CPPU 對尼羅草 (Acroceras macrum Stapf) 癒合組織誘導與植株再生之影響

Effects of CPPU on Callus Induction and Plant Regeneration from Immature Inflorescences of Nilegrass (Acroceras macrum Stapf)

施意敏、張珈錡、廖成康

Yih-Min Shy, Jia-Ci Chang, Cherng-Kang Liao

抽印自台灣農學會報第十一卷第五期

中華民國九十九年十月

Reprinted from

Journal of the Agricultural Association of Taiwan

Vol. 11, No. 5 October 2010

台灣農學會報 11(5)：429-440，2010
Journal of the Agricultural Association of Taiwan

CPPU 對尼羅草 (*Acroceras macrum* Stapf) 癒合組織誘導與植株再生之影響

施意敏[1] 張珈錡[2] 廖成康[3]*

摘 要

本研究主要以尼羅草台畜草1號 (*Acroceras macrum* Stapf) 的幼穗 (immature inflorescence) 為培殖體，探討生長調節劑 CPPU (N- (2-chloro-4-pyridyl) -N'-phenylurea) 對癒合組織誘導與植株再生之影響，並建立尼羅草組織培養之系統。將幼穗接種於含有 2.0 mg L^{-1} 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 與 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg L^{-1} CPPU 不同濃度組合之 MS 培養基。5 週後，培養於 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.10 mg L^{-1} CPPU 的未成熟花穗，癒合組織的誘導率為 72.4 %。將癒合組織移至含有 0.05 mg L^{-1} TDZ (N-phenyl-N'-1, 2, 3- thiadiazol-5-yl urea) 的培養基，有 16.7% 的癒合組織可分化成莖葉 (shoot)，於 1.0 mg L^{-1} BA (N6-Benzyladenine) 的培養基，則有 13.3% 的莖葉分化率。為提高植株再生率，將 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.10 mg L^{-1} CPPU 誘導的癒合組織，移至含有 0.5 mg L^{-1} NAA (naphthaleneacetic acid) 與 1.0 mg L^{-1} TDZ 的 MS 培養基，培養 5 週後，莖葉的再生率達 77.8%，顯著改善植株的分化率。將再生的植株移至 1 / 2 MS 的培養基促進發根與健化，再移至田間生長，其存活率達 92% 以上。本研究建立之尼羅草台畜草一號組織培養系統，將有助於種苗商業大量生產之需。

關鍵詞：尼羅草、幼穗、癒合組織、植株再生

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所副研究員。
(2) 本文為第二作者碩士論文之一部份，國立嘉義大學農藝學系暨研究所研究生。
(3) 國立嘉義大學農藝學系副教授。
* 通訊作者
(民國 98 年 4 月 30 日收件；民國 99 年 5 月 24 日修改；民國 99 年 6 月 4 日接受)

前 言

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 年經農委會通過命名為尼羅草台畜草一號，具高產、高蛋白質、抗銹病及冬季生長良好之特性，是台灣地區重要的牧草品種 (蕭等，2002)。尼羅草台畜草一號具自交不孕性，種子發芽率低，在繁殖上主要採用莖苗撒播之無性繁殖法，播種量需高達 2500 kg / ha 以上，方能完成草地的初期建立 (張等，2006)。然莖苗撒播之無性繁殖法，受限於氣候條件，種苗發根率不佳，與野草之競爭性低，常造成牧草地建立之困境。因此，利用組織培養方法，建立尼羅草健康種苗之生產體系為種苗推廣之可行途徑。

禾草類作物之組織培養已有許多成功的例子，如百慕達草 (*Cynodon dactylon* L.) 以莖節、成熟種子和幼穗作為培殖體，可誘導癒合組織形成，經器官發生或體胚發生途徑形成植株 (Ahn *et al*., 1987; Chaudhury and Qu, 2000; Salehi and Khosh-Khui, 2005; Jain *et al*., 2005)。果園草 (*Dactylis glomerata* L.) 之葉片、穎果、幼穗經培養可形成癒合組織並再生成植株 (Conger and Carabia, 1978; Chen *et al*., 1982; Conger *et al*., 1995)。Jha *et al*. (2009) 以珍珠粟 (*Pennisetum americanum* L.) 之幼穗、種子、莖頂三種培殖體進行培養，其中以幼穗為培殖體，具有最佳之胚性癒合組織誘導和植株再生能力。

人工合成的植物生長素如 2,4-D，可用於誘導蘆葦 (*Phragmites australis*) (Lauzer *et al*., 2000)、鴨跖草 (*Paspalum scrobiculatum* L.) (Vikrant and Rashid, 2001) 之幼穗形成癒合組織；百慕達草之成熟種子培養於含有 2,4-D 之 MS 培養基，可顯著促進癒合組織誘導率，而不含 2,4-D 之培養基則無法誘導癒合組織形成 (Salehi and Khosh-Khui, 2005)。除生長調節劑 2,4-D 之外，若與具細胞分裂素活性的生長調節劑如 CPPU 或 BA 一併使用，往往可提高胚性癒合組織的誘導率及植株再生率 (施等，2007; Yadav *et al*., 2009)。

有關尼羅草幼穗誘導癒合組織的形成與植株再生，目前國內外並無相關之研究報告。因此，本研究以尼羅草台畜草一號之幼穗為培殖體，探討 2,4-D、CPPU 不同濃度組合對誘導癒合組織形成之影響及 CPPU 誘導之癒合組織對植株再生率之影響，以期建立尼羅草台畜草一號之植株再生系統。

材料與方法

一、試驗材料與幼穗消毒

本試驗材料尼羅草 (*Acroceras macrum Stapf*) 台畜草一號，取自行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所牧草區，其栽培管理依一般慣行法。自田間採集孕穗期之尼羅草，攜回實驗室，剪去多餘葉片，留下劍葉、第一葉及葉鞘包覆的幼穗，以 70% 酒精進行表面消毒，於無菌操作台內取出幼穗，置入滅菌過之 500 ml 圓錐空瓶，加入 0.5% 次氯酸鈉至足以完全覆蓋所有材料及 2 滴 Tween 20，以手搖方式浸泡消毒 15 分鐘，再以滅菌水連續沖洗 3 ～ 4 次。將幼穗取出置於含有滅菌過濾紙之培養皿中，將多餘水分吸乾，分別接種於癒合組織的誘導培養基。

二、癒合組織的誘導

癒合組織的誘導培養基為含有 2 mg L^{-1} 2,4-D 和 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mg L^{-1} CPPU 不同濃度組合的 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基，以及 3% (w / v) 蔗糖和 0.3% (w / v) 水晶洋菜 (Gelrite)，培養基之 pH 值調整至 5.7-5.8，經 121℃及 102 kpa 高壓滅菌釜滅菌 15 分鐘後，分裝於直徑 9 cm、高 1.5 cm 之塑膠培養皿。每 9 cm 培養皿放置 5 穗，每穗約長 5 ～ 7 cm，培養於恆溫 24±1℃之無光照生長箱。暗培養 5 週後，調查每小花穗形成癒合組織的誘導率。

三、植株再生與移植

以含有 0.01 mg L^{-1} TDZ 或 1 mg L^{-1} BA 或 0.5 mg L^{-1} NAA 與 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg L^{-1} TDZ 不同濃度組合之 MS 培養基做為分化培養基，並加入 3% (w / v) 蔗糖和 0.3% (w / v) 水晶洋菜，pH 值調整為 5.7-5.8。

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，於恆溫 25±1 ℃的培養室培養，每日光照 16 小時，光照強度為 25 μ mol m^{-2} s^{-1}。培養 5 週後調查植株再生率。之後，將已分化之地上部移到大量元素減半之 1 / 2 MS 培養基進行發根誘導。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 3.5 寸塑膠硬盆中，栽培介質為珍珠石：蛭石：泥碳土＝ 1：1：1。置於溫室 4 週後，調查再生植株存活率。

四、統計分析

利用 SAS 統計分析系統的一般線性模式 (General linear model) 進行變方分析。以 F-test 檢測顯著性，並以最小顯著性差異法 (Least Significant Difference test, LSD) 比較各處理組合平均值間之差異顯著性。

結果與討論

將尼羅草台畜草一號之幼穗，培養於含有 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg L^{-1} CPPU 不同濃度組合之 MS 基礎培養基，探討 CPPU 對癒合組織誘導率之影響。由 (表 1) 結果得知，CPPU 濃度由 0.01 mg L^{-1} 提高至 0.10 mg L^{-1}，癒合組織誘導率亦隨之增加，以 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.10 mg L^{-1} CPPU 之組合，誘導率達 72.4% 為最高。當 CPPU 濃度由 0.10 mg L^{-1} 增加至 1.0 mg L^{-1}，癒合組織誘導率則顯著下降至 62.5%。

未成熟幼穗誘導癒合組織常依賴生長調節劑如 2,4-D 的使用，如添加 1 mg L^{-1} 2,4-D 於 MS 培養基，可誘導蘆葦 (*Phragmites australis*) 幼穗形成胚性癒合組織，其誘導率為 28.4%，增加 2,4-D 濃度至 2 或 4 mg L^{-1} 反而抑制胚性癒合組織的形成 (Lauzer *et al.*, 2000)。鴨跖草 (*Paspalum scrobiculatum* L.) 的幼穗培養於含有 2 mg L^{-1} 2,4-D 的 MS 培養基，可直接誘導體胚的形成，誘導率為 30.0% (Vikrant and Rashid, 2001)。盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*) 幼穗培養於 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 的 MS 培養基，僅 13.4% 的癒合組織為白色緊密的胚性癒合組織，隨 CPPU 濃度由 0.05 mg L^{-1} 增加至 0.5 mg L^{-1}，白色胚性癒合組織的誘導率由 30.5% 增加至 90.0%，CPPU 顯著影響盤固草 A254 胚性癒合組織的形成與植株再生 (施等，2007)。但也有研究報告指出，CPPU 促進檸檬花柱薄層細胞體胚的誘導率，添加 2,4-D (0.088 或 0.88 mg L^{-1}) 反而抑制體胚的形成 (Fiore *et al.*, 2002)。根據本試驗之結果 (表 1)，2,4-D 的使用濃度與鴨跖草 (Vikrant and Rashid, 2001) 及盤固草 (施等，2007) 的幼穗培養相近。本試驗

表 1　CPPU 對尼羅草台畜草一號幼穗誘導癒合組織之影響

Table 1　Effect of CPPU on the percentage of callus induction from immature inflorescences of nilegrass

Callus induction medium (mg L^{-1})		Number of inoculated	Number and percentage of callus induction[z]	
2,4-D	CPPU	spikelets	No.	%
2.0	0.01	431	276	64.0 bc
2.0	0.05	393	274	69.7 ab
2.0	0.10	463	335	72.4 a
2.0	0.50	438	270	61.6 c
2.0	1.00	459	287	62.5 c

[z] Immature inflorescence was cultured on MS basal medium supplemented with different concentrations of CPPU. Data was recorded 5 weeks after cultured. Each Petri-dish had five inflorescences. Means followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

CPPU 濃度由 0.01 mg L^{-1} 增加至 0.10 mg L^{-1}，癒合組織的誘導率由 64.0% 增加至 72.4%，CPPU 提高至 1.00 mg L^{-1} 反而抑制癒合組織的誘導率，顯示細胞分裂素對癒合組織誘導率呈曲線之變化。

一些研究指出，將癒合組織移至不添加生長素或生長素含量降低之培養基，能促進癒合組織朝向體胚發生途徑或直接進行莖葉的分化 (Conger and Carabia, 1978; Brettell *et al.*, 1980)。因此，本試驗首先嘗試將癒合組織培養於不含任何生長素，僅分別添加 1.0 mg L^{-1} BA 或 0.05 mg L^{-1} TDZ 之培養基進行植株分化。於培養 2 週後，癒合組織開始出現綠點，並逐漸有莖葉之分化，5 週後調查分化率結果如 (表 2)，不同濃度 CPPU 誘導的癒合組織移至含有 0.05 mg L^{-1} TDZ 培養基，僅 11.7% 至 20.0% 莖葉的分化，差異不顯著。2.0 mg L^{-1} 2,4-D 和 1.0 mg L^{-1} CPPU 誘導之癒合組織移至 1.0 mg L^{-1} BA 的莖葉分化率為 30%，其餘處理的植株再生率皆低於 30%。

表 2　BA、TDZ 對 CPPU 誘導之癒合組織地上部植株分化率之影響

Table 2　Effects of BA、TDZ on shoot regeneration of callus induced with different CPPU concentrations of nilegrass

Callus induction medium (mg L^{-1})		Number of callus cultured	Number and percentage of shoot regeneration[z]			
			TDZ 0.05 mg L^{-1}		BA 1.00 mg L^{-1}	
2,4-D	CPPU		No.	%	No.	%
2.00	0.01	60	8	13.3 a	6	10.0 b
2.00	0.05	60	9	15.0 a	12	20.0 ab
2.00	0.10	60	10	16.7 a	8	13.3 b
2.00	0.50	60	7	11.7 a	7	11.7 b
2.00	1.00	60	12	20.0 a	18	30.0 a

[z] The callus was cultured on MS basal medium supplemented with 0.05 mg L^{-1} TDZ or 1.00 mg L^{-1} BA. Data was recorded 5 weeks after cultured. Means followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

BA、TDZ 分別屬於不同類之細胞分裂素，BA 為具有嘌呤環結構屬於嘌呤類之細胞分裂素，而 TDZ 則屬於苯基尿素類之人工合成細胞分裂素。TDZ 在促進莖葉的分化具極佳的效果，可誘導叢生芽產生 (Kadota and Niimi, 2003)。比較 BA、TDZ、CPPU 三種細胞分裂素對薰衣草葉片誘導之癒合組織分化之影響，其試驗結果指出以濃度為 4.4 x 10^{-6} M 之 BA 處理具有最佳之莖葉分化率，且 BA 處理誘導之芽較易發根；相反的，由 TDZ、CPPU 誘導分化之叢生芽則不易發根，並且於培養期間易褐化、死亡 (Tsuro *et al.*, 1999)，此與本試驗使用

0.05 mg L^{-1} TDZ 進行癒合組織之分化培養，其分化率較使用 BA 處理組為差，主要因分化之莖葉缺少根系，且易於培養期間褐化、死亡，造成再生植株數較 BA 處理者少。

進一步調整分化培養基以改善分化率，於分化培養基中加入 0.5 mg L^{-1} NAA，並改變 TDZ 濃度為 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00 mg L^{-1}，調整生長素與細胞分裂素的比例，以提高植株分化率。由 (表 3) 試驗結果得知，2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.1 mg L^{-1} CPPU 組合誘導之癒合組織，培養於含有 0.5 mg L^{-1} NAA 與不同濃度 TDZ 之分化培養基，隨 TDZ 濃度由 0.01 mg L^{-1} 增加至 1.00 mg L^{-1}，莖葉再生率由 5.0% 顯著提高至 77.8%。TDZ 對較高濃度 (1.0 mg L^{-1}) CPPU 誘導的癒合組織，亦呈現相同的效應，隨 TDZ 濃度增加，莖葉再生率由 4.2% 顯著增加至 68.2%。且各處理的植株移置田間的存活率皆達 92.0% 以上，表示 NAA 的添加對促進植株分化具顯著效應 (表 3)。

表 3　CPPU 誘導之癒合組織對尼羅草地上部植株分化率與存活率之影響

Table 3　Effect of callus induced with CPPU on shoot regeneration and plantlet survival of nilegrass

Callus induction medium (mg L^{-1})		Number of cultured callus	Plant regeneration medium (mg L^{-1})		Number and percentage of shoot regeneration[z]		Percentage of survival plant
2,4-D	CPPU		NAA	TDZ	NO.	%	%
2.00	0.10	20	0.50	0.01	1	5.0 c	100 a
2.00	0.10	20	0.50	0.05	7	35.0 b	100 a
2.00	0.10	20	0.50	0.10	12	60.0 ab	100 a
2.00	0.10	20	0.50	0.50	15	75.0 a	96 a
2.00	0.10	18	0.50	1.00	16	77.8 a	92 a
2.00	1.00	24	0.50	0.01	1	4.2 c	100 a
2.00	1.00	22	0.50	0.05	13	59.1 ab	100 a
2.00	1.00	22	0.50	0.10	14	63.6 a	100 a
2.00	1.00	22	0.50	0.50	14	63.6 a	100 a
2.00	1.00	22	0.50	1.00	15	68.2 a	100 a

[z] The callus was cultured on MS basal medium supplemented with different concentrations of NAA and TDZ. Data was recorded 5 weeks after cultured. The regenerated shoots for rooting were transferred to 1 / 2-strength MS basal medium 6 weeks and then transferred to pots. Data was recorded 3 weeks after transferring to pots. Means followed by different letters are significantly different at the 0.05 level according to Least Significant Difference (LSD) test.

埃及三葉草 (*Trifolium alexandrinum* L.) 之完整子葉或胚軸，培養於含有 NAA (0.0、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 mg L^{-1})、BA (0.5、1.0、2.0、4.0 mg L^{-1}) 和 TDZ (0.5、1.0、2.0 mg L^{-1}) 不同濃度組合之培養基，直接誘導莖葉的分化，其中 0.05 mg L^{-1} NAA 和 1.0 mg L^{-1} TDZ 處理下，完整子葉之莖葉分化率為 43.1%，較單獨使用 TDZ 的莖葉分化率高，NAA 的添加影響植株的分化 (Abogadallah and Quick, 2010)。若癒合組織具完整體胚之型態，僅需少量 0.05 mg L^{-1} TDZ，即可促進體胚的萌發，完整植株的再生率高達 80.0%，並不需要 NAA 的添加 (施等，2007)。由本試驗結果得知，高濃度 (1.00 mg L^{-1}) CPPU 誘導的尼羅草癒合組織，單獨培養於 0.05 mg L^{-1} TDZ 培養基，莖葉的分化率為 20% (表 2)。相同條件，添加 0.5 mg L^{-1} NAA，顯著提高莖葉的分化率達 59.1%，且移植至田間的存活率皆 92% 以上 (表 3)，推測 CPPU 誘導的尼羅草癒合組織可能非體胚的形態，缺乏胚根的發育，需 NAA 的添加以促進植株的根系發育。

尼羅草未成熟花穗誘導之癒合組織其外表形態如圖 1A，每個小花梗之小穗皆可形成白色的癒合組織，將癒合組織經培養於含有 0.5 mg L^{-1} NAA 和 0.5 mg L^{-1} TDZ 分化培養基，5 週後其莖葉分化情形如圖 1B，具綠色葉片與莖節，唯根系生長不明顯，將地上部植株移至含有 1 / 2 MS 的培養基進行根系馴化，其根系生長如圖 1C，將再生植株移至田間生長，其外表形態如圖 1D，其生長發育良好。

本試驗以尼羅草台畜草一號幼穗培殖體，建立癒合組織誘導和植株再生方法。以添加 2.0 mg L^{-1} 2,4-D 與 0.10 mg L^{-1} CPPU 之 MS 培養基，癒合組織誘導率為 72.4% (表 1)，將癒合組織移至添加 0.5 mg L^{-1} NAA 和 1.0 mg L^{-1} TDZ 的分化培養基，其植株再生率達 77.8%，將再生植株移至含有 1 / 2 MS 的培養基，可促進根系的發展，提高植株移植的存活率達 92% 以上 (表 3)，評估自誘導癒合組織形成至移植獲得存活之再生植株約需 14-18 週，可作為健康種苗生產之需。

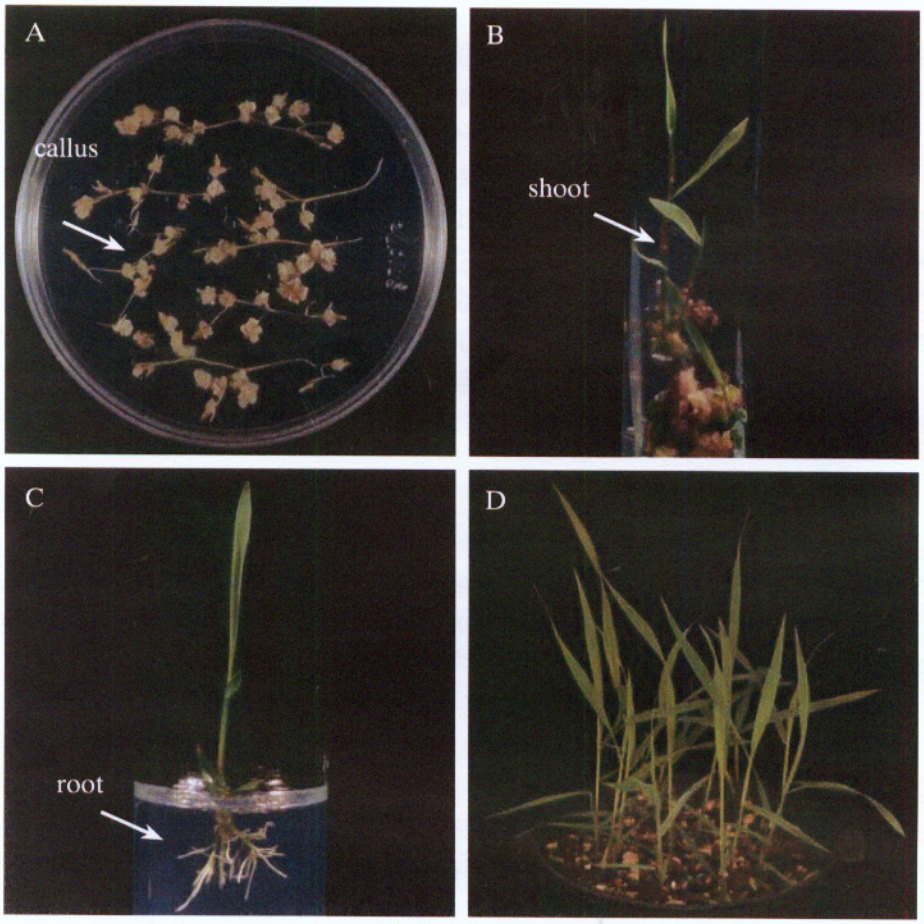


圖 1　CPPU 對尼羅草台畜草一號癒合組織誘導及植株再生之影響

Fig. 1　Effect of CPPU on callus induction and plant regeneration of nilegrass.

A. Immature inflorescences of nilegrass cultured on MS basal medium supplemented with 2.0 mg L^{-1} 2,4-D and 1.0 mg L^{-1} CPPU.

B. Plant regeneration on MS medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} NAA and 0.5 mg L^{-1} TDZ.

C. The plantlet cultured on 1 / 2 MS medium for rooting.

D. Regenerated plants grew vigorously 4 weeks after transplanting to pot.

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 (2)：97-107。

張世融、洪國源、許福星。2006。尼羅草莖苗播種量對草地建立之影響。畜產研究 39 (3)：203-213。

蕭素碧、林政斌、金文蔚、陳文、陳玉燕、張溪泉、顏素芬。2002。尼羅草台畜草一號之育成。畜產研究 35 (2)：91-100。

Abogadallah, G. M. and W. P. Quick. 2010. Fast versatile regeneration of *Trifolium alexandrinum* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 100：39-48.

Ahn, B. J., F. H. Huang and J. W. King. 1987. Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of somatic embryogenesis. Crop Sci. 27 (3)：594-597.

Brettell, R. I. S., W. Wernicke and E. Thomas. 1980. Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor*. Protoplasma 104：141-148.

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. Organ. Cult. 60 (2)：113-120.

Chen, C. H., L. F. Chen, P. F. Lo and J. G. Ross. 1982. Plant regeneration from culture immature inflorescences of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Euphytica 31：19-23.

Conger, B. V. and J. V. Carabia. 1978. Callus induction and plantlet regeneration in orchardgrass. Crop Sci. 18：157-159.

Conger, B. V., R. N. Trigiano, D. J. Gray and J. K. McDaniel. 1995. Somatic embryogenesis in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Biotechnol. Agr. Forest. 31：70-80.

Fiore, S., F. D. Pasquale, F. Carimi and M. Sajeva. 2002. Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 68：57-63.

Jain, M., K. Chengalrayan, M. Gallo-Meagher and P. Mislevy. 2005. Embryogenic callus induction and regeneration in a pentaloid hybrid bermudagrass cv. Tifton 85. Crop Sci. 45：1069-1072.

Jha, P., C. B. Yadav, V. Anjaiah and V. Bhat. 2009. *In vitro* plant regeneration through somatic embryogenesis and direct shoot organogenesis in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant 45：145-154.

Kadota, M. and Y. Niimi. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72：261-265.

Lauzer, D., S. Dallaire and G. Vincent. 2000. *In vitro* propagation of reed grass by somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 60：229-234.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Salehi, H. and M. Khosh-Khui. 2005. Effects of genotype and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration in four important turfgrass genera : a comparative study. In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant 41：157-161.

Tsuro, M., M. Koda and M. Inoue. 1999. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). Sci. Hortic. 81：331-336.

Vikrant and A. Rashid. 2001. Direct as well as indirect somatic embryogenesis from immature (unemerged) inflorescence of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. Euphytica 120：167-172.

Yadav, C. B., P. Jha, C. Mahalakshmi, V. Anjaiah and V. Bhat. 2009. Somatic embryogenesis and regeneration of *Cenchrus ciliaris* genotypes from immature inflorescence explants. Biol. Plant. plant. 53 : 603-609.

Effects of CPPU on Callus Induction and Plant Regeneration from Immature Inflorescences of Nilegrass (*Acroceras macrum* Stapf)

Yih-Min Shy[(1)] Jia-Ci Chang[(2)] Cherng-Kang Liao[(3)*]

Abstract

The objectives of the studies were to develop a system for callus induction and plant regeneration from immature inflorescences of nilegrass (*Acroceras macrum* Stapf cv. Taishu No. 1). Explants were cultured on an MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 2.00 mg L^{-1} 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) and different concentrations of CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl) -N'-phenyl urea). The effects of CPPU on callus induction frequency were examined. The frequency of callus induction was 72.4% when immature inflorescences were cultured on MS medium with 2.00 mg L^{-1} 2,4-D and 0.10 mg L^{-1} CPPU for 5 weeks. For plant regeneration, the callus was transferred to MS medium with BA (N6-Benzyladenine) or TDZ (N-phenyl-N'-1, 2, 3- thiadiazol-5- lurea). The frequency of shoot regeneration was 16.7% with

(1) Associate Researcher, Hsinchu Branch, Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) This paper is a part of master thesis of the second author, Department of Agronomy, Graduate Institute of Agriculture, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, R. O. C.
(3) Associate Professor, Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi 600, Taiwan, R. O. C.
* Corresponding author
(Received April 30, 2010; Revised May 24, 2010; Accepted June 4, 2010)

0.05 mg L^{-1} TDZ and 13.3 % with 1.0 mg L^{-1} BA. To increase the frequency of plant regeneration, callus induced with 2.00 mg L^{-1} 2,4-D and 0.1 mg L^{-1} CPPU was transferred to MS medium with 0.5 mg L^{-1} NAA and 1.0 mg L^{-1} TDZ for 5 weeks. This increased the shoot regeneration significantly by 77.8% . The shoots were transferred to 1/2 MS medium for rooting and then transplanted to the field. The percentage of surviving plantlets was more than 92% . From these results, we established an efficient system for plant regeneration from immature inflorescences of nilegrass. It would be helpful for commercial mass production of nilegrass propagation.

Keywords: nilegrass, immature inflorescence, callus, plant regeneration