

尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 細胞懸浮培養與植株再生⁽¹⁾

施意敏⁽²⁾ 張珈錡⁽³⁾ 廖成康⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：104 年 3 月 10 日；接受日期：104 年 4 月 8 日

摘 要

本研究主要建立尼羅草臺畜草一號 (*Acroceras macrum* Stapf NLcv.TS1) 細胞懸浮培養及植株再生的方法。將尼羅草臺畜草一號未成熟花穗消毒後，培養於含有 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 與 0.5 mg L⁻¹ BA 的 MS 培養基，五週後形成癒合組織。將癒合組織壓碎後，懸浮培養於添加 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 和 50 mg L⁻¹ 水解酪蛋白 (casein hydrolysate) 之 MS 液體培養基，進行震盪懸浮培養，每隔 2 週繼代一次。將細胞懸浮液增生之細胞團，移至添加 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D 和 0.5 mg L⁻¹ BA 之 MS 固體培養基，培養 4 週後形成結構緊實的胚性癒合組織。將癒合組織移至添加 1.0 mg L⁻¹ BA 的 MS 固體培養基，僅 4.7% 的植株再生，再將未分化之癒合組織移至 0.5 mg L⁻¹ NAA 與 0.05 mg L⁻¹ TDZ 的二次分化培養基，可獲得 75.0% 的植株再生，再生之綠色植株移至盆栽種植存活率達 100%。因此，根據本試驗結果，在適當的生長調節劑處理下，尼羅草臺畜草一號的懸浮細胞經生長分化，可發育至完整植株並於田間正常生長。

縮寫字：BA: N⁶-benzyladenine; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA: α -naphthaleneacetic acid; MS: Murashige and Skoog's medium; TDZ: N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea.

關鍵詞：細胞懸浮培養、植株再生、尼羅草。

緒 言

植物組織培養技術之建立，主要基於植物細胞具細胞全能性 (cell totipotency)，能於器官 (根、莖、葉、花、果實) 分化完成後，將欲培養的組織由母體切離，培植體 (explant) 經消毒後放置在添加植物生長調節劑的培養基，於一定光照與溫度環境下培養，植物組織細胞可以經由去分化 (dedifferentiation) 的過程，回復至細胞初始增殖形成癒合組織 (callus)，經細胞分化 (differentiation) 的階段，再生 (regeneration) 為完整植株。可經由體胚分化 (somatic embryogenesis) 或器官分化 (organogenesis) 產生與母體一樣的均質性後裔，常用於優良母體的大量繁殖。在植物組織培養過程，由於生長調節劑使用促進細胞快速分裂增殖與分化，因而產生遺傳變異稱為體細胞變異 (somaclonal variation)，有別於傳統有性生殖產生的遺傳變異。利用分子檢測技術如 RFLP、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、同功異構酶、AFLP、微粒體標誌、rDNA 分析等，檢測體細胞變異的原因，包括染色體倍數或數目的改變、染色體的重排或轉置、基因單一鹽基或片段序列的改變，跳躍轉子 (transposon) 的插入，其變異可遺傳至後裔 (Bairu *et al.*, 2012)。組織培養過程，於試管內完成細胞分裂、生長與分化，目前已應用於植物生長發育基因體組調控的研究 (Neelakandan and Wang, 2012)。

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，可提高百慕達草的抗除草劑特性 (Hu *et al.*, 2005)、增加高狐草 (*Festuca arundinacea*) 的耐冷性 (Hu *et al.*, 2005) 與高狐草抗真菌性葉斑病的抗病性 (Dong *et al.*, 2007) 及延遲黑麥草葉片老化 (Li *et al.*, 2004)。或將玉米 Zein 基因轉殖至苜蓿 (Bellucci *et al.*, 2002)，把向日葵的 albumin 基因轉殖至高狐草 (Wang *et al.*, 2001)，以提高反芻動物對含硫蛋白質的利用。或調控木質素合成酵素 CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase) 的表現，達到提高苜蓿纖維消化率之目的 (Baucher *et al.*, 1999)。或抑制木質素合成酵素 COMT (caffeic acid O-methyltransferase) 的表現，改善高狐草 (*Festuca arundinacea*) 的消化率 (Chen *et al.*, 2004a)。或降低細胞壁多醣體與酚酸間的酯鍵鍵結，提高生質能源酒精發酵的利用率 (Hamelinck

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2223 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 本文為第二作者碩士論文之一部分，行政院農業委員會種苗改良繁殖場。

(4) 國立嘉義大學農藝學系。

(5) 通訊作者，E-mail：ckliao@mail.ncyu.edu.tw。

et al., 2005)。以水稻細胞懸浮培養生產人類血清蛋白 (Huang *et al.*, 2005) 及 γ -干擾素 (Chen *et al.*, 2004b)。或以基因轉殖水稻種子生產磷酸植酶 (Hong *et al.*, 2004)、雙功能的澱粉普魯南醣酶與 β -澱粉水解酶 (Chiang *et al.*, 2005)、增加水稻種子含硫氨基酸如 methionine 及 cysteine 的累積 (Lee *et al.*, 2003)、或作為醫藥蛋白與工業酵素之生產系統等，目前皆有禾本科基因轉殖與商業生產成功之案例 (Fischer *et al.*, 2004)。唯基因轉殖技術或體細胞變異之應用，其前提必須建立具高分化能力之組織培養系統。

尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 英文名 *nilegrass*，為多年生禾本科牧草。行政院農業委員會畜產試驗所於 1960 年自南非引種進行品種選育，其中 AC15 品系於 2000 年經農業委員會通過命名為尼羅草臺畜草一號，具高產、高蛋白質、抗銹病及冬季生長良好之特性，是臺灣地區重要的牧草品種 (蕭等，2002)。尼羅草臺畜草一號為四倍體，具自交不孕性，種子發芽率低，在繁殖上主要採用莖苗撒播之無性繁殖方法，亦可利用組織培養方式進行種苗大量繁殖 (施等，2010)。唯其後裔為均質的族群缺少遺傳變異。

利用細胞懸浮培養產生之體細胞變異，進行百慕達草 (*Cynodon transvaalensis* x *Cynodon dactylon*) 的品種改良，進行耐旱性與耐鹽性選育已有成功之案例 (Lu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007)。因此，本研究主要建立尼羅草臺畜草一號細胞懸浮培養系統，參照盤固草細胞懸浮培養方法 (施等，2008)，以未成熟花穗誘導癒合組織形成，做為建立懸浮細胞之來源，探討 TDZ 及 NAA 對胚性癒合組織分化及植株再生率之影響，期應用於基因轉殖或體細胞變異篩選之研究。

材料與方法

I. 試驗材料

尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 臺畜草一號，取自行政院農業委員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。

II. 未成熟花穗消毒

自田間採集孕穗期之尼羅草，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。於無菌操作臺取出未成熟花穗，放入滅菌過之 500 mL 三角瓶，加入 250 mL 0.5% 次氯酸鈉 (Clorox, USA) 及 0.4 mL 界面活性劑 Tween 20，震盪消毒 15 分鐘，以無菌水 250 mL 連續沖洗 5—6 次，直至清洗液清澈無混濁物。將未成熟花穗取出，接種於供試培養基，以誘導癒合組織的形成。

III. 基本培養基與培養條件

以 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基添加 3% 蔗糖為基本培養基，除細胞懸浮培養的液體培養基之外，其餘皆添加 0.3% 水晶洋菜 (Gelrite, Sigma-Aldrich)，使培養基凝固。滅菌前，先調整培養基 pH 值 5.7—5.8，每 125 mL 三角瓶加入 20 mL 液體培養基。用鋁箔紙封住瓶口後，以 121°C 及 102 kpa 壓力，進行滅菌 15 分鐘。平盤培養基的配製則是將滅菌後的培養基冷卻至 60°C，倒入直徑 90 mm 高 15 mm γ 放射線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。

所有處理的培養條件，除暗培養不光照外，其餘以三波長自然色日光燈管 (FL40D-EX/38，旭光) 及植物生長燈管 (FL-40SBR/38FIOW-LUX，旭光) 為光源，光照強度為 25—47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，16 小時光照週期，於 25 \pm 1°C 的組織培養室培養。

IV. 癒合組織的誘導

將消毒過的未成熟花穗，平鋪於添加 2 mg L⁻¹ 2,4-D 及 0.5 mg L⁻¹ BA 之癒合組織誘導培養基 (callus induction medium)，每個平盤培養皿放置 3—4 個未成熟花穗，穗長約 4—5 cm，至少 4 重複。於黑暗下培養 5 週後，誘導癒合組織的形成 (施等，2007)。

V. 細胞懸浮培養的初始建立

以滅菌過之刀片輕輕將誘導的癒合組織與穗軸剝離，取約 0.3 g (平鋪面積約 2 cm²) 的癒合組織 (Lu *et al.*, 2006)，以滅菌後之刀片或藥勺均勻壓碎，放置於添加 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 及 50 mg L⁻¹ 水解酪蛋白 (casein hydrolysate) 的 MS (Murashige and Skoog, 1962) 液體培養基。每 125 mL 三角瓶添加 20 mL 的液體培養基。於 25 \pm 1°C 無光照的組織培養室，以 75 rpm 震盪培養，每 2 週更換 1/2 新鮮培養液進行繼代培養，做為懸浮細胞培養的來源。

VI. 懸浮細胞生長量調查

為測量懸浮細胞的生長量，採用具側臂的 125 mL 三角瓶，側臂為具刻度之試管，可量測細胞之沉澱體積

(Pradhan *et al.*, 1998)。以 1mm 孔隙的篩網過濾之細胞懸浮液體，靜置沉澱後，取 0.5 mL 之沉澱細胞，放入 125 mL 具側臂之 125 三角瓶，加 20 mL 添加 1.0 mg L^{-1} 2,4-D 及 50 mg L^{-1} 水解酪蛋白的 MS 液體培養基，每處理至少四重複。於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 無光照的組織培養室，以水平式振盪器 75 rpm 震盪培養，每隔 4 天測量沉降細胞的體積 (settled cell volume, SCV) (Pradhan *et al.*, 1998) 或稱沉澱細胞的體積 (sedimented cell volume) (Fereol *et al.*, 2005)。測量方法為先均勻搖晃三角瓶，使液體培養基中之細胞完全懸浮，立即將三角瓶瓶身傾斜使約 10 mL 含有懸浮細胞之液體，落入三角瓶側臂之量管中，靜置 10 分鐘以上使細胞完全沉澱後記錄細胞沉降體積，以沉降細胞的體積佔懸浮液體體積的 % 表示。

VII 癒合組織的分化與植株再生

待懸浮細胞建立後，以 1 mm 的篩網過濾，將大於 1 mm 的細胞團移至含有 2 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 固體培養基，並預先放入濾紙 (No.1, Whatman) 作為細胞適應固體培養之中繼培養 (intermediate culture)，於無光照 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的組織培養室培養 4 週，以誘導胚性癒合組織的形成。當白色緊密的胚性癒合組織形成後，分別移至添加 1.0 mg L^{-1} BA 或 0.05 mg L^{-1} TDZ 用於植株再生的培養基 (plant regeneration medium)，每平盤接 15 個培植體，每處理組合至少 3 重複。於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 具光照的組織培養室培養，培養 8 週後，調查癒合組織第一次分化再生植株的比率。

由於植株再生率不佳，將部分形成綠點之細胞團，移至添加 0.5 mg L^{-1} NAA 與 (0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg L^{-1}) TDZ 分化培養基，於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 具光照的組織培養室培養，培養 8 週後，調查第二次分化的植株再生率。

VIII 再生植株之存活率調查

將再生植株移至 1/2 MS 固體培養基，促進根系的生長。培養 6 週後，將尼羅草再生植株由試管取出，先以清水將根部附著的水晶洋菜清洗乾淨，種植到 5 吋塑膠硬盆中，栽培介質為珍珠石：蛭石：泥炭土 = 1：1：1。種植於自然光照環境下，1—2 天澆水一次，4 週後調查再生植株之存活率。

IX 統計分析

利用 SAS 統計分析系統的一般線性模式 (General liner model) 進行變方分析。以 F-test 檢測主效應之顯著性，並以最小顯著性差異法 (Least Significant Difference test, LSD) 比較各處理組平均值之差異顯著性 (SAS, 2002)。

結果與討論

尼羅草臺畜草一號懸浮細胞培養之建立，主要以尼羅草未成熟花穗消毒後，以 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 之 MS 固體培養基誘導癒合組織形成。將癒合組織移至添加 1.0 mg L^{-1} 2,4-D 及 50 mg L^{-1} 水解酪蛋白的 MS 液體培養基進行懸浮細胞培養，建立懸浮細胞之來源。依懸浮細胞沉降的體積 (SCV) 表示細胞生長速率 (Pradhan *et al.*, 1998)。由圖 1 尼羅草細胞懸浮培養之生長曲線得知，於培養起始第 0 天，每 10 mL^{-1} 培養液之懸浮細胞沉降體積約維持 5%，至第 8 天，懸浮細胞沉降體積約維持在 6.7%，並沒有明顯的增加，為生長遲滯期 (lag phase)。於培養第 8 天至第 12 天細胞開始迅速增生，第 12 天細胞增殖至 14.3%，第 8—12 天指數生長期 (exponential phase)。隨後細胞增殖趨於飽和，第 20 天仍維持在 15.3%，第 12—20 天為生長飽合期 (stationary phase)。雖然第 24 天懸浮細胞沉降體積達 18.3%，但沉澱的細胞外觀上為褐化死亡的細胞，並非真正的細胞增殖。因此尼羅草細胞懸浮培養建議約每隔 14 天進行一次繼代培養，以維持細胞生長活力。

菊科 (*Asteraceae*) 草本單年生油料作物小油菊 (*Guizotia abyssinica*) 以種子的子葉誘導癒合組織形成，再以 $5 \mu\text{M}$ 2,4-D 及 $0.5 \mu\text{M}$ kinetin 的 MS 液體培養基建立懸浮細胞培養，大約在第 14 天懸浮細胞開始指數生長期，至第 28 天達最高 (Naik and Murthy, 2010)，該懸浮細胞的生長曲線與本研究結果相近，屬 S 型生長曲線，包括生長遲滯期、指數生長期及生長飽合期。薑科 (*Zingiberaceae*) 族群的凹唇薑 (*Boesenbergia rotunda*)，俗稱手指薑 (fingerroot ginger)，其懸浮細胞的生長曲線，以 1.0 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 液體培養基做為細胞懸浮培養的培養基，第 8—10 天為生長遲滯期、第 15—17 天為指數生長期、第 25—30 天為生長飽合期 (Wong *et al.*, 2013)，與本研究結果相類似。但盤固草細胞懸浮培養的液體培養基，僅添加 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 並不添加 BA (施等, 2008)。因此，懸浮細胞生長曲線常因物種與液體培養基添加的生長調節劑而異。

為使懸浮培養之細胞團具有分化能力，並能獲得大量的再生植株。先將懸浮細胞以 1 mm 篩網過濾，將大於 1 mm 的細胞團培養於添加 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 和 0.5 mg L^{-1} BA 之 MS 固體培養基進行暗培養，促進細胞增生胚性細胞團，培養 4 週後將細胞團移至 1.0 mg L^{-1} BA 或 0.05 mg L^{-1} TDZ 之分化培養基，光照培養 8 週。由表 1 的結果得知，0.05

mg L⁻¹ TDZ 處理之莖葉 (shoot) 分化率為 11.3%，高於 1.0 mg L⁻¹ BA 處理之 4.7%，細胞團的莖葉分化率相當低。盤固草細胞懸浮培養增殖的細胞團，移 0.5 mg L⁻¹ BA 的 MS 固體培養基有 88.9% 可再生成完整植株，細胞團移至 0.05 mg L⁻¹ TDZ 的 MS 固體培養基也有 87.8% 可再生成植株 (施等, 2008)，表示尼羅草與盤固草促進細胞分化所需之培養基不同。

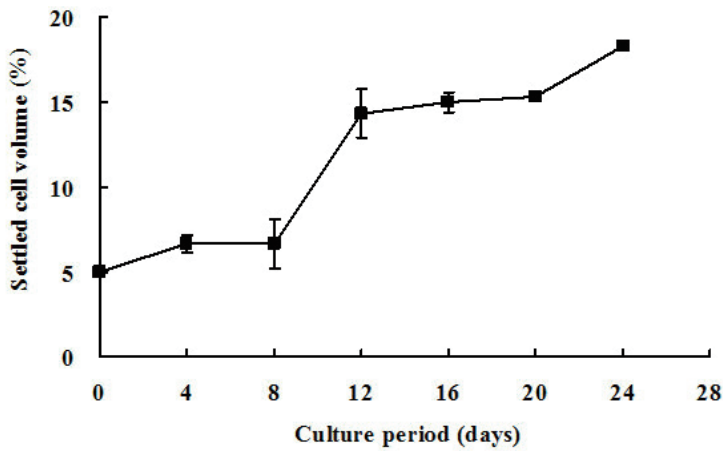


圖 1. 尼羅草細胞懸浮培養之生長曲線。

Fig. 1. Growth curve of cell suspension culture of Nile grass on MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ 2,4-D and 50 mg L⁻¹ casein hydrolysate. (Mean ± SE, n = 3)

表 1. BA、TDZ 對尼羅草臺畜草一號細胞懸浮培養莖葉分化率之影響

Table 1. Effect of BA and TDZ on shoot regeneration of suspension culture of Nile grass

Liquid medium		First plant regeneration medium		Number of callus cultured	Number and percentage of shoot regeneration ^z	
2,4-D	CH	BA	TDZ		No.	%
(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)				
1.0	50	1.00	-	150	7	4.7 ^b
1.0	50	-	0.05	150	17	11.3 ^a

^z Data were recorded 8 weeks after transferring to first plant regeneration medium. Means in the same column followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

表 2. NAA、TDZ 對尼羅草懸浮細胞植株再生與植株形態之影響

Table 2. Effect of NAA and TDZ on plant regeneration and plant type from cell suspension culture of Nile grass

First regeneration medium		Second regeneration medium		Number and percentage of plant regeneration [*]		Phenotypic appearance of plant [*]	Percentage of survival plant [*]
(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)					
BA	TDZ	NAA	TDZ	No.	%	% (No.)	%
1.0		0.5	0.01	37	61.7 ^{bc}	62.2 (23) ^{bc}	100 ^a
1.0		0.5	0.05	45	75.0 ^a	57.8 (26) ^c	100 ^a
1.0		0.5	0.10	44	73.3 ^a	68.2 (30) ^b	95 ^a
1.0		0.5	0.50	38	63.3 ^b	65.8 (25) ^b	100 ^a
1.0		0.5	1.00	34	56.7 ^c	76.5 (26) ^a	100 ^a
	0.05	0.5	0.01	31	51.7 ^{de}	12.9 (4) ^{de}	100 ^a
	0.05	0.5	0.05	28	46.7 ^{ef}	21.4 (6) ^{ef}	100 ^a
	0.05	0.5	0.10	40	66.7 ^{ab}	47.5 (19) ^d	100 ^a
	0.05	0.5	0.50	33	55.0 ^{cd}	75.8 (25) ^a	100 ^a
	0.05	0.5	1.00	25	41.7 ^f	56.0 (14) ^c	100 ^a

^{*} Means in the same column followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

由於細胞團再生為植株的比率偏低，因此將形成綠點之細胞團移至含有 0.5 mg L^{-1} NAA 與 0.01 、 0.05 、 0.10 、 0.50 、 1.0 mg L^{-1} TDZ 不同濃度組合之 MS 固體培養基，進行第二次分化培養，由表 2 結果得知，來自 1.0 mg L^{-1} BA 培養之細胞團，經第二次分化培養，其植株再生率以培養於 0.5 mg L^{-1} NAA 添加 0.05 mg L^{-1} TDZ 之 75.0% 為最高，正常綠色植株占再生植株的 57.8% ，綠色植株存活率 100% 。 0.5 mg L^{-1} NAA 添加 0.05 mg L^{-1} TDZ 之植株再生率為 56.7% ，但正常綠色植株佔 76.5% ，表示 TDZ 濃度由 0.05 mg L^{-1} 增加至 1.00 mg L^{-1} ，高濃度 TDZ 使細胞死亡，植株再生率降低，一旦能分化再生成植株， 76.5% 為正常之綠色植株。來自 0.05 mg L^{-1} TDZ 第一次分化培養之細胞團，移至 0.5 mg L^{-1} NAA 與 0.1 mg L^{-1} TDZ 之培養基可獲得 66.7% 之植株再生率，但其中僅有 47.5% 為正常綠色再生植株，其存活率 100% 。BA 為自然界存在之細胞分裂素屬 adenine 型態的衍生物，TDZ 為人工合成之細胞分裂素以 phenylurea 衍生物為主，人工合成之 TDZ 穩定性高，其促進植株再生的效果較 BA 為佳 (Guo *et al.*, 2005)。由表 1 得知 TDZ 促進植株再生率較 BA 高，但相對其殘藥性將影響下一階段植株再生率。由表 2 第二階段的植株再生率得知，分別來自 BA 或 TDZ 的細胞團，移至相同濃度的 NAA 及 TDZ 培養基，來自 BA 細胞團的植株再生率高於來自 TDZ 的細胞團，表示交互使用 BA 與 TDZ 較連續使用 TDZ 更有助於尼羅草懸浮細胞之植株再生。

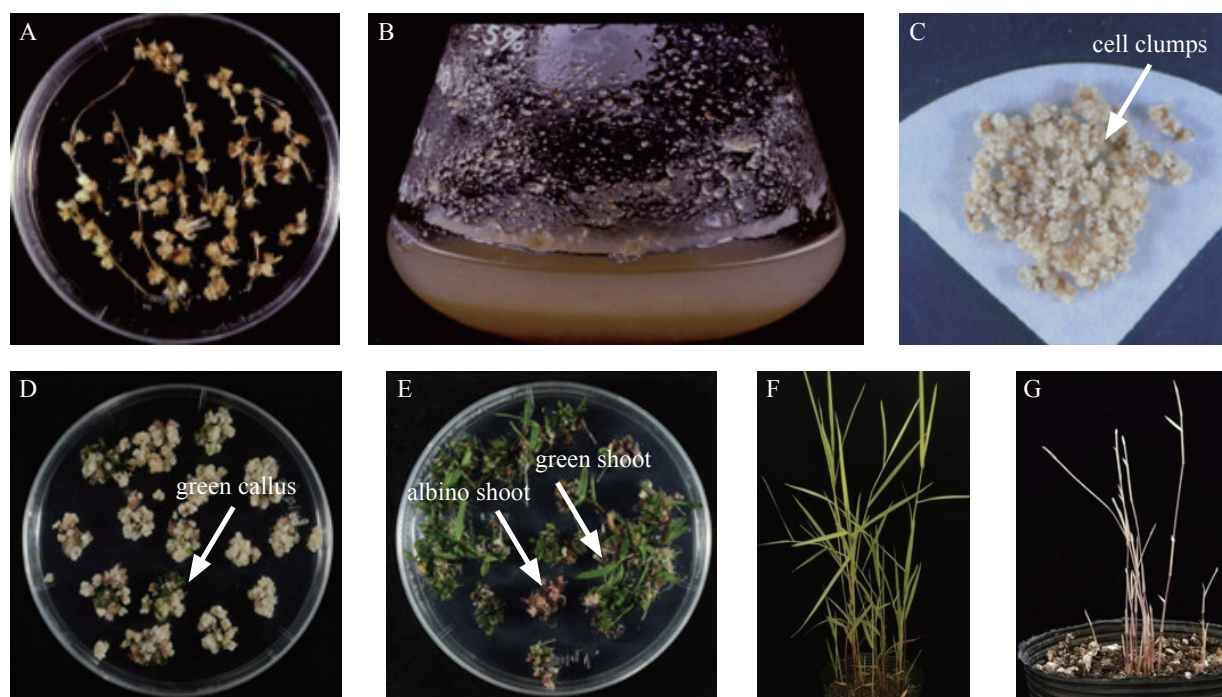


圖 2. 尼羅草細胞懸浮培養與植株再生系統。

- 尼羅草幼穗培養於添加 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 和 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 培養基，可誘導癒合組織產生。
- 懸浮細胞每隔 14 天繼代培養於添加 2 mg L^{-1} 2,4-D 和 50 mg L^{-1} 水解酪蛋白的培養基。
- 懸浮細胞的細胞團移至添加 2 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 培養基，可誘導白色結構緊密的癒合組織產生。
- 將白色結構緊密的癒合組織移至添加 1.0 mg L^{-1} BA 的 MS 培養基，可誘導綠色芽體的產生。
- 將白色結構緊密的癒合組織移至添加 1.0 mg L^{-1} BA 的 MS 培養基，再移至添加 0.5 mg L^{-1} NAA 和 0.5 mg L^{-1} TDZ 的培養基，可誘導綠色莖葉的產生。
- 由尼羅草細胞懸浮培養形成之正常植株。
- 由尼羅草細胞懸浮培養形成之不正常植株。

Fig. 2. The cell suspension cultures and plant regeneration system of Nilegrass.

- Immature inflorescences of Nilegrass cultured on MS medium supplemented with 2.0 mg L^{-1} 2,4-D and 0.5 mg L^{-1} BA.
- The cell suspension was sub-cultured with 2 mg L^{-1} 2,4-D and 50 mg L^{-1} casein hydrolysate every 14 days.
- The white and compact callus was induced from cell suspension culture by transferred cell clumps on MS medium with 2 mg L^{-1} 2,4-D and 0.5 mg L^{-1} BA.
- Shoot regeneration from the white and compact callus cultured on MS medium with 1.0 mg L^{-1} BA.
- Plant regeneration from callus cultured on MS medium with 1.0 mg L^{-1} BA and then transferred on MS medium with 0.5 mg L^{-1} NAA and 0.5 mg L^{-1} TDZ.
- Normal plant regenerated from cell suspension culture of Nilegrass.
- Abnormal plant regenerated from cell suspension culture of Nilegrass.

尼羅草懸浮細胞培養流程如圖 2 所示，尼羅草未成熟花穗經消毒後放置於添加 2 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 固體培養基可誘導癒合組織的形成 (圖 2A)，將癒合組織壓碎成小的細胞團放入添加 1 mg L^{-1} 2,4-D 及 50 mg L^{-1} 水解酪蛋白的液體培養基進行培養，每隔 14 天繼代培養一次，將老化的細胞團過濾，以 1/2 的方式更換新鮮培養液，繼代培養 2—3 月可獲得均質之懸浮細胞 (圖 2B)。當細胞持續生長至 1 mm 大小，移至添加 2 mg L^{-1} 2,4-D 及 0.5 mg L^{-1} BA 的 MS 固體培養基，可促進結構緊密的胚性細胞形成 (圖 2C)，將胚性細胞團移至含有 1.0 mg L^{-1} BA 的 MS 固體培養基，僅有少數綠色細胞團產生 (圖 2D)，持續培養並不能改善植株再生率。將 1.0 mg L^{-1} BA 培養的綠色細胞團，再移至添加 0.5 mg L^{-1} NAA 及 0.05 mg L^{-1} TDZ 的培養基，植株再生率可達 75% (圖 2E)，再生植株移至田間生長，其植株外表型為正常綠色植株 (圖 2F)，少數有莖稈紫色葉片白色的尼羅草苗產生 (圖 2G)，但紫色尼羅草移植一週後全部死亡，可能因缺少葉綠素無法進行光合作用。在癒合組織增生的階段由外表型態，即可區分將來發育為正常的綠色植株 (green shoot) 或不正常的紫色植株 (albino shoot) (圖 2E)，因此優良母體繁殖時必需挑選外表正常之癒合組織，方能再生為正常綠色植株。

結 論

根據本試驗建立之尼羅草臺畜草一號細胞懸浮培養方法，以未成熟花穗為培育體誘導癒合組織形成，進行細胞懸浮培養，經二階段分化培養基的培養，懸浮細胞的植株再生率達 75%，將來可應用於尼羅草優良母體的大量繁殖或體細胞變異之選種及基因轉殖之研究。

誌 謝

本研究經費來源為行政院農業委員會科技計畫 (96 農科 -2.1.3- 畜 -L1(2)、97- 農科 -2.1.4- 畜 -L1(2))，承蒙畜產試驗所飼料作物組前研究員蕭素碧博士提供尼羅草臺畜草一號之育種材料及試驗研究之建議，畜產試驗所遺傳育種組吳明哲組長及畜產試驗所新竹分所前分所長張菊犁全力支持該項研究，畜產試驗所新竹分所分所長賈玉祥之文稿斧正，在此一併致上最高之謝忱。

參考文獻

- 施意敏、廖成康、盧虎生、朱鈞。2007。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。畜產研究 40：97-107。
- 施意敏、廖成康、盧虎生、朱鈞。2008。盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*) 細胞懸浮培養與植株再生。中華農學會報 9：433-445。
- 施意敏、張珈錡、廖成康。2010。CPPU 對尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 癒合組織誘導與植株再生之影響。臺灣農學會報 11：429-440。
- 蕭素碧、林正斌、金文蔚、陳文、陳玉燕、張溪泉、顏素芬。2002。尼羅草臺畜草一號之育成。畜產研究 35：91-100。
- Bairu, M. W., A. O. Aremu and J. V. Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 63: 147-173.
- Baucher, M., M. A. Bernard-Vailhe, B. Chabbert, J. Besle, C. Opsomer, M. Van Montagu and J. Botterman. 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect of composition and digestibility. *Plant Mol. Biol.* 39: 437-447.
- Bellucci, M., A. Alpini and S. Arcioni. 2002. Zein accumulation in forage species (*Lotus corniculatus* and *Medicago sativa*) and co-expression of the γ -zein: KDEL and β -zein: KDEL polypeptides in tobacco leaf. *Plant Cell Rep.* 20: 848-856.
- Chen, L., C. Auh, P. Dowling, J. Bell, D. Lehmann and Z. Y. Wang. 2004a. Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biol.* 31: 235-245.
- Chen, T. L., Y. L. Lin, Y. L. Lee, N. S. Yang and M. T. Chan. 2004b. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Res.* 13: 499-510.

- Chiang, C. M., F. S. Yeh, L. F. Huang, T. H. Tseng, M. C. Chung, C. S. Wang, H. S. Lur, J. F. Shaw and S. M. Yu. 2005. Expression of a bi-functional and thermostable amylopullulanase in transgenic rice seeds leads to autohydrolysis and altered composition of starch. *Mol. Breeding*. 15: 125-143.
- Dong, S., L. P. Tredway, H. D. Shew, G. L. Wang, E. Sivamani and R. Qu. 2007. Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases. *Plant Sci*. 173: 501-509.
- 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.
- Fischer, R., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou and R. M. Twyman. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol*. 7: 152-158.
- 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 Tiss. Org. Cult*. 83: 123-127.
- Hamelinck, C. N., G. V. Hooijdonk and A. P. Faaij. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy* 28: 384-410.
- Hong, C. Y., K. J. Cheng, T. H. Tseng, C. S. Wang, L. F. Liu and S. M. Yu. 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Res*. 13: 29-39.
- Hu, F., L. Zhang, X. Wang, J. Ding and D. Wu. 2005. Agrobacterium-mediated transformed transgenic triploid bermudagrass (*Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis*) plants are highly resistant to the glufosinate herbicide Liberty. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 83: 13-19.
- Hu, Y., W. Jia, J. Wang, Y. Zhang, L. Yang and Z. Lin. 2005. Transgenic tall fescue containing the *Agrobacterium tumefaciens ipt* gene shows enhanced cold tolerance. *Plant Cell Rep*. 23: 705-709.
- Huang, L. F., Y. K. Liu, C. A. Lu, S. L. Hsieh and S. M. Yu. 2005. Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture. *Transgenic Res*. 14: 569-581.
- Lee, T. T. T., M. M. C. Wang, R. C. W. Hou, L. J. Cheng, R. C. Su, C. S. Wang and J. T. C. Tzen. 2003. Enhanced methionine and cysteine levels in transgenic rice seeds by the accumulation of sesame 2S albumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 67: 1699-1705.
- Li, Q., P. R. H. Robson, A. J. E. Bettany, I. S. Donnison, H. Thomas and I. M. Scott. 2004. Modification of senescence in ryegrass transformed with *IPT* under the control of a monocot senescence-enhanced promoter. *Plant Cell Rep*. 22: 816-821.
- Lu, S., Z. Wang, X. Peng, Z. Guo, G. Zhang and L. Han. 2006. An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 87: 77-84.
- Lu, S., X. Peng, Z. Guo, G. Zhang, Z. Wang, C. Wang, C. Pang, Z. Fan and J. Wang. 2007. *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep*. 26: 1413-1420.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Naik, P. M. and H. N. Murthy. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.). *Acta Physiol Plant* 32: 75-79.
- Neelakandan, A. K. and K. Wang. 2012. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep*. 31: 597-620.
- Pradhan, C., S. Pattnaik, M. Dwari, S. N. Patnaik and P. K. Chand. 1998. Efficient plant regeneration from cell suspension-derived callus of East Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.) *Plant Cell Rep*. 18: 138-142.
- SAS, 2002. SAS procedure guide for personal computer. Version 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary. NC. U.S.A.
- Wang, Z. Y., X. D. Ye, J. Nagel, I. Potrykus and G. Spangenberg. 2001. Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants. *Plant Cell Rep*. 20: 213-219.
- Wong, S. M., N. Salim, J. A. Harikrishna and N. Khalid. 2013. Highly efficient plant regeneration via somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Boesenbergia rotunda*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 49: 665-673.

Plant regeneration from cell suspension culture of nilegrass (*Acroceras macrum* Stapf)⁽¹⁾

Yih-Min Shy⁽²⁾ Jia-Ci Chang⁽³⁾ and Cherng-Kang Liao⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: Mar. 10, 2015; Accepted: Apr. 8, 2015

Abstract

The objective of this study was to develop an efficient system for plant regeneration from cell suspension culture of nilegrass (*Acroceras macrum* Stapf NLcv.TS1). The callus used for cell suspension culture was induced from immature inflorescences cultured on MS medium with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ BA for 5 weeks. For establishing and maintaining the suspension culture system, the callus was cut to small pieces and sub-cultured on MS liquid medium with 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 50 mg L⁻¹ casein hydrolysate every 2 weeks for 3 months. When the cell clumps were proliferated, they were transferred to MS solid medium with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ BA for inducing white and compact callus that was beneficial for shoot regeneration. Plant regeneration from callus cultured on MS medium with 1.0 mg L⁻¹ BA was sub-cultured on MS medium with 0.5 mg L⁻¹ NAA and 0.05 mg L⁻¹ TDZ. The frequency of plant regeneration increased from 4.7% to 75%. The plantlets grew normally in the field with 100% survival. The results showed that a successful culture system for plant regeneration from cell suspension culture of nilegrass could be established.

Key words: Cell suspension culture, Plant regeneration, Nilegrass.

(1) Contribution No. 2223 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(3) This paper is a part of master thesis of the second author, Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(5) Corresponding author, E-mail: ckliao@mail.nyu.edu.tw.