

CPPU對盤固草A254未成熟花穗誘導癒合組織形成及植株再生之影響⁽¹⁾

施意敏^{(2) (5)} 廖成康⁽³⁾ 盧虎生⁽⁴⁾ 朱鈞⁽⁴⁾

收件日期：96年3月5日；接受日期：96年4月20日

摘要

本試驗以盤固草A254 (*Digitaria decumbens*) 未成熟花穗為培植體，接種於含有2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) 及CPPU (N- (2-chloro-4-pyridyl) -N'-phenylurea) 的MS (Murashige and Skoog) 培養基，探討CPPU 對盤固草A254癒合組織形態及癒合組織誘導率之影響。在含有2,4-D 2.0 mg/l的MS培養基，隨著CPPU濃度由0.0 mg/l增加至0.5 mg/l，白色緊密癒合組織的誘導率由13.4%增加至90.0%，CPPU顯著影響誘導的癒合組織形態。將不同型態的癒合組織，接種至含有TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea) 0.05 mg/l的MS培養基，其中2,4-D 2 mg/l 及CPPU 0.1 mg/l誘導的白色緊密癒合組織有80.0%可分化成完整植株，而透明鬆軟的癒合組織甚少植株的分化。因此，CPPU與白色緊密癒合組織的形成具有密切的關係，而癒合組織的型態往往決定盤固草植株的再生能力，未來可應用此盤固草植株再生系統進行基因轉殖之研究。

關鍵詞：植株再生、癒合組織形態、盤固草。

緒言

盤固草A254 (*Digitaria decumbens*) 為台灣地區栽培面積最廣的禾本科牧草，可青刈、調製成乾草、半乾青貯草、青貯草（陳等，1994），深具營養價值與可消化物質，為乳牛重要的飼料來源之一（卜等，1993；李等，1991；施等，1997；施及廖，2000）。由於盤固草A254花粉發育不完全（成，1984；成，1986），無法以傳統雜交育種法進行品種改良。長久以來，僅以走莖進行無性繁殖，缺乏族群遺傳變異，一旦遭受病蟲害侵襲，將危及台灣地區牧草的生產。因此，如何引進新的遺傳物質，增加盤固草A254遺傳變異性，以作為品種改良之基石為目前當務之急。

植物組織培養技術在農業上的應用，包括利用植物生長點培養，生產無病毒苗，體細胞變異（somatic variation）的選拔，以未成熟胚培養克服種間或屬間雜交不和合性，花藥培養生產單倍

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1362號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 國立嘉義大學農藝系。

(4) 國立台灣大學農藝系。

(5) 通訊作者，E-mail：emshy@mail.tlri.gov.tw。

體或超雄株多倍體的應用，原生質體培養進行細胞質融合，或細胞懸浮培養生產二次代謝產物等，植物組織培養技術應用於作物品種改良，已有許多成功的例證（蔡，1992；林等，1996）。隨著生物科技基因轉殖技術的進步，以基因鎗轟擊或農桿菌感染方式，將外源基因導入植物體，進行耐寒性、抗除草劑等品種改良（Gao *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2005a; Hu *et al.*, 2005b; Smith *et al.*, 2002），或醫藥用蛋白質的生產等，亦有諸多報導（Horn *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Gomord *et al.*, 2005），唯基因轉殖技術之應用，其前提必須建立具高分化能力之組織培養系統（Lin and Zhang, 2005）。

不論是傳統的品種改良，如原生質體融合、懸浮細胞誘變處理或新興科技植物基因轉殖等，皆以組織培養系統之建立為首要工作。植物的組織培養較動物組織更容易進行，主要是植物細胞具細胞全能性（cell totipotency）。在適當植物生長調節劑的刺激下，細胞可經由器官分化（organogenesis）或體胚分化（somatic embryogenesis）途徑，再生成完整植株，端賴細胞分裂素（cytokinin）與植物生長素（auxin）之間的拮抗作用而定。一般而言，細胞分裂素促進植株地上部的發育，而細胞分裂素與植物生長素的比值較低，即植物生長素含量較高時則促進植株地下根部的發育。

人工合成的植物生長素如2,4-D（2,4-dichlorophenoxyacetic acid），常用於維持懸浮細胞生長（Fereol *et al.*, 2005）或誘導胚性細胞的產生（Eisa *et al.*, 2005）。細胞分裂素可分為二大類，自然界存在的細胞分裂素以 adenine 衍生物為主，如KN（kinetin）、BA（6-benzylaminopurine）、ZR（zeatin riboside）、2-ip（6-（ γ , γ -dimethylallyl-amino）purine riboside）等。另一類為人工合成的細胞分裂素，以phenylurea衍生物為主，如TDZ（N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea）、CPPU（N-（2-chloro-4-pyridyl）-N'-phenylurea）、PBU（N-phenyl-N'-benzothiazol-6-ylurea）（Carra *et al.*, 2006）。其中，TDZ具很高的穩定性，添加在培養基中，可誘導未成熟花穗（Velcheva *et al.*, 2005）、葉片（Guo *et al.*, 2005）或上胚軸（Uranbey, 2005）直接形成不定芽並再生成植株，其效果較BA、CPPU、KN佳（Guo *et al.*, 2005）。TDZ亦常用於促進體胚的萌芽，促進植株再生（Ipekci and Gozukirmizi, 2003; Rashid, 2002）。

盤固草組織培養系統之建立，早期以盤固草未成熟花穗（成，1984）或莖節（成及羅，1987）為培植體，接種於含有2,4-D + KN的培養基，可誘導體胚的形成，並再生成植株。不同品系間以盤固草A254體胚誘導率（53.5 %）及植株再生率（49.6 %）最高（成及羅，1987）。為建立更有效率之組織培養系統，提高盤固草A254體胚形成率及植株再生率。本試驗以人工合成的細胞分裂素CPPU、TDZ及植物生長素2,4-D為主要生長調節劑，探討CPPU、2,4-D及TDZ對誘導盤固草A254未成熟花穗形成癒合組織之影響，及不同型態癒合組織對植株再生率之影響。

材料與方法

I. 試驗材料

盤固草A254（*Digitaria decumbens*），取自行政院農委會畜產試驗所新竹分所的牧草區，其栽培管理依一般慣行法。自田間採集孕穗期之盤固草，攜回實驗室，剪去多餘的葉片，留下劍葉、第一葉及葉鞘包覆的未成熟花穗，以70%酒精進行植體表面消毒。於無菌操作台取出未成熟花穗，放入滅菌過之三角瓶，加入0.5%次氯酸鈉及1~2滴界面活性劑Tween 20，浸泡消毒15分鐘，以無菌水連續沖洗5~6次。將未成熟花穗取出，接種於供試培養基，以誘導體胚癒合組織的形成。

II. 癒合組織的誘導

誘導癒合組織形成的培養基為含有2,4-D (2 mg/l) 及CPPU (0、0.05、0.1、0.5、1 mg/l) 的MS培養基 (Murashige and Skoog, 1962)，添加3%蔗糖及0.3%水晶洋菜 (Gelrite, Sigma[®])。滅菌前，先調整培養基pH值5.7~5.8，以121℃及102 kpa 壓力，進行滅菌15分鐘。待培養基稍冷卻後，倒入直徑90 mm高15 mm滅菌過的塑膠培養皿，每個培養皿約25 ml，待培養基凝固後以塑膠封口膜密封。

將消毒過的未成熟花穗，接種於上述癒合組織誘導培養基，每個培養皿接5~6個未成熟花穗，穗長約4~6 cm。於25±1℃，無光照下培養三週，調查白色緊密癒合組織及透明鬆軟癒合組織的誘導率。

III. 癒合組織的分化與植株再生

以含有TDZ 0.05 mg/l的MS培養基，作為癒合組織之分化培養基，添加3%蔗糖及0.3%水晶洋菜，調整pH值5.7~5.8後，分裝至2 cm直徑的15 ml試管，每管5 ml，以鋁箔紙封口後，再以121℃及102 kpa壓力滅菌15分鐘。

將不同濃度CPPU誘導的癒合組織，分別接種於上述分化培養基。於25±1℃，16小時光照週期下，培養數週，並以三波長日光燈管及植物生長燈管 (歐思朗) 作為光源，光照強度為54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。培養期間 (二至五週)，調查白色緊密癒合組織及透明鬆軟癒合組織，其分化為完整植株之分化率。

IV. 再生植株之移植

將盤固草A254再生植株由試管取出，先以清水將根部附著之水晶洋菜清洗乾淨，種植於珍珠石：蛭石：泥炭苔=1：1：1的栽培介質中，置於溫室。於移植的初期，先以塑膠膜覆蓋以保持濕度，經一週的適應期，再移至田間，於移植後四週，調查植株存活率。

試驗資料進行變方分析與最小差異顯著性測驗 (Least significant difference test, LSD)。

結果與討論

將盤固草A254未成熟花穗接種於含有2,4-D及CPPU的MS培養基，三週後調查癒合組織的形態與誘導率，結果如表1所示。於添加2,4-D 2 mg/l但不含CPPU的培養基，誘導的癒合組織以透明鬆軟的癒合組織為主，佔全部癒合組織的86.6%，隨CPPU的濃度由0.05 mg/l增加至1.00 mg/l，透明鬆軟的癒合組織由69.5%降低至13.4%，取而代之是白色緊密的癒合組織，由30.5%增加至86.6%，其中CPPU 0.5 mg/l，誘導的白色緊密癒合組織更高達90.0%。另一方面，由圖1A及1B的結果得知，不論是CPPU 0.05 mg/l或CPPU 0.5 mg/l的誘導培養基，每個未成熟花穗上的小花，皆可誘導透明鬆軟類似水晶狀的癒合組織 (如圖1C) 或白色緊密的癒合組織 (如圖1D)，未成熟花穗上每小花的癒合組織誘導率接近100%，其他處理亦同，僅不同型態癒合組織的分佈比例有明顯差異 (表1)。

將不同型態的癒合組織 (圖1C, 1D)，依CPPU濃度分別接種於含有0.05 mg/l TDZ 的MS培養基，由表2的結果得知，CPPU濃度介於0.0 ~ 0.1 mg/l，誘導的透明鬆軟癒合組織，有10.4% ~ 11.5%直接發育為根的型態，並無植株再生。很可能因CPPU濃度較低，與2,4-D之間的比值偏低，因此傾向根部的發育。雖然在CPPU 0.05 mg/l誘導的透明鬆軟癒合組織，有少許植株的再生 (17 callus*4.2%)，主要因未成熟花穗誘導培養時，有90.0%誘導的癒合組織皆為白色緊密狀，僅10%為透明鬆軟的組織 (表1)，很難找到完全透明鬆軟的癒合組織，有些許白色細胞團雜合在透明鬆

軟的癒合組織表面。因此，這類透明鬆軟的癒合組織可能進行分化，但數量不多。

同樣培養二週的時間，除不含CPPU的處理外，白色緊密的癒合組織皆開始有完整植株與地上部莖葉的分化，但透明鬆軟的癒合組織僅少數植株形成，大部份褐化死亡（88.1% ~ 79.6%）。因此，不同癒合組織的型態，顯著影響盤固草A254植株的再生能力。成及羅（1987）以盤固草A254莖節培養，亦誘導白色緊密癒合組織的形成，經組織切片與掃描式電子顯微鏡觀察的結果，認為這些白色緊密癒合組織具體胚的結構，包括具芽鞘與根鞘的雙極結構，單獨的維管束構造，推測很可能是經由體胚分化途徑再生成植株。

Fiore *et al.*（2002）的研究報告指出，以檸檬花柱（style）的薄層細胞培養而言，在不含2,4-D的培養基，隨CPPU濃度由0.4 μ M（0.1 mg/l）增加至4.0 μ M（1.0 mg/l），體胚的誘導率由16.7%顯著增加至76.6%，表示CPPU可顯著促進體胚的形成，但添加2,4-D（0.088, 0.88 mg/l）反而無體胚的形成。在本試驗中單獨使用2,4-D 2.0 mg/l 僅能形成透明鬆軟不具分化能力的癒合組織，在含有2,4-D 2.0 mg/l的MS培養基，隨CPPU濃度由0.1 mg/l增加到1.0 mg/l，白色緊密癒合組織的誘導率由49.8%增加到86.6%（表1）。因此，CPPU與盤固草A254白色緊密癒合組織的形成具有密切的關係。

雖然一些試驗指出，1.0 mg/l 2,4-D可誘導葉片（Martin, 2003）、胚軸（Lee and Lee, 2003）或幼苗根部（Rashid, 2002）形成具胚性的癒合組織。以盤固草A254而言，添加2,4-D 2 mg/l 僅能誘導透明鬆軟的癒合組織，必需添加CPPU（表1）或KN（成及羅，1987）方有利於體胚的形成。因此，不同的物種與培殖體對各種生長調節劑的反應互異，可能與植體內生荷蒙含量及受體的敏感性有關。

表 1. 生長調節劑2,4-D與CPPU對盤固草A254未成熟花穗誘導癒合組織之影響

Table 1. Effects of 2,4-D and CPPU on the percentage of callus induction from immature inflorescence of Pangolagrass A254

Concentration of plant growth regulators		Total number of callus induction	Transparent and friable calli		White and compact calli	
2,4-D	CPPU		Number	Percentage	Number	Percentage
—— mg/l ——			No.	%	No.	%
2.00	0.00	186	161	86.6 ^a	25	13.4 ^c
2.00	0.05	151	105	69.5 ^b	46	30.5 ^b
2.00	0.10	199	100	50.2 ^b	99	49.8 ^b
2.00	0.50	170	17	10.0 ^c	153	90.0 ^a
2.00	1.00	247	33	13.4 ^c	214	86.6 ^a

* The immature inflorescence was cut into 4-6 cm long and cultured in MS medium supplemented with different concentration of 2,4-D and CPPU. Data were recorded after 3 weeks. Each Petri dish had five to six explants.

** Means followed by the same letter in a column are not significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

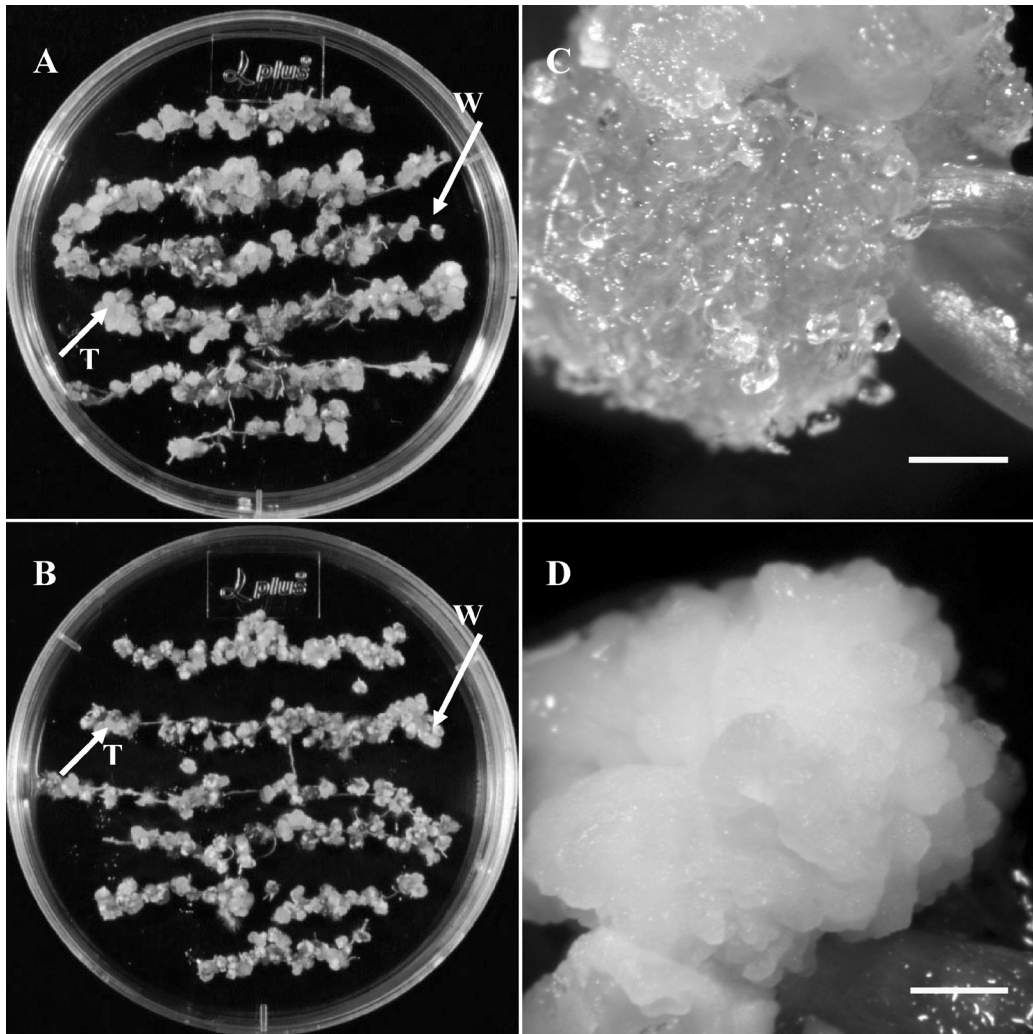


圖 1. 生長調節劑2,4-D與CPPU對盤固草A254癒合組織之影響。

Fig. 1. Effects of 2,4-D and CPPU on the morphology of callus induced from immature inflorescence of Pangolagrass A254.

A. The immature inflorescence cultured on MS medium with 2,4-D 2.0 mg/l and CPPU 0.05 mg/l for 3 weeks.

B. The immature inflorescence cultured on MS medium with 2,4-D 2.0 mg/l and CPPU 0.5 mg/l for 3 weeks.

C. Transparent (T) and friable callus. Each bar indicated 0.5 mm.

D. The white (W) and compact callus. Each bar indicated 0.5 mm.

表 2. 盤固草A254癒合組織形態對植株分化能力之影響

Table 2. Effect of callus type on the ability of plant regeneration of Pangolagrass A254

Callus induced on the medium		Type of callus	No. of callus cultured	Percentage of plant regeneration after two weeks cultured				
2,4-D	CPPU			Plantlet	Shoot	Root	Callus	Brown
— mg/l —			No.	— % —				
2.00	0.00	Transparent	161	0.0 ^c	0.0 ^d	11.5 ^a	0.5 ^c	88.1 ^a
2.00	0.05	Transparent	105	0.0 ^c	2.0 ^{cd}	11.0 ^a	1.2 ^c	85.8 ^a
2.00	0.10	Transparent	80	0.0 ^c	0.0 ^d	10.4 ^a	9.9 ^c	79.6 ^a
2.00	0.50	Transparent	17	4.2 ^b	8.3 ^{ab}	4.2 ^b	29.2 ^b	50.0 ^b
2.00	1.00	Transparent	33	0.0 ^c	5.0 ^{bc}	1.5 ^{bc}	13.6 ^{bc}	79.8 ^a
2.00	0.00	White	25	0.0 ^c	0.0 ^d	2.5 ^{bc}	63.1 ^a	34.4 ^{cd}
2.00	0.05	White	46	3.9 ^b	1.1 ^{cd}	0.0 ^c	49.9 ^a	45.1 ^{bc}
2.00	0.10	White	99	2.1 ^{bc}	2.1 ^{cd}	1.0 ^{bc}	64.5 ^a	30.3 ^{cd}
2.00	0.50	White	153	6.9 ^a	10.4 ^a	0.0 ^c	60.4 ^a	22.3 ^d
2.00	1.00	White	214	1.1 ^c	3.8 ^{cd}	3.3 ^{bc}	59.3 ^a	32.3 ^{cd}

* Callus induced with different medium was cultured in MS medium supplied with 0.05 mg/l TDZ for plant regeneration. Data was recorded after 2 weeks of cultured.

** Means followed by the same letter in a column are not significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

由於透明鬆軟的癒合組織幾乎無分化能力，因此後續試驗皆以白色緊密的癒合組織作為盤固草A254植株再生率之調查。由表3的結果得知，CPPU 0.10 mg/l誘導的白色癒合組織，培養三週後，有63.0% 已再生成植株，培養至第五週，有80.0% 的植株再生率，顯著高於其它處理組。CPPU 0.5 mg/l 誘導的白色癒合組織，培養三週後，其再生成植株的比例偏低僅3.0%，主要有64.0% 的癒合組織先進行地上部莖葉的發育，根部發育較慢，待培養至第五週，已有60% 發育至完整植株，尚有20.0% 僅地上部發育，合計仍有80.0% 的癒合組織具分化能力。同樣的，當CPPU濃度增加至1.00 mg/l誘導的癒合組織，培養至第三週，有57.0% 形成莖葉的地上部，17.0% 為完整植株，待培養至第五週，13.0% 僅具地上部組織，尚未發根，有70.0% 再生成完整植株，合計有83.0% 癒合組織具分化能力。當CPPU濃度由0.1 mg/l 增加至1.0 mg/l，誘導的白色緊密癒合組織，皆有80.0% 以上的分化率，CPPU 0.5 mg/l或1.0 mg/l誘導的癒合組織，根部的發育較慢。很可能因CPPU與2,4-D的比值偏高，傾向地上部的發育，延緩根部的發育，而CPPU 0.1 mg/l誘導的癒合組織，因CPPU濃度較低不會抑制根部的發育，因此，在培養第三週，即有63.0% 的植株再生率，培養至第五週有80% 的植株再生率。

表 3. CPPU誘導癒合組織對盤固草A254植株再生率之影響

Table 3. Effect of callus induced with CPPU on plant regeneration of Pangolagrass A254

Callus induced medium		Plant regeneration medium	Total number of callus cultured	Percentage of plant and shoot regeneration			
2,4-D	CPPU	TDZ		3 weeks		5 weeks	
				Shoot	Plant	Shoot	Plant
mg/l			No.	%			
2.00	0.00	0.05	20	30.0 ^c	0.0 ^c	20.0 ^a	25.0 ^c
2.00	0.05	0.05	20	40.0 ^b	5.0 ^c	5.0 ^c	45.0 ^d
2.00	0.10	0.05	30	10.0 ^d	63.0 ^a	3.0 ^c	80.0 ^a
2.00	0.50	0.05	30	64.0 ^a	3.0 ^c	20.0 ^a	60.0 ^c
2.00	1.00	0.05	30	57.0 ^a	17.0 ^b	13.0 ^b	70.0 ^b

* The white and compact callus was cultured on MS medium supplemented with different plant growth regulators.

** Means followed by the same letter in a column are not significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

Guo *et al.* (2005) 的研究指出，在NAA 5.37 μ M (1 mg/l) 的條件下，TDZ 2.27 μ M (0.5 mg/l) 誘導大白菜葉片直接再生不定芽的效果較BA、CPPU、KN佳。由於TDZ具很高的穩定性，添加在培養基中，可誘導未成熟花穗 (Velcheva *et al.*, 2005)、葉片 (Guo *et al.*, 2005) 或上胚軸 (Uranbey, 2005) 直接形成不定芽並再生植株。因此，我們在不添加NAA的情況下，先使用TDZ 0.05 mg/l作為癒合組織的分化培養基。由盤固草A254再生植株外表形態的觀察，不論是CPPU 0.1 mg/l (圖 2A) 或0.5 mg/l (圖 2B) 誘導的癒合組織，皆分化成具叢生狀的地上部，而非單株，根長約0.5 cm，僅2-3個發根數。但將盤固草A254再生植株移至田間種植，皆可正常生長 (圖 2C)。將CPPU各項處理的再生植株，移至田間的存活率皆接近100%，差異不顯著 (表 4)。

根據本試驗建立之盤固草A254組織培養系統，從未成熟花穗培養誘導癒合組織形成至植株再生，僅需六週的時間，大大的提高繁殖效率。未來可依試驗需求，如基因轉殖、細胞懸浮培養或大量繁殖，選擇CPPU 0.1 mg/l或0.5 mg/l 與2,4-D 2 mg/l作為盤固草A254未成熟花穗的誘導培養基，將誘導的白色緊密的癒合組織，接種至TDZ 0.05 mg/l，其植株再生率皆達80.0%以上。

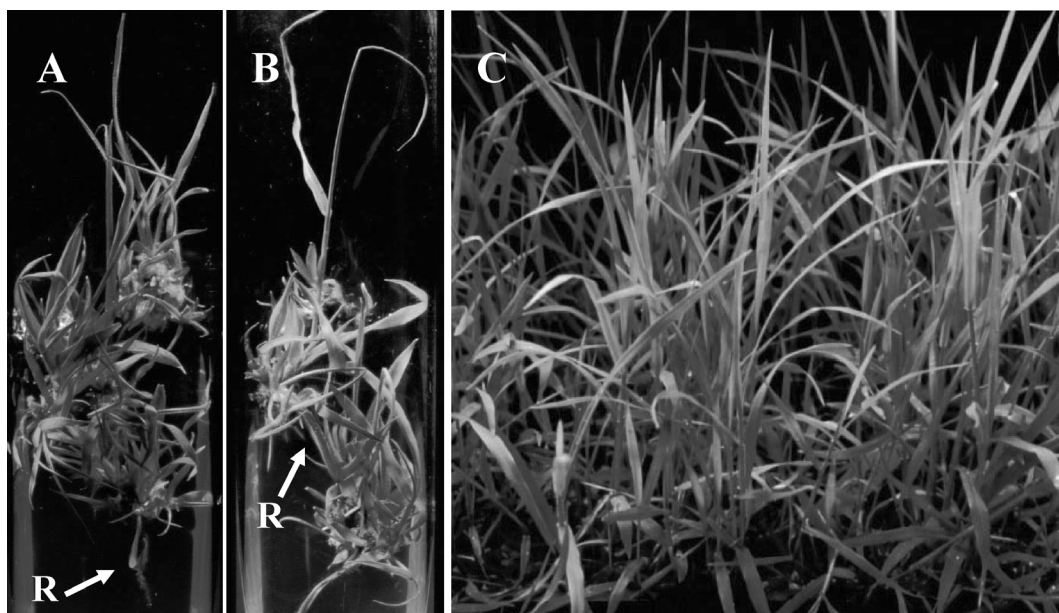


圖 2. 盤固草A254再生植株外表型態及田間生長情形。

Fig. 2. The morphology of plantlets regenerated from the white and compact callus of Pangolagrass A254 and grew vigorously in field.

- A. Plantlets regenerated from the white and compact callus induced in MS medium with 2,4-D 2 mg/l and CPPU 0.1 mg/l.
- B. Plantlets regenerated from the white and compact callus induced in MS medium with 2,4-D 2 mg/l and CPPU 0.5 mg/l.
- C. Regenerated plants grew vigorously 4 weeks after transplanted to field.

表 4. CPPU誘導癒合組織對盤固草A254再生植株存活率之影響

Table 4. Effect of callus induced with CPPU on the survivability of plant regeneration of Pangolagrass A254

Callus induced medium		Plant regeneration medium	Total number of plant transferred	Number and percentage of survival plant	
2,4-D	CPPU	TDZ	No.	No.	%
	mg/l				
2.00	0.00	0.05	1	1	100 ^a
2.00	0.05	0.05	12	12	100 ^a
2.00	0.10	0.05	10	10	100 ^a
2.00	0.50	0.05	35	33	94 ^a
2.00	1.00	0.05	36	36	100 ^a

* The white and compact callus was cultured on MS medium supplemented with different plant growth regulators. Data were recorded four weeks after the treatment.

** Means followed by the same letter in a column are not significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

致謝

本研究承蒙行政院農業委員會農業科技計畫經費補助，計畫編號：94農科-4.1.4-畜-L1（10），新竹分所前分所長吳明哲博士與現任分所長張菊犁博士支持與鼓勵，及分所同仁協助試驗進行，謹致謝忱。

參考文獻

- 卜瑞雄、施意敏、陳吉斌、陳茂墻。1993。不同割期對盤固草產量、化學成分與營養價值之影響。中國畜牧學會會誌 22：373-386。
- 成游貴。1984。盤固草組織培養之研究。I. 利用幼穗培養以誘發癒合組織及植物體形成。畜產研究 17：55-67。
- 成游貴。1986。盤固草雄不稔性之細胞與組織構造觀察。畜產研究 19：99-114。
- 成游貴、羅國棟。1987。盤固草莖節培養之體胚形成過程及植物體再生。畜產研究 20：69-79。
- 李春芳、卜瑞雄、施意敏、陳茂墻。1991。盤固草A254 (*Digitaria decumbens*, A254) 不同生長期之營養價值。畜產研究 24：59-65。
- 林俊義、王強生、王惠亮、陳良築、蔡新聲。1996。生物技術在農作物上之應用。中華農學會報 176：11-37。
- 施意敏、廖成康、李春芳。1997。以瘤胃袋法評估氮肥用量對盤固草蛋白質分解率之影響。中華農學會報 179：30-43。
- 施意敏、廖成康。2000。以瘤胃袋法評估生長期對盤固草 (*Digitaria decumbens*) 及 'Survenola' (*Digitaria x umfolozi* Hall) 乾物質消化率之影響。中華農學會報 1：171-182。
- 陳吉斌、楊德威、卜瑞雄、施意敏、李素珍、陳茂墻。1994。盤固乾草與半乾青貯草飼養泌乳牛之研究。畜產研究 27：227-236。
- 蔡新聲。1992。重要農藝作物之組織培養技術及應用。中華農學會報 158：1-18。
- Carra, A., F. D. Pasquale, A. Ricci and F. Carimi. 2006. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in *Citrus*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 87：41-48.
- Eisa, S., H. W. Koyro, K. H. Kogel and J. Imani. 2005. Induction of somatic embryogenesis in cultured cells of *Chenopodium quinoa*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81：243-246.
- Fei, S. Z., T. Riordan and P. Read. 2002. Stepwise decrease of 2,4-D and addition of BA in subculture medium stimulated shoot regeneration and somatic embryogenesis in buffalograss. Plant Cell Tissue Organ Cult. 70：275-279.
- Fereol, L., V. Chovelon, S. Causse, D. Triaire, I. Arnault, J. Auger and R. Kahane. 2005. Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. Plant Cell Rep. 24：319-325.
- Fiore, S., F. D. Pasquale, F. Carimi and M. Sajeve. 2002. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 68：57-63.
- Gao, C., L. Jiang, M. Folling, L. Han and K. K. Nielsen. 2006. Generation of large numbers of transgenic Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) plants following biolistic gene transfer. Plant Cell Rep. 25：19-25.

- Gomord, V., P. Chamberlain, R. Jefferis and L. Faye. 2005. Biopharmaceutical production in plants : problems, solutions and opportunities. Trends. Biotechnol. 23 : 559-565.
- Guo, D. P., Z. J. Zhu, X. X. Hu and S. J. Zheng. 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) . Plant Cell Tissue Organ Cult. 83 : 123-127.
- Horn, M., S. L. Woodard and J. A. Howard. 2004. Plant molecular farming : systems and products. Plant Cell Rep. 22 : 711-720.
- Hu, F., L. Zhang, X. Wang, J. Ding and D. Wu. 2005a. *Agrobacterium*-mediated transformed transgenic triploid bermudagrass (*Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis*) plants are highly resistant to the glucosinate herbicide Liberty. Plant Cell Tissue Organ Cult. 83 : 13-19.
- Hu, Y., W. Jia, J. Wang, Y. Zhang, L. Yang and Z. Lin. 2005b. Transgenic tall fescue containing the *Agrobacterium tumefaciens ipt* gene shows enhanced cold tolerance. Plant Cell Rep. 23 : 705-709.
- Ipekci, Z. and N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. Plant Cell Rep. 22 : 16-24.
- Kang, T. J., W. S. Lee, E. G. Choi, J. W. Kim, B. G. Kim and M. S. Yang. 2006. Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in Siberian ginseng. J. Biotechnol. 121 : 124-133.
- Lee, K. P. And D. W. Lee. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seeds of wild *Dicentra spectabilis* (L.) LEM. Plant Cell Rep. 22 : 105-109.
- Lin, Y. J. and Q. Zhang. 2005. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of Indian rice. Plant Cell Rep. 23 : 540-547.
- Martin, K. P. 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma adakodien*, a rare medicinal plant. Plant Cell Tissue Organ Cult. 72 : 79-82.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- Rashid, V. A. 2002. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures. Plant Cell Rep. 21 : 9-13.
- Smith, R. L., M. F. Grando, Y. Y. Li, J. C. Seib and R. G. Shatters. 2002. Transformation of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) . Plant Cell Rep. 20 : 1017-1021.
- Uranbey, S. 2005. Thidiazuron induced adventitious shoot regeneration in *Hyoscyamus niger*. Biol. Plant. 49 : 427-430.
- Velcheva, M., Z. Faltin, A. Vardi, Y. Eshdat and A. Perl. 2005. Regeneration of *Aloe arborescens* via somatic organogenesis from young inflorescences. Plant Cell Tissue Organ Cult. 83 : 293-301.

Effect of CPPU (N - (2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) on callus induction and plant regeneration from immature inflorescences of Pangolagrass A254 (*Digitaria decumbens*)⁽¹⁾

Yih-Min Shy^{(2) (5)}, Cherng-Kang Liao⁽³⁾, Huu-Sheng Lu⁽⁴⁾ and Chun Chu⁽⁴⁾

Received : Mar. 5, 2007 ; Accepted : Apr. 20, 2007

Abstract

A system for callus induction and plant regeneration of Pangolagrass A254 (*Digitaria decumbens*) was developed using immature inflorescences as explants. Explants were cultured in MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with different concentration of 2,4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) and CPPU (N - (2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea). The effects of CPPU on callus induction frequency and morphology were examined. When the concentration of CPPU was increased from 0.0 mg/l to 0.5 mg/l with 2,4-D 2.0 mg/l in MS medium, the frequency of white and compact callus induction was increased from 13.4 % to 90.0 %. CPPU significantly influenced the morphology of calli induced. Different types of calli were cultured in MS medium supplemented with TDZ (N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-yl urea) 0.05 mg/l. The percentage of plant regenerated from white and compact callus induced with 2,4-D 2.0 mg/l and CPPU 0.1 mg/l medium was as high as 80.0 %. There was little plant regeneration from friable and transparent callus. The frequency of plant regeneration depended on the type of callus that was affected by CPPU concentration. We concluded that CPPU was involved in the white and compact callus formation that is important for plant regeneration of Pangolagrass. We could use the plant regeneration system for gene transformation in the future.

Key words: Plant regeneration, Callus type, Pangolagrass.

(1) Contribution No.1362 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Hsinchu 300, Taiwan, R. O. C.

(3) Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, R.O.C.

(4) Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail: emshy@mail.tlri.gov.tw

