

# 甘藍組織培養誘導再生繁殖及組培苗健化技術

許圳塗 鍾仁彬

國立臺灣大學園藝系

## 摘要

甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 組織培養參試四個栽培種，選用不同胚體組織及花器組織為培植體。其中以下胚軸段節及花托組織不定芽發生潛力最佳，但兩者對外加生長調節劑需求不同。

生長素對下胚軸 2-3 mm 段節培養其作用依類型及濃度改變而有多重形態發生效應。低濃度生長素如 2,4-D 0.01 mg/L、picloram 0.05 mg/L 或 PAA 1.0 mg/L 具有促進不定芽發生效果。發生頻率為 42.9-52.4%。較高濃度生長素，如 picloram 提高為 0.1 mg/L 則顯著降低不定芽發生頻率及芽數，此劑量抑制效應可藉乙烯發生抑制劑硝酸銀或硫代硫酸鈉處理而克服之。品種間‘初秋’對生長素反應較為敏感，銀劑處理可完全恢復其不定芽誘導作用。

分裂素亦為誘引胚軸莖段不定芽發生重要因素，其誘導再生活性強弱依序為 BA、TDZ、2ip 及 kinetin。其中以 BA 對增殖效率及芽體生長最佳，但需與低濃度生長素組合方有相乘效應。picloram 0.05 mg/L 與 BA 0.5 mg/L 組合處理對參試品種不定芽發生率皆近倍數增加，平均不定芽數則增加 4-5 倍達 28.4-31.8 個。

花托培植體生理特性有異於胚體組織，單一生長素處理並無誘導不定芽發生之效果，但與分裂素組合則有協補效應。以 MS 配方添加 2,4-D 0.01mg/L 或 picloram 0.05 mg/L 組合 BA 0.5 mg/L，則再生發生率提高為 95%，品種間每一培植體平均不定芽數為 22.2-25.0，故此一平衡之培養基，適用於不同性質之培植體，達平均高效率不定芽再生目的。

甘藍體胚再生其被視為困難作物，本研究顯示培植體其誘導性之胚性潛勢，以下胚軸段節比花托組織為高。體胚再生之配方，若以 2,4-D 2mg/L 組合 TDZ 1mg/L，可誘使 100%，接種體大量形成粒狀構造物，但體胚呈遲滯發育。而以 picloram 0.1 mg/L 組合 2ip 0.5 mg/L，及蔗糖 45-60g/L，體胚發生頻率較低，但可促使體胚發育至子葉型期。體胚發生途徑呈中間型，即由擬分生中心之原表皮細胞，大多以單細胞起始進行分化為形態雙極性之體胚。甘藍體胚形成條件與不定芽之器官發生有重疊性，但兩者之間似有消長競爭趨勢。

再生培養基所誘導芽群，移植至抽長培養基含有 GA 1mg/L 及 BA 0.5mg/L，經 10 天可有效誘使芽群抽長並持續增生 2 倍以上。小枝微扦插法，先在含 PAA 1mg/L 培養基健化 7-10 天，然後切取小枝處理 IBA 200 ppm 粉劑，瓶外穴盤微扦插，發根率可達 92%。組培苗田間定植，生長勢佳，成活率 100%，生長結球整齊，比實生苗早熟二~三週，產量亦高。

## 引言

甘藍(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)為種子繁殖作物，隨著育種技術之發達，一代雜交品種已成為甘藍主要栽培種。一代雜交品種最大特色為高度遺傳異質性與整齊一致之性狀，所以具有雜種優勢與生長一致性之優點，廣為農民與消費者所接受。甘藍等莖苔屬作物一代雜交品種種子生產上，可利用其自交不親和(self-incompatibility)特性，在田間採種上將兩親本種於採種田可得到自然異交之 F1 雜交種子，而生產高遺傳異質性與表現齊一性的 F1 雜交種子，其先決條件為必需有高度純質之自交親本，所以維持親本自交系成為非常重要之採種工作。然而利用蕾期授粉維持親本自交系，或雜交採種，需廣大土地與眾多人力，目前台灣土地取得困難和人力缺乏情況下，發展組織培養無性繁殖技術，可建立更經濟省工及有效增殖體系，在親本自交系的維持與增殖，並可供新選育品系短期大量增殖。亦有助種質保育體外保存系統，及遺傳工程基因轉殖植物等之發展。

Bajaj 和 Nietsch (1975) 首先報導甘藍微體繁殖技術 (micropropagation)，以紅甘藍之根、莖和實生苗子葉得到不定芽 (adventitious buds) 與小植株。其他培植體如以葉深甘藍小花蕾 (何 1976)、腋生芽之分生組織 (Walkey et al., 1980)，和花芽 (Leike & Wiczorrek, 1982) 等皆可在甘藍不同組織得到再生之不定芽。近年來乙烯抑制劑如 AgNO<sub>3</sub> 和 aminoethoxyvinyl glycine (AVG) 加入培養基，對不定芽發生上常有促進效果，莖苔屬作物上 *B. campestris* 研究較多，可使原本較難發生器官之基因型，協助誘使不定芽發生率提高 (Chi et al., 1990, 1991, 1994; Hachey et al., 1991; Palmer, 1992)。甘藍不定芽發生對生長素很敏感，較高濃度生長素造成負效應，則可由銀劑處理而克服之 (鍾、許, 1995)。

甘藍有關二倍體體胚發生的文獻尚未有報導，然而莖苔屬作物最早有胚發生之文獻為西洋油菜 (*B. napus*)，以花粉擬胚 (pollen embryoid) 發生並再生單倍體植株 (Thomas et al., 1976)。Pareek 和 Chandra (1978) 則第一次發表莖苔屬作物二倍體細胞再生體胚之文獻，其以花椰菜 (*B. oleracea* var. *botrytis*) 幼葉逆分化為癒合組織後再生體胚。歷年來有關莖苔屬作物組織培養胚發生研究，花粉擬胚再生文獻非常多，以西洋油菜、青花菜 (*B. oleracea* var. *italica*) 與花椰菜較為完整，尤其西洋油菜為此方面研究之模式植物，幾乎莖苔屬各作物以其配方為修改後之配方。而甘藍雖無二倍體體胚再生方面的研究報告，然而在花粉擬胚發生曾以花藥當培植體誘出單倍體擬胚 (Roulund et al., 1990; Semova & Anokhin, 1990)，亦利用分離小孢子 (microspores) 培養胚發生並再生植株 (Anokhin & Semova, 1991)。

本研究主要報告以極低之生長素濃度組合分裂素，以單一配方適用於不同生理性質培植體有效誘導大量不定芽形成，並建立快速培育健化小植株之體系。體胚發生亦有進展，惟其量化生產與調控則尚待研發之。

## 材料與方法

### 1. 參試品種

選擇不同遺傳來源，國內外重要品種，包括有初秋 (日本 Takii 公司)、春陽、高峰 (農友種苗公司)、中甘十一號 (大陸中國農科院) 等四栽培種。

### 2. 培植體選取與消毒

依繁殖利用上的目的，選取胚體組織(embryonic tissue)及花器組織(reproductive tissue)為培植體，前者包括實生苗不同部位組織，後者代表無性繁殖為取用花托及花絲組織。

### (1) 無菌播種

參試品種無菌苗培育，為種子經商業漂白劑Clorox 2.5% 添加一滴Tween-20展著劑，振動消毒15分鐘，再以無菌水洗滌三次，然後播種於MS培養基(Murashige & Skoog, 1962)，於 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ， $40 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  環境下生長。以五天苗齡最適合培養利用，如下胚軸則加以分切為2~3 mm片段再接再種於再生培養基。

### (2) 花托培植體選取

花器組織取得，亦可採用綠株春化處理。開花株誘導，溫室播種成株至莖粗6mm，經 $5^\circ\text{C}$  低溫處理一個月後，於 $20/15^\circ\text{C}$ ，光度 $100 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  植物生長箱。開花前一~二天採收花蕾，經Clorox 2.5% 添加一滴 Tween-20 溶液，消毒15分鐘，再以無菌水洗滌三次，消毒後，剝取花托與花絲等為參試培植體。

## 3. 再生培養基備製

以MS配方當作基本培養基，參試添加不同生長調節劑，生長素 auxins 包括有2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)、4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram)、Indole-3-butyric acid (IBA)及Penylacetic acid (PAA)等。cytokinin類有 $\text{N}^6$ -benzyladenine (BA)、 $\text{N}^6$ -furfuryl adenine (kinetin)、 $\text{N}^6$ -2-isopentenyl adenine (2iP)及 N-phenyl- $\text{N}^1$ -1,2,3-thiadiazol-5-yl urea (TDZ) 等。測試濃度範圍  $0.01 \text{ mg/L} \sim 2.0 \text{ mg/L}$ ，分有單獨生長調節劑及 auxin 與 cytokinin 之組合試驗。

另測試乙烯抑制劑與生長調節劑交感作用對甘藍再生作用影響。參試抑制劑有 $\text{AgNO}_3$ 、Silver thiosulphate(STS)等。STS配製法，以 $12 \text{ mM AgNO}_3$ 和 $96 \text{ mM NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分開配製，並經濾膜無菌過濾，存於 $4^\circ\text{C}$ 黑暗條件，使用時硝酸銀及硫代硫酸鈉各取1mL，加入一升的培養基中。

所有培養基蔗糖濃度調為3%及Agar 0.7%，pH值皆調至5.7，採用廣口瓶容器，裝注20 mL 培養基，置於 $121^\circ\text{C}$ 殺菌釜消毒15分鐘。

## 4. 再生解剖形態觀察

組織石蠟切片之固定、脫水、滲蠟、埋蠟、切片、貼片及染色等方法參照蔡淑華(1988)所著「植物組織切片技術綱要」。已染好之玻片最後以封片膠(Euparal)封片，製成永久片以供觀察並拍照記錄。

## 5. 微扦插及健化處理與定植

### (1) 不定芽促生

選用不定芽再生培養基 DB5 (MS+2,4-D 0.01mg/L+BA 0.5mg/L)，以花托為培植體誘導培養三週後，逢機取樣已長出不定芽之培植體，繼代培養在 GB5(MS+GA 1.0 mg/L + BA 0.5 mg/L) 培養基，一週後與對照組 DB5 培養基培養四週的結果比較。

### (2) 不定芽微扦插

花托或下胚軸所誘導之不定芽，抽長之枝梢大約1.5 cm 時，切下1~1.5 cm 後扦插於健化培養基 PA (MS+PAA 0.5mg/L)，大約十天後將健壯小植株取出瓶外。

### (3) 穴盤育苗

微扦插插穗長出不定根後，取出洗去根部培養基，移殖至穴盤。另一交替試驗為從健壯小植株，由頂部算起大約3~4公分高去根，再以 IBA 500mg/L 發根粉

劑沾於小植株底部，直接扦插於無土介質(#2珍珠石:#2蛭石:泥炭土=1:1:1.5)之穴盤內，保持高濕度，並置於 20°C 光度 100 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> 之植物生長箱，15天後調查其發根率及根系生長情形。

#### (4) 田間初步觀察

將已健化好 150 株甘藍苗，試種於台大園藝分場，1994 年 9 月 20 日定植，並與分場其他實生苗做初步生育與結球性比較觀察。

## 結果與討論

### 1. Auxin 類型對甘藍下胚軸培植體再生之影響

甘藍下胚軸 3 mm 段節培養於 MS 培養基，單獨外加不同生長素 picloram、2,4-D 或 PAA 能夠誘導產生不同之發生形態事件，如不定芽、不定根或癒合組織形成。其發生途徑隨生長素類型及濃度範圍各有差別(表一)。

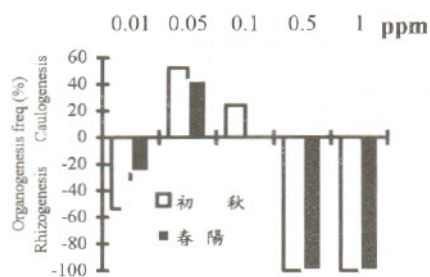
誘導不定芽發生適當濃度，強生長素 picloram 為 0.05 mg/L，2,4-D 則需低至 0.01 mg/L，而 PAA 則須提高為 0.5~2.0 mg/L。從外觀形態觀察皆屬直接不定芽，大約處理二週可在下胚軸段節之生理頂端(distal end)觀察到芽體發生(圖四-A)。單獨添加 0.05mg/L picloram 不定芽發生率在初秋品種可達 52.4%，提高至 0.1 mg/L 則降至 23.8%。春陽品種不定芽發生率較初秋差，只在 0.05 mg/L 顯示 42.9% 不定芽發生率。當濃度降低至 0.01 mg/L 時，兩參試品種卻在生理基端(proximal end)以直接不定根發生形態，而濃度提高至 0.5 mg/L 以上時，則在頂端逆分化為癒合組織而基端形成不定根(圖一)。外加 2,4-D 0.01 mg/L 至 2.0 mg/L，其形態發生依濃度之不同，而有不定芽、不定根及癒合組織的變化，在低濃度 0.01 mg/L 時，生理頂端有不定芽發生，但基端逆分化為癒合組織。而 PAA 在 0.1 mg/L 至 2.0 mg/L 則依濃度而有不定芽、不定根被誘導。

表一、Auxin 類型對甘藍初秋品種下胚軸培植體多種形態發生效應

Auxin 濃度	Picloram	2,4-D	PAA
0.01 ppm	R	S	-
0.05 ppm	S	R	-
0.1 ppm	S	R, C	-
0.5 ppm	C, R	C	S
1.0 ppm	C, R	C	S
2.0 ppm	N	C	S

說明:

S:不定芽發生, R:不定根發生, C:癒合組織  
N:壞死, -:未試驗



圖一、Picloram 不同濃度對甘藍「初秋」及「春陽」下胚軸培植體器官發生率

### 2. Auxins 與 Cytokinins 組合對甘藍再生之協補作用

#### (1) 下胚軸培植體

初秋及春陽兩品種若培養於MS含 picloram 0.05 mg/L 及 BA 0.5 mg/L，或 2,4-D 0.01 mg/L+BA 0.5 mg/L之培養基皆有極佳的再生效果。一週後從下胚軸段節

兩端逆分化為癒合組織，兩週後再分化出多數芽點，一個月後增生出許多增生之不定芽，則其不定芽發生頻率皆可達 85% 以上，兩品種不定芽數分別高達 28.4 及 31.8 個，顯示 picloram 與 BA 組合對兩參試品種皆反應出有加成作用。利用 picloram 0.05 mg/L 組合不同類型 cytokinins 皆有誘導下胚軸再生不定芽效果，如混加 0.5 mg/L 2iP 或 TDZ，可提高不定芽發生率為 90% 左右，但所誘導之平均芽數只有 BA 之一半以下。由 picloram 與 TDZ 組合增生出之不定芽形態，其特性為葉片較薄，微呈透明水浸狀，較易玻璃質化。而與 0.5 mg/L kinetin 組合，無論發生率或平均芽數皆為最低。反之若將 picloram 濃度提高為 0.1 mg/L，與 0.5 mg/L BA 或 kinetin 組合，無論不定芽發生率或不定芽數在兩參試品種皆急劇下降。與 2iP 之組合雖發生率未明顯改變，但不定芽數則減半。

為瞭解不同甘藍栽培種之再生效果，另參試「高峰」與「中甘十一號」下胚軸段節，於 PB5 (MS+picloram 0.05 mg/L + BA 0.5 mg/L) 及 PT5 (MS+picloram 0.05 mg/L + TDZ 0.5 mg/L) 培養基誘導一個月，顯示皆呈現極高再生效果 (圖二)，此結果顯示 picloram 在特定濃度下與 BA 或 TDZ 對參試四品種皆具良好誘導組織再生植株之效果，但從發生芽數仍以 BA 較 TDZ 為佳 (圖四-B)。

## (2) 花的器官培植體再生作用

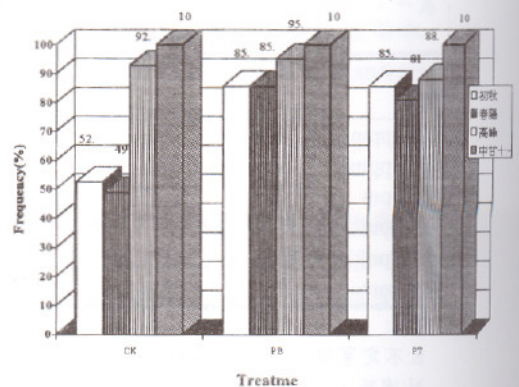
以花托或花絲培植體探討 PB5 培養基 (MS+picloram 0.05 mg/L+BA 0.5 mg/L) 對誘導不定芽之效應，顯示初秋與春陽兩品種之花托組織具良好再生效果 (表二)，再生率可高至 95% 以上，然而平均不定芽數稍比下胚軸低些。花托組織培植體經 PB5 培養基培養五天後可見其組織膨大，此時花托頂端長出綠色突點圍繞子房基部外緣 (圖四-C)，此突出物逐漸形成初生芽並有癒合組織發生，十四天後已有多數芽點產生 (圖四-D)。以花絲為培植體在 PB5 培養基培養，兩端會產生少許碎冰狀透明之癒合組織，然而兩參試品種無法有任何器官形成。

表二、Picloram (0.05mg/L) 與 BA (0.5mg/L) 誘導甘藍不同培植體不定芽再生影響

品種	初 秋		春 陽	
	a.	b.	a.	b.
培植體				
下胚軸	85.7%	28.4 ± 7.2	85.7%	31.8 ± 8.6
花 托	95.2%	22.2 ± 9.4	97.6%	25.0 ± 8.2
花 絲	0	0	0	0

a: 不定芽發生頻率

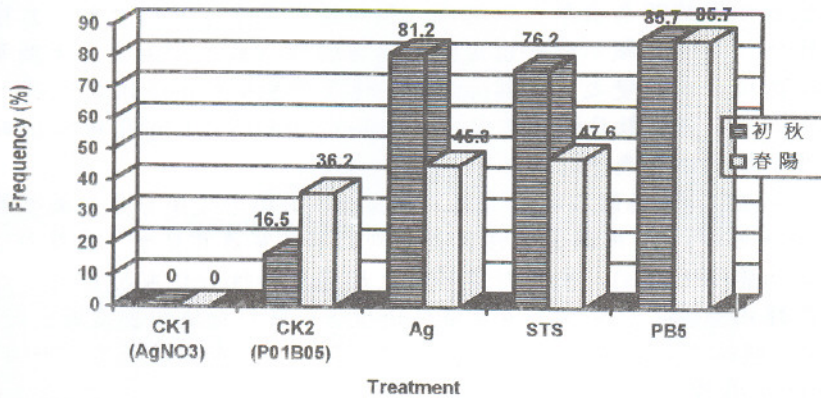
b: 每個培植體不定芽誘導數目



圖二、Picloram 0.05 mg/L 與 0.5 mg/L BA (PB5), 0.5 mg/L TDZ (PT5) 組合誘導甘藍四種栽培種不定芽發生頻率  
CK: MS + picloram 0.05 mg/L

### (3) 生長素與乙烯抑制劑交感作用

為瞭解乙烯對不定芽再生之影響，進行添加AgNO<sub>3</sub> 與 STS 試驗。圖三顯示含銀劑培養基之培養甘藍初秋及春陽下胚軸，皆無不定芽發生。而 AgNO<sub>3</sub> 或 STS 加入 P01B05 培養基(MS+ picloram 0.1 mg/L+BA 0.5 mg/L)，AgNO<sub>3</sub> 或 STS 明顯促進 P01B05 所誘導之不定芽發生率，初秋品種添加 AgNO<sub>3</sub> 與 STS 提高至 81.2% 與 76.2%，然而春陽只提高至 45.3% 與 47.6%。此結果P01B05 較PB5 (MS+ picloram 0.05 mg/L+BA 0.5 mg/L) 不定芽發生率減少一半以上，可能與 picloram 濃度提高一倍造成乙烯量提高抑制不定芽再生效果，但添加乙烯作用抑制劑於 P01B05 培養基中，不定芽再生效果明顯回復，所以乙烯對不定芽發生可能扮演著抑制者的角色。



圖三、 乙烯作用抑制劑對甘藍下胚軸不定芽再生影響

### 3. 不定芽再生途徑及解剖發生形態

甘藍不定芽再生過程，提供形態發生上之證據，有助於瞭解組織培養不定芽起始細胞來源。Auxins (picloram) 與 cytokinin (BA、2iP、TDZ) 組合所誘導之不定芽模式，由石蠟切片觀察其生長分化情形，不同培植體間間接再生模式有其差異。下胚軸為培植體時，以 PB5 (MS+picloram 0.05mg/L+ BA 0.5mg/L) 培養基誘導一星期，兩端開始產生一些逆分化現象，十四天後誘導出較大癒合組織並已有芽長出，此癒合組織在解剖顯微鏡下觀察可看出二種細胞鑲嵌在一起，一種為透明狀癒合組織，此種細胞一般為長形之空胞，不具再生能力，且隨著培養時間加長，生長速率很快；另一種為呈綠色之癒合組織，不定芽之再生由此區域產生。由切片探討整個再生過程，可看出頂端表皮與皮層組織散出許多空胞，而維管組織周圍細胞散出顏色較深之細胞團(cell mass)，然後再形成擬分生組織(meristemoid)，也就是外觀看到之綠色癒合組織；大約十四天後，以每個擬分生組織為中心，增生初生不定芽及許多次生之芽原體(鍾、許, 1995)。

體外培養後，定期進行解剖顯微鏡形態觀察，並取花托組織在 PB5 培養基培養，並以石蠟切片進行再生觀察。以 PB5 大約五天後即可見到花托培植體頂端(即

朝雌雄蕊端) 外圍有許多突出之綠色組織，十四天後逆分化且外圍有許多不定芽點。石蠟切片解剖觀察顯示，新鮮花托可見兩團染色較深之未分化的雄性器官(undevelopmental male organ)(Hayward, 1938)，大約誘導五天可內生成芽原體，然後芽原體基端與母體相連細胞破裂後，自行形成另一個分生團塊，不定芽由分生團塊長出，分生團塊與母體組織之間有許多空胞或破碎細胞，此為外觀所見之透明狀癒合組織，而外觀呈綠色之癒合組織即為可再生不定芽之分生團塊。不定芽增生以分生團塊為中心，初生不定芽發生後由兩葉原體之間形成許多之芽分生組織(鍾、許, 1995)。

#### 4. 甘藍體胚發生

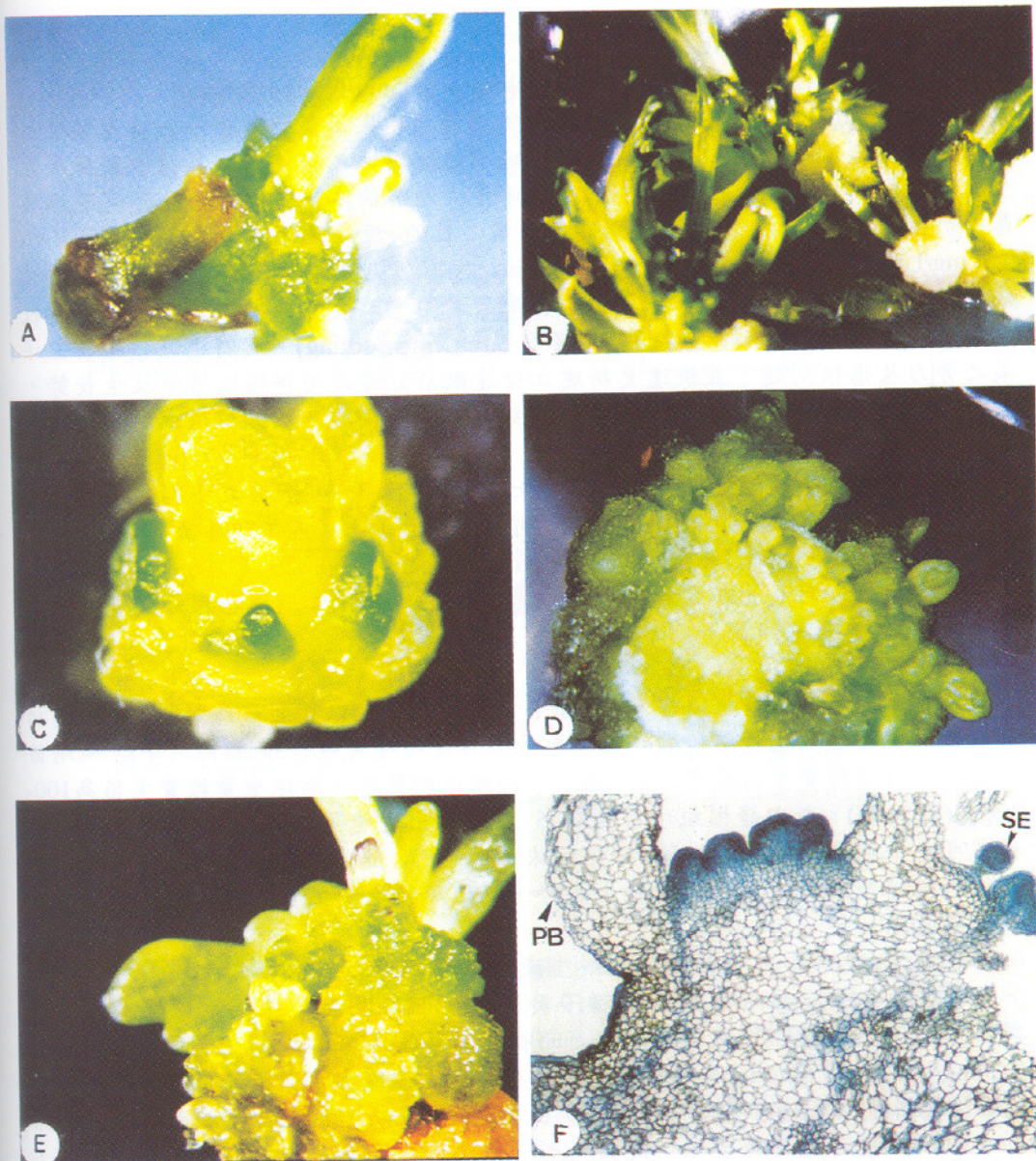
Picloram 提高濃度至0.1 mg/L 並組合2ip 0.5~2.0 mg/L，培植體大約有20%左右形成體胚，然而在外觀形態上常有不定芽與體胚伴隨發生之情形(圖四-E)。一般作物體胚發生起始體被認為由單一細胞或少數細胞所參予，然而甘藍一直被視為體胚難再生作物。本研究顯示以體胚組織可誘導體胚形成。但兩者發生頻率可隨特定生長調節劑組合而改變之。尤其picloram 濃度降至0.05mg/L組合2ip時，更易朝不定芽發生方向，體胚數目顯著減少。但提高picloram至0.1 mg/L組合2ip時，不定芽數目降低，體胚發生機會則增加。

從解剖形態上顯示，其體胚發生形態為間接型，由新形成擬分生組織之原表皮細胞形成體胚(圖四-F)。利用高濃度強生長素抑制不定芽器官發生，並導向逆分化誘引胚性定向細胞(IPEDCs)，惟其對體胚發生形態雙極性分化有抑制性。故欲質量化誘導甘藍體胚形成，交替進階培養條件仍待進一步探討之以期突破。

#### 5. 微扦插及健化處理

##### (1) 不定芽增生與抽長

甘藍下胚軸段節先以誘導不定芽培養基 DB5 (MS+2,4-D 0.01 mg/L+BA 0.5 mg/L)培養三週，再繼代培養於 GB5(MS+GAs 1.0 mg/L+BA 0.5 mg/L)培養基，一週後與對照組 (PB5 未繼代) 不定芽數目比較，顯示處理所得不定芽增加數為 61.3 ± 10.6，提高幾近為對照之PB5 二倍，且不定芽有抽長效果，此種抽長一致效果非常利於小枝條取得，以供微扦插利用(圖六-A)。



圖四、甘藍胚軸及花器培植體不定芽及體胚發生形態特性

圖A、單獨Picloram 0.05 mg/L 誘導不定芽在生理頂端長出情形。(15x)

圖B、Picloram(0.05 mg/L)與BA(0.5 mg/L)組合培養下胚軸段節再生多數不定芽。(15x)

圖C、花托組織以PB5培養基誘導5天後長出綠色突出構造。(15x)

圖D、花托組織在PB5培養基誘導14天後在癒合組織表面形成多數不定芽。(15x)

圖E、下胚軸培植體以picloram 0.1 mg/L 組合 2ip 0.5 mg/L 誘導四十天後之芽體與體胚共同發生。(18x)

圖F、不定芽與擬胚共同發生解剖形態(300X)。



## (2.) 微扦插組培苗健化

適合不定芽再生培養基PB5 (MS+picloram 0.05mg/L+ BA 0.5 mg/L)，其auxins與 cytokinin 比例上差距在 10~50 倍，所誘導之不定芽直接發根移入溫室種植，易出現有分裂素之殘留效應。分裂素中以 TDZ 誘導之組培苗，其特徵是極度簇生狀，葉柄細小，葉片小而薄，無法結球等。為解決本試驗所用再生不定芽培養基所衍生之 cytokinins 效應，達到健康種苗之目的，設計健化培養基 PA (MS+PAA 0.5 mg/L) 達到健化種苗與加速 cytokinins 代謝功能。即以 PB5所誘導出之小枝條，微扦插 (microcutting) 在 PA 培養基，大約十天後所抽出之舊枝條或更新枝條由頂端取 3~4 公分再進行瓶外扦插發根(ex vitro rooting)。其特色為節省去掉洋菜之勞力及傷根問題，並快速更新建立發達根系，達成高移植成活率及生長勢。而由 PA 健化培養基處理後，亦可解決組培苗分枝問題，明顯解決本試驗再生不定芽培養基所衍生之問題。

甘藍不定芽小枝微扦插方法，如圖七-B~D切下 3~4 公分之小插穗，以 500 ppm IBA 發根粉劑處理，直接扦插在穴植盤 (plug) 上，人工培養土 (2號蛭石：2號珍珠石：泥炭土=1:1:1.5) 為育苗介質，扦插苗保持在 20 °C 高光高濕度環境下，大約一週即可長出不定根，成活率可達 91.7%，二週後已形成完整健壯之甘藍組培苗(圖六-E)。

## (3) 田間觀察

穴盤育苗後之甘藍組培苗，照一般行株距畦植，並以實生苗為對照。組培苗初期較實生苗健壯，生長勢較強，而在生長整齊度組培苗較一致性(圖六-F)。組培苗結球採收時間較實生苗提早二~三週，平均結球較緊密，結球重量較實生苗為100-200克(圖六-G)。瓶內發根組培苗約有 5% 左右出現雙芽球問題情形(圖六-H)，此種苗可在早期栽培時除去一芽，確保結球正常。PA 健化培養基處理及瓶外發根，可促進組培苗高定植成活率及強生長勢、早熟等特色，主要原因以發達纖細根系及根圍效應。

## 6. 以甘藍組織培養再生與健化系統生產穴盤苗之可行性評估

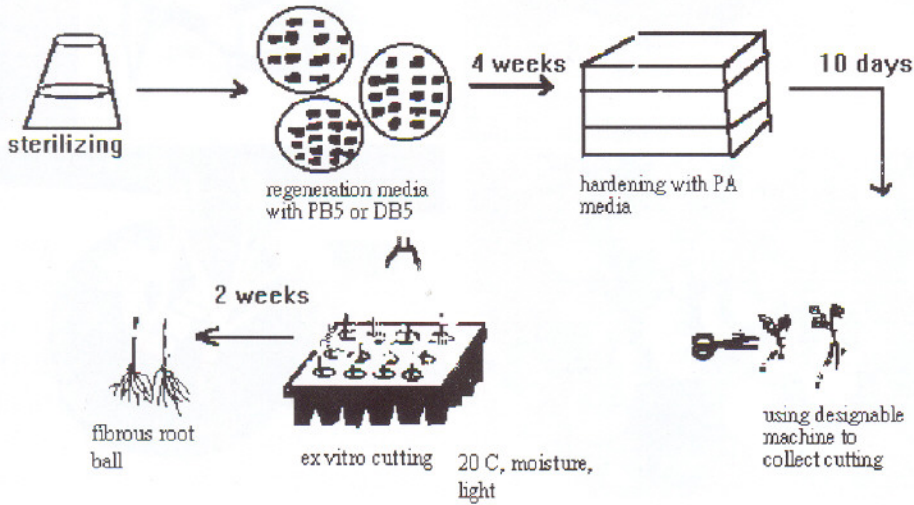
本試驗依繁殖性質之不同以種子發芽之下胚軸及成年株之花托組織為培植體，因此擴大了無性繁殖之利用性。而在不定芽誘導培養基上 PB5(MS+picloram 0.05mg/L+ BA 0.5mg/L)培養基皆可適用在二種培植體上，亦提高了培養基之普遍性。然而所建立之培養基配方，生長調節劑auxin與cytokinin之比例相差10~50倍，初步田間試種可見到簇生株，此種畸形株無法結球，尤其添加TDZ簇生株較多，判斷可能為 cytokinins 效應所致。

如何利用本試驗之組織培養不定芽再生系統，並配合目前種苗產業穴盤化及機械化，如圖五之流程可歸納試驗內容並定出下列生產步驟：

- (1) 培植體取得及消毒：培植體可先由優良品種種子之下胚軸進行繁殖，往後固定留一批種株，春化後取花托繁殖。
- (2) 組織培養不定芽之誘導：利用 PB5 培養基誘導四週。
- (3) 瓶內微扦插：PA (MS + PAA 0.5mg/L) 培養基無菌操作健化及抽長，健化大約十天，此步驟可提高瓶外扦插存活率，並避免多芽苗生成。
- (4) 穴盤育苗：取已瓶內健化之組培苗，直接剪去沾滿洋菜膠的根部，取3-4公分插穗。以 IBA 500mg/L 發根劑處理後扦插於無土介質之72格穴盤中，以 20°C 高濕高光環境控制育苗二週。

(5) 鬚根系穴盤苗育成並待定植田間。

在生產線上組織培養與健化部份需少許人力，而以後之步驟可配合機械化生產，從繁殖至培育為可定植小植株費時只52-55天，若以組培苗配合穴盤質量化生產，所生產高品質鬚根系穴盤苗將有應用發展之潛力。



圖五、以甘藍組織培養不定芽再生與健化系統生產穴盤苗模式流程

圖六、甘藍組織培養苗健化過程及田間結球生長情形

圖A、甘藍花托培植體於 DB5(MS+2,4-D 0.01 mg/L+BA 0.5 mg/L)培養基誘導不定芽三週後以GB5(MS+GAs 1.0 mg/L+BA 0.5 mg/L)培養基繼代一週，不定芽數顯著增加且有抽長效果。

圖B、微扦插在PA(MS+PAA 0.5 mg/L)培養基健化一週後，取3~4公分之枝梢當插穗。

圖C、扦插在穴盤之枝梢十天後已有不定根長出。

圖D、組培苗以穴盤育苗待定植之健康種苗。

圖E、穴盤苗所形成發達鬚根系。

圖F、定植在台大園藝分場整齊一致且生長勢強健之甘藍組培苗。

圖G、初秋品種甘藍組培苗結球正常並具有早收之特性。

圖H、組培苗有少數雙芽情形，可在早期去除一芽維持後期結球正常。



## 參考文獻

- 何偉真. 1976. 十字花科花序培養再生不定芽的研究. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 蔡淑華. 1988. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書有限公司. pp.1-43.
- 鍾仁彬. 許圳塗. 1995. 甘藍組織培養不定芽發生及再生模式. 中國園藝. 41:261-278.
- Anokhin, Yu. N. and N. Yu. Semova. 1991. Structural and functional relationships in white cabbage anther in embryo competent stages of microsporogenesis. Soviet Agri. Sci. 2: 20-23.
- Bajaj, Y.P.S. and P. Nietsch. 1975. In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). J. Exp. Bot. 26: 883-890.
- Chi, G.L., D.G. Barfield., G.E. Sim and E.C. Pua. 1990. Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxyvinylglycine on in vitro shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rept. 9: 195-198.
- Chi, G.L., E.C. Pua and C.J. Goh. 1991. Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson in vitro. Plant Physiol. 96: 178-183.
- Chi, G.L., W.S. Lin., J.E.E. Lee and E.C. Pua. 1994. Role of polyamines on de novo shoot morphogenesis from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson in vitro. Plant Cell Rept. 13: 323-329.
- Hachey, J.E., K.K. Sharma and M.M. Moloney. 1991. Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. Plant Cell Rept. 9: 549-554.
- Hayward, H. E. 1938. The Structure of Economic Plants. The Macmillan Co. New York.
- Hicks, G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. Bot. Rev. 46: 1-23.
- Leike, H. and G. Wiczorrek. 1982. In vitro - Vermehrung bei Kopfkohl (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). Arch. Zuchtungsforsch 12: 375-383. Cited In: Bajaj, Y.P.S. 1988. Biotechnology in Agriculture and Forestry 6. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 237.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-479.
- Palmer, C. E. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. Plant Cell Rept. 11:541-545.
- Pareek, L.K. and N. Chandra. 1978. Somatic embryogenesis in leaf callus from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Plant Sci. Lett. 11: 311-316.
- Roulund, N., L. Hausted, S.B. Andersen. and B. Farestveit. 1990. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response

- in head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Euphytica* 49: 237-242.
- Semova, N. Yu. and Yu. N. Anokhin. 1990. Induced embryoid formation in anther culture of white head cabbage. *Soviet Argri. Sci.* 8: 26-30.
- Thomas, E., F. Hoffmann., I. Potrykus and G. Wenzel. 1976. Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape. *Molecular and General Genetics* 145: 245-247.
- Walkey, D. G. A., H. A. Neely and P. Crisp. 1980. Rapid propagation of white cabbage by tissue culture. *Sci. Hort.* 12: 99-107.
- Williams, E. G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.