

# 指草 *Survenola* (*Digitaria* × *umfolozi* Hall) 未成熟花穗 培養與植株再生<sup>(1)</sup>

施意敏<sup>(2)(3)</sup>

收件日期：111 年 5 月 2 日；接受日期：111 年 11 月 9 日

## 摘 要

*Survenola* (*Digitaria* × *umfolozi* Hall) 為種間雜交的指草屬草種，染色體為 6 倍數，染色體數為 54，主要以匍匐莖進行營養繁殖，為佛羅里達的熱帶草種育種計畫釋出的品種之一。本研究主要以 *Survenola* 的未成熟花穗為培植體，建立癒合組織誘導與植株再生的方法，期建立種原保存與種苗量化生產之技術。將 *Survenola* 的未成熟花穗經適當消毒後，培養於添加植物生長調節劑 1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 與 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (N6-benzyladenine) 不同濃度組合之 MS (Murashige and Skoog) 培養基，探討 2,4-D 及 BA 對 *Survenola* 癒合組織誘導率及植株再生率之影響。試驗結果顯示，培養基添加 2,4-D 及 BA 對未成熟花穗癒合組織誘導率的主效應影響顯著，交感效應不顯著。其中 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 癒合組織誘導率的主效應平均值為 93.1% 顯著高於 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的 88.1% ( $P < 0.05$ )。2,4-D 與 BA 不同濃度組合誘導的癒合組織移至添加 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid) 及 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea) 的植株分化培養基，2,4-D 與 BA 對植株再生率並無顯著的影響。添加 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 與 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 誘導的癒合組織有 60.0% 可分化為植株，顯著高於其他處理組合 ( $P < 0.05$ )。根據本試驗建立之組織培養流程，將有助於 *Survenola* 種苗大量繁殖及未來應用生物技術協助指草屬牧草品種改良之研究。

關鍵詞：指草、癒合組織、植株再生。

## 緒 言

盤固草 A254 (*Digitaria decumbens* Stent) 為 1935 年佛羅里達大學 (University of Florida) 研究團隊，於非洲 Transvala 東方收集到的盤固草種原，*Digitaria* 意指似手指張開放射狀的花序又稱指草 (digitgrass)，*decumbens* 原意為匍匐狀，形容其具匍匐狀的走莖 (stolon)，可依著地面匍匐生長，其註冊號 137 (PI 299601)，染色體組為三倍體，染色體數 27，只能以營養系繁殖 (Schank *et al.*, 1990a)。行政院農業委員會畜產試驗所自菲律賓引進後，盤固草 A254 遂成為臺灣種植面積最廣的盤固草品系。盤固草 A254 長期以無性繁殖，無法產生遺傳變異。面對氣候變遷與銹病危害的風險，盤固草的育種計畫相形重要。

除了傳統雜交育種與生物技術之應用外，引種也是育種家常用的策略。指草 *Survenola* (*Digitaria* × *umfolozi* Hall) 與盤固草 A254 同為指草屬，是美國佛羅里達州熱帶牧草育種計畫第一個命名通過指草屬的雜交品種，註冊號碼為 PI 421785，為種間雜交 (*D. setivalva* × *D. valida*) 的 F1 後裔，染色體數 54，為六倍體，葉寬 10 – 13 mm 較其他指草屬的葉片寬大，葉鞘光滑不具茸毛，很容易與其它指草區分，除具高產特性外並具抗毒素病 (Pangola stunt virus, PSV) 等特性 (Schank *et al.*, 1990b)。畜產試驗所所恆春分所 1992 年自美國引進指草 *Survenola* 後，分別於新竹分所與花蓮種畜繁殖場試種 (陳等, 1998)。 *Survenola* 於嘉義大學試種結果，產量高於盤固草 A254 並具較高的氮素利用效率 (kg dw/kg N applied) (廖等, 1996) 及較高的瘤胃乾物質消化速率 (施及廖, 2000)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2723 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

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

畜產試驗所於牧草組織培養的研究已進行數十餘年，利用盤固草的莖節(成及羅, 1987)或幼穗(成, 1984)，添加植物生長調劑誘導盤固草 A24 或 A254 癒合組織的形成與植株再生。建立盤固草癒合組織液體培養(成, 1993)或懸浮細胞系的培養(王等, 1997)，並以化學誘變劑 EMS (ethyl-methanesulfonate) 處理，誘導 A254 的體細胞突變，進行盤固草 A254 耐鹽品系的篩選(王等, 1999a)。目前已完成盤固草 A254 幼穗培養(施等, 2007)與細胞懸浮培養技術(施等, 2008)，並進行盤固草 A254 基因轉殖之基礎研究(施, 2008)。利用細胞懸浮培養產生之體細胞變異，進行百慕達草 (*Cynodon transvaalensis* × *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; 2007)。近年因氣候變遷影響，耐旱作物的選育愈加重要，Abdelsalam *et al.* (2021) 則利用癒合組織組織培養的方式，在試管內進行甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 品系耐性性選拔，成功選育耐旱品種。

植物組織培養等生物技術在農業上的應用，包括種原保存、無病毒苗的大量繁殖、體細胞變異的誘導，以協助農作物的育種計畫已行之有年，包括超雄株蘆筍的育種計畫與生產等(蔡, 1992)。目前有關 *Survenola* 未成熟花穗組織培養之研究尚闕如，因此本研究主要建立 *Survenola* 之組織培養方法，探討 1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 與 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 不同濃度組合之 MS (Murashige and Skoog) 培養基對誘導癒合組織及後續植株分化之影響，期未來應用植物組織培養等生物技術協助指草屬牧草的品種改良。

## 材料與方法

### I. 試驗材料

指草 *Survenola* (*Digitaria × umfolozi* Hall)，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。

### II. 未成熟花穗消毒

自田間採集孕穗期(劍葉與第一葉的節間距離約 3 – 5 cm，花穗包覆在劍葉葉鞘內尚未抽出)之指草 *Survenola*，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，花穗長約 9.5 cm，剪斷前端與後端約 1 cm 長度，剩餘中間約 7 cm 花穗，放入滅菌過之 350 mL 三角瓶，加入 250 mL 0.5% 次氯酸鈉 (Clorox<sup>®</sup>, 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 至 6 次，直至清洗液清澈無混濁物。將消毒後的未成熟花穗立即取出，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，添加 0.3% 水晶洋菜 (Gelrite, Sigma<sup>®</sup>)，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 2 cm 直徑的 15 mL 試管，每試管 5 mL，以鋁箔紙封口後，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  $\gamma$  放射線滅菌過的塑膠培養皿(直徑 90 mm 高 15 mm)，每個培養皿約 25 mL，待培養基凝固後以塑膠封口膜密封。癒合組織的誘導以試管培養，植株分化的培養以培養皿的培養基進行測試。所有處理的培養條件，除癒合組織的誘導需暗培養不照光外，其餘誘導植株分化的光照培養，則以三波長自然色日光燈管(旭光<sup>®</sup> FL40D-EX/38)及植物生長燈管(旭光<sup>®</sup> FL-40SBR/38FIOW-LUX)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 ± 1°C 的組織培養室培養。

### IV. 癒合組織的誘導率調查

為探討植物生長調節劑 2,4-D 及 BA 對 *Survenola* 癒合組織誘導與植株再生之影響。將消毒後的未成熟花穗，修剪為約 6 – 7 cm 長度，依小花穗 (spikelet) 著生穗軸的位置，每 1 cm 穗軸約可交互著生 5 – 6 朵小花穗，每朵小花穗之護穎仍是閉合。由於消毒過程小花穗容易散落，最後每培養皿著生在穗軸的小花穗總數約 150 – 210 朵。未成熟花穗培養於含有 1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (代號 D) 及 0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (代號 B) 複因子組合 (2 × 6) 的 MS 培養基，分別以 D<sub>x</sub>B<sub>y</sub> 表示培養基代號，x 與 y 為濃度，每一處理 4 培養皿，每個培養皿約放 5 條未成熟花穗。於黑暗下培養 3 週後，以每一培養皿未成熟花穗的小花穗總數為 125 – 211 (如表 1)，調查每朵小花穗癒合組織之誘導率。不論白色緊密或是透明浸潤狀的癒合組織皆列入癒合組織誘導率之計算，每朵小花穗誘導的癒合組織約 2 mm 大小，很容易由穗軸撥離，未誘導為癒合組織的小花穗則呈現護穎包覆的褐色死亡狀態。

### V. 癒合組織的分化與植株發根率調查

將 1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 及 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 組合誘導的癒合組織，分別接種於含有 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 及 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ 的 MS 培養基。每平盤培養皿接 10 個癒合組織，每個癒合組織大小約 2 mm，為獨立的圓球體形狀，每處理組合 4 重複。於光照條件下誘導綠色植株的分化，培養 4 週，調查癒合組織分化為完整植株之再生率。癒合組織誘導之植株則移至鹽類離子濃度減半之 MS 培養基 (1/2 MS) 進行發根，培養 4 週調查植株的發根率。

表 1. 2,4-D 與 BA 對誘導 *Survenola* 未成熟花穗的小花穗形成癒合組織之影響

Table 1. Effects of 2,4-D and BA on the percentage of callus induction from spikelet of immature inflorescence of *Survenola*

Callus induction medium		Total number of spikelet	Total number of callus induction	Percentage of callus induction (%)
2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BA			
1.0	0.0	213	191	89.7 <sup>b</sup>
1.0	0.1	176	168	95.5 <sup>a</sup>
1.0	0.5	189	179	94.7 <sup>ab</sup>
1.0	1.0	128	103	80.5 <sup>c</sup>
1.0	2.0	211	176	83.4 <sup>c</sup>
1.0	4.0	205	174	84.9 <sup>bc</sup>
2.0	0.0	166	149	89.8 <sup>b</sup>
2.0	0.1	125	121	96.8 <sup>a</sup>
2.0	0.5	145	135	93.1 <sup>ab</sup>
2.0	1.0	130	121	93.1 <sup>ab</sup>
2.0	2.0	199	186	93.5 <sup>ab</sup>
2.0	4.0	145	134	92.4 <sup>ab</sup>
main effect (2,4-D)				
1.0				88.1 <sup>b</sup>
2.0				93.1 <sup>a</sup>
main effect (BA)				
0.0				89.8 <sup>b</sup>
0.1				96.2 <sup>a</sup>
0.5				93.9 <sup>a</sup>
1.0				86.8 <sup>b</sup>
2.0				88.5 <sup>b</sup>
4.0				88.7 <sup>b</sup>
Significance				
2,4-D				**
BA				*
2,4-D × BA				ns

<sup>a, b, c</sup> Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

\* Significant at  $P < 0.05$ ; \*\* Significant at  $P < 0.01$ ; ns: non-significant.

## VI. 統計分析

在癒合組織誘導上利用 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 檢測主效應與交感效應之顯著性，如達顯著性差異，再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, 2017)。另外，在癒合組織分化與植株發根試驗中進行 2,4-D 與 BA 組合處理變方分析，主效應與交感效應皆不顯著，僅進行平均值之差異顯著性比較，以  $P < 0.05$  為顯著差異水準。

## 結果與討論

為探討植物生長調節劑 2,4-D 及細胞分裂素 BA 對 *Survenola* 癒合組織誘導與植株再生之影響。將未成熟花穗消毒後，培養於含有 1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 及 0、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 不同濃度組合之 MS 培養基。培養基組合採複因子設計，以每個小花穗為調查對象，進行癒合組織誘導率的調查。由表 1 的結果得知，2,4-D 的主效應達極顯著水準，BA 的主效應顯著，2,4-D 與 BA 交感不顯著。主效應 D<sub>2</sub> 的平均癒合組織誘導率為 93.1% 顯著高於 D<sub>1</sub> 的 88.1%，表示不同濃度的 BA 處理平均在 D<sub>2</sub> 的表現高於 D<sub>1</sub> 的表現。BA 的主效應顯著，表示以同一

濃度 BA 在  $D_1$  與  $D_2$  的平均值而言, BA 濃度顯著影響癒合組織誘導率。以  $BA_{0.1}$  平均達 96.2% 顯著高於  $BA_0$  的 89.8%,  $BA_{0.5}$  的平均誘導率亦達 93.9% 高於其他  $BA_{1.0}$ 、 $BA_{2.0}$  及  $BA_{4.0}$  的平均值。表 1 的結果顯示, 誘導癒合組織的形成需添加少量的  $BA_{0.1}$  或  $BA_{0.5}$  以促進癒合組織的誘導, BA 濃度提高至 1.0、2.0 或 4.0 反而降低癒合組織的誘導率, BA 濃度的劑量效應亦見諸於蓮花 (*Nelumbo nucifera*) 之組織培養 (Xianbao *et al.*, 2020)。以康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) 的子葉為培植體, 添加 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> BA 於 MS 培養基, 可誘導 80% 癒合組織形成體胚 (somatic embryos) 之結構 (Almemory *et al.*, 2020)。盤固草 A254 亦使用 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 與 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 誘導癒合組織的形成, 前述研究與本研究使用之 2,4-D 與 BA 濃度相近, 表示 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的濃度需搭配較低的 BA 濃度, 方有利於指草 *Survenola* 癒合組織的誘導。

進一步探討不同植物生長調節劑誘導之癒合組織對後續植株分化之影響, 分別將 2,4-D 及 BA 誘導的癒合組織, 包括大小約 2 mm 透明或白色緊密的圓球體型癒合組織, 移至添加 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 及 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ 的植株分化培養基, 進行光照培養 4 週, 調查植株再生率。由表 2 的結果得知,  $D_2B_1$  的植株再生率為 60%, 其次為  $D_1B_2$  的植株再生率 51.1%。2,4-D 及 BA 的主效應與交感效應皆不顯著, 表示不同濃度與生長調節劑誘導的癒合組織, 對後續植株的分化並無顯著的影響。為促進植株根系的生長, 將植株移至鹽離子濃度減半的 1/2 的 MS 培養基進行發根, 由表 3 的結果得知, 除  $D_2B_{0.1}$  的發根率為 83.3% 偏低外, 其餘  $D_2B_{0.5}$ 、 $D_2B_1$ 、 $D_2B_2$  及  $D_2B_4$  的發根率皆為 100%。

表 2. 2,4-D 及 BA 誘導癒合組織對 *Survenola* 植株再生率之影響

Table 2. Effects of callus induced with different 2,4-D and BA concentrations on percentage of plant regeneration of *Survenola*

Callus induction me-dium		Plant regeneration medium		Total number of callus culture (No.)	Percentage of plant regeneration (%)
2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BA	NAA (mg L <sup>-1</sup> )	TDZ		
1.0	0.1	0.5	0.1	45	46.7 <sup>ab</sup>
1.0	0.5	0.5	0.1	45	31.1 <sup>c</sup>
1.0	1.0	0.5	0.1	45	37.8 <sup>bc</sup>
1.0	2.0	0.5	0.1	45	51.1 <sup>ab</sup>
1.0	4.0	0.5	0.1	45	40.0 <sup>bc</sup>
2.0	0.1	0.5	0.1	45	31.1 <sup>c</sup>
2.0	0.5	0.5	0.1	45	42.2 <sup>bc</sup>
2.0	1.0	0.5	0.1	45	60.0 <sup>a</sup>
2.0	2.0	0.5	0.1	45	42.2 <sup>bc</sup>
2.0	4.0	0.5	0.1	45	44.4 <sup>bc</sup>

<sup>a, b, c</sup> Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

表 3. 2,4-D 與 BA 誘導之癒合組織對 *Survenola* 地上部植株發根率之影響

Table 3. Effect of callus induced with 2,4-D and BA on root formation rate of *Survenola*

Callus induction me-dium		Plant regeneration medium		Total number of callus culture (No.)	Root formation rate (%)
2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BA	NAA (mg L <sup>-1</sup> )	TDZ		
1	0.1	0.5	0.1	8	100.0 <sup>a</sup>
1	0.5	0.5	0.1	8	100.0 <sup>a</sup>
1	1.0	0.5	0.1	7	85.7 <sup>b</sup>
1	2.0	0.5	0.1	10	90.0 <sup>b</sup>
1	4.0	0.5	0.1	7	100.0 <sup>a</sup>
2	0.1	0.5	0.1	6	83.3 <sup>b</sup>
2	0.5	0.5	0.1	9	100.0 <sup>a</sup>
2	1.0	0.5	0.1	27	100.0 <sup>a</sup>
2	2.0	0.5	0.1	8	100.0 <sup>a</sup>
2	4.0	0.5	0.1	7	100.0 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Means in the same column with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

Root formation medium was 1/2 salt concentration of MS medium.

Survenola 未成熟花穗誘導的癒合組織與植株再生的外表型態如圖 1，未成熟花穗培養於  $D_2B_1$  培養基，癒合組織形態如圖 1A 箭號所示。將癒合組織移至  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 及  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ 分化培養，誘導植株的產生如圖 1B 所示，有些癒合組織無法繼續分化為植株，大部分癒合組織培養 4 週已有完整葉片的分化，且地上部葉片生長旺盛。將植株移至  $1/2 \text{ MS}$  培養基進行發根，其植株型態如圖 1C 所示，根系非常茂密。再生植株移至田間盆栽種植，其植株外表型態如圖 1D 所示，植株外表非常健壯且高度一致，並無異常植株產生。

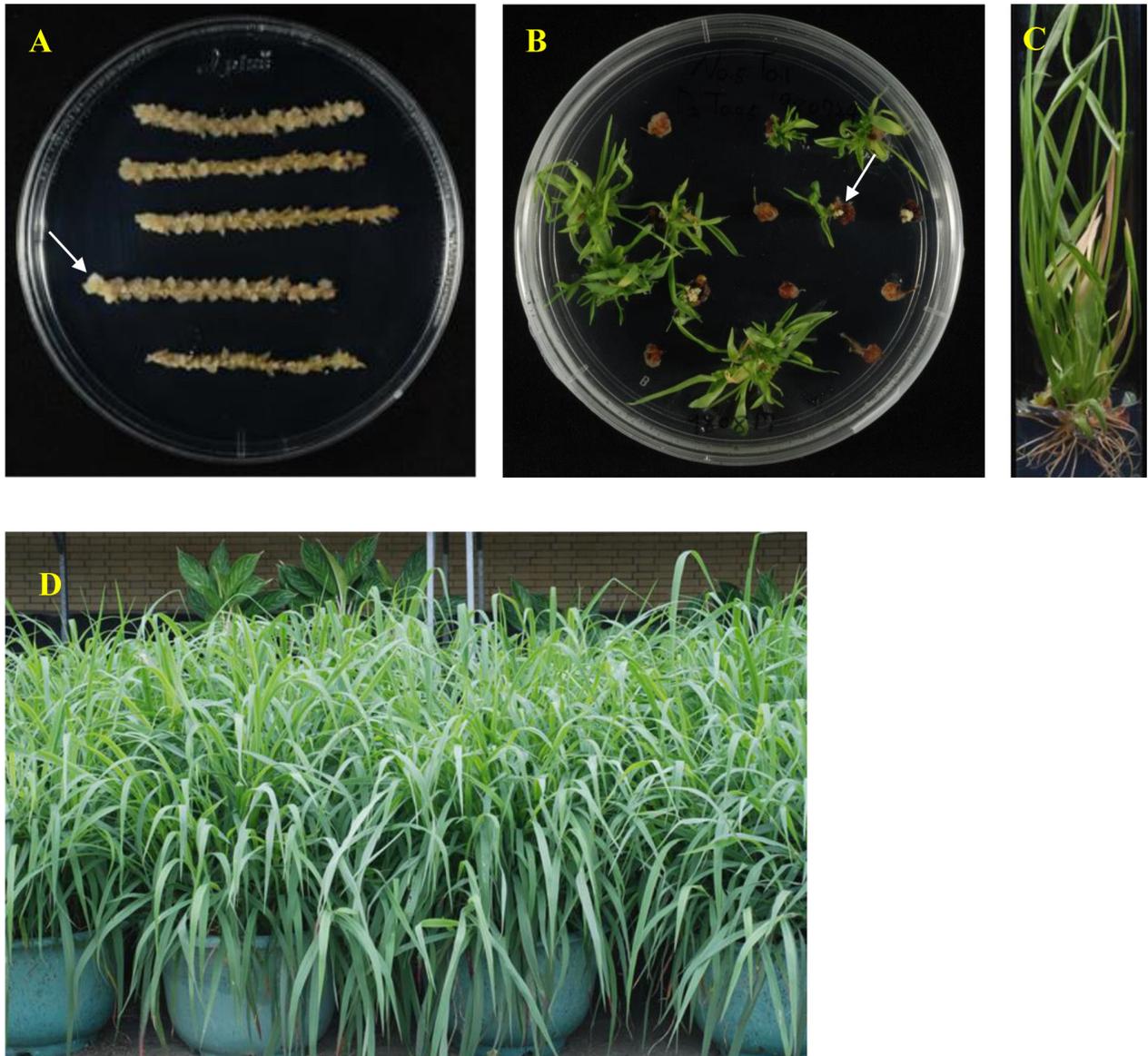


圖 1. 誘導 Survenola 未成熟花穗形成癒合組織及植株再生之外表型態。

- Survenola 未成熟花穗培養於  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 及  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA 的 MS 培養基，培養 3 週後之外表型態。箭號所指為白色緊密的癒合組織。
- 癒合組織培養於添加  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 及  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ 的 MS 分化培養基，培養 4 週後之外表型態。箭號所指為癒合組織分化為綠色地上部植株 (Shoot)。
- 地上部植株於  $1/2 \text{ MS}$  培養基，培養 3 週後之外表型態，其根系外表型態茂密。
- 試管培育的再生植株移置田間進行盆栽，種植 1 個月後，其外型均一高度整齊。

Fig. 1. The morphology of callus induction from immature inflorescences and plant regeneration of Survenola.

- The morphology of callus induction from immature inflorescences of Survenola cultured on MS basal medium supplemented with  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D and  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA after 3 weeks. Arrow indicated the white and compact callus.
- The morphology of plant regeneration on MS medium supplemented with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA and  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ. Arrow indicated the green shoots regeneration from callus after 4 weeks.
- The morphology of plantlet's roots was abundant when green shoots cultured on  $1/2 \text{ MS}$  medium for rooting after 3 weeks.
- The morphology of plantlets was uniform and grew vigorously after transplanting to pot after 1 month.

根據盤固草 A254 未成熟花穗培養的結果 (施, 2008), 以  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 與  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA 培養基 ( $D_2B_{0.5}$ ) 誘導癒合組織形成, 其中 95.0% 的癒合組織為白色緊密的胚狀體, 96.7% 的白色胚狀體可以分化再生為完整植株。盤固草 A254 未成熟花穗誘導的白色緊密的癒合組織與植株再生率具緊密關係 (施等, 2007)。根據成及羅 (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。Chaudhury and 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  $1 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 可誘導組織鬆散無結構的非胚性癒合組織, 此種癒合組織幾乎無植株再生能力。一旦添加  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  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。由於本研究之試驗並未區分癒合組織的型態, 因此癒合組織分化為植株的再生率 60% (表 2) 低於盤固草 A254 的植株再生率 (96.7%) (施, 2008)。因此, 在 *Survenola* 組織培養過程, 建議後續試驗可挑選白色緊密的癒合組織進行植株的分化, 將有助於提高植株的再生率。

## 結 論

由本研究之癒合組織誘導率、植株再生率及後續植株發根率的結果, 建議以  $D_2B_1$  的培養基誘導 *Survenola* 癒合組織的形成, 再將誘導的癒合組織, 移至含有  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 及  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ 的 MS 培養基誘導植株的分化, 再生的植株可移至鹽離子濃度減半的 1/2 MS 培養基促進根系生長, 將發根幼苗移至田間盆栽種植可獲得外表型生長均一的植株。經由本系統建立之 *Survenola* 未成熟花穗誘導癒合組織產生及植株再生之組織培養系統, 將有助於 *Survenola* 種苗大量繁殖及未來應用生物技術協助指草屬品種改良之研究。

## 誌 謝

本研究經費來源為行政院農業委員會科技計畫, 承蒙畜產試驗所飼料作物組前研究員成游貴博士提供指草 *Survenola* 之育種材料及試驗研究之建議, 在此一併致上最高之謝忱。

## 參考文獻

- 王紓愨、成游貴、陳嘉昇。1997。盤固草 A254 懸浮細胞系的建立及誘變條件探討。畜產研究 30：13-21。
- 王紓愨、陳嘉昇、成游貴。1999a。盤固草 A254 之體細胞變異。畜產研究 32：83-91。
- 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。
- 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。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。
- 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、廖成康。2000。以瘤胃袋法評估生長期對盤固草 (*Digitaria decumbens*) 及 'Survenola' (*Digitaria × umfolozi* Hall) 乾物質消化率之影響。中華農學會報 1：171-182。
- 施意敏。2008。盤固草組織培養與基因鎗轉殖系統之建立。國立臺灣大學農藝學系。博士論文, 臺北市。
- 陳嘉昇、成游貴、王紓愨、黃耀興、顏素芬、張溪泉、陳文、施意敏。1998。盤固草育種。芻料作物研究研討會論文集。行政院農業委員會畜產試驗所, 臺南市, 第 34-43 頁。
- 廖成康、施意敏、金文蔚、卜瑞雄、成游貴。1996。氮肥用量對 'Survenola' (*Digitaria × umfolozi* Hall) 產量及氮素利用效率之影響。中華農學會報 176：46-66。
- 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。
- Abdelsalam, N. R., W. E. Grad, N. S. A. Ghura, A. E. Khalid, R. Y. Ghareeb, E. S. M. Desoky, M. M. Rady, H. M. AiYasi, and E. F. Ali. 2021. Callus induction and regeneration in sugarcane under drought stress. Saudi J. Bio. Sci. 28: 7432-7442.

- Almemary, A. M. S. 2020. Callus induction and differentiation (Review Article). *Future J. Agric.* 3: 5-9.
- 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 Tiss. Org.* 60: 113-120.
- 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* × *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep.* 26: 1413-1420.
- 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* × *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell Tiss. Org.* 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.
- SAS. 2017. SAS/STAT® 14.3 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, U.S.A.
- Schank S. C., F. T. Boyd, R. L. Smith, E. M. Hodges, S. H. West, A. E. Kretschmer, J. B. Brolmann, and J. E. Moore. 1990a. Registration of 'Transvala' digitgrass. *Crop Sci.* 30: 1368-1369.
- Schank, S. C., O. C. Ruelke, W. R. Ocumpaugh, J. E. Moor, and D. W. Hall. 1990b. Registration of 'Survenola' digitgrass. *Crop Sci.* 30: 1369-1370.
- Xianbao, D., Y. Xiong, J. Li, D. Yang, J. Liu, H. Sun, H. Song, Y. Wang, J. Ma, Y. Liu, and M. Yang. 2020. The establishment of an efficient callus induction system for lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plants* 9: 1436-1449.
- (

# Callus induction and plant regeneration from the immature inflorescences of digitgrass *Survenola* (*Digitaria* × *umfolozi* Hall) <sup>(1)</sup>

Yih-Min Shy <sup>(2)(3)</sup>

Received: May 2, 2022; Accepted: Nov. 9, 2022

## Abstract

*Survenola* (*Digitaria* × *umfolozi* Hall) is a hexaploid interspecific hybrid grass species with  $6\times = 54$  chromosomes. Mainly vegetative propagated by stolons, *Survenola* is one of the varieties released from Florida's tropical grass breeding program. In this study, a tissue cultured method for callus induction and plant regeneration from the immature inflorescences of *Survenola* was established for variety preservation and mass production. In order to investigate the effects of 2,4-D and BA on the induction rate of *Survenola* callus and the rate of plant regeneration, the immature inflorescences of *Survenola* were properly sterilized and cultured with MS (Murashige and Skoog) medium and combined with different concentrations of plant growth regulators 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (N<sup>6</sup>-benzyladenine). The experimental results showed that the main effect of medium supplementation with 2,4-D and BA on the induction rate of callus of immature inflorescences was significant, but the effect of interaction was not significant. In particular, the average figure of the main effect for 2.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D callus induction rate was 93.1%, which was significantly higher than 88.1% with 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D. The effects of 2,4-D and BA showed no significant effect on plant regeneration from the results of the callus induced by 2,4-D and BA were cultured on medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea). There were 60% of callus induced with 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D and 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA that could be regenerated into plantlet, which was significantly higher than the combination of other treatments. The tissue culture process established according to this experiment will help the mass propagation of *Survenola* seedlings and the research on the improvement of forage varieties using biotechnology in the future.

Key words: Digitgrass, Callus, Plant regeneration.

---

(1) Contribution No. 2723 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

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