

盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*) 細胞 懸浮培養與植株再生⁽¹⁾

施意敏^{(2)*} 廖成康⁽³⁾ 盧虎生⁽⁴⁾ 朱 鈞⁽⁴⁾

摘 要

盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*) 是台灣地區適應性相當廣的熱帶牧草，由於盤固草遺傳組成三倍體，花粉不稔。為加速傳統育種效率，期利用生物技術提供遺傳改良的另一個途徑。因此，本研究主要建立具植株再生能力的細胞懸浮培養方法，以因應基因轉殖或突變育種之需。將盤固草 A254 未成熟花穗，接種於含有 2 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 及 0.5 mg/l BA (N⁶-benzyladenine) 的 MS (Murashige and Skoog's) 固體培養基，誘導的癒合組織幾乎全部為白色結構緊密的胚性癒合組織，BA 顯著影響癒合組織的型態。一些透明鬆軟的癒合組織，可持續繼代培養於含有 2 mg/l 2,4-D 的 MS 液體培養基，至少六個月以上。一旦需要植株再生時，可於原懸浮細胞培養基添加 0.5 mg/l BA，培養一週後，再移至含有 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l BA 的固體培養基，以誘導白色緊密的胚性癒合組織。將這些胚性癒合組織移至含有 0.5 mg/l BA 或 0.05 mg/l TDZ 的 MS 培養基，分別含 88.9% 或 87.7% 的癒合組織可再生為完整植株。本研究結果對盤固草基因轉殖非常重要且相當有益，因為可以在人為的控制下，精準地促進細胞持續增殖，並保有高頻度的植株再生能力。

縮寫字：BA: N⁶-benzyladenine; CPPU: N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea;

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; KN: Kinetin

MS: Murashige and Skoog's medium;

TDZ: N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea;

關鍵詞：植株再生、癒合組織形態、盤固草

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1386 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所副研究員。新竹市台灣。

(3) 國立嘉義大學農藝系副教授。嘉義市台灣。

(4) 國立台灣大學農藝系教授。台北市台灣。

*通訊作者。

(民國96年10月26日收件；民國96年11月19日修改；民國96年11月22日接受)

前 言

近年來，以蛋白質為基礎的生物製劑類（Biopharmaceuticals），其應用領域相當廣泛，如口服疫苗、抗體、醫療診斷試劑、或治療藥劑等，以往這些蛋白質的商業生產以仰賴微生物發酵或哺乳動物細胞株的生產為主，但這些生產方式有其缺點，如生產成本高、無法大量化生產，及可能遭受動物性病原內毒素汙染等風險，尋求其替代的生產系統應運而生。

由於植物基因轉殖技術的進步，以植物作為生物製劑的生產系統正如火如荼的進行，特別以穀類作物如玉米、水稻、大麥及小麥等的種子，作為醫藥蛋白質的生產載體，目前已進入商品化大量生產的例子，包括以玉米種子生產促進蛋白質分解的胰蛋白酶（trypsin）、或抑制某些細菌生長的卵白素（avidin）、及 β -glucuronidase 等（Stoger *et al.*, 2005）。一些接近上市的产品，如預防腦海綿蛋白病變的 Aprotinin，治療胰臟分泌不足的胃脂肪分解酶（human gastric lipase），預防蛀牙的單株抗體 α -carie 等，已陸續進入人體試驗階段（Horn *et al.*, 2004）。雖然以植物生產動物性蛋白質有其遺傳上的困難，如蛋白質的後修飾作用不同，重組蛋白質表現量不足等，但還是有一些策略性的技術可解決，如利用誘導性的啟動子（inducible promoter），在適當條件才表現，以提高基因表現量。或利用對胞器專一的引導訊號，使重組蛋白質在內質網（endoplasmic reticulum）停留久一點，或抑制高爾基體的轉配醣酵素（glycosyltransferase），降低重組蛋白質在高爾基體的後修飾，皆是可利用的策略（Gomord and Faye, 2004; Fischer *et al.*, 2004）。

利用植物細胞懸浮培養生產重組蛋白，可以精確控制細胞生長條件，每批次的產量均一，利用細胞外泌的作用，及層析管柱的吸附與分離，可純化大量的重組蛋白質，並較其它基因表現系統，如動物、田間植物等，更易達到品質均一穩定的 cGMP（compliance with good manufacturing practice）等環境控制要求，因此常用來作為生產生物製劑的首要選擇（Hellwig *et al.*, 2004）。目前利用煙草的懸浮細胞，生產人類組織性轉麩氨酶（human tissue transglutaminase, htTG），並能辨識腸胃道病患血清中的自發性抗體，作為疾病診斷之試劑（Sorrentino *et al.*, 2005），或是利用大豆細胞懸浮培養，生產 B 型肝炎表面抗原（HBsAg）等（Ganapathi *et al.*, 2007），皆是利用植物細胞生產動物性蛋白質相當成功的例子。

植物基因轉殖技術的應用，除了生產外源性蛋白質之外，尚可應用於品種的改良，如遺傳上不稔的肯塔基藍草（Gao *et al.*, 2006）、印度藍莖草（Dalton *et al.*, 2003），或多倍性的雜交品種，如百慕達草（Hu *et al.*, 2005a）等，無法以傳統育種法改良的草種，目前皆已建立農桿菌或基因鎗的轉殖系統，包括增加高狐草（*Festuca arundinacea*）的耐冷性（Hu *et al.*, 2005b）與抗真菌性的葉斑病（Dong, *et al.*, 2007），可延遲黑麥草葉片老化（Li *et al.*, 2004）、或增加百慕達草的抗除草劑特性等（Hu *et al.*, 2005a）。除基因轉殖技術的應用，以懸浮培養的方式，進行癒合組織體細胞變異（somaclonal variation）的篩選，在百慕達草已篩選出七個細胞品系，其再生植株比母本更具耐旱性（Lu *et al.*, 2006）。不論是基因轉殖或體細胞變異的篩選，細胞懸浮培養與植株再生系統的建立，提供另一個遺傳改良的途徑。

盤固草 A254 品系（*Digitaria decumens*）自美國引進台灣地區種植後，迅速成為台灣地區

栽培面積最廣的牧草，其染色體組成為三倍體，無法以傳統育種法進行品種改良（成游貴，1986）。盤固草具栽培容易，一年可收穫多次，無病蟲害，花粉不具傳播性等遺傳特性，非常適合作為生產外源性蛋白質的生物農場（施及廖，2006）。盤固草細胞懸浮培養，最早以盤固草 A24 品系未成熟花穗為培植體，經長期繼代培養，植株的再生率為 21.4~48.0%，添加 KN（kinetin）亦可顯著增加盤固草 A24 未成熟花穗誘導胚性癒合組織的頻度（成游貴，1993）。盤固草 A254 品系未成熟花穗，培養於含有 2,4-D 2.0 mg/l 的 MS 培養基，添加 CPPU 0.5 mg/l，白色緊密癒合組織的誘導率為 90.0%。將白色緊密癒合組織，接種至含有 TDZ 0.05 mg/l 的 MS 培養基，有 80.0% 可分化成完整植株，而透明鬆軟的癒合組織則甚少完成植株的分化（施等，2007）。因此，不論是自然界存在細胞分裂素，如 adenine 的衍生物 BA、KN，或是人工合成的 phenylurea 衍生物如 CPPU，皆對胚性癒合組織的形成具密切關係。

由於直立型的盤固草 A24 品系與雜草競爭性低，已逐漸被匍匐型的盤固草 A254 品系取代，目前國內並無盤固草 A24 的種植。因此，本研究主要重新建立盤固草 A254 細胞懸浮培養系統，探討 2,4-D 及 BA 對胚性癒合組織形成、胚性細胞懸浮培養及植株再生率之影響，以期因應未來基因轉殖或體細胞變異篩選之需。

材料與方法

一、試驗材料

盤固草 (*Digitaria decumbens*) A254 品系，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。

二、幼穗消毒

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 350 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。

三、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[®])，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 15mm 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。

四、癒合組織的誘導

將消毒過的未成熟花穗，分別接種於添加 2,4-D (0.5、1、2 mg/l) 及 BA (0、0.05 mg/l) 不同組合之癒合組織誘導培養基 (callus induction medium)，每個平盤培養皿接 3~4 個未成熟花穗，穗長約 4~5 cm，至少四重複。於黑暗下培養，三週後，調查白色緊密癒合組織及透明鬆軟癒合組織的誘導率。

三、細胞懸浮培養的建立

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)，接種至與誘導培養基相同生長調節劑的液體培養基，每處理至少四重複。於 25 ± 1°C 無光照的組織培養室，以 75 rpm 震盪培養，每週更換 1/4 的新鮮培養液。其中僅 2 mg/l 2,4-D 誘導的鬆軟癒合組織，可持續於含 2 mg/l 2,4-D 的液體培養基培養，其餘由 0.5 mg/l BA 誘導的白色癒合組織，經液體培養一週後，全部褐化死亡，因此僅有 2 mg/l 2,4-D 誘導的癒合組織可持續液體培養，做為懸浮細胞培養之細胞來源。

四、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，取 10 ml 大於 1 mm 的細胞濾液，加入 20 ml 含有 2,4-D (0.5、1、2 mg/l) 與 BA (0.5 mg/l) 不同組合之液體培養基，以誘導胚性細胞的形成。待細胞增殖一週後，將細胞團接種於含有 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l 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)，以誘導胚性癒合組織的形成。

一週後，將白色緊密的胚性癒合組織，分別接種於添加 0.5 mg/l BA 或 0.05 mg/l TDZ 用於植株再生的培養基 (plant regeneration medium)，每平盤接 30 個培植體，每處理組合至少 3 重複。於 25 ± 1°C 具光照的組織培養室培養，培養二週後，調查胚性癒合組織再生成植株的比率。

五、統計分析

利用 SAS 統計分析系統的一般線性模式 (General liner model) 進行複因子變方分析。以 F-test 檢測主效應 (2,4-D、BA) 及交感效應 (2,4-D × BA) 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

要成功建立具植株再生能力之懸浮細胞培養方法，一開始胚性細胞團的誘導與挑選是很重要的一環。禾草的研究方面，常用來誘導胚性癒合組織形成的培植體，包括小麥的葉片 (Wang and Wei, 2004)，玉米、大麥、小麥、百慕達草的莖節 (Hu *et al.*, 2005a; Sharma *et al.*, 2007; Sidorov *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003)，暨奧古斯丁草、百慕達草的未成熟花穗 (Chaudhury and Qu, 2000; Li and Qu, 2004; Li *et al.*, 2006) 及高粱、小米、小麥或大麥的未成熟胚 (Chang *et al.*, 2003; Fellers *et al.*, 1995; Oldach *et al.*, 2001) 等。使用的培養基以 MS 培養基加上 2,4-D 及一些細胞分裂素如 BA、KN 及 CPPU 等，依物種與培植體而異。因此，本試驗先以 2,4-D (0.5、

1.0、2.0 mg/l) 與 BA (0.0、0.5 mg/l) 不同生長調節劑組合的 MS 培養基、誘導盤固草 A254 未成熟花穗形成癒合組織。由表一的結果得知，在不含 0.5 mg/l BA 的培養基，隨 2,4-D 濃度由 0.5 mg/l 增加至 2.0 mg/l，透明鬆軟的癒合組織數量由每培植體誘導 0.3 個增加至 25.7 個，且誘導出的癒合組織接近 97.6%~100.0% 為此類透明鬆軟的癒合組織。一旦加入 0.5 mg/l BA，則癒合組織的型態為白色緊密的癒合組織，隨 2,4-D 濃度由 0.5 mg/l 增加至 2.0 mg/l，白色緊密癒合組織的數量由每培植體誘導 8.1 個增加至 64.9 個。由此可知，2,4-D 與癒合組織的數目呈顯著的線性關係增加，而 BA 與癒合組織的型態發生具顯著的密切關係。

表 1 2,4-D 與 BA 對誘導盤固草 A254 未成熟花穗形成癒合組織型態之影響

Table 1. Effects of 2,4-D and BA on the type of callus induction from immature inflorescences of pangolagrass A254.

Callus induction medium (mg/l)		Number of explant culture	Total number of callus induction	Number and percentage of callus type per explant ^z			
2,4-D	BA			transparent and friable		white and compact	
				No.	%	No.	%
0.5	0.0	8	2	0.3 b	100.0 a	0.0 d	0.0 b
1.0	0.0	14	47	3.3 b	97.6 a	0.1 d	2.4 b
2.0	0.0	13	334	25.7 a	100.0 a	0.0 d	0.0 b
0.5	0.5	7	57	0.0 b	0.0 b	8.1 c	100.0 a
1.0	0.5	9	296	0.0 b	0.0 b	32.9 b	100.0 a
2.0	0.5	8	519	0.0 b	0.0 b	64.9 a	100.0 a
Significance							
2,4-D				**	ns	**	ns
BA				**	**	**	**
2,4-D x BA				**	ns	**	ns

^z Immature inflorescence was cut into 4-5 cm long and cultured in MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and BA. Data were recorded 3 weeks later. Each Petri dish had three to four explants. Means followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test. *Significant at $p=0.05$; ** Significant at $p=0.001$; ns: non-significant.

根據 Chaudhury & Qu (2000) 的研究報告指出，百慕達草 Tifgreen 品種的未成熟花穗培養，添加 1 mg/l (4.52 μ M) 2,4-D 會誘導組織鬆散無結構的非胚性癒合組織，幾乎無植株再生能力。一旦添加 0.01 mg/l (0.044 μ M) BA，則會形成白色緊密顆粒狀的胚性組織，約有 24.2% 的胚性組織具植株再生能力。成及羅 (1987) 以盤固草的莖節，培養於含有 2 mg/l 2,4-D 及 1.0 mg/l KN 的 MS 培養基，有 55.4% 可形成白色緊密的胚性癒合組織，經組織切片與掃描式電子顯微鏡觀察的結果，這些白色緊密的胚性癒合組織，具地上部芽鞘與地下部根鞘之雙極結構，

其主要經由體胚分化的途徑再生成植株。因此，據以推測本試驗由 0.5 mg/l BA 誘導的白色緊密癒合組織，可能為具高分化能力之胚性細胞，將來以體胚分化的途徑再生成植株。

雖然以盤固草未成熟花穗誘導的胚性癒合組織具有很高的植株再生能力（施等，2007），但這些胚性癒合組織經固體培養基的繼代培養後，往往失去植株分化能力。Lu 等（2006）也觀察到以 6.6 mg/l dicamba 及 0.5 mg/l BA 誘導百慕達草莖節產生的胚性癒合組織，在固體培養基繼代培養，也會失去細胞增殖與分化能力。Lu 等（2006）等遂將胚性癒合組織接種至原來的誘導培養基，改以液體培養基，低轉速（20 rpm）震盪培養，使細胞團分散懸浮，經二年的長期繼代培養仍能維持植株再生能力。成游貴（1993）亦曾以盤固草 A24 胚性癒合組織進行液體培養，可長期繼代培養一年以上。因此，本試驗嚐試將 2,4-D 與 BA 不同濃度組合誘導的癒合組織，再接種至相同生長調節劑濃度的液體培養基進行培養。試驗結果顯示，由 0.5 mg/l BA 誘導的白色緊密胚性癒合組織，在含有 0.5 mg/l BA 的液體培養基培養，一週內幾乎全部褐化死亡，很可能因 BA 誘導的白色緊密癒合組織已具體胚發育的特性，一旦液體培養類似遭受淹水逆境，細胞因此褐化死亡。值得注意的是，僅 2 mg/l 2,4-D 誘導的鬆軟組織（如圖 1A），於含有 2 mg/l 2,4-D 的液體培養基可持續培養數週，並逐漸產生細小顆粒（如圖 1B），若將這些細小顆粒，直接移至含有 0.05 mg/l TDZ 的分化培養基，幾乎無植株再生。因此，這些鬆軟的細胞團，在含有 2 mg/l 2,4-D 的液體培養基，可長期繼代增殖具細胞分裂能力，但並未具細胞分化能力，符合細胞懸浮培養的目的。

要如何喚醒這些在 2,4-D 液體培養基培養的細胞，開始進入細胞分化呢？改變生長素（auxin）與細胞分裂素（cytokinin）的比例是常用的方法（Arnold *et al.*, 2002）。因此，本試驗採用的策略是於液體培養基降低 2,4-D 濃度或增加 BA 濃度。將大於 1 mm 的懸浮細胞移至含有 2,4-D（0.5、1.0、2.0 mg/l）及 BA（0.0、0.5 mg/l）不同組合的液體培養基，進行一週的短暫培養，再全部移至含有 2 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l BA 鋪有濾紙的固體培養基，比擬早期研究的半固體培養，一週後在透明鬆軟的癒合組織表面形成白色緊密的胚性癒合組織，類似體胚的形狀（如圖 1C），與百慕達草（Chaudhury and Qu, 2000）、奧古斯丁草（Li *et al.*, 2006）、高粱（Oldach *et al.*, 2001）或大麥（Chang *et al.*, 2003）等的體胚外形結構相似。將白色緊密的癒合組織再移至含有 0.5 mg/l BA 或 0.05 mg/l TDZ 的分化培養基，二週後即形成再生植株並具完整根系（如圖 1D）。由表 2 結果得知，當液體培養基不含 BA 時，不論是 0.5 mg/l BA 或 0.05 mg/l TDZ 的培養基，癒合組織再生為植株的比率僅 11.1%~28.9%。若液體培養基添加 0.5 mg/l BA，隨 2,4-D 濃度由 0.5 mg/l 增加至 2.0 mg/l，BA 培養基的植株再生率由 0.0% 增加至 88.9%。雖然 0.5 mg/l 2,4-D 與 0.5 mg/l BA 液體培養的細胞團，植株再生率為 0.0%，但分化為地上部莖葉的佔 21.1%，主要因 2,4-D 濃度偏低，培養二週時尚未發根，其他高濃度的 2,4-D 已促進植株發根，因此植株再生率較高。當液體培養基含有 2 mg/l 及 0.5 mg/l BA，誘導的白色緊密癒合組織，不論是接種在 0.5 mg/l BA 或 0.05 mg/l TDZ 的分化培養基，皆有 88.9% 及 87.8% 再生為植株，其餘 11.1%~12.2% 為地上部莖葉的分化，接近 100% 的癒合組織皆具分化能力，成功克服盤固草細胞分化的問題。

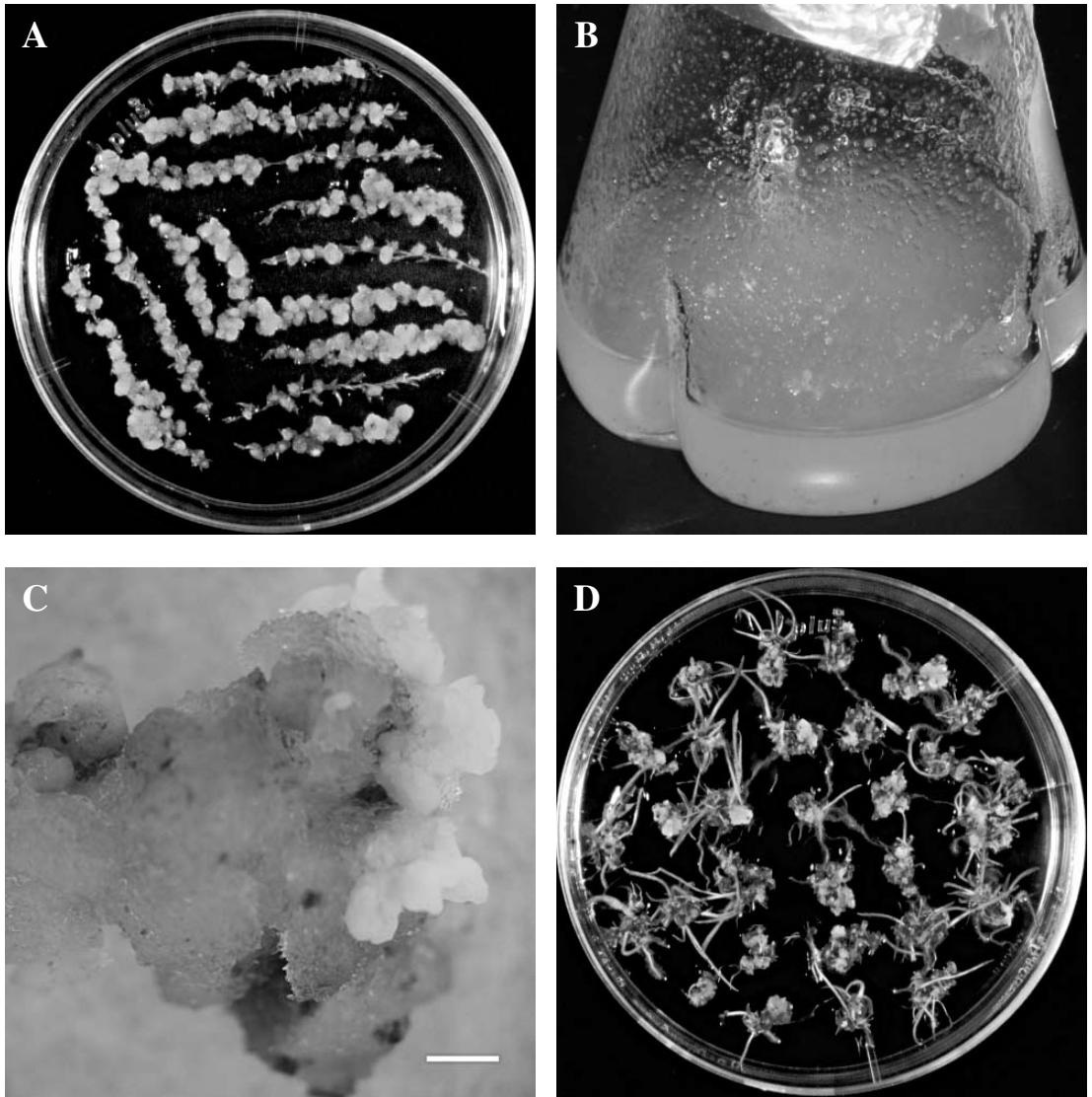


圖 1 盤固草A254未成熟花穗細胞懸浮培養與植株再生系統

Fig 1. The cell suspension cultures and plant regeneration system were established from immature inflorescences of pangolagrass A254.

- A. The cell suspension cultures were initiated from the friable callus induced on MS medium with 2 mg/l 2,4-D.
- B. The cell suspension was subcultured with 2 mg/l 2,4-D every week.
- C. The white and compact calli were induced by adding 0.5 mg/l BA and 2 mg/l 2,4-D on liquid suspension medium for 1 week and then transferred to MS solid medium with 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA. Arrow head indicated the somatic embryos, Bars = 100 μ m.
- D. Plant regeneration from the white and compact callus cultured on MS solid medium with 0.5 mg/l BA for 2 weeks.

表 2 液體培養基添加 2,4-D 及 BA 對盤固草 A254 懸浮細胞植株再生之影響

Table 2. Effects of liquid medium with 2,4-D and BA on plant regeneration from cell suspension culture of pangolagrass A254.

Liquid culture medium (mg/l)		Number of callus cultured	Percentages of plant regeneration (%) ^z			
2,4-D	BA		BA 0.5 mg/l		TDZ 0.05 mg/l	
			Plantlet	Shoot	Plantlet	Shoot
0.5	0.0	90	25.6 c	4.4 b	20.0 b	12.2 b
1.0	0.0	90	28.9 c	13.3 ab	22.2 b	16.7 b
2.0	0.0	90	11.1 cd	13.3 ab	28.9 b	10.0 b
0.5	0.5	90	0.0 cd	21.1 a	0.0 c	45.6 a
1.0	0.5	90	62.2 b	24.4 a	70.0 a	15.6 b
2.0	0.5	90	88.9 a	11.1 ab	87.8 a	12.2 b
Significance						
2,4-D			**	ns	**	*
BA			**	*	**	*
2,4-D x BA			**	ns	**	*

^z The cell suspension material was pre-cultured on MS solid medium with 2,4-D 2 mg/l + BA 0.5 mg/l for one week and then transferred to different regeneration mediums for two weeks. Means followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

*Significant at $p=0.05$; **significant at $p=0.001$; ns: non-significant.

在維持細胞懸浮培養的培養基方面，2,4-D 是常用的生長調節劑。Ganapathi 等 (2007) 以大豆 (*Glycine max*) 細胞懸浮培養方式，生產 B 型肝炎表面抗原，其懸浮細胞培養系統之建立，其先以大豆成熟子葉為培植體，種子經消毒後，將子葉接種於含有 2 mg/l 2,4-D 及 1 mg/l KN 的 MS 固體培養基，誘導帶有一點點白色但結構鬆軟的癒合組織，作為懸浮培養的起始細胞團。四週後，將癒合組織移至含有 1 mg/l 2,4-D 的 MS 液體培養基，進行細胞懸浮培養。挑選分裂旺盛的細胞株進行繼代培養，以添加低濃度 0.4 mg/l 2,4-D 不含 KN 的 MS 液體培養基，作為維持繼代培養的培養基，可顯著增加細胞團的鮮重 10.05 倍。因此，一個細胞懸浮培養的建立，包括癒合組織的誘導、懸浮細胞的建立及懸浮細胞的長期維持，所需的培養基各異，添加的 2,4-D 濃度有依序遞減的趨勢。在體胚發育過程 (somatic embryogenesis)，植物生長調節劑如 2,4-D 主要是促進細胞的增殖，但會抑制體胚的形成，必需降低 2,4-D 濃度或移至不含 2,4-D 的培養基 (Arnold *et al.*, 2002)，或是添加細胞分裂素如 BA (Chaudhury and Qu,

2000; Li *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006) 或 CPPU (施等, 2007; Fiore *et al.*, 2002), 方能促進體胚的形成, 以提高植株再生率。此等概念的應用散見於諸多報導, 如黎豆 (*Vigna unguiculata*) (Ramakrishnan *et al.*, 2005)、小麥草 (Wang *et al.*, 2003)、裸麥草 (Wang *et al.*, 2002)、及大蒜 (Fereol *et al.*, 2005) 等的細胞懸浮培養。

盤固草 A254 細胞懸浮培養的建立, 端賴最初癒合組織的誘導與挑選, 雖然以 2 mg/l 2,4-D 誘導的透明鬆軟癒合組織不具植株的分化能力, 但可作為細胞懸浮培養的起始細胞團, 在含有 2 mg/l 2,4-D 的液體培養基, 可進行細胞增殖與繼代培養 (至少六個月)。當需要植株分化時, 再加添 0.5 mg/l BA 促進細胞形成體胚 (約二週), 即可移至含有 0.05 mg/l TDZ 或 0.5 mg/l BA 的培養基, 進行植株再生 (約二週), 有 88.9% 的癒合組織可分化為完整植株, 11.1% 的癒合組織具地上部莖葉, 發根較慢。因此, 依據本試驗建立的盤固草 A254 細胞懸浮培養與植株再生系統。細胞團可持續液體懸浮培養, 未失去細胞分裂的能力。另一方面, 由細胞團分化至完整植株約四週, 生命週期相當快速, 以生長調節劑精確調控細胞的分裂與分化, 將來可應用於盤固草體細胞變異篩選或基因轉殖之研究。

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: 95 農科 -5.1.3-畜-L1(5), 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

- 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。盤固草雄不稔花藥之細胞與組織構造觀察。畜產研究 19: 99-114。
- 成游貴。1993。盤固草癒合組織液體培養之體胚形成及植物體再生。畜產研究 26: 259-269。
- 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。
- 施意敏、廖成康。2006。牧草的培育與基因轉殖。科學發展 407: 12-15。
- 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。
- Arnold, S. von., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69: 233-249.
- Chang, Y., J. Von Zitzewitz, P. M. Hayes and T. H. H. Chen. 2003. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). *Plant Cell Rep.* 21: 733-738.

- Chaudhury, A. and R. Qu. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 60: 113-120.
- Dalton, S. J., A. J. E. Bettany, V. Bhat, M. G. Gupta, K. Bailey, E. Timms and P. Morris. 2003. Genetic transformation of *Dichanthium annulatum* (Forssk) – an apomictic tropical forage grass. *Plant Cell Rep.* 21: 974-980.
- 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.
- Fellers, J. P., A. C. Guenzi and C. M. Taliaferro. 1995. Factors affecting the establishment and maintenance of embryogenic callus and suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 232-237.
- 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, Stefania. F. D. Pasquale, F. Carimi and M. Sajeve. 2002. Effect of 2, 4-D and 4-CPMU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 68: 57-63.
- 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.
- Ganapathi T. R., G. B. S. Kumar, L. Srinivas, C. J. Revathi and V. A. Bapat. 2007. Analysis of the limitations of hepatitis B surface antigen expression in soybean cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 26: 1575-1584.
- 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. and L. Faye. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 171-181.
- Hellwig, S., J. Drossard, R. M. Twyman and R. Fischer. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotech.* 22: 1415-1422.
- Horn, M. E., 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 glufosinate 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.

- Li, L. and R. Qu. 2004. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) Plant Cell Rep. 22: 403-407.
- 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.
- Li. R., A. H. Bruneau and R. Qu. 2006. Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St. Augustinegrass (*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze). Plant Breed. 125: 52-56.
- 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 Tissue Organ Cult. 87: 77-84.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 497.
- Oldach, K. H., A. Morgenstern, S. Rother, M. Girgi, M. O'Kennedy and H. Lorz. 2001. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Rep. 20: 416-421.
- Ramakrishnan, K., R. Gnanam, P. Sivakumar and A. Manickam. 2005. *In vitro* somatic embryogenesis from cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. Plant Cell Rep. 24: 449-461.
- SAS, 2002. SAS procedure guide for personal computer. Version 6th Ed. SAS Institute Inc. Cary. NC. U.S.A.
- Sharma, V. K., R. Hansch, R. R. Mendel and J. Schulze. 2007. Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. Plant Cell Tissue Organ Cult. 88: 21-33.
- Sidorov, V., L. Gilbertson, P. Addae and D. Duncan. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. Plant Cell Rep. 25: 320-328.
- Sorrentino, A., S. Schillberg, R. Fischer, R. Rao, R. Porta and L. Mariniello. 2005. Recombinant human tissue transglutaminase produced into tobacco suspension cell cultures is active and recognizes autoantibodies in the serum of coeliac patients. Int. J. Biochem. Cell Bio. 37: 842-851.
- Stoger, E., J. K. C. Ma, R. Fischer and P. Christou. 2005. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 167-173.
- Wang, C. T. and Z. M. Wei. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base. Plant Cell Tissue Organ Cult. 77: 149-156.
- Wang, Z. Y., J. Bell and A. Hopkins. 2003. Establishment of a plant regeneration system for wheatgrasses (*Thinopyrum*, *Agropyron* and *Pascopyrum*). Plant Cell Tissue Organ Cult. 73: 265-273.

- Wang, Z., D. Lehmann, J. Bell and A. Hopkins. 2002. Development of an efficient plant regeneration system for Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*). Plant Cell Rep. 20: 797-801.
- Zhang, G., S. Lu., T. A. Chen, C. R. Funk and W. A. Meyer. 2003. Transformation of triploid bermudagrass (*Cynodon dactylon* x *C. transvaalensis* cv. TifEagle) by means of biolistic bombardment. Plant Cell Rep. 21: 860-864.



Plant Regeneration from Cell Suspension Culture of Pangolagrass A254 (*Digitaria decumbens*)⁽¹⁾

Yih-Min Shy^{(2)*} Cherng-Kang Liao⁽³⁾ Hsu-Sheng Lur⁽⁴⁾ Chun Chu⁽⁴⁾

Abstract

Pangolagrass A254 (*Digitaria decumbens*) is a triploid forage grass with wide adaptation in Taiwan. The objective of this study was to develop an efficient plant regeneration system from cell suspension culture of pangolagrass to accelerate genetic improvement of this species by gene transformation or mutation. The embryogenic callus was induced from immature inflorescences of pangolagrass on MS medium with 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA. The type of callus induction was influenced by BA. The induced transparent and friable calli were used to establish and maintain suspension cultures with 2 mg/l 2,4-D for at least 6 months. For plant regeneration, the embryogenic calli were induced by adding 0.5 mg/l BA in suspension medium for one week and then transferred to a solid medium with 2 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA. The addition of BA in the suspension medium enhanced embryogenic callus formation and the ability of plant regeneration. The plant regeneration frequency of the embryogenic calli derived from cell suspension system reached up to 88.9% and 87.8% cultured with 0.5 mg/l BA and 0.05 mg/l TDZ, respectively. The results showed that the calli could keep proliferating and regenerating into the plantlets with high frequency under control. The results show potential for the genetic transformation of pangolagrass.

Keywords: Plant regeneration Callus type Pangolagrass

(1)Contribution No. 1386 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

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

*Corresponding author.

(Received October 26, 2007; Revised November 19, 2007; Accepted November 22, 2007)