

## 小白菜組織培養再生系統之建立

許家言<sup>1)</sup> 張有明<sup>2)</sup> 曾夢蛟<sup>3)</sup>

關鍵字：小白菜、組織培養再生、器官形成再生、體細胞胚胎發生

**摘要：**本研究試驗結果顯示，含有 1 mg/L BA、0.5 mg/L NAA、0.25mg/L GA<sub>3</sub>、3mg/L AgNO<sub>3</sub>、與 5mg/L putrescine 之 2% sucrose 的 MS 基本鹽類與有機成分配方對'台農一號'與'台農二號'小白菜誘導組織培養再生最佳，再生率達 66.7%~70%；且子葉組織的再生率均優於下胚軸組織。本研究同時發現通常小白菜的下胚軸或子葉培植體是經由誘導出癒傷組織，再依循分化出芽原體，抽出芽梢，形成再生植株等過程，亦即經由「器官形成再生路徑」(organogenesis pathway)。但若在再生培養基中添加多胺類，例如腐胺或亞精胺，會使得誘導癒傷組織的比率降低，誘導出胚狀體，再生長出芽梢及根，形成再生植株，此即經由「體細胞胚胎發生再生途徑」(somatic embryogenesis pathway)，而再生成植株。

### 前 言

影響植物組織培養再生的因子相當多，包括培植體的選擇、培養基的組成、培養的方式與培養的環境等 (George and Sherrington, 1984)。組織培養過程中，培植體的選擇會影響器官與組織的分化能力。雖然植物細胞具有分化全能性，但大部分只侷限於某些細胞。一般培植體之選擇，通常於植物的分生組織或生殖器官組織等細胞分裂旺盛部位，如：莖頂、生長點、芽體、未成熟胚、下胚軸、子葉、葉柄、幼根、幼莖段、胚珠、未成熟子房等部位之培植體 (Lowe *et al*, 1996)。此外在選擇培植體時需考慮培植體的大小、培植體的年齡、與取材部位等因子。培植體不同的成熟度或不同來源的培植體，所產生的癒傷組織、不定芽或體胚的能力也不相同 (Margarita and Margarita, 1991)。

- 
- 1) 國立中興大學園藝學系博士班研究生。
  - 2) 環球科技大學生物科技學系助理教授。
  - 3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

一個成功的組織培養再生系統的建立，除了培植體的選擇外，培養基的組成對植物之分化再生影響甚鉅。隨著植物種類或生長階段的不同，所需求之營養成分亦有差異，我們可以利用培養基組成或比例上改變來達成目的。一般植物組織培養的培養基內所包括的主要成分可分為：大量無機鹽類、微量元素、維生素類、碳水化合物、植物生長調節劑、其他添加物等成分 (George and Sherrington, 1984)。本研究乃針對影響小白菜組織培養再生的培植體來源及培養基內主要成分等因子，作一系列的研究探討。其目的為研發出一個小白菜組織分化再生頻度高的培養基配方，並建立一完善的小白菜組織培養再生系統。

## 材料及方法

### 一、試驗材料

本試驗以十字花科芸苔屬之小白菜(學名 *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino, 英名 Pak-choi)為試驗材料，試驗品種為'台農一號'(Tainung No. 1)與'台農二號'(Tainung No. 2)，兩個台灣所育成適合本土氣候風土之品種。將供試種子經 70%酒精 30 秒與 1%次氯酸鈉 12 分鐘之表面滅菌後，無菌播種於含有 2%蔗糖與 1%洋菜膠之 MS 基本培養基 (Murashige and Skoog, 1962) 中供試驗使用。培養條件為 25/20°C (日/夜)，光強度為 150  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，16 小時光週期。取無菌播種後第 3 天的子葉與下胚軸 (長度約 2mm) 為本試驗之材料。

### 二、試驗方法

#### (一) 供試培養基之配製

以含有 2%蔗糖與 1%洋菜膠之 MS (Murashige and Skoog, 1962) 配方做為基本培養基，參試不同無機鹽類濃度、不同生長調節劑的種類與濃度組合及其他添加物質對誘導癒傷組織的形成、不定芽之再生與根之發育生長的影響。本試驗所有培養基之 pH 值均調整為  $5.70 \pm 0.01$ ，滅菌條件為 121°C、1.2 Kg/cm<sup>2</sup>，滅菌時間 15 分鐘。

#### (二) 培養基配方之處理

##### 1. 基本無機鹽類配方處理

以 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L kinetin 為基本成分，測試：(1)全量 MS 無機鹽類與全量 MS 有機成分；(2) 1/2 量 MS 無機鹽類與全量 MS 有機成分。

##### 2. 植物生長調節劑之種類與濃度組合處理

以全量 MS 無機鹽類與全量 MS 有機成分 (即 MS) 為基本成分，測試：(1) 1mg/L 2,4-D + 1 mg/L kinetin；(2) 1 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA；(3) 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA；(4) 2 mg/L BA + 1 mg/L NAA；(5) 2 mg/L BA + 1 mg/L NAA + 0.25 mg/L GA<sub>3</sub>。

##### 3. 胺基酸類、多胺類、酪蛋白水解物或硝酸銀之添加處理

以添加 1 mg/L BA 與 0.5 mg/L NAA 之 MS 配方為基本成分，測試以下各種添加物質

之處理效果：(1) 脯胺酸 (proline) 5mg/L、(2) 色胺酸 (tryptophan) 5mg/L、(3) 酪蛋白水解物 (casein hydrolysate) 500mg/L、(4) 硝酸銀(AgNO<sub>3</sub>) 3mg/L、(5) 腐胺 (putrescine, Put) 5mg/L、(6) 亞精胺 (spermidine, Spd) 5mg/L。

### 三、試驗調查項目

本試驗於培植體培養後第 45 天分別調查下胚軸與子葉的生長情形，調查項目包括：(1) 培植體褐化的程度、(2) 癒傷組織之有無與其生長狀況、(3) 不定芽再生的狀況與芽再生率 (shoot regeneration rate)、(4) 根的發育生長狀況與根再生率(root formation rate)。

## 結 果

### 一、無機鹽類對'台農一號'及'台農二號'小白菜培植體再生之影響

將小白菜之下胚軸(長度約 2mm)與子葉培養於含有 1 mg/L 之 2,4-D 與 1 mg/L 之 kinetin 的全量 MS 有機成分(Murashige and Skoog, 1962)及全量或 1/2 量 MS 無機鹽類，以探討無機鹽類對小白菜之不同培植體再生的影響。由表 1 的結果顯示，'台農一號'小白菜培養於全量 MS 無機鹽類，在子葉與下胚軸兩種培植體上誘導癒傷組織(分別為 66.7%與 53.3%)與不定芽(分別為 13.3%與 10%)的比率均高於培養於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理(癒傷組織誘導率分別為 60%與 50%；不定芽誘導率分別為 10%與 3.3%)；但在不定根的誘導上，僅在下胚軸培養於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理有少數培植體有不定根發生。由表 2 的結果顯示，'台農二號'小白菜呈現出類似的結果。使用全量 MS 無機鹽類在子葉培植體上誘導癒傷組織(70%)與不定芽(16.7%)的比率均略優於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理(癒傷組織誘導率為 56.7%；不定芽誘導率為 6.7%)；但迨培養後 45 天，無論全量或 1/2 量 MS 無機鹽類均無法誘導子葉培植體長出不定根。而在下胚軸培植體上誘導癒傷組織的比率反而以 1/2 量 MS 無機鹽類的處理(53.3%)略優於全量 MS 無機鹽類的處理(46.7%)，但差異未達統計分析之 5%顯著水準；下胚軸培植體之不定芽誘導率在全量 MS 無機鹽類的處理與 1/2 量 MS 無機鹽類的處理效果均相同 (均為 6.7%)，但培養於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理有少數培植體有不定根發生。

由表 1 與表 2 的結果顯示，'台農一號'與'台農二號'小白菜在基本無機鹽類配方處理試驗中，無論在癒傷組織之誘導與不定芽之再生方面，均以子葉培植體之表現較優於下胚軸培植體(在 MS 與 1/2MS 兩處理均有完全相同的結果)；但在不定根之誘導方面，1/2MS 處理組 (1 mg/L 2,4-D 與 1 mg/L kinetin)之下胚軸培植體略優於子葉培植體，此結果在'台農一號'與'台農二號'小白菜均有完全相同的結果(下胚軸培植體之不定根誘導率為 3.3%，而子葉培植體之不定根誘導率為 0%)，MS 處理組(1 mg/L 2,4-D 與 1 mg/L kinetin)無論是下胚軸培植體或子葉培植體均無法誘導不定根之形成。

表 1. 無機鹽類對'台農一號'小白菜培植體再生之影響<sup>W</sup>

Table 1. Effects of inorganic salts content on the explants regeneration of Pak-choi 'Tainung No. 1'.

培養基 Medium	培植體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽梢再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
MS	60	60	40 (66.7) <sup>a,z</sup>	32 (53.3) <sup>a</sup>	8 (13.3) <sup>a</sup>	6 (10.0) <sup>a</sup>	0 (0.0)	0 (0.0)
½ MS	60	60	36 (60.0) <sup>a</sup>	30 (50.0) <sup>a</sup>	6 (10.0) <sup>a</sup>	2 (3.3) <sup>b</sup>	0 (0.0)	2 (3.3)

<sup>w</sup> 資料為培養後 45 天之數據。Data were collected after 45 days of cultivation.

<sup>x</sup> 每一處理有 60 個培植體，三重複。Sixty explants per treatment, 3 replications.

<sup>y</sup> C：子葉，H：下胚軸。C: Cotyledon, H: Hypocotyl.

<sup>z</sup> 同欄內相同英文字母表示以 Fisher's LSD test 未達 P=0.05% 的顯著水準。Means with the same letter within each column indicates no significant difference at 5% level by Fisher's LSD test.

綜合'台農一號'與'台農二號'兩品種的分析之結果，顯示在癒傷組織與不定芽之誘導以全量 MS 無機鹽類的處理稍優於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理，故以下的試驗處理均培養於全量 MS 無機鹽類與全量 MS 有機成分的 MS 基本配方中。

## 二、植物生長調節劑對'台農一號'及'台農二號'小白菜培植體再生之影響

將小白菜之下胚軸(長度約 2mm)與子葉培養於含有全量 MS 無機鹽類與全量 MS 有機成分的 MS 基本配方的培養基中，植物生長調節劑之種類與濃度組合處理共有 5 種：(1) 1mg/L 2,4-D +1 mg/L kinetin；(2) 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA；(3) 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA；(4) 2 mg/L BA+1 mg/L NAA；(5) 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub>。

由表 3 與表 4 的結果顯示植物生長調節劑之種類與濃度組合處理對誘導'台農一號'與'台農二號'小白菜培植體癒傷組織形成的結果相似，均以添加 1mg/L 2,4-D 與 1 mg/L kinetin 的處理組合可達到最高的癒傷組織誘導率(子葉及下胚軸之平均約為：'台農一號' 70%，'台農二號' 71.7%)；其他四個生長調節劑之組合的癒傷組織誘導率均低於 40% 以下(子葉及下胚軸之平均)，其中以 2 mg/L BA+1 mg/L NAA 之處理次之(子葉及下胚軸之平

均約為：'台農一號' 36.7%，'台農二號' 16.7%)；添加 0.25 mg/L 之 GA<sub>3</sub> 反而會稍微降低癒傷組織的誘導率；五個處理中以 2 mg/L BA +0.5 mg/L NAA 之癒傷組織的誘導率最低，兩品種均在 4% 以下。

表 2. 無機鹽類對'台農二號'小白菜培植體再生之影響<sup>w</sup>

Table 2. Effects of inorganic salts content on the explants regeneration of Pak-choi 'Tainung No. 2'.

培養基 Medium	培植體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽梢再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
MS	60	60	42 (70.0)	28 (46.7)	10 (16.7) <sup>a z</sup>	4 (6.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
½ MS	60	60	34 (56.7)	32 (53.3)	4 (6.7) <sup>b</sup>	4 (6.7)	0 (0.0)	2 (3.3)

<sup>w, x, y, z</sup>：如表 1 所述。

<sup>w, x, y, z</sup>：The same as indicated in Table 1.

在芽的誘導方面，以 1mg/L 2,4-D +1 mg/L kinetin 之處理的不定芽再生率最低(子葉及下胚軸之平均約為：'台農一號' 11.7%，'台農二號' 21.7%)；而 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA、2 mg/L BA+1 mg/L NAA 與 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 三個處理較高(約為 43.3%~61.7%)，其中'台農一號' 以 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 處理之不定芽再生率最高，為 51.7%；但'台農二號'則以 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 處理為最高，達 61.7%。

在芽的誘導方面，兩品種均以 0.5 mg/L NAA 搭配 1~2 mg/L BA 的兩處理之發根率最高，達 38.3%~55%。2 mg/L BA+1 mg/L NAA 的處理之發根率反而較低(分別為'台農一號' 20%，'台農二號' 28.3%)；添加 GA<sub>3</sub> 會使兩品種的發根率更為降低，所有處理中以 1mg/L 2,4-D +1 mg/L kinetin 之處理的發根率最低(兩品種的發根率均為 0%)。

試驗結果顯示，5 個植物生長調節劑之種類與濃度組合處理中，在癒傷組織之誘導方面，子葉培植體均優於下胚軸培植體，僅在'台農一號'之 1mg/L 2,4-D +1 mg/L kinetin 處理組與'台農二號'2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 處理組中，下胚軸培植體之癒傷組織誘導率略優

表 3. 植物生長調節劑對'台農一號'小白菜殖體再生之影響<sup>w</sup>  
 Table 3. Effects of plant growth regulators on the explants regeneration of 'Pak-choi' Tainung No. 1'.

生長調節劑 Plant Growth Regulators	培植體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽樹再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
2,4-DI + KNI	60	60	40 (66.7)	34 (73.3)	8 (13.3) <sup>z</sup>	6 (10.0) <sup>c</sup>	0 (0.0) <sup>c</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>
BA1 + NAA0.5	60	60	30 (50.0)	0 (0.0)	32 (53.3) <sup>ab</sup>	26 (43.3) <sup>a</sup>	30 (50.0) <sup>a</sup>	36 (60.0) <sup>a</sup>
BA2 + NAA0.5	60	60	2 (3.3)	0 (0.0)	20 (33.3) <sup>b</sup>	16 (26.7) <sup>b</sup>	26 (43.3) <sup>ab</sup>	26 (43.3) <sup>b</sup>
BA2 + NAA1	60	60	24 (40.0)	20 (33.3)	30 (50.0) <sup>ab</sup>	22 (36.7) <sup>ab</sup>	10 (16.7) <sup>b</sup>	14 (23.3) <sup>c</sup>
BA2 + NAA1 + GA0.25	60	60	22 (36.7)	20 (33.3)	36 (60.0) <sup>a</sup>	26 (43.3) <sup>a</sup>	6 (10.0) <sup>bc</sup>	2 (3.3) <sup>d</sup>

<sup>w, x, y, z</sup> : 如表 1 所述。

<sup>w, x, y, z</sup> : The same as indicated in Table 1.

表 4. 植物生長調節劑對'台農二號'小白菜培養體再生之影響<sup>w</sup>

Table 4. Effects of plant growth regulators on the explants regeneration of Pak-choi 'Tainung No. 2'.

生長調節劑 Plant Growth Regulators	培養體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽樹再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
2,4-D1 + KN1	60	60	48 (80.0)	38 (63.3)	14 (23.3) <sup>z</sup>	12 (20.0) <sup>c</sup>	0 (0.0) <sup>e</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>
BA1 + NAA0.5	60	60	12 (20.0)	6 (10.0)	40 (66.7) <sup>a</sup>	34 (56.7) <sup>a</sup>	32 (53.3) <sup>a</sup>	26 (43.3) <sup>a</sup>
BA2 + NAA0.5	60	60	0 (0.0)	4 (6.7)	32 (53.3) <sup>b</sup>	28 (46.7) <sup>b</sup>	26 (43.3) <sup>b</sup>	20 (33.3) <sup>b</sup>
BA2 + NAA1	60	60	14 (23.3)	6 (10.0)	38 (63.3) <sup>a</sup>	24 (40.0) <sup>b</sup>	20 (33.3) <sup>c</sup>	14 (23.3) <sup>c</sup>
BA2 + NAA1 + GA0.25	60	60	10 (16.7)	8 (13.3)	40 (66.7) <sup>a</sup>	26 (43.3) <sup>b</sup>	14 (23.3) <sup>d</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>

<sup>w, x, y, z</sup> : 如表 1 所述。

<sup>w, x, y, z</sup> : The same as indicated in Table 1.

於子葉培植體；不定芽之再生，在'台農一號'與'台農二號'小白菜均有完全相同的結果，即子葉培植體均顯著優於下胚軸培植體('台農一號'子葉培植體之不定芽再生率比下胚軸培植體之不定芽再生率高約 3~16%；'台農二號'更高約 7~23%)；在不定根之誘導方面，'台農二號'顯示子葉培植體之發根率優於下胚軸培植體，但'台農一號'卻顯示下胚軸培植體之發根率略優於子葉培植體(僅在 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 處理組稍有例外)。

綜合'台農一號'與'台農二號'兩品種的表現結果，顯示若欲誘導癒傷組織，則須選擇 1mg/L 2,4-D 與 1 mg/L kinetin 之植物生長調節劑組合處理；若欲誘導不定芽之再生與不定根之形成，則以 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 組合最佳，此結果在'台農一號'與'台農二號'兩品種均有相同的效果；其次為 2 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 之處理，不定芽之再生與不定根之形成均佳；而 2 mg/L BA+1 mg/L NAA 組合之不定芽再生率佳，但發根率稍差；2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 之不定芽芽再生率佳，但發根率極差。本研究以下的試驗處理均將培植體培養於添加 1 mg/L BA 與 0.5 mg/L NAA 之 MS 基本配方中，以誘導不定芽之再生與不定根之形成。

### 三、胺基酸類、多胺類、酪蛋白水解物及硝酸銀對'台農一號'及'台農二號'小白菜培植體再生之影響

將小白菜之下胚軸(長度約 2mm)與子葉培養於添加 1 mg/L BA 與 0.5 mg/L NAA 之 MS 基本配方中，其他添加物質之處理共有 6 種：(1) 脯胺酸 (proline) 5mg/L、(2) 色胺酸 (tryptophan) 5mg/L、(3) 酪蛋白水解物 (casein hydrolysate) 500mg/L、(4) 硝酸銀(AgNO<sub>3</sub>) 3mg/L、(5) 腐胺 (putrescine, Put) 5mg/L、(6) 亞精胺 (spermidine, Spd) 5mg/L。

由表 5 與表 6 的結果顯示，'台農一號'與'台農二號'小白菜在培養基中添加酪蛋白水解物，可使癒傷組織之誘導率達到 31.7%~33.3% (子葉及下胚軸之平均)，為 6 種處理中最高者，而其誘導不定芽之再生與不定根之形成的效果亦不錯 (子葉及下胚軸之不定芽再生率的平均約為：'台農一號'與 '台農二號'均為 43.3%；子葉及下胚軸之不定根誘導率的平均約為：'台農一號' 33.3%，'台農二號' 68.3%)。但是不定芽與不定根之分化再生過程中，若有癒傷組織之出現，易使再生幼苗之移植成活率降低。其他 5 種添加物質處理，其對不定芽與不定根之分化再生效果相近，子葉及下胚軸之不定芽再生率的平均約為：'台農一號'為 40%~58.3%，'台農二號' 36.7%~60%；子葉及下胚軸之不定根分化率的平均約為：'台農一號'為 43.3%~71.7%，'台農二號'為 40%~81.7%。其他五個處理中以脯胺酸(5mg/L)效果較差，腐胺(5mg/L) 與亞精胺(5mg/L)效果最好，也最相近，若配合使用子葉培植體，其不定芽再生率可達到 66.7%~70%，不定根分化率在'台農一號'可達到 71.7%，'台農二號'在腐胺(5mg/L)處理可高達 81.7%，亞精胺(5mg/L)處理亦高達 75%。而硝酸銀(3mg/L)之處理亦可提高不定芽再生率，硝酸銀可提高'台農一號'不定芽再生率約為 10%，但對'台農二號'則無明顯提高之效果。

試驗結果顯示，'台農一號'與'台農二號'小白菜在 6 種添加物質之處理中，其不定芽再生率均以子葉培植體較下胚軸培植體為高 ('台農一號'約為 16.7~30%；'台農二號'約為



表 5. 胺基酸類、多胺類、酪蛋白水解物及酪氨酸對'台農一號'小白菜培養體再生之影響<sup>w</sup>

Table 5. Effects of amino acids, polyamines, casein hydrolysate, and silver nitrate on the explants regeneration of Pak-choi 'Tainung No. 1'.

添加物質 Additives	培養體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽梢再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
脯氨酸 (Proline)	60	60	4 (6.7)	2 (3.3)	32 (53.3) <sup>b</sup>	16 (26.7) <sup>bc</sup>	28 (46.7) <sup>c</sup>	24 (40.0) <sup>b</sup>
色氨酸 (Tryptophan)	60	60	4 (6.7)	0 (0.0)	36 (60.0) <sup>ab</sup>	28 (46.7) <sup>ab</sup>	40 (66.7) <sup>b</sup>	36 (60.0) <sup>ab</sup>
酪蛋白水解物 (Casein hydrolysate)	60	60	22 (36.7)	18 (30.0)	32 (53.3) <sup>b</sup>	20 (33.3) <sup>b</sup>	18 (30.0) <sup>d</sup>	22 (36.7) <sup>bc</sup>
硝酸銀 (AgNO <sub>3</sub> )	60	60	2 (3.3)	6 (10.0)	38 (63.3) <sup>a</sup>	26 (43.3) <sup>ab</sup>	30 (50.0) <sup>c</sup>	26 (43.3) <sup>b</sup>
腐胺 (Putricine)	60	60	0 (0.0)	0 (0.0)	40 (66.7) <sup>a</sup>	30 (50.0) <sup>a</sup>	48 (80.0) <sup>a</sup>	38 (63.3) <sup>a</sup>
亞精胺 (Spermidine)	60	60	0 (0.0)	0 (0.0)	40 (66.7) <sup>a</sup>	26 (43.3) <sup>ab</sup>	46 (76.7) <sup>a</sup>	40 (66.7) <sup>a</sup>

<sup>w, x, y, z</sup> : 如表 1 所述。

<sup>w, x, y, z</sup> : The same as indicated in Table 1.

表 6. 胺基酸類、多胺類、酪蛋白水解物及酪氨酸對'台農二號'小白菜培養體再生之影響<sup>w</sup>  
 Table 6. Effects of amino acids, polyamines, casein hydrolysate, and silver nitrate on the explants regeneration of Pak-choi 'Tainung No. 2.'

添加物質 Additives	培養體數目 <sup>x</sup> Explants		癒傷組織數目 Callus Induced (%)		芽梢再生數目 Shoot Regeneration (%)		不定根數目 Root Formation (%)	
	C <sup>y</sup>	H <sup>y</sup>	C	H	C	H	C	H
脯氨酸 (Proline)	60	60	8 (13.3)	0 (0.0)	24 (40.0) <sup>z</sup>	20 (33.3) <sup>bc</sup>	32 (53.3) <sup>b</sup>	24 (40.0) <sup>c</sup>
色氨酸 (Tryptophan)	60	60	10 (16.7)	4 (6.7)	34 (56.7) <sup>b</sup>	28 (46.7) <sup>ab</sup>	26 (43.3) <sup>bc</sup>	36 (60.0) <sup>b</sup>
酪蛋白水解物 (Casein hydrolysate)	60	60	20 (33.3)	18 (30.0)	28 (46.7) <sup>bc</sup>	24 (40.0) <sup>b</sup>	44 (73.3) <sup>ab</sup>	38 (63.3) <sup>b</sup>
硝酸銀 (AgNO <sub>3</sub> )	60	60	12 (20.0)	4 (6.7)	38 (63.3) <sup>ab</sup>	32 (53.3) <sup>a</sup>	28 (46.7) <sup>bc</sup>	20 (33.3) <sup>cd</sup>
腐胺 (Putricine)	60	60	6 (10.0)	2 (3.3)	42 (70.0) <sup>a</sup>	30 (50.0) <sup>a</sup>	52 (86.7) <sup>a</sup>	46 (76.8) <sup>a</sup>
亞精胺 (Spermidine)	60	60	0 (0.0)	4 (6.7)	42 (70.0) <sup>a</sup>	30 (50.0) <sup>a</sup>	52 (86.7) <sup>a</sup>	38 (63.3) <sup>b</sup>

<sup>w, x, y, z</sup> : 如表 1 所述。

<sup>w, x, y, z</sup> : The same as indicated in Table 1.

6.7~20%)，不定根之誘導率亦以子葉培植體為高。綜合'台農一號'與'台農二號'兩品種的分析結果，顯示子葉培植體在癒傷組織之誘導、不定芽之再生與不定根之誘導上均較下胚軸培植體為佳。

綜觀本試驗之小白菜之培植體，無論是以下胚軸(圖 1A)或子葉(圖 1B)為材料，均能誘導出癒傷組織或不定根(圖 1C)，再依循分化出芽原體(圖 1D)，抽出芽梢(圖 1E)，生長出不定芽及根(圖 1F)，形成再生植株(圖 1G)等過程；亦即經由「器官形成再生路徑」(organogenesis pathway)，而再生成植株。但若在再生培養基中添加多胺類，例如腐胺或亞精胺，會使得誘導癒傷組織的比率降低，無論在下胚軸(圖 2A)或子葉(圖 2B) 培植體，均能誘導出胚狀體；而此胚狀體亦可經由誘導再生長出芽梢及根(圖 2C)，形成再生植株(圖 2D)；此即經由「體細胞胚胎發生再生途徑」(somatic embryogenesis pathway)，而再生成植株。

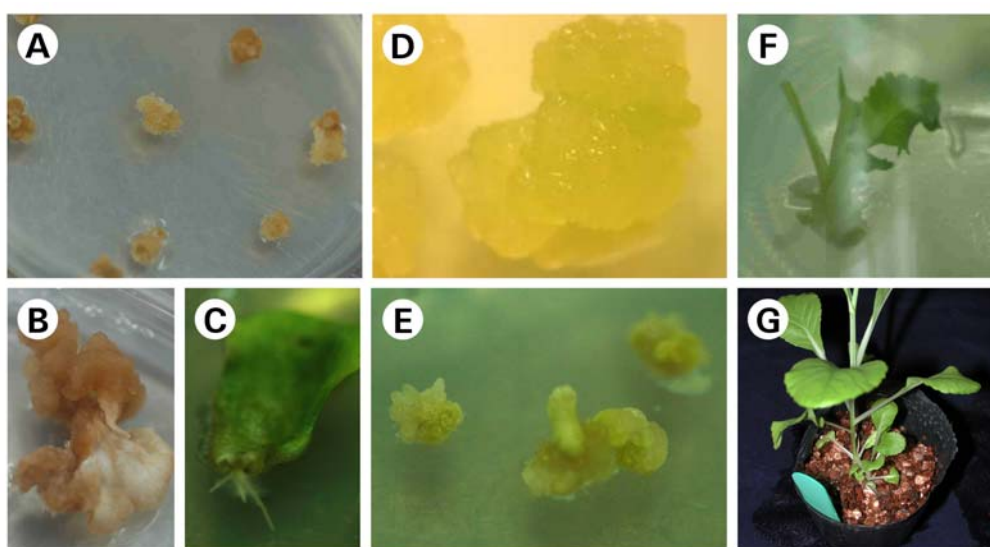


圖 1. 小白菜培植體經由「器官形成再生途徑」之過程。A：小白菜下胚軸誘導出癒傷組織。B：子葉誘導出癒傷組織。C：子葉誘導出不定根。D：癒傷組織分化出芽原體。E：芽原體抽出芽梢。F：長出不定芽及根。G：移到栽培盆中成長成株。

Fig. 1. *In vitro* regeneration of Pak-choi explants via organogenesis pathway. A: Calli were induced from hypocotyls. B: Calli were induced from cotyledons. C: Adventitious roots were regenerated from cotyledons. D: Formation of shoot primordium from calli. E: Shoots emerged from shoot primordium. F: Growth of adventitious shoots and roots. G. Regenerated Pak-choi plants.

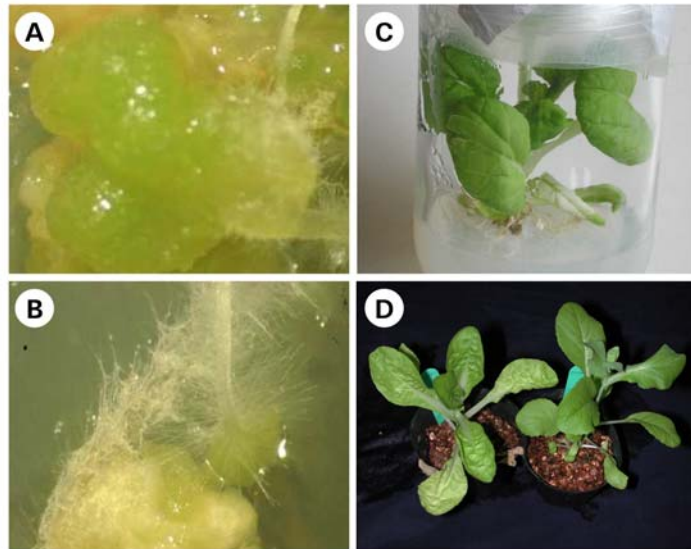


圖 2. 小白菜培植體經由「體細胞胚胎發生再生途徑」之過程。A：小白菜下胚軸誘導出胚狀體。B：子葉誘導出胚狀體。C：分化成再生瓶苗。D：移到栽培盆中成長成株。

Fig. 2. *In vitro* regeneration of Pak-choi explants via somatic embryogenesis pathway. A: Somatic embryos were induced from hypocotyls. B: Somatic embryos were induced from cotyledons. C: Formation of regenerated. D. Regenerated Pak-choi plants.

## 討 論

Cai 等人 (1997) 以‘矮腳黃’與‘蘇州青’兩個品種的小白菜作為試驗材料，而以子葉、子葉柄與葉片做為培植體成功進行農桿菌基因轉殖試驗。尤等 (1996) 研究蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉移到青花菜、花椰菜及小白菜之試驗係取用無菌播種後 5 天的子葉及下胚軸為培植體。通常大白菜、青菜以子葉外植體誘導不定芽的頻率較高 (蔡, 1997; 張, 1998; 王, 1999; 蔡, 1999; 蔡, 2003)，甘藍、花菜、青花菜一般以下胚軸誘導不定芽的頻率較高(方, 1997; 李, 1999; 蔡, 2003; Ding *et al*, 1998)，而培植體的苗齡通常以 4-8 天較為適宜 (蔡, 2003)。本試驗結果顯示：無論在癒傷組織之誘導與不定芽之再生方面，均以子葉培植體之表現優於下胚軸培植體，但在不定根之誘導方面，下胚軸培植體略優於子葉培植體，此結果在‘台農一號’與‘台農二號’小白菜均有相同的結果。

在本試驗之基本無機鹽類配方處理中，顯示出‘台農一號’與‘台農二號’小白菜在不定根的誘導上表現相同的結果，亦即 1/2 量 MS 無機鹽類的處理略優於全量 MS 無機鹽類的處

理。在子葉培植體之癒傷組織的誘導與不定芽的分化再生方面，呈現與不定根的誘導完全相反的結果，即兩品種均顯示出全量 MS 無機鹽類的處理均優於 1/2 量 MS 無機鹽類的處理；而在下胚軸培植體誘導癒傷組織與不定芽分化再生方面，兩品種有完全相異的結果，由此顯示品種的差異性影響組織培養分化再生。此與器官分化形成的控制因子係與培養基內 auxins 及 cytokinins 間含量之比值有關(George and Sherrington, 1984; 高, 1987b; George, 1993)。

甘藍、花椰菜與青花菜等 *oleracea* 種的不定芽誘導較 *campestris* 種來得容易 (蔡, 2003)，通常在培養基中添加 IAA、NAA、IBA 等 auxins 並配合 cytokinins 之 BA、zeatin，即可獲得較高的植株再生率 (李, 1999; 方, 1997)。結球白菜與小白菜的不定芽誘導較為困難，這是由於遺傳上的 A 組染色體所決定的(蔡, 2003)。在中國，以往研究使用較傳統的 adenine，以致結球白菜與小白菜的再生頗為困難。蔡 (1997, 1999) 改用氯吡苯脲 (forchlorfenuron, CPPU) 使結球白菜與小白菜之不定芽誘導率明顯提高；王(1999)在小白菜的組織培養中使用 TDZ 以代替其他 cytokinins，同樣達到較好的效果。

在本試驗中，'台農一號'與'台農二號'小白菜在植物生長調節劑之種類與濃度組合處理的結果相似，均在添加 1mg/L 2,4-D 與 1 mg/L kinetin 的處理組合可達到最高的癒傷組織誘導率，此結果完全符合高濃度的 auxin 可促進癒傷組織的形成之定論。培養基內 auxin 及 cytokinin 間含量之比值對兩個品種小白菜不定芽的誘導均以 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA、2 mg/L BA+1 mg/L NAA 與 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 三個處理較高，顯示在 cytokinin / auxin=2 的比值最有利於小白菜不定芽的再生，此結果完全符合 auxin/cytokinin < 1 的比值會誘使癒傷組織形成芽體，是故將高濃度的 cytokinin (1~2 mg/L BA 或 kinetin) 配合少量的 auxin (0.5~1 mg/L NAA) 可誘導小白菜不定芽的形成。

然而在不定根的誘導方面，兩品種均以 0.5 mg/L NAA 搭配 1~2 mg/L BA 的兩處理之發根率最高，2 mg/L BA+1 mg/L NAA 的處理之發根率反而較低，此結果可能係因 2 mg/L BA+1 mg/L NAA 的處理之 cytokinin 濃度較高所致。而小白菜在 cytokinin / auxin=2~4 的比值條件下發根特別良好，此結果與蔡 (1997, 1999) 及王 (1999) 有異曲同工之效，蔡 (1997, 1999) 及王 (1999) 分別使用 CPPU (forchlorfenuron) 與 TDZ 兩種 cytokinins 即可使小白菜之不定芽誘導率明顯提高，而且兼具發根良好的效果。雖然此兩篇文獻並未提及其原因，本研究推測可能係小白菜的內生 auxins 含量較高所致。至於添加 GA<sub>3</sub> 於小白菜組織培養之培養基中，本試驗顯示添加 GA<sub>3</sub> 會降低癒傷組織的誘導率，且使兩品種的發根率稍微降低；但在不定芽的誘導方面，'台農一號'以 2 mg/L BA+1 mg/L NAA+0.25 mg/L GA<sub>3</sub> 處理之不定芽再生率最高，'台農二號'則以 1 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 處理為最高。綜合以上之結果，可知雖則 GA<sub>3</sub> 會降低癒傷組織的誘導率，但添加 GA<sub>3</sub> 可提高'台農一號'小白菜之不定芽再生率，但對'台農二號'則無明顯的效果，由此結果可推測係兩品種之差異性所使然。

許多研究報告報導在培養基中添加硝酸銀(AgNO<sub>3</sub>)，可吸收培植體在培養過程中釋放

的乙烯，因而減少組織褐化，增加不定芽再生。在蕓苔屬的許多蔬菜作物，再生培養基中添加硝酸銀確實可改善培植體再生(蔡, 2003; 曾與劉, 2004)。蔡 (2003) 指出結球白菜組織培養較難獲得再生植株與其培植體在培養過程中產生大量乙烯有關，銀離子( $\text{Ag}^+$ )可競爭性結合乙烯受體，而消除乙烯對不定芽形態發生之抑制作用，進而提高組織培養再生不定芽的誘導率。在本試驗中， $\text{AgNO}_3$ 可提高'台農一號'不定芽再生率約 10%，但對'台農二號'則無明顯提高之效果，此結果顯示'台農一號'小白菜在組織培養過程中較易產生乙烯，是故添加  $\text{AgNO}_3$  則可提高不定芽之再生率，而'台農二號'小白菜較不易產生乙烯或對於乙烯之抑制作用具有緩解之效果。

在植物組織培養過程中，為了提高培植體的分化再生能力，常在培養基中添加多胺類，此係目前已有許多證據認為多胺類與植物之生長與分化有密切的關係，可促進細胞分裂(高, 1987a; 高, 1987b; George, 1993)。本研究之小白菜再生培養基試驗結果顯示：腐胺與亞精胺兩種多胺類對小白菜之不定芽再生具有極明顯的促進效果，若配合使用子葉培植體，其不定芽再生率可達到 66.7%~70%，不定根分化率在'台農一號'可達到 71.7%，'台農二號'在腐胺 5mg/L 處理可高達 81.7%，亞精胺 5mg/L 處理亦高達 75%。本研究同時發現一般小白菜的下胚軸或子葉培植體是經由「器官形成再生路徑」(organogenesis pathway)，而再生成植株；但若在再生培養基中添加多胺類，則小白菜培植體，會經由「體細胞胚胎發生再生途徑」(somatic embryogenesis pathway)，而再生成植株；此與多胺類與胚之形成有關的理論相符合。

在本試驗中添加 500mg/L 酪蛋白水解物可使癒傷組織之誘導率達到 31.7% ~ 33.3%，為 6 種處理中最高者，而其誘導不定芽之再生與不定根之形成亦不差，但因不定芽與不定根之分化再生過程中，若有癒傷組織之出現，易使再生幼苗之移植成活率降低，因此在本研究之後續試驗的再生培養基中並未添加酪蛋白水解物。

朱 (2003) 研究不同的培植體部位與不同種類濃度之生長調節劑的比例，提出一個結球白菜組織培養再生頻度較高的培養基配方為含有 2% 蔗糖之 MS 基本鹽類與維生素類(其中之  $\text{NH}_4^+$  降低為 1/2 濃度)，並添加 2 mg/L BA、0.45 mg/L NAA、7.5 mg/L  $\text{AgNO}_3$  與 80 ml/l 椰子汁，可大幅提高結球白菜之再生率達到 84.8% 以上。此研究所使用之培植體為子葉—子葉柄，使用以上之培養基配方可在培養第 6 天即可分化出不定芽，再經過 40-50 天即可移出健化，再生植株之移植成活率可達 95% 以上。

綜合以上本研究所有培養基成分測試因子，歸納不定芽再生與不定根形成之結果，已為'台農一號'與'台農二號'小白菜找出一個最佳再生培養基之配方——即含有 1 mg/L BA、0.5 mg/L NAA、0.25mg/L  $\text{GA}_3$ 、3mg/L  $\text{AgNO}_3$  與 5mg/L putrescine 之 2% sucrose 的 MS 基本鹽類與有機成分配方。此結果與 Cai 等 (1997) 之小白菜不定芽再生之培養基配方完全相異，追究其原因，係因兩研究所使用之試驗材料(試驗品種)完全不同所致，Cai 等 (1997) 使用中國之地方品種'矮腳黃'與'蘇州青'兩品種的小白菜，而本試驗則使用台灣本地育成之'台農一號'與'台農二號'小白菜。

## 參 考 文 獻

- 尤進欽、曾夢蛟、陳良築。1996。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因轉移到青花菜、花椰菜及小白菜。中國園藝 42(4):312-330。
- 方紅筠。1997。轉豇豆胰蛋白酶抑制劑基因抗蟲甘藍植株的獲得。植物學報 39(10):940-945。
- 王凌健。1999。青菜組織培養和轉化系統的初步建立。實驗生物學報 32(1):93-95。
- 朱祝軍。2003。芸薹屬植物高效再生體系的建立。中國農業科學 2(11): 1239-1245。
- 李國梁。1999。青花菜子葉和下胚軸原生質體的遺傳轉化系統。上海農業學報 15(1):28-32。
- 高景輝。1987a。植物荷爾蒙。華香園出版社。586 頁。
- 高景輝。1987b。植物生長與分化。國立編譯館。731 頁。
- 張智奇。1998。小白菜子葉誘導不定芽再生植株。上海農業學報 14(2):25-28。
- 曾夢蛟、劉程煒。2004。甘藍之基因轉殖技術。植物基因轉殖與分子檢測技術—第二章：十字花科作物—第三節:p.75-89。植物生物技術教學資源中心主編。
- 蔡小寧。1997。建立青菜農桿菌介導法基因轉化體系。江蘇農業學報 13(2):110-114。
- 蔡小寧。1999。影響大白菜離體再生和基因轉化的因素。江蘇農業學報 20(2):1-4。
- 蔡小寧。2003。芸苔屬蔬菜轉基因研究新進展。江蘇農業學報專文。共 6 頁。
- Cai, X. N., J. M. She, Z. Zhu, W. M. Zhu, X. H. Yuan and X. J. Su. 1997. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of common Chinese cabbage (*Brassica chinensis*). Jiangsu Journal of Agricultural Science 13(2):110-114.
- Ding. 1998. Development of insect-resistant transgenic cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato. Plant Cell Report 17:854-860.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part I & II (2<sup>nd</sup> Ed.) pp.1361. Exegetics Ltd., Wilts, England.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. In: Handbook and Dictionary of Commercial Laboratories. pp.125-330. Eastern Press, Reading, Berks. England.
- Lowe, K. C., M. R. Davey and J. B. Power. 1996. Plant tissue culture: past, present and future. Plant Tissue Culture and Biotechnology 2(4):175-186.
- Margarita, C. and M. Margarita. 1991. Morphogenesis in leaf, hypocotyls and explants of *Digitalis thapsi* L. cultured in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 25:117-123.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

## Establishing *In Vitro* Tissue Regeneration System of Pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino)

Jia-Yan Hsu <sup>1)</sup>    You-Ming Chang <sup>2)</sup>    Menq-Jiau Tseng <sup>3)</sup>

Key words: Pak-cho, *In vitro* tissue regeneration, Organogenesis, Somatic embryogenesis

### Summary

The sources of explants of Pak-choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* L. Makino) and the components of culture medium were studied to develop a tissue culture system for Pak-choi. The results indicated that the MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 2% sucrose, 1 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA, 0.25mg/L GA<sub>3</sub>, 3mg/L AgNO<sub>3</sub> and 5mg/L putrescine was the best components of culture medium for the explants regeneration of 'Tainung no. 1' and 'Tainung no. 2' Pak-choi, and 66.7% to 70% of regeneration rate could be achieved. Higher regeneration rates were obtained from the explants derived from the cotyledons than those of from hypocotyls. In general, calli were first regenerated from the explants of Pak-choi, and then adventitious shoots and roots were regenerated on the regeneration medium subsequently, i.e. *via* "organogenesis pathway". However, embryoids rather than calli were regenerated on the regeneration medium supplemented with polyamines (e.g. putrescine or spermidine), i.e. *via* "somatic embryogenesis pathway".

---

1) Graduate student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University..

2) Associate Professor, Department of Biotechnology, TransWorld University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.