

狼尾草 (*Pennisetum purpureum*) 芽體培養與 植株增殖之研究⁽¹⁾

施意敏⁽²⁾⁽⁵⁾ 李姿蓉⁽³⁾ 廖成康⁽⁴⁾

收件日期：104 年 2 月 13 日；接受日期：104 年 4 月 23 日

摘 要

本研究主要建立狼尾草 (*Pennisetum purpureum*) 臺畜草三號之芽體培養與增殖之組織培養方法，並應用至狼尾草臺畜草一、二、四、五號之品種保存。試驗材料取自田間生長的狼尾草臺畜草三號，幼芽經消毒後培養於 MS 培養基，誘導無菌試管苗單株的形成，由單株切取單芽後，分別移至含有添加細胞分裂素 TDZ (0.05, 0.25, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹) 或 BA (0.5, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹) 的 MS 培養基，進行芽體增殖。培養 8 週後，調查每單芽增殖的芽數、株高、發根數與根長。隨培養基添加細胞分裂素 BA 或 TDZ 濃度增加，可顯著促進狼尾草分蘖芽數的增加，但株高、發根數及根長的生長明顯受到抑制。因此根據本試驗結果，以狼尾草芽體培養可做為狼尾草品種保存之方法。

關鍵詞：狼尾草、芽體培養、植株增殖。

緒 言

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或品種保存，已有許多成功的例證 (蔡，1992；林等，1996)。

在牧草種原保存與品種改良方面，包括建立盤固草 (*Digitaria decumbens*) 品系 A254 幼穗培養 (施等，2007) 與細胞懸培養技術 (施等，2008)，並應用於牧草基因轉殖之研究 (施，2008)，期進行盤固草 A254 之遺傳改良與種原之保存。目前已命名通過的尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 臺畜草一號，也以組織培養方式建立健康種苗之生產體系與種苗保存方法 (施等，2010)。

民國 80 年 4 月命名通過的狼尾草臺畜草一號，由矮性珍珠粟 (*Pennisetum americanum*) Tift1# S-1 與高莖狼尾草 (*Pennisetum purpureum*) A146 雜交後裔，所選育之矮性狼尾草 (代號 7301)，染色體數為三元體， $2n = 21$ ，分蘖數多，葉莖的乾重比率較高，與野生高大具茸毛之野生狼尾草不同，深受酪農喜愛 (成，1991)。民國 85 年 12 月命名狼尾草臺畜草二號主要由高莖狼尾草 A146 與 A149 (四元體) 等自然族群後裔，經多年選育選出高莖品系 7262 (四元體)，鮮草產量較原栽培種 A146 高 20% 以上，在花蓮瑞穗地區建立之全年芻料穩定供應模式以臺畜草二號為主 (蕭等，1996；成等，2001)。民國 98 年 10 月 13 日命名通過之狼尾草臺畜草三號為矮莖之品系，屬矮性直立叢生型，葉片直立，葉身與葉鞘毛茸多，為矮性品種 "Mott" 之自然受粉後裔選出之優良品系，四倍體， $2n = 28$ 。評估狼尾草臺畜草三號及二號對乳羊的採食量及泌乳性能之影響，乾物採食量、乳產量、4% 脂肪校正乳及乾物採食量 / 體重上，狼尾草臺畜草三號組皆顯著高於狼尾草臺畜二號組 ($P < 0.05$)。在乳組成方面，乳脂率、乳蛋白率、乳糖及總固形物，臺畜三號組皆顯著高於臺畜二號組 ($P < 0.05$) (黃等，2012)。民國 99 年 6 月 10 日育成之狼尾草臺畜草四號，以狼尾草臺畜草二號為母本，紫色狼尾草為父本之雜交後裔選拔，為高莖品種，主要作為纖維酒精發酵之用。民國 100 年 8 月育成之狼尾草臺畜草五號為高莖直立叢生型之紫色品種，由臺灣地區紫色狼尾草種原收集後選育之品種，具大量花青素可做健康飲品等 (成等，1992；成，1994；成等，1995；成等，2003)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2225 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所飼料作物組。

(4) 國立嘉義大學農藝學系。

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

狼尾草臺畜草一、二、三、四、五號之植株外觀顯著不同，狼尾草臺畜草一號因節間短且靠近地面不耐淹水，目前國內已甚少栽培，迫切需要以植物組織培養的技術進行保種。由於狼尾草為異交作物，以慣行之田間種原保存，開放授粉條件下易產生種間雜交，失去原有品種特性，因此以組織培養方式進行狼尾草種原保存有其必要性，並可縮短國際種原交換之檢疫流程，促進國際交流。因此，本研究主要建立狼尾草臺畜草三號之芽體培養與芽體增殖之組織培養方法，並應用至狼尾草臺畜草（一號、二號、四號、五號），以進行品種保存與種苗量產之需。

材料與方法

I. 試驗材料與芽體消毒

狼尾草臺畜草一、二、三、四及五號，取自畜產試驗所新竹分所的牧草區，其栽培管理依一般慣行法。自田間取回之莖節，攜回實驗室剪去多餘的葉片，先以 70% 酒精進行植體表面消毒，於無菌操作臺取出莖節上幼芽，放入滅菌過之 500 mL 圓錐瓶，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。將消毒過幼芽取出，移至 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基，作為無菌試管苗與品種保存之材料。

II. 細胞分裂數對芽體增殖與植株生長之影響

為探討細胞分裂素 N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea (TDZ) 及 6-benzylaminopurine (BA) 對狼尾草臺畜草三號芽體增殖之影響。添加不同濃度的細胞分裂素 TDZ (0.05, 0.25, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹) 或 BA (0.5, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹)，或活性碳 (Charcoal activated) 3 g L⁻¹ 於含有 3% 蔗糖的 MS 基本培養基。固體培養則另外添加 0.3% (w/v) 水晶洋菜 (Gelrite, Sigma-Aldrich) 使培養基凝固。滅菌前，先調整培養基 pH 值為 5.7 – 5.8，分裝至直徑 9 cm 的 500 mL 圓錐瓶，每瓶 100 mL，或是直徑 2 cm 高 12 cm 的試管，每試管加入 10 mL 培養基，以鋁箔紙封口後，以 121℃ 及 102 kpa 壓力，進行滅菌 15 分鐘。每處理放置 4 個單芽，4 重覆，於培養 8 週後調查每單芽的增生數目、株高與根長。並以各處理組每增殖體增生的芽數，除以未加細胞分裂素自然增殖的芽數，計算每處理芽數增殖的倍率。

所有處理的培養條件，以三波長自然色日光燈管 (旭光 FL40D-EX/38) 及植物生長燈管 (旭光 FL-40SBR / 38 FLOW-LUX) 為光源，燈管外觀偏紅色，λ 545 nm，光照強度為 25 – 47 μmol m⁻² s⁻¹。16 小時光照週期，於 25 ± 1℃ 的組織培養室培養。

III. 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 檢測各效應之顯著性，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

細胞分裂素 (cytokinin) 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 Kinetin (KN)、BA、zeatin riboside (ZR)、6-(γ, γ-dimethylallyl amino) purine riboside (2-ip) 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-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU)、N-phenyl-N'-benzothiazol-6-ylurea (PBU) (Carra *et al.*, 2006)。在適當植物生長調節劑的刺激下，植物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。因此，本研究以 BA 及 TDZ 探討細胞分裂素對狼尾草臺畜草三號芽體增殖之影響，並應用於狼尾草臺畜草一、二、四及五號。由表 1 的結果得知，不添加 BA 的培養基，狼尾草臺畜草三號單芽培養於 MS 培養基 8 週，平均可增生至 1.1 芽，隨 BA 濃度增加分蘖的芽數也增加，8 mg L⁻¹ BA 處理增殖的芽數最高為 6.1 芽。若以不加 BA 處理的芽數當作對照，計算添加 BA (0.5, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹) 每單芽的增殖倍率由 2.5 增加至 5.6 倍。雖然隨 BA 濃度增加每單芽的分蘖數增加，但株高，發根數與根長度明顯受到抑制。不加 BA 處理的 MS 培養基，株高可達 30.8 cm，根數為 5.5，根長為 6.6 cm，皆顯著高於其他處理組，表示 BA 處理雖可增加分蘖數，但植株地上部株高與根系生長則受到抑制。由表 2 的結果得知，TDZ 濃度由 0.00 增加至 0.50 mg L⁻¹，狼尾草臺畜草三號芽數由 1.1 芽增加至 4.5 芽，但高濃度 2.00 mg L⁻¹ TDZ 則明顯抑制芽體的增殖僅為 2.1 芽，表示隨 TDZ 濃度增加可促進芽數增加，但高濃度 TDZ 則抑制芽數的增加，添加 TDZ 顯著抑制株高、發根數、根長的生長，與 BA 處理的結果類似。由圖 1 的結果可觀察到，隨 BA 或 TDZ 濃度增加，狼尾草臺畜草三號植株的分蘖芽數雖然增加，但植株株高明顯被抑制且無根系的生長，因此不建議採用高濃度的細胞分裂素。根據表 1 及圖 2 的結

果建議以 0.5 mg L⁻¹ BA 做為狼尾草臺畜草三號的基本培養基，促進芽數增加，當需要移至田間種植則預先將試管苗移至不含 BA 的液體培養基培養，由圖 2 的狼尾草臺畜草三號植株外表型態觀察，分蘖芽數正常 (圖 2B) 且根系生長良好 (圖 2C)。因此本試驗結果可應用於狼尾草臺畜草三號之種原保存。

表 1. BA 對狼尾草臺畜草三號芽體增殖與植株生長之影響

Table 1. Effect of BA on bud proliferation and plant growth of napiergrass cultivar TLG 3

Bud induction medium (BA) (mg L ⁻¹)	Number of explants cultured (No.)	Average bud number per explant ^z (No.)	The ratio of bud increased	Plant height (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
0.0	11	1.1 ^d	1.0 ^d	30.8 ^a	5.5 ^a	6.6 ^a
0.5	8	2.8 ^c	2.5 ^c	15.1 ^b	1.3 ^{bc}	2.8 ^b
1.0	10	4.1 ^b	3.8 ^b	13.5 ^c	0.5 ^c	0.6 ^d
2.0	12	5.1 ^b	4.7 ^b	12.4 ^d	1.1 ^c	1.1 ^{cd}
4.0	11	4.6 ^b	4.3 ^b	12.7 ^{cd}	1.6 ^b	1.6 ^c
8.0	9	6.1 ^a	5.6 ^a	10.4 ^e	2.2 ^b	1.7 ^c

^z Means followed by different superscript letters are significantly different at the 0.05 level according to least significant difference (LSD) test. The ratio of bud increased was calculated by the bud number of BA treatment divide the number (1.1) of zero BA treatment. BA: 6-benzylaminopurine

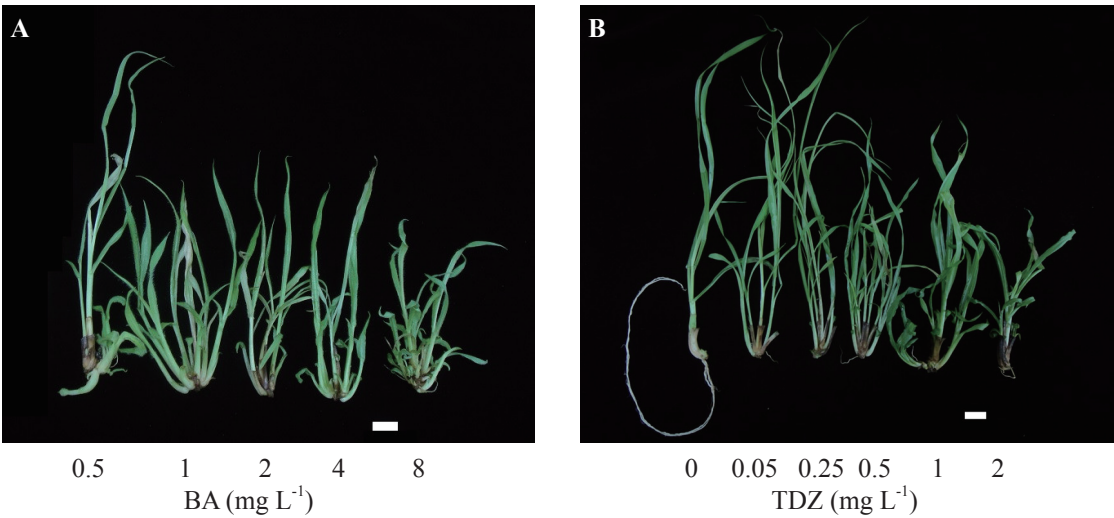


圖 1. BA 及 TDZ 對狼尾草臺畜草三號芽體增殖與植株外表型態之影響。A. BA 處理 B. TDZ 處理 (bar=1cm)。
Fig. 1. The effect of BA and TDZ on the morphology of napiergrass cultivar TLG 3. A: BA treatment B: TDZ treatment.

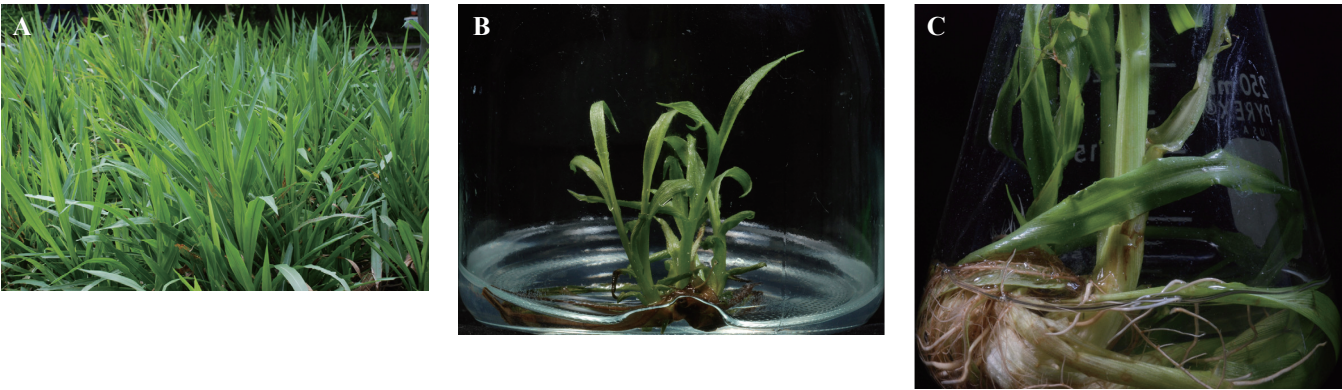


圖 2. 狼尾草臺畜草三號田間苗 (A) 及液體培養試管苗 (B)(C)。
Fig. 2. The morphology of napiergrass cultivar TLG 3 growth in field (A) and in vitro (B) (C) by liquid medium.

TDZ 具促進細胞分裂素活性 (Mok *et al.*, 1982; Thomas and Katterman, 1986)，可誘導小米 (*Paspalum scrobiculatum* L.) 穎果 (Rashid, 2002) 或大麥 (*Hordeum vulgare*) 未成熟胚形成不定芽 (Ganeshan *et al.*, 2003)，亦常用於促進體胚的萌芽，促進植株再生 (Ipekci and Gozukirmizi, 2003; Rashid, 2002)。TDZ 其作用機制可能與抑制 cytokinin oxidase 活性 (Hare and van Staden, 1994)，或促進內生細胞分裂素的合成 (Capelle *et al.*, 1983) 有關，較其它 purine 類的細胞分裂素更能有效地誘導地上部不定芽的形成 (Guo *et al.*, 2005)，但組織不能長期放置在含有 TDZ 的培養基，以免影響植株的發根 (Lu, 1993)，與本試驗表 2 的結果相近。亦見諸於一些研究報告 (施等, 2007; 施等, 2010)。

表 2. TDZ 對狼尾草臺畜草三號芽體增殖與植株生長之影響

Table 2. Effect of TDZ on bud proliferation and plant growth of napiergrass cultivar TLG 3

Bud induction medium (BA) (mg L ⁻¹)	Number of explants cultured (No.)	Average bud number per explant ^z (No.)	The ratio of bud increased	Plant height (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
0.00	11	1.1 ^c	1.0 ^c	24.6 ^a	2.6 ^a	9.4 ^a
0.05	12	3.8 ^a	3.4 ^a	20.8 ^b	1.4 ^b	1.7 ^b
0.25	11	3.8 ^a	3.5 ^a	14.6 ^c	0.6 ^b	0.9 ^b
0.50	12	4.5 ^a	4.1 ^a	12.9 ^d	1.1 ^b	1.5 ^b
1.00	14	2.5 ^b	2.3 ^b	13.2 ^d	0.8 ^b	1.4 ^b
2.00	10	2.1 ^b	1.9 ^b	12.0 ^e	0.7 ^b	0.7 ^b

^z Means followed by different superscript letters are significantly different at the 0.05 level according to least significant difference (LSD) test. The ratio of bud increased was calculated by the bud number of TDZ treatment divide the number (1.1) of zero TDZ treatment. TDZ: N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea

根據狼尾草臺畜草三號之消毒與田間取材方法，進行狼尾草臺畜草一、二、四、五號之無菌苗培養方法之建立。試驗結果如圖 3 所示，狼尾草臺畜草一號之田間苗為叢生狀，無菌苗因剛消毒尚未有根系發育，培養基 MS 培養基並添加 3 g L⁻¹ 活性碳之 MS 培養基，無菌苗可經 0.5 mg L⁻¹ BA 處理促進芽數增加。狼尾草臺畜草二號及四號之田間苗與試管苗如圖 4 所示，狼尾草臺畜草二號為高莖植株，取其芽體消毒後放置於 MS 培養基，主要芽體抽長但尚未有根系生長。狼尾草臺畜草四號田間苗亦為高莖狼尾草，其無菌試管苗與狼尾草臺畜草二號外表相似。狼尾草臺畜草五號田間苗與試管苗如圖 5 所示，為紫色高莖狼尾草，其芽體消毒後放置於 MS 培養基，主要芽體抽長並具根系生長，由於紫色狼尾草之花青素為二次代謝產物，必須植株成熟後才會表現，因此在組織培養的幼苗期，紫色性狀並未表現。

依據品種與物種特性往往需建立不同培養方式，但根據本試驗之消毒與取材方法，已初步建立狼尾草臺畜草三號之組織培養方法，亦可應用於狼尾草臺畜草一號、二號、四號、五號之組織培養，因此利用植物組織技術之芽體培養，可視為國內狼尾草品種保存之重要方法之一。

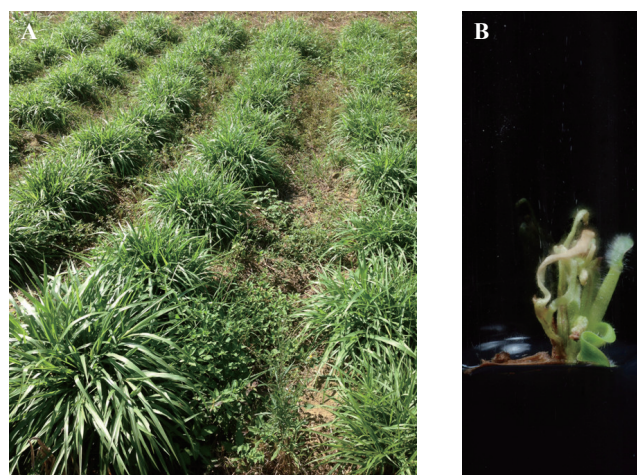


圖 3. 狼尾草臺畜草一號田間苗 (A) 及試管苗 (B) 之外表形態。

Fig. 3. The morphology of napiergrass cultivar TLG 1 growth in field (A) and *in vitro* (B).

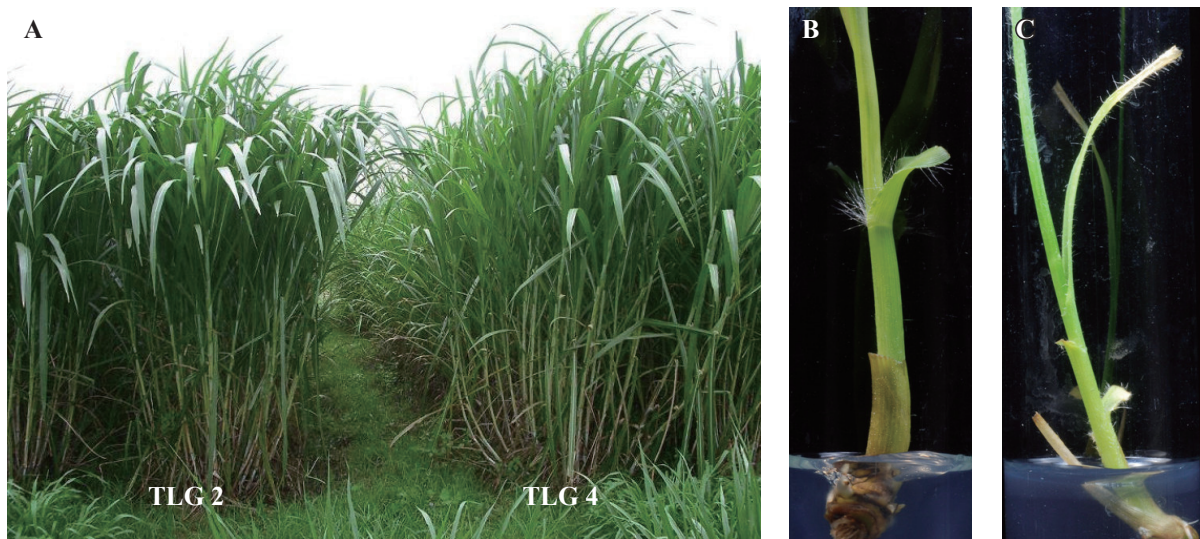


圖 4. 狼尾草臺畜草二號與四號。田間苗 (A)、二號試管苗 (B)、四號試管苗 (C)。

Fig. 4. The morphology of napiergrass cultivar TLG 2 and cultivar TLG 4 growth in field (A) and in vitro TLG 2 (B) TLG 4 (C).



圖 5. 狼尾草臺畜草五號田間苗 (A) 及試管苗 (B)。

Fig. 5. The morphology of napiergrass cultivar TLG 5 growth in field (A) and in vitro (B).

誌 謝

本研究經費來源為行政院農業委員會科技計畫 (100 農科 -8.1.3- 畜 -L1(9)、101 農科 -2.1.8- 畜 -L1(10)、102 農科 -2.1.8- 畜 -L1(4))，承蒙畜產試驗所飼料作物組前研究員成游貴博士提供狼尾草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本項研究，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

- 成游貴。1991。狼尾草新品種臺畜草 1 號。豐年 41：12-14。
- 成游貴。1994。珍珠粟一狼尾草複二倍體與野生種狼尾草之雜交種之細胞遺傳與性狀之研究。畜產研究 27：311-323。
- 成游貴、王紓愍、陳嘉昇。2003。狼尾草育種一紫色狼尾草種原性狀之研究。畜產研究 36：181-191。

- 成游貴、吳建福、羅國棟、唐清岑、張溪泉、陳文、黃耀興。1992。狼尾草育種改良。畜產研究 25：151-170。
- 成游貴、陳嘉昇、王紓愍、張溪泉、陳玉燕、黃耀興、陳文。2001。不同倍數性矮性狼尾草產量與品質之研究。畜產研究 34：29-36。
- 成游貴、陳嘉昇、吳建福。1995。矮性狼尾草產量與品質之改良。畜產研究 28：285-294。
- 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。2008。盤固草組織培養與基因鎗轉殖系統之建立。臺灣大學農藝學研究所。博士論文。臺北。
- 施意敏、張珈錡、廖成康。2010。CPPPU 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。
- 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。
- 黃憲榮、成游貴、許晉賓、王治華。2012。狼尾草臺畜草三號及二號品種對乳羊泌乳性能之影響評估。畜產研究 45：217-226。
- 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。
- 蕭素碧、成游貴、陳嘉昇。1996。牧草育種現況。豐年 46：38-43。
- Capelle, S. C., D. W. S. Mok, S. C. Kirchner and M. C. Mok. 1983. Effects of TDZ on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Δ 2-isopentenyl)[8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73: 796-802.
- Carra, A., F. D. Pasquale, A. Ricci and F. Carimi. 2006. Diphenylurea derivatives induce somatic embryogenesis in *Citrus*. Plant Cell Tiss. Org. 87: 41-48.
- Ganeshan, S., M. Baga, B. L. Harvey, B. G. Rosnagel, G. J. Scoles and R. N. Chibbar. 2003. Production of multiple shoots from thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Cell Tiss. Org. 73: 57-64.
- 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. 83: 123-127.
- Hare, P. D. and J. van Staden. 1994. Inhibitory effects of TDZ on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. Plant Cell Physiol. 35: 1121-1125.
- Ipekci, Z. and N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. Plant Cell Rep. 22: 16-24.
- Lu, C. Y. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Plant. 20: 92-96.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea (thidiazuron). Phytochemistry. 21: 1509-1511.
- 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.
- SAS. 2002. SAS Procedure Guide for Personal Computer. Version 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary. NC. U.S.A
- Thomas, J. C. and F. R. Katterman. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiol. 81: 681-683.

The study of bud culture and plant proliferation of napiergrass (*Pennisetum purpureum*)⁽¹⁾

Yih-Min Shy⁽²⁾⁽⁵⁾ Tzu-Rung Li⁽³⁾ and Cherng-Kang Liao⁽⁴⁾

Received: Feb. 13, 2015; Accepted: Apr. 23, 2015

Abstract

The object of this study was to establish a system for bud culture and plant proliferation of napiergrass for preservation of cultivar TLG 1, TLG 2, TLG 3, TLG 4 and TLG 5. The buds of cultivar TLG 3 were used as explants and cultured on MS medium with TDZ (0.05, 0.25, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹) or BA (0.5, 1, 2, 4, 8 mg L⁻¹). The number of bud induction and plant height were examined 8 weeks after culture. The average number of bud per plant was increased with BA and TDZ concentration but plant growth was inhibited include plant height, root number and root length. From those results, the bud culture system was effective for preservation of napiergrass cultivar.

Key words: Bud culture, Plant proliferation, Napiergrass.

(1) Contribution No. 2225 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. R.O.C.

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

(3) Forage Crops Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R.O.C.

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

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