被選出，大多數的隱性突變必須種至 M_2 方能進行篩選，對於一些數量遺傳控制的性狀，更要等到 M_3 才能穩定選拔，並於 M_4 加以確認。此外，若突變發生的頻率很低，則必須提高誘變族群之數量，才有機會篩選到所需之性狀 (Szarejko & Forster 2007)。綜上，若能在相同突變率下減少誘變族群所需之數量，並將篩選世代提早，將有機會提升傳統誘變系統之效率。

由配子體分化而來的植株，其染色體數是孢子體的一半，也就是所謂的單倍體，其染色體經過自然或人為倍加後成為雙單倍體 (doubled haploid; DH)。DH 的等位基因具同質性，可直接成為自交作物的純系，或作為異交作物生產 F_1 所需之親本。DH 不僅可縮短育種年限，並能提高選拔效率，對遺傳研究及育種工作的進行大有助益 (Szarejko & Forster 2007)。DH 可藉由組織培養技術培養配子體，如花藥、小孢子、子房或胚珠而得之 (Germanà 2011)。藝苔屬 (*Brassica*) 植物的小孢子培養始於油菜 (Lichter 1982)，因小孢子培養效率較花藥培養為高，遂成為十字花科作物生產 DH 的主要途徑。DH 亦可作為誘導 (inducing)

及固定 (fixing) 突變的一個快速捷徑，因為隱性基因突變在 M_1 即得以選拔，除加速突變體的獲得外，選拔的效率亦可提高 (Gik-Humanes & Barro 2009)。綜上所述，利用人工誘變結合小孢子培養生產突變體的 DH 品系，當突變的性狀為隱性遺傳時可提早於 M_1 世代進行選拔之外，且 M_1 同質突變體 (DH) 一對基因之分離比為 1:1，一般 M_2 突變體之基因分離比為 3:1。在突變率相同情況下， M_1 世代之 DH 選拔族群的規模可大幅縮小，在育種時間及投入成本上皆能因此有效縮減 (Forster & Thomas 2005)。

國內過去鮮少有利用單倍體生產系統結合誘變之研究，本研究擬藉由已建立之花椰菜小孢子培養系統及穩定的 DH 品系作為供體親 (Hsia *et al.* 2017a)，於小孢子培養過程中進行誘變處理，建立花椰菜雙單倍體誘變平台。除測試各種人工誘變處理所需之條件外，並將 DH 誘變株種植於田間進行初步觀察，作為未來改進雙單倍體誘變平台之基礎。

材料與方法

試驗材料

將「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養而來之 DH 品系，於 2017–2018 年間種植於農業試驗所田間，連續調查 2 年之結球天數，從中選出 4 個結球期不同之 DH 品系，編號分別為 32、102、157 和 165，4 個 DH 品系其定植至花球採收所需日數如表 1 所示。取上述 4 個 DH 品系之自交種子與「慶農 S-65」 F_1 種子播種於培養皿，發芽後移植至 60 格穴盤中培養。4 wk 後將小苗定植至 5 吋硬盆，於行政院農業委員會農業試驗所溫室中培養至開花。花椰菜於 5 吋硬盆生長期間，每週施用 1 次 1 g L^{-1} Peters (N : P_2O_5 : K_2O = 20 : 20 : 20) 液肥，抽苔後每週改施 1 g L^{-1} 花寶三號 (N : P_2O_5 : K_2O = 10 : 30 : 20) 液肥。植株花球發育後，將植株移入日溫/夜溫為 $20^\circ\text{C}/15^\circ\text{C}$ 、光照強度為 $98.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，光照時間為 14 h 的生長箱中培養，植株開花後選擇適當發育階段之小花蕾進行誘變。

表 1. 源自「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養之 4 個 DH 品系於田間種植 2 年之定植至花球採收所需日數。

Table 1. Head mature days of four DH lines derived from microspore culture of 'Chinglong S-65' cultivated in field for consecutive two years².

DH line	Year of 2017 head mature days	Year of 2018 head mature days	Mean head mature days
165	61	58	59.5 ± 2.1
102	71	68	69.5 ± 2.1
32	81	84	82.5 ± 2.1
157	89	90	89.5 ± 0.7

² Days from seed sowing to field planting are about 30 d. DH: doubled haploid.

試驗方法

以不同結球天數 DH 品系之小孢子進行 UV 誘變

取花椰菜 DH32、102、157 和 165 品系大小約 3–4 mm 之花蕾進行小孢子培養。小孢子分離及培養過程參照 Hsia *et al.* (2017a)，以 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) 添加 13% 蔗糖 (簡稱 1/2NLN-13) 培養液將小孢子懸浮液濃度調整為 4×10^5 小孢子 mL^{-1} ，將 10 mL 小孢子懸浮液加入直徑 9 cm 塑膠培養皿中，使液面高度為 1.57 mm。使用 40 瓦 UV 燈管 (253.7 nm, G40T10, Sankyo Denki Co., Ueda, Japan)，燈管至培養皿之高度距離為 54.5 cm，對小孢子分別進行 10 s 及 20 s 之 UV 光照處理，每處理 3 重複，每重複 2–5 皿。UV 處理方式為先將 UV 燈打開，將裝有小孢子懸浮液之培養皿置於固定位置後，開始 UV 光照並計時。UV 處理完成後添加 1/2 NLN-13 培養液於培養皿中，並調整懸浮液濃度為 4×10^4 小孢子 mL^{-1} 。將上述小孢子懸浮液分裝至直徑 6 cm 塑膠培養皿中，每皿加入 5 mL 小孢子懸浮液，培養 6 wk 後記錄小孢子胚分化之情形。

雙誘變處理

以上一試驗中 DH32 經 UV 光照 10 s 處理

所分化之子葉期胚 (約 1 cm 長)，將胚分別置入含有 0.125%、0.250% 和 0.500% (v/v) EMS 溶液與無菌水中，以水平迴轉式震盪器 80 rpm 震盪處理 10 min，之後將液體移除，並以培養液清洗胚共 3 次。接著，參照 Hsia *et al.* (2017b) 方法進行胚培養，於 4 wk 後記錄胚發芽情形。本試驗共 5 重複，每一重複為 10 個胚。

以 EMS 處理小花蕾後進行小孢子培養

試驗 A：採「慶農 S-65」花椰菜大小為 3–4 mm 之花蕾作為供試材料，每處理取 48 朵花蕾，將花蕾放入無菌水 (對照組) 或含有濃度 0.025%、0.050%、0.100% EMS 溶液中。置於室溫中浸泡 5 min 或 10 min 後，將液體移除，並以去離子水清洗 1 次。經 EMS 處理後之花蕾依照 Hsia *et al.* (2017a) 方法進行小孢子分離及培養，並於培養 6 wk 後記錄胚數。

試驗 B：每處理使用 45 朵之花蕾，處理方式同上之試驗 A，但於 EMS 溶液中添加 20 μL Tween 20，並以 80 rpm 進行震盪處理。

不同結球天數 DH 株系之小孢子經 UV 處理後獲得之 DH 誘變株於田間種植觀察

取參試 DH 品系經 UV 誘變處理獲得之小苗進行流式細胞儀檢測，將檢測為 2N 之發根瓶苗，出瓶種植於 3 吋黑色塑膠軟盆中於農業試驗所溫室中栽培。出瓶第一週進行保濕及遮陰處理，之後管理如一般種苗。出瓶苗經 1 個月馴化培養後，移入有頂之塑膠網室繼續培養 1 個月後，於 2019 年 11 月 8 日定植於農業試驗所網室。經於田間種植 84 d 後，調查植株之發育階段，並計算各發育階段 DH 誘變株之占比。

經 UV 與 EMS 處理雙重誘變之 DH 株種植田間進行發育觀察

DH32 品系之小孢子經 UV 處理後長出之胚再以 EMS 溶液處理，發芽小苗及出瓶馴化過程與上一試驗相同。誘變株於田間種植 84 d 後，調查植株之發育階段，並計算各發育階段 DH 誘變株之占比。

試驗設計和統計分析

本研究採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得若為比例資料則先經角度轉換後再進行分析，經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

以不同結球天數 DH 品系之小孢子進行 UV 誘變

本研究使用自「慶農 S-65」花椰菜小孢子培養而來之 4 個 DH 品系，4 個 DH 品系具有不同之結球天數，其中以 DH165 結球天數最短為 59.5 d，而以 DH157 最長為 89.5 d (表 1)。4 個 DH 品系之小孢子胚分化能力具差異性 (表 2)，未進行誘變處理之對照組以 DH32 每皿可獲得 105.2 個胚最高，DH102 的 48.7 胚/皿以及 DH165 的 34.5 胚/皿其次，而以 DH157 的 11.9 胚/皿最低。4 個 DH 品系之小孢子經 UV 誘變處理後，胚分化率與對照組相比皆顯著降

低，UV 處理 10 s 時各 DH 品系胚分化率降至對照組的 45.0–65.1%，其中以 DH32 之 65.1% 胚分化率最高；在 UV 光照處理 20 s 後，4 個 DH 品系之胚分化率下降至對照組的 23.9–60.7%，仍以 DH32 之 60.7% 為最高 (圖 1)，而以 DH157 的 23.9% 最低。比較同一品系內經 UV 光照 10 s 或 20 s 對小孢子胚分化率的影響差異並不顯著，其中胚分化率較高之 DH32 與 DH102 呈現的差異較小，分別為 4.4% 與 1.7%；而胚分化率較低之 DH165 及 DH157 在延長 UV 處理時間後，呈現出較大之差異，分別為 15.9% 與 23.9%。觀察 UV 處理後之小孢子胚，其發芽率僅為對照組之 72.9–83.5%，但同一 DH 品系經 10 s 或 20 s 之 UV 處理後之胚發芽率則差異不明顯，在 2.0–5.0% 之間，相對而言，延長 UV 處理時間對胚分化的影響大於對胚發芽的影響。

雙誘變處理

取上述試驗中 DH32 經 UV 10 s 處理後形成之子葉期胚 (長度約 1 cm)，將胚分別置入含有 0.125、0.250 及 0.500% EMS 溶液中震盪處理 10 min。將胚取出以無菌水洗淨後培養於發芽培養基，經 4 wk 培養後調查胚發芽率，EMS 濃度由低至高之胚發芽率依序為 53、44

表 2. UV 光照處理時間對 4 個 DH 品系小孢子胚分化之影響。

Table 2. Effect of UV exposure time on microspore embryogenesis of four DH lines^z.

DH line	UV duration (s)	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
165	0	34.5 ± 12.4 a ^y (100.0)	75.4 (100.0)
	10	18.7 ± 6.0 b (54.2)	62.3 (82.6)
	20	13.2 ± 4.3 b (38.3)	60.8 (80.6)
102	0	48.7 ± 6.5 a ^y (100.0)	64.8 (100.0)
	10	21.9 ± 2.3 b (45.0)	54.1 (83.5)
	20	21.1 ± 0.9 b (43.3)	50.9 (78.5)
32	0	105.2 ± 11.6 a ^y (100.0)	99.0 (100.0)
	10	68.5 ± 11.4 b (65.1)	78.8 (79.6)
	20	63.9 ± 4.9 b (60.7)	76.3 (77.1)
157	0	11.9 ± 4.2 a ^y (100.0)	75.9 (100.0)
	10	5.4 ± 1.0 b (47.8)	59.3 (78.1)
	20	2.7 ± 0.4 b (23.9)	55.3 (72.9)

^z Four DH lines were derived from microspore culture of 'Chinglong S-65'. DH: doubled haploid; UV: ultraviolet.

^y Means with different letters in the same DH line are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

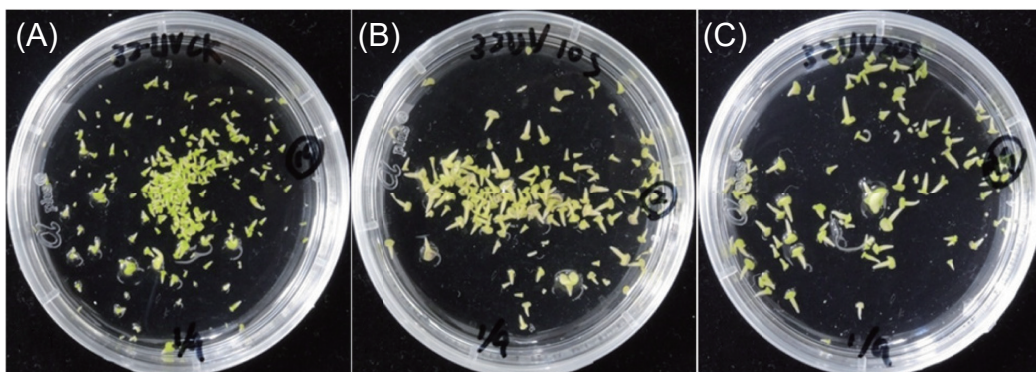


圖 1. 花椰菜 DH32 小孢子經 UV 照射 (A) 0 s、(B) 10 s、(C) 20 s 後，經 4 wk 培養後之胚分化情形。

Fig. 1. Microspore embryogenesis of DH32 derived from UV exposure for (A) 0 s, (B) 10 s and (C) 20 s after 4 wk of culturing.

及 34%，顯著低於對照組的 93.3%。顯示 EMS 濃度處理顯著影響胚發芽率，但不同 EMS 濃度處理間差異不顯著。然而，觀察 EMS 濃度提高後，芽體後續的生長狀況，明顯受到抑制 (表 3、圖 2)。

以 EMS 處理小花蕾後進行小孢子培養

靜置處理

取「慶農 S-65」花椰菜 3–4 mm 之小花蕾以不同濃度 EMS 靜置處理不同時間，將花蕾清洗後取其內之小孢子進行培養，各處理小孢子之胚分化率及其胚發芽率如表 4 所示。結果

表 3. 雙誘變處理之 EMS 濃度對花椰菜 DH32 子葉期胚發芽之影響。

Table 3. Effect of EMS concentrations on germination of microspore embryos derived from UV 10 s treated microspores of DH32².

EMS (v/v) (%)	No. of treated embryos	Embryo germination (%)	Relative germination (%)
0	30	93.3 ± 5.8 a ³	100.0
0.125	50	53.0 ± 17.9 b	56.8
0.250	50	44.0 ± 27.9 b	47.2
0.500	50	34.0 ± 11.4 b	36.4

² Microspore embryos were derived from UV 10 s treatment before using in the ethyl methanesulphonate (EMS) treatment.

³ Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test at 5%, respectively.

顯示，EMS 濃度與靜置處理時間兩因子對胚分化均有顯著影響，其中又以濃度的影響較顯著 ($P < 0.001$)，但 EMS 濃度和處理時間的交感效應並不顯著。胚分化率以對照組平均每皿 6.4 個胚最高，處理組中以 0.025% EMS 處理 5 min 具最高之胚分化率，隨處理濃度增加或處理時間延長，抑制小孢子胚的分化越明顯。觀察小孢子胚後續之發芽情形，以對照組具 89.2% 發芽率最高，隨著 EMS 處理濃度增加，胚發芽率有下降之趨勢。

震盪處理

本試驗與上述試驗使用相同 EMS 濃度與處理時間，但於 EMS 培養液中添加 Tween 20 並以震盪方式 (80 rpm) 進行處理，結果顯示如表 5。EMS 濃度與震盪處理時間兩因子對胚分化皆具有顯著之影響，其中以濃度的影響更為顯著 ($P < 0.001$)，濃度與處理時間的交感作用並不顯著。胚分化率以對照組平均每皿 19.7 個胚最高，0.025% EMS 處理組以 5 min 較 10 min 震盪處理具有較高之胚分化率，胚分化率會隨著 EMS 處理濃度增加而下降，0.05% 及 0.10% 濃度處理之胚分化率顯著減少。持續觀察小孢子胚後續的發芽情形，結果亦以對照組之 79.0% 為最高，0.025% EMS 處理 5 min 組其次，處理時間增至 10 min 時胚發芽率下降，其中 0.100% EMS 處理 5 min 組僅獲得 1 個胚，且未能順利發芽。

綜合靜置與添加 Tween 20 加震盪處理之

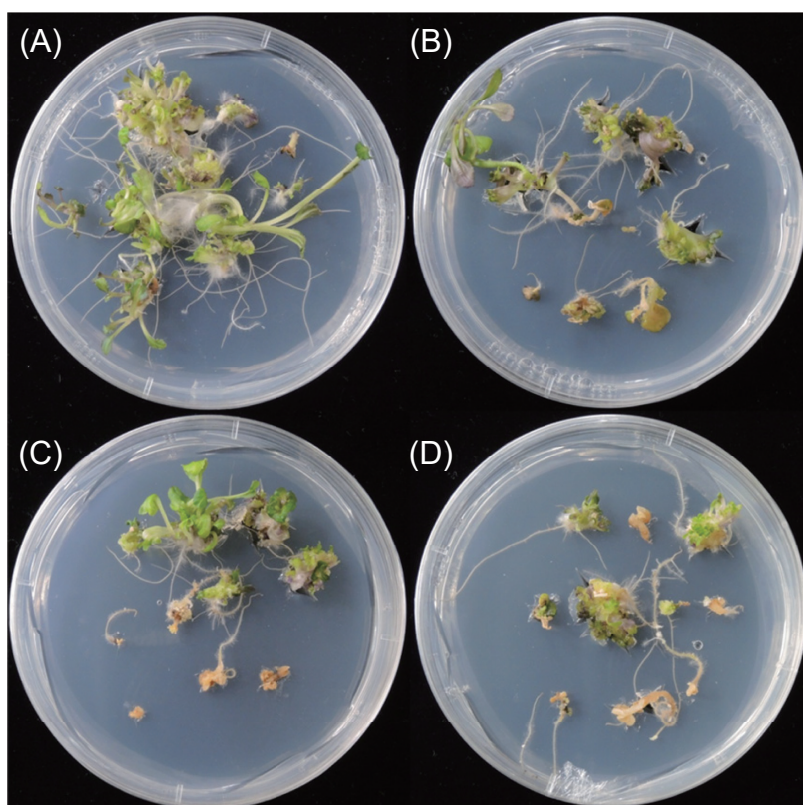


圖 2. 花椰菜 DH32 小孢子胚分別以濃度 (A) 0%、(B) 0.125%、(C) 0.250%、(D) 0.500% EMS 處理 10 min 後，經 4 wk 培養後之發芽情形。

Fig. 2. Germination of microspore embryos of DH32 after 4 wk of culturing. Microspore embryos were derived from (A) 0%, (B) 0.125%, (C) 0.250% and (D) 0.500% ethyl methanesulphonate (EMS) for 10 min.

表 4. 花椰菜「慶農 S-65」花蕾以 EMS 靜置浸泡不同時間對小孢子胚分化之影響。

Table 4. Effect of EMS soaking flower buds for various time without shaking on microspore embryogenesis of cauliflower 'Chinglong S-65'^z.

EMS (v/v) (%)	Duration (min)	Total embryos	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
0	5	83	6.4 ± 2.1 a ^y (100.0)	89.2 (100.0)
0.025	5	42	3.8 ± 1.7 b (59.4)	61.9 (69.4)
	10	32	2.7 ± 1.4 bc (42.2)	53.1 (59.5)
0.050	5	24	1.6 ± 1.2 cd (25.0)	41.7 (46.7)
	10	10	0.9 ± 0.8 d (14.1)	50.0 (56.1)
0.100	5	27	1.1 ± 1.2 d (17.2)	37.3 (41.8)
	10	16	0.8 ± 1.1 d (12.5)	37.5 (42.0)
Concentration			***	
Times			*	
Concentration × times			ns	

^z A total of 48 flower buds were used in each treatment. Microspore culture medium was 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) with 4×10^4 microspores per mL. EMS: ethyl methanesulphonate.

^y Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test. ns: non-significant; * and ***, significant at 5% and 0.1%, respectively.

表 5. 花椰菜「慶農 S-65」花蕾以添加 Tween 20 之 EMS 振盪處理不同時間對小孢子胚分化情形。

Table 5. Effect of flower buds soaking in EMS solution with Tween-20 for various shaking time on microspore embryogenesis of 'Chinglong S-65'^z.

EMS (v/v) (%)	Duration (min)	Total embryos	Embryos/petridish (relative %)	Germination (relative %)
0	5	138	19.7 ± 3.7 a ^y (100.0)	79.0 (100.0)
0.025	5	84	9.3 ± 4.5 b (47.2)	72.6 (91.9)
	10	10	3.3 ± 3.1 c (16.8)	50.0 (63.3)
0.050	5	0	0.0 ± 0.0 c (0.0)	0.0 (0.0)
	10	0	0.0 ± 0.0 c (0.0)	0.0 (0.0)
0.100	5	1	0.2 ± 0.4 c (1.0)	0.0 (0.0)
	10	-	-	-
Concentration			***	
Times			*	
Concentration × Times		ns		

^z A total of 48 flower buds were used in each treatment. Microspore culture medium was 1/2 NLN (Nitsch & Nitsch medium modified by Lichter) with 4×10^4 microspores per mL. EMS: ethyl methanesulphonate.

^y Means with different letters in the same column are significantly different by least significant difference (LSD) test. ns: non-significant; * and *** significant at 5% and 0.1%, respectively.

結果，顯示 2 種處理方式皆以 0.025% EMS 有較高之胚分化率，但採用添加 Tween 20 加震盪處理時，胚分化率會因處理濃度或時間延長而明顯下降。

以 UV 處理 4 個 DH 品系小孢子獲得之 DH 誘變株於田間之發育表現

將 UV 處理 4 個 DH 品系之小孢子所獲得之 DH 植株，於田間種植 84 d 後進行調查，記錄誘變株發育階段之占比 (表 6、圖 3)。4 個 DH 品系定植至花球採收所需日數如表 1 所示，其中結球天數最久之 DH165 (59.5 d)，在定植 84 d 後，對照組 100% 皆已開花，但 UV 10 s 處理組仍有 1 株誘變株尚為結球階段 (3.8%)，發育時期明顯延後。DH102 之結球天數約 70 d，於定植 84 d 後，對照組 100% 處於抽苔及開花之生殖階段，但 UV 10 s 及 UV 20 s 處理組分別仍有 11.3% (1.4% + 9.9%) 與 2.8% 誘變株尚處於結球階段。DH32 結球天數為 80 d，於定植後 84 d，對照組 100% 之發育階段皆為結球前期 (球緊實)，但 UV 10 s 及 UV 20 s 處理誘變株之發育階段明顯提前，分別有 79.1% 與 73.7% 已達抽苔及開花期。DH157 之結球天數為 89.5 d，於定植 84 d 後，對照組之發育階段亦 100% 處於結球前期，但 UV 10 s 及

UV 20 s 處理誘變株發育階段亦明顯提前，分別有 53.6% 與 63.6% 誘變株已達結球晚期 (球鬆散)，更分別有 21.4% 與 36.4% 已處於花序抽出之抽苔期 (生殖階段)。綜觀 4 個不同結球天數之 DH 品系，其誘變株發育階段的表現比率與對照組相較，有不同比例之提前或延後發育表現，但整體以提前發育較延後之比例為高。

經 UV 與 EMS 雙重誘變獲得之 DH 植株於田間種植之發育表現

以 DH32 品系之小孢子經 UV 處理後長出之子葉期胚，再以 EMS 溶液進行誘變處理，所獲得之誘變株於田間種植 84 d 後調查其發育階段，並計算各誘變株發育階段之占比，結果如表 7 所示。DH32 之結球天數為 80 d，於定植 84 d 後其發育階段應為結球期，單誘變對照組 (僅 UV 處理) 顯示以生殖階段占比最高 (83.4%)，少數為結球晚期 (16.7%)。雙誘變 (UV + EMS) 發育時期於生殖階段之比例為 88.3–100.0%，皆高於單誘變 (UV) 對照組之 83.4%。因生殖階段與結球晚期為連續相鄰之生理時期，較難認定其為處理差異，但 0.125% EMS 處理有 7.1% 不正常植株，可作為誘變效果的間接證明。

表 6. 不同結球天數之 4 個 DH 株系其小孢子以 UV 照射後所獲得 DH 誘變株於田間種植 84 d 後之發育階段調查。

Table 6. Developmental stages of mutants derived from UV treated microspores of four DH lines after 84 d growing in the field².

DH line	Plants derived from	No. of plants	Developmental stage %				
			Heading		Reproduction ^y	Abnormal	Dead
			Early	Late			
165	CK	2	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	UV-10 s	26	0.0	3.8	96.2	0.0	0.0
	UV-20 s	27	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
102	CK	6	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
	UV-10 s	71	1.4	9.9	88.7	0.0	0.0
	UV-20 s	36	0.0	2.8	91.7	2.8	2.8
32	CK	2	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	UV-10 s	43	2.3	14.0	79.1	0.0	4.7
	UV-20 s	57	5.3	19.3	73.7	0.0	1.8
157	CK	4	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	UV-10 s	28	21.4	53.6	21.4	3.6	0.0
	UV-20 s	22	0.0	63.6	36.4	0.0	0.0

² Four DH lines were derived from microspore culture of 'Chinglong S-65'. DH: doubled haploid; UV: ultraviolet. CK: control check.

^y Reproductive stage includes bolting and flowering stages.

討論

UV 誘變對胚分化的影響

利用單倍體相較以 2 倍體進行誘變具有許多優點，如選拔世代可提前、有利於隱性基因的選拔以及毋須自交純化等 (Kott 1995; Szarejko & Forster 2007)。單倍體誘變進行之方式可分為兩種，一是以種子 (M0) 進行誘變，以誘變株 (M1) 所開之花進行小孢子培養獲得 DH；二是直接以配子體之組織如花序、花蕾或配子體本身如小孢子來進行誘變處理。兩法皆可直接獲得同質之 M2 世代 (DH)，可節省大量育種資源，但前提是必須對供體親的小孢子胚分化表現有所瞭解，才能對誘變結果有正確之預估。從這個角度來看，本次研究選用的 4 個 DH 品系，其小孢子胚分化率較高的有 DH32 與 DH102，每皿 (含 4×10^5 個小孢子) 有近 50 個或以上之胚分化，是進行誘變較佳之材料，而 DH157 與 DH165 的胚分化率較低 (11.9–34.5 個胚/皿)。若想要獲得與 DH32 相同數量之誘變個體，則須增大其誘變的規模 (表 6)。本研究在試驗規劃時，選擇以 DH 品系作

為供體親利用其小孢子作為誘變材料，著眼點在於同一 DH 品系內之個體具高度一致性，並以結球天數作為選擇 DH 的標準，但未考慮不同 DH 品系間小孢子胚分化率的差異。因此，建議未來此類型之研究，宜先篩選小孢子胚分化率較高之 DH 品系作為雙單倍誘變平台之材料。

本研究中使用了物理及化學兩種誘變方法，物理方法因毋需接觸培植體，對於必須保持無菌狀態的組織培養系統是相對理想之誘變方法。物理誘變中以 UV 光設備相對其他種類之放射線較易取得，但 UV 光的穿透性相較其他放射光線為差。因此，一般適用於單層而非多層細胞之組織，而屬於單細胞階段的小孢子，正好符合此項要求。Barro *et al.* (2003) 以衣索比亞芥菜 (Ethiopian mustard, *Brassica carinata* Braun) 小孢子進行 UV 誘變，指出培養皿中的培養液高度會影響小孢子後續的分裂性，原因即與 UV 穿透性有關。本研究中誘變所用之小孢子懸浮液高度為 1.57 mm，是經測試可克服懸浮液表面張力之最小液體量，同時符合 Barro *et al.* (2003) 指出液面高度不超過

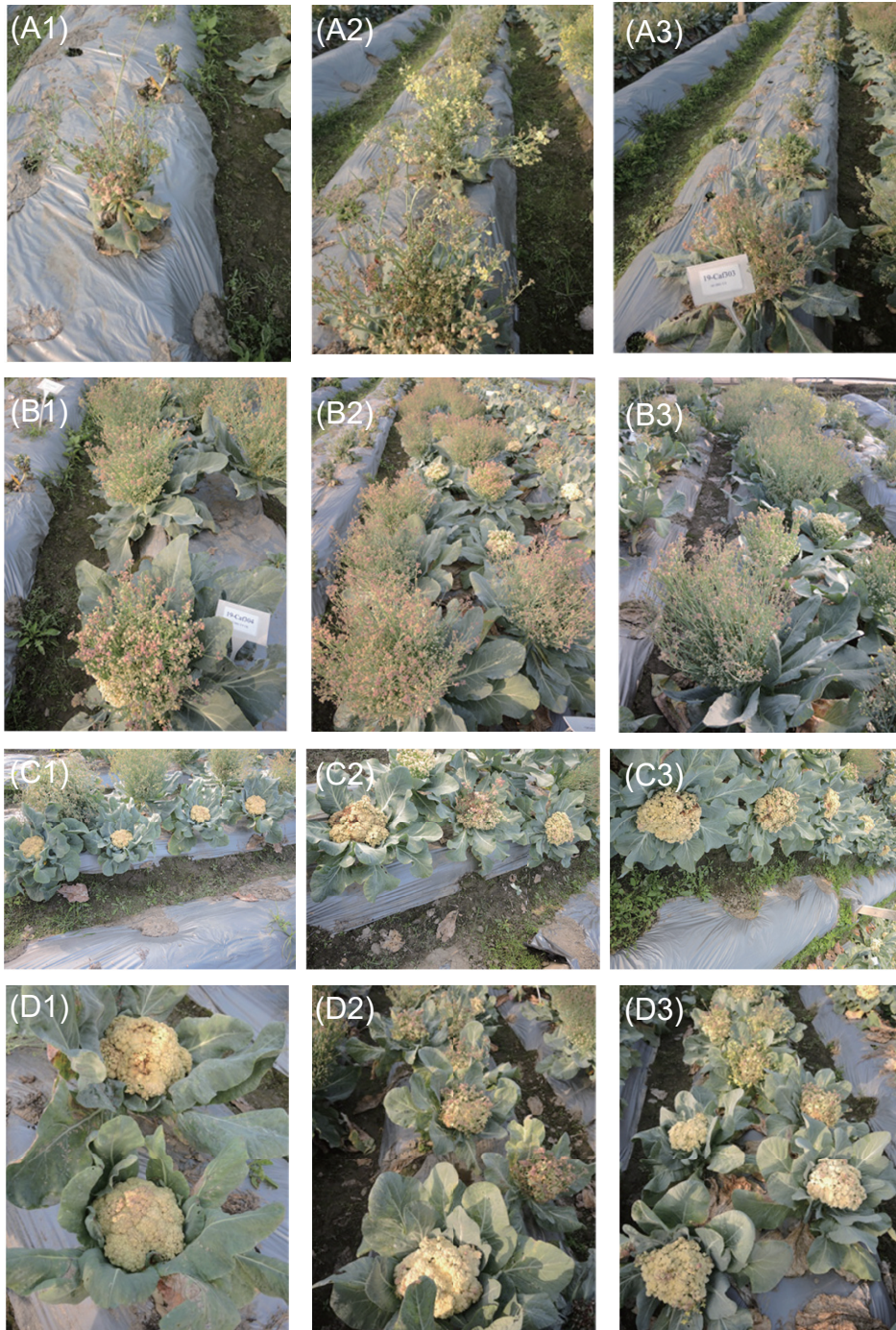


圖 3. 源自 4 個不同結球天數 DH 株系之小孢子經 UV 處理後所得之雙單倍體誘變株於田間種植 84 d 後之生長情形。(A1–A3) DH165; (B1–B3) DH102; (C1–C3) DH32; (D1–D3) DH157。UV 處理時間 (A1, B1, C1, D1) 0 s; (A2, B2, C2, D2) 10 s; (A3, B3, C3, D3) 20 s。

Fig. 3. Growth of mutants derived from ultraviolet (UV) exposure for (A1, B1, C1, D1) 0 s; (A2, B2, C2, D2) 10 s; and (A3, B3, C3, D3) 20 s. Mutants were derived from (A1–A3) DH165; (B1–B3) DH102; (C1–C3) DH32; and (D1–D3) DH157.

表 7. 經雙誘變之 DH 誘變株於田間生長發育之情形。雙誘變 DH 植株源自花椰菜 DH32 之小孢子經 UV 處理後分化之小孢子胚再施以 EMS 處理。

Table 7. Developmental stages of double mutated plants after 84 d growing in the field. Mutation plants were derived from EMS treated microspore embryos which were derived from UV treated microspores of DH32^z.

Plants derived from EMS (%)	No. of plants	Developing stage %				
		Heading		Reproductive ^y	Abnormal	Dead
		Early	Late			
0	6	0.0	16.7	83.4	0.0	0.0
0.125	14	0.0	0.0	92.8	7.1	0.0
0.250	17	0.0	11.8	88.3	0.0	0.0
0.500	5	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0

^z DH: doubled haploid; UV: ultraviolet; EMS: ethyl methanesulphonate.

^y Reproductive stage includes boltine and flowering stages.

2 mm 之建議。MacDonald *et al.* (1991) 以油菜 (*Brassica napus*) 小孢子進行 UV、Gamma 及 X 射線誘變，結果顯示 Gamma 及 X 射線對小孢子胚的分化率與發芽率影響顯著，而 UV (0–60 s) 處理雖然隨著處理時間增加會影響小孢子胚分化率，但對後續之胚發芽率不會造成影響。本研究中以 4 個 DH 品系之小孢子進行 2 種時間的 UV 處理，結果顯示 10 s 與 20 s 處理對胚分化率的影響不顯著，差異在 1.7–23.9% 間，相對胚發芽率差異在 2.0–5.0% 間。本研究結果雖然顯示胚發芽率受 UV 處理時間延長的影響較胚分化率為低，但並非完全不受影響，與 MacDonald *et al.* (1991) 結果並非完全一致。推測 MacDonald *et al.* (1991) 以胚分化率較高的油菜作為材料，導致 UV 對胚發芽率的影響變得相對不明顯。整體而言，本研究結果顯示，短時間 UV 光照處理僅對小孢子胚分化產生影響，而對於之後的胚發芽影響較小，可視為 UV 誘變的優點。

由於作物種類對誘變的反應具有特異性，一般多以處理後培植體或植株存活 1/2 的劑量，即半致死劑量 (LD₅₀) 作為誘變敏感性的指標。Ahmad *et al.* (1991) 指出油菜小孢子 UV 處理的 LD₅₀ 為 10 s。Zhang & Takahata (1999) 對大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 的研究顯示，延長 UV 處理時間會造成胚分化率下降，超過 20 s 時胚分化率會大幅下降，並估算 LD₅₀ 為 12 s。比較本研究 10 s 及 20 s 處理之間的差異，以 DH165 與 DH157 差異較大，在 15.9–23.9 個胚/皿之間，而以 DH32 與 DH102

差異較小，在 1.7–4.4 個胚/皿之間 (表 2)。上述結果除顯示不同品系對 UV 耐受性具有個別差異外，亦顯示胚分化率較高的品系在 UV 處理時間延長時所受到的影響較小。此外，Barro *et al.* (2003) 以 UV 對衣索比亞芥菜處理的研究，結果顯示 LD₅₀ 為 8 min。此一結果與 Ahmad *et al.* (1991) 及本研究之結果差異較大，惟 Barro *et al.* (2003) 自己推測原因為衣索比亞芥菜對 UV 輻射的耐受度較高所致。

以小孢子胚作為 EMS 誘變之材料

本研究將 DH32 經過 UV 光照 10 s 處理後獲得之小孢子胚，再施以不同濃度 EMS 進行雙誘變處理，對照組 (0% EMS) 之胚發芽率為 93.3% (表 3)。但經 3 種 EMS 濃度處理後之胚發芽率，則分別下降 43.2–63.6%。由此推測，EMS 處理的 LD₅₀ 濃度，應該在 0.125–0.250% 之間 (表 3)。過去十字花科作物的研究顯示，EMS 大都施用於小孢子培養階段 (Barro *et al.* 2001; Ferrie & Keller 2002; Polsoni *et al.* 2011)，僅少數如 Shi *et al.* (1997) 是將油菜小孢子胚的上胚軸切成 0.7 cm 長，再以含有 0、0.20、0.25 及 0.50% EMS 之 Murashige & Skoog (MS) 培養液處理 3–10 h。結果顯示，培植體的成活率會隨著 EMS 濃度增加而下降，其中 D083 品系以 0.20% 處理 4 h 的相對胚發芽率為 63.4%，而以 0.25% 處理 4 h 為 45.7%。因此推測其 LD₅₀ 濃度應在 0.20–0.25% 之間，與本研究之結果相類似。過去以小孢子胚進行 EMS 誘變的研究較少，主要是油菜小孢子的分化率相當高，因此大部分的誘

變皆於小孢子培養階段實施。但對於小孢子胚分化率偏低的其他蕓苔屬作物，如甘藍類或芥菜類作物而言，建議可以考慮利用小孢子胚作為誘變之材料，較能掌握最後可獲得之誘變數量，本研究結果亦證實此一觀點的可行性。此外，UV 與 EMS 雙重誘變植株於田間之表現 (表 7)，則顯示增加 EMS 之雙重誘變處理會導致誘變株之發育階段更趨提前。此點對於突變率偏低的作物而言，雙重誘變或許是可以不增加致死率但能提升突變率的可行方法。

以花蕾進行 EMS 誘變處理

Dai (2013) 以大白菜 (*B. campestris* ssp. *pekinensis*) 的種子及花蕾分別進行誘變，其中種子以 0.4–0.8% EMS 處理 4–6 h，從 614 株後代中篩選出 49 株變異株，突變率為 7.98%；而花蕾以 0.03–0.10% EMS 處理 5–10 min 後，取其小孢子進行培養，突變率為 15.60%。除此之外，並觀察到花蕾誘變所獲得之變異型態較種子誘變更為多樣性。Lu *et al.* (2016) 利用 0.03–0.10% EMS 以緩和震動方式處理大白菜花蕾 5–10 min，之後取小孢子進行培養，結果從 475 株後代中篩選出 142 株變異株，突變率為 29.90%，證實花蕾誘變是進行單倍體誘變的選項之一。Prem *et al.* (2011) 以印度芥菜 (India mustard, *Brassica juncea*) 種子進行誘變並培養其小孢子獲得 DH 株，利用正交對比進行各因子之變異數分析 (orthogonal contrast partitioning ANOVA)，結果顯示誘變劑 EMS 及 ENU (ethyl nitrosourea) 及其濃度與誘變後的成活率呈現線性關係，但誘變劑的處理時間與成活率之間則不具線性關係。本研究以不同 EMS 濃度利用靜置或添加 Tween 20 加震盪方式處理花蕾不同時間，結果顯示靜置或震盪處理所得結果相似 (表 4、表 5)，亦即 EMS 濃度與處理時間 2 因子對胚分化率均產生顯著影響。其中，又以濃度 ($P < 0.001$) 較時間 ($P < 0.05$) 影響顯著，但 EMS 濃度和處理時間之間的交互並不顯著。Dai (2013) 與 Lu *et al.* (2016) 之研究，前者未述及是否施以震盪處理，後者則未詳述震盪方法及強度，因此難以與之相互比較。本研究在花椰菜花蕾以靜置方式處理時，結果以 0.025% EMS 處理 5–10 min 較佳，

與上述大白菜之研究結果相類似，但若添加 Tween 20 並配合震盪方式處理，則以 0.025% EMS 處理 5 min 最適當。提高濃度至 0.050% 以上或延長處理時間至 10 min，胚分化率皆明顯下降，顯示震盪處理或 Tween 20 其中之一或是兩者皆具有增加 EMS 效果之協同作用。

UV 誘變株的田間表現

本次研究選用 4 個源自於「慶農 S-65」小孢子培養的 DH 品系，依據連續 2 年田間種植資料，選出定植至花球採收日數從 60–90 d 共 4 個 DH 品系，作為誘變材料小孢子的供體親。本研究採用 DH 品系而非 F_1 作為小孢子的供體材料進行誘變的原因，是想藉由 DH 的高度一致性，提高突變體的篩選效率，為節省人力於種植 84 d 後僅針對 DH 誘變株之發育階段特性進行調查。本研究之花蕾誘變試驗中亦採用了「慶農 S-65」(F_1) 進行單倍體誘變，但基於 F_1 小孢子培養所得之誘變株為一分離族群 (F_2)，誘變株外表型之差異，可能來自遺傳分離或誘變，因無法區別差異的來源，為節省調查人力，因此並未進行此批誘變 DH 植株的田間種植。

比較 4 個 DH 品系 UV 誘變株於田間發育時期的表現，結果顯示 UV 處理 10 s 及 20 s 之差異並不明顯 (表 6)。4 個 DH 誘變族群之發育時期與對照組相較，皆以提早發育的比率較高，在 DH32 為 93.0–93.1%，在 DH157 為 75.0–100.0%；而以延遲發育表現的比率較低，在 DH165 為 0–3.8%，在 DH102 為 2.8–11.3%。花椰菜之生產受栽培地區環境因子之影響甚大，針對不同栽培地區需要提供不同熟性之品種，本研究顯示誘變處理可能改變花椰菜發育之快慢，未來有可於優良 DH 品系中利用誘變處理誘導出不同成熟期之近同源系，擴大品種的環境適應範圍。同時本研究之觀察將提供吾人對不同誘變方法及其誘變方向的變化有所瞭解，有助未來進行誘變時對突變趨勢的正確評估。

結語

本研究目的為建立花椰菜單倍體誘變平台，測試之誘變方法包括以 UV 處理 DH 小孢

子、以 EMS 處理 DH 小孢子胚以及以 EMS 處理花蕾，並以誘變產生之 DH 植株種於田間對植株之發育狀態進行觀察。結果顯示 UV 處理施用於小孢子培養階段，處理時間在 10 s 至 20 s 間較為適當，處理時間超過 30 s 時小孢子之成活率會大幅下降 (資料未顯示)。化學誘變方面採用花蕾及小孢子胚兩種材料，其中花蕾以 0.025% EMS 靜置處理 5 或 10 min，或以相同濃度震盪處理 5 min；小孢子胚則以 0.125–0.250% EMS 震盪 10 min，胚分化率最接近 LD₅₀，對於小孢子胚分化率較高之供試材料建議可提高誘變強度。在突變體篩選方面，本研究採用遺傳同質性一致之 DH 品系為供試材料，有助篩選效率的提升。以植株發育階段產生之變化來看，UV 及 EMS 誘變株皆以提早發育較延遲發育之比例為高，這點可提供育種者在誘變目標設定時作為參考。隨著反向遺傳學的進步，DH 突變族群可利用定向誘導基因組局部突變技術 *targeting induced local lesions in genomics (TILLING)* 快速、有效的篩選突變，未來配合次世代定序技術及表型體精準篩選系統，將可縮短育種流程並提高選種效率，且雙單倍體誘變系統的建立將有助功能基因組學研究、種質資源創新以及作物遺傳改良方面的提升。

誌謝

本研究係執行科技部計畫編號：MOST 107-2321-B-055-001 之成果。試驗期間承郭雅芬小姐及紀銘坤、蘇永傑先生三位助理協助，特此申謝。

引用文獻

- Ahmad, I., J. P. Day, M. V. MacDonald, and D. S. Ingram. 1991. Haploid culture and UV mutagenesis in rapid-cycling *Brassica napus* for the generation of resistance to chlorsulfuron and *Alternaria brassicicola*. *Ann. Bot.* 67:521–525. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a088193
- Barro, F., J. Fernández-Escobar, M. De La Vega, and A. Martin. 2001. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breed.* 120:262–264. doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00602.x
- Barro, F., J. Fernández-Escobar, M. De La Vega, and A. Martin. 2003. Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica* 129:1–6. doi:10.1023/A:1021578318098
- Broertjes, C. and A. M. van Harten. 2013. *Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops*. Elsevier Science Publishing. New York, NY. 345 pp.
- Council of Agriculture. 2019. *Agricultural Statistics Yearbook 2018*. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx> (visit on 01/09/2019)
- Dai, S. Y. 2013. *Research on Mutants of Chinese Cabbage by EMS Mutagenic Buds Combining with Microspore Culture*. Master Thesis. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei. Baoding, China. 41 pp. (in Chinese with English abstract)
- Ferrie, A. M. R. and W. A. Keller. 2002. Application of double haploidy and mutagenesis in Brassica. *in: Thirteenth Crucifere Genetics Workshop*. March 23–26, 2002. Davis, CA. University of California, Davis, CA.
- Forster, B. P. and W. T. B. Thomas. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25:57–88.
- 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
- Gik-Humanes, J. and F. Barro. 2009. Production of Doubled Haploids in Brassica. p.65–73. *in: Advances in Haploid Production in Higher Plants*. (Touraev, A., B. P. Forster, and S. M. Jain, eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. 348 pp.
- 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. Taiwan Agric. Res.* 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. Taiwan Agric. Res.* 66:184–192. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06603.02
- Kott, L. 1995. Production of mutants using the rapeseed doubled haploid system. p.505–515. *in: Proceedings of International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. June 19–23, 1995. Vienne, Austria. In-

- ternational Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 748 pp.
- 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
- Lu, Y., S. Dai, A. Gu, M. Liu, Y. Wang, S. Luo, Y. Zhao, S. Wang, S. Xuan, X. Chen, X. Li, G. Bonnema, J. Zhao, and S. Shen. 2016. Microspore induced doubled haploids production from ethyl methane-sulfonate (EMS) soaked flower buds is an efficient strategy for mutagenesis in Chinese cabbage. *Front. Plant Sci.* 7:1780. doi:10.3389/fpls.2016.01780
- MacDonald, M. V., I. Ahmad, J. O. M. Menten, and D. S. Ingram. 1991. Haploid culture and *in vitro* mutagenesis (UV light, X-rays, and gamma rays) of rapid cycling *Brassica napus* for improved resistance to disease. p.129–138. *in: Plant Mutation Breeding for Crop Improvement*. Vol. 2. June 18–22, 1990. Vienna, Austria. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 498 pp.
- Pathirana, R. 2011. Plant mutation breeding in agriculture. *CAB Rev.: Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 6:1–20.
- Polsoni, L., L. S. Kott, and W. D. Beversdorf. 2011. Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 66:1681–1685. doi:10.1139/b88-230
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64:185–210. doi:10.1023/A:1010623203554
- Prem, D., K. Gupta, and A. Agnihotri. 2011. Can we predict mutagen-induced damage in plant systems mathematically? Insights from zygotic embryo and haploid mutagenesis in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Bot. Serbica* 35:137–143.
- Shi, S. W., Y. M. Zhou, and H. L. Liu. 1997. EMS mutagenesis of microspore-derived embryogenic cultures of *Brassica napus*. *MBNL* 43:8–9.
- Szarejko, I. and B. P. Forster. 2007. Doubled haploidy and induced mutation. *Euphtica.* 158:359–370. doi:10.1007/s10681-006-9241-1
- Zhang, F. I. and Y. Takahata. 1999. Microspore mutagenesis and *in vitro* selection for resistance to soft rot disease in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Breed Sci.* 49:161–166. doi:10.1270/jsbbs.49.161

Establishment of a Doubled Haploid Mutagenesis Platform in Cauliflower

Chi-Ni Hsia¹, Uei-Chern Chen², Shiow-Huey Hseu³, Chen-Yu Lin⁴, Chin-Yi Tsao⁵, and Tzu-Kai Lin^{6,*}

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, S. H. Hseu, C. Y. Lin, C. Y. Tsao, and T. K. Lin. 2021. Establishment of a doubled haploid mutagenesis platform in cauliflower. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(3):182–195.

An integrated haploid mutagenesis platform through doubled haploid (DH) donor plants providing microspores in cauliflowers was established in this study. Ultraviolet (UV) irradiation was applied to microspores of four DH lines derived from ‘Chinglong S-65’ and each line with various heading mature days. Embryos derived from UV treated microspores of DH32 as stated above were treated with ethyl methanesulphonate (EMS) subsequently for double mutagenesis. EMS was also applied on flower buds of ‘Chinglong S-65’ before microspore culturing for mutagenesis. The results showed that embryo production (embryos/petri dish) from two UV exposure duration in all four DH lines was significantly lower, accounting for 23.9% to 65.1% decrease compared to the control. However, no significant difference was observed on embryo production between the two UV exposure duration. The results also showed that embryo germination rate of the UV treated microspores decreasing 50.9 to 78.8% compared to that of the control. Cotyledonary embryos of DH32 derived from the UV 10 s treatment were soaked in 0.125–0.5% ethyl methanesulphonate (EMS) for 10 min. Embryo germination rates decreased in all EMS treatments by 36.4% to 56.8% compared to that of the control. However, no significant difference was found among three EMS treatments. Flower buds of ‘Chinglong S-65’ were soaked in 0.025–0.1% EMS for 5 or 10 min with or without shaking for mutagenesis before microspore culturing. The results showed that regardless exposure time, the highest embryo production was obtained in buds treated with 0.025% EMS. However, embryo production decreased as exposure time increased and shaking was applied. DH plants derived from the UV or double mutagenesis (UV plus EMS) of four of DH lines were cultivated in the field and data were recorded at 84 d after cultivation. Field observation concluded that percentage of early growth rate was higher than that of delaying based on developmental performance of DH mutants in the four DH lines. Our results not only provide useful information for prediction of mutant tendency in cauliflower but also demonstrate that haploid mutagenesis is capable of shortening time span and enhancing selection efficiency on breeding. Additionally, this study demonstrated that trait screening on mutants was more efficient than using the highly uniform DH as donor plants for haploid mutagenesis.

Key words: *Brassica oleracea* var. *botrytis* L., Microspore culture, Doubled haploid, Haploid mutagenesis.

Received: November 26, 2020; Accepted: March 26, 2021.

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

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

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

³ Research Fellow and Head, Plant Protection Department, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Vegetable Department, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

⁵ Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁶ Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.