

Thidiazuron 及 2,4-D 或 Picloram 促進火鶴花試管 苗葉片之培養再生不定芽

Thidiazuron Promotes Adventitious Shoot Regeneration on 2,4-D or Picloram
Containing Medium in *in vitro* Lamina Culture of *Anthurium*

楊苑欣²、林金和³、陳福旗²

by

Yuan-hsin Yang², Chin Ho Lin³ and Fure-Chyi Chen²

關鍵字：火鶴花、葉片培養、不定芽再生

Key words: *Anthurium*、lamina culture、adventitious shoot regeneration

摘要：火鶴花 *Anthurium* sp. T2 營養系試管苗葉片，以半量之 Murashige 及 Skoog 配方 (1/2 MS) 為基本培養基，單獨添加生長素 Picloram 或 2,4-D 不易再生芽體，但有少量的癒合組織形成；添加 0.5 mg/l TDZ 於 2,4-D (0~0.5 mg/l) 培養基，不定芽形成率介於 10~30%；不論在 1/2 MS 或 MS 培養基，添加 TDZ 均能誘導癒合組織形成。T18 營養系試管苗葉片培養於以全量 MS 及 0.5 mg/l TDZ 為基本培養基，添加 Picloram 之處理，易形成癒合組織，而不定芽形成率均較含單獨 TDZ 者低；再生之植株其外觀正常。

前 言

火鶴花為原產於中南美洲的天南星科植物，約有 1000 個原生種 (Croat, 1992)，引入台灣種植已經有多年，栽培面積至 89 年期間約為 120 多公頃，目前其已為台灣花卉市場及外銷日本重要切花之一。其產地主要集中在南部地區的南投、台南、屏東等縣市 (農業統計年報, 2000)。由於細菌性葉枯病及線蟲等病蟲害會危害葉片及根部，甚至導致系統性感染，因此栽培時所需的健康種苗，大多以組織培養苗供應 (邱等, 1999)。火鶴花的組織培養研究，約始於 70 年代 (Pierik, 1974)，並且已實際應用於商業生產體系。火鶴花之再生多先經由誘導癒合組織，然後才產生不定芽 (Matsumoto & Kuehnle, 1997)，此外亦可利用葉片培養誘導形成體胚 (Kuehnle et al., 1992)。火鶴花基因轉殖技術雖已有報導 (Chen and Kuehnle, 1996; Chen et al., 1997; Kuehnle and Sugii, 1991, Kuehnle et al, 2001)，然其轉殖效率仍低，有待開發再生效率較高的程序以便應用於基因轉殖。

1. 本文為第一作者碩士論文之一部分，並受國科會計畫補助。 This paper is a part of MS thesis of the senior author, and was supported by grants from National Science Council of Republic of China, (NSC 89-2313-B-020-015).

2. 國立屏東科技大學熱帶農業研究所碩士班研究生、農園系教授(通訊作者)。 Graduate student of Institute of Tropical Agriculture, and professor of Plant Industry Department, respectively, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC. (corresponding author, furechen @ mail. npust. edu. tw).

3. 國立中興大學生命科學系教授。 Professor, Department of Life Sciences, National Chung Hsin University, Taichung, Taiwan, ROC.

4. 本文於民國 92 年 6 月 6 日收到。 Date received for publication: June 6, 2003.

本試驗之目的，主要為探討生長素或生長素和細胞分裂素組合對火鶴花試管苗葉片再生之影響，期望經由葉片所產生的癒合組織及再生芽體的路徑，能夠作為火鶴花基因轉殖及再生植株之用途。

材料與方法

1. 植物材料

供試之 T2 及 T18 營養系火鶴花試管植株由赤道園，維持於本校農園系組培室內(楊等, 2002)，藝(屏東龍泉)提供。將無菌苗枝梢切割為每段含有 2~3 節，扦插於維持培養基中，其成份為 1/2 MS 培養基 (Murashige and Skoog, 1962) 添加 150 ml/l 椰子水及 20 g/l 蔗糖。每一個含約 45ml 培養基之 Magenta GA-7 培養盒中接種 16 段，培養條件為 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，1800~2000 lux，每日光照 16 小時。約 4-5 個月，待葉片長到 0.5cm 以上可為試驗處理材料。

2. 2,4-D 與 Picloram 對火鶴花 T2 營養系葉片培養再生芽體之影響

切取 T2 營養系之葉片培植體，置於 1/2 MS 鹽類的基本培養基，並分別添加 2,4-D 或 Picloram (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/l)，共 8 種處理。將 10 片 0.5~1.5 公分之葉身切下(不含葉柄)，置於內含 25ml 固體培養基之塑膠培養皿中，每處理四重複，所試驗材料置於 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養，經過 60 天黑暗後移至 1800~2000 lux 光照培養。自培養第 8 週起至 16 週止，觀察培植體再生情形，記錄癒合組織的形成率、不定芽發生率、不定根發生率、平均根數。

3. Thidiazuron、2,4-D 及 Picloram 對 T2 及 T18 營養系再生之影響

將 T2 營養系的葉片，置放在含 1/2 MS 鹽類的基本培養基，並添加 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ)及不同濃度的 2,4-D (0, 0.1, 0.2, 0.5 mg/l)，共 4 種處理，另以 T18 營養系的葉片培植體，放在全量 MS 培養基，並添加 0.5 mg/l TDZ 及不同濃度的 Picloram (0, 0.1, 0.2, 0.5 mg/l)，共 4 種處理，每一處理 4 重複。切取培植體的方法及培養條件同上述。

4. 鹽類濃度及 TDZ 與 Picloram 對 T2 品系再生之影響

T2 營養系的葉片培養於 1/2 MS 或 MS 基本培養基，並添加 0.5 mg/l TDZ 及不同濃度 Picloram (0, 0.1, 0.2, 0.5 mg/l)，共 8 種處理，每一處理 4 重複，培養條件同上述。

5. 統計分析

前述試驗 2、3 的結果平均值作單向 ANOVA，試驗 4 的結果平均值作雙向 ANOVA，並以 SAS 軟體進行鄧肯式多變域分析(Duncan's multiple range test)，進而比較不同培養基對再生是否有顯著性差異存在。

結 果

一、生長素對火鶴花 T2 營養系葉片再生之影響

以 2,4-D 及 Picloram 處理之培植體，培養 10 週時，大多由綠色轉為黃綠色，切口處則為褐色，且低濃度下(0.1 mg/l)的培植體維持綠色的數目較高濃度下多，培養 16 週時培植體轉為黃白色或褐色。培養在 2,4-D 0.1 mg/l 下，有 5.0 %培植體形成癒合組織，在 0.1 及 0.5 mg/l Picloram 的培養基，分別有 2.5 %及 5.0 %培植體形成癒合組織，但是培養過程中，培植體褐化，並沒有不定芽或不定根形成；因此單獨以生長素(2,4-D 或 Picloram)處理，似乎不利於火鶴花 T2 營養系試管苗葉片之再生(表 1)。

二、TDZ 及生長素對 T2 品系再生之影響

T2 營養系的葉片，放在 1/2 MS 鹽類的基本培養基，並添加 0.5 mg/l TDZ 與不同濃度的 2,4-D 處理，結果顯示不定芽形成率為 10~30%，以不含 2,4-D 的培養基，不定芽形成率最高。各濃度處理間

不定芽數的形成，無明顯差異。於 0.5 mg/l 2,4-D 下之培植體會產生不定根，其形成率為 50.0 %，平均不定根最多為 1.4 根(表 2)。

T18 營養系的葉片培植體，放在 MS 培養基，並添加 0.5 mg/l TDZ 及不同濃度的 Picloram 處理，結果顯示不定芽形成率為 0~70%，以不含 Picloram 的培養基不定芽形成率為最高，平均不定芽數為 0.2 個，不定根形成率為 97.5%，平均不定根數為 7 個(表 3)。上述兩種處理，92%以上會形成癒合組織(表 2, 3)，在 TDZ 培養基中，形成癒傷組織，經長時間培養會繼續旺盛生長且分化不定芽(圖 1, 2)。

表 1、2,4-D及Picloram對火鶴花T2 營養系試管苗葉片癒合組織形成之影響^z

Table 1. Effect of 2,4-D and picloram on callus formation of T2 lamina on 1/2 MS medium^z

Auxin(mg/l)	Callus formation (%) ^y
2,4-D	
0.1	5.0a
0.2	0.0a
0.5	0.0a
1.0	0.0a
Picloram	
0.1	2.5a
0.1	0.0a
0.5	5.0a
1.0	0.0a

^z MS as basal medium. Data taken after 16 weeks of culture.

^y Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

表 2、2,4-D對火鶴花T2 營養系試管苗葉片再生之影響^z

Table 2. Effect of 2,4-D on regeneration of *Anthurium* T2 clone

2,4-D (mg/l)	Shoot formation (%) ^y	No.of shoot/ explant ^y	Root formation (%) ^y	No.of root/ explant ^y	Callus formation (%) ^y
0.0	30.0 a	0.6 a	16.7 b	0.6 b	100a
0.1	23.7ab	0.4 a	37.7ab	0.7ab	93a
0.2	16.7ab	0.2 a	20.0 b	0.2 b	96a
0.5	10.0 b	0.4 a	50.0 a	1.4 a	96a

^z 1/2 MS plus 0.5 mg/l TDZ as basal medium. Data taken after 16 weeks of culture.

^y Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

表 3、Picloram對火鶴花T18 營養系試管苗葉片再生之影響^z

Table 3. Effect of picloram on regeneration of *Anthurium* T18 clone

Picloram (mg/l)	Shoot formation (%) ^y	No of shoot/ explant ^y	Root formation (%) ^y	No of root/ explant ^y	Callus formation (%) ^y
0	70.0a	0.2a	97.5a	7.0a	93a
0.1	7.5b	0.1b	72.5b	4.8b	95a
0.2	2.5b	0.1b	25.0c	3.5c	95a
0.5	0.0b	0.0b	20.0c	2.3c	90a

^z MS plus 0.5 mg/l TDZ as basal medium. Data taken after 16 weeks of culture.

^y Mean separation within each column by Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$

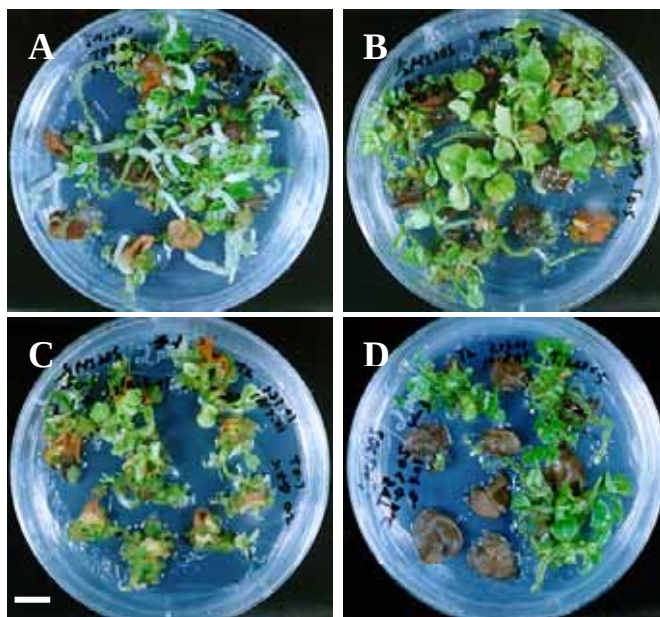


圖 1. 火鶴花 T2 營養系葉片培養 33 週後再生不定芽之情形 A 為基本培養基: 1/2 MS + 0.5 mg/l TDZ B 為基本培養基內添加 0.1 mg/l 2,4-D、C 為基本培養基內添加 0.2 mg/l 2,4-D、D 為基本培養基內添加 0.5 mg/l 2,4-D

Fig.1. Adventitious shoot regeneration from *Anthurium* sp. T2 clone lamina after 33 weeks of culture
A, Basal medium: MS medium with 0.5 mg/l TDZ. B, Basal medium with 0.1 mg/l 2,4-D. C, Basal medium with 0.2 mg/l 2,4-D. D, Basal medium with 0.5 mg/l 2,4-D Scale bar = 1 cm

三、鹽類濃度及細胞分裂素與生長素對 T2 品系癒合組織之影響

經由雙向變方分析顯示，在含有 TDZ 的培養基中鹽類濃度會影響癒合組織形成($P=0.0215$)；Picloram 濃度對葉片癒合組織形成無顯著差異，鹽類濃度和 Picloram 之間並無交互作用。資料顯示半量 MS 培養基處理有 79.3 % 葉片產生癒合組織，全量 MS 下只有 42.5 % 葉片產生癒合組織，因此在半量 MS 培養基中癒合組織較易產生(表 4)。

討 論

一、葉片培植體誘導產生不定芽、不定根

本實驗以 T2 營養系試管苗葉片，置於以 1/2 MS 為培養基，添加 TDZ 和不同濃度 2,4-D，均可誘導產生不定芽；含有 2,4-D 處理，不定根的形成率較高。在全量 MS 培養基添加 TDZ 和不同濃度的 Picloram 組合，亦可促使 T18 營養系形成不定芽，兩者均顯示不含 Auxin 類生長調節劑處理，不定芽的形成率較高，但添加兩種不同生長素，則均可誘導產生癒合組織，經長時間培養，亦可由這些癒合組織形成不定芽。由於以農桿菌媒介之基因轉殖，切口易褐化，使其不易誘導癒合組織及不定芽形成 (Chen and Kuehnle, 1996)，因此本試驗以 TDZ 處理培植體，使其易長出癒合組織，將有利於在篩選培

營養基的逆境下再生不定芽；若要使用體胚再生系統(Kuehnle et al., 1992)於農桿菌媒介基因轉殖，則必須提高其再生出胚效率。

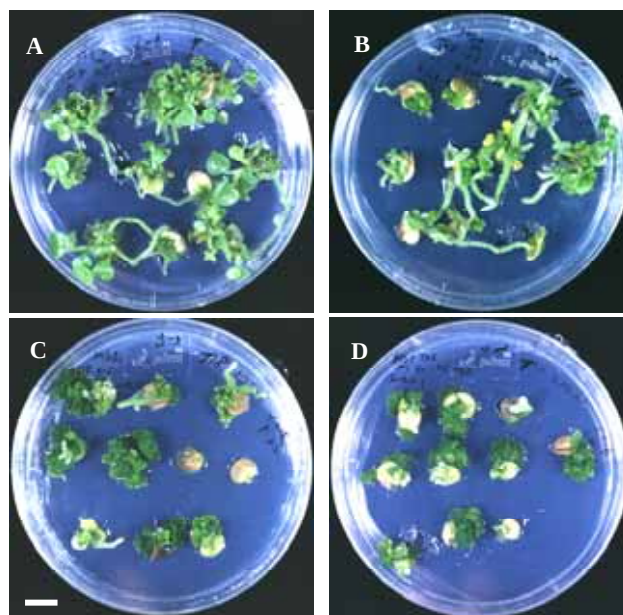


圖 2. 火鶴花 T18 營養系葉片培養 33 週後再生不定芽之情形 A 為基本培養基:MS + 0.5 mg/l TDZ B 為基本培養基內添加 0.1 mg/l Picloram C 為基本培養基內添加 0.2 mg/l Picloram D 為基本培養基內添加 0.5 mg/l Picloram

Fig.2. Adventitious shoot regeneration from *Anthurium* sp. T18 clone lamina after 33 weeks of culture A, Basal medium: MS medium with 0.5 mg/l TDZ B, Basal medium with 0.1 mg/l Picloram C, Basal medium with 0.2 mg/l Picloram D, Basal medium with 0.5 mg/l Picloram Scale bar = 1 cm

表 4、以雙向變方分析 T2 營養系試管苗葉片癒合組織形成之因子^z

Table 4. Two- way ANOVA of callus formation of T2 lamina

Source	MS	F	P
Callus (%)			
Main effect			
Salt (S)	10878.1	6.046	0.0215*
Plant growth regulator (P)	311.0	0.173	0.7135ns
S x P	1561.4	0.867	0.4713ns
Error	1798.9		

Salt Strength	Mean Callus formation (%)
MS	42.5b
1/2 MS	79.3a

^z Basal medium contains 1/2 MS or MS and 0.5 mg/l TDZ and Picloram.



Rosario等(1981) 於MS培養基內，添加 10 mg/l IBA (3-indolebutyric acid)、10 mg/l Kinetin (N6-furfurylaminopurine)及 20%的椰子水，能促進癒合組織形成不定芽。Kuehnle及 Sugii (1991) 指出，在 MS 培養基中，添加 0.5~5 mg/l BA能促進癒合組織及芽體的再生。Orlikowska 等人(1995)在 1/2MS培養基內，添加 400 mg/l NH_4NO_3 、0.2 mg/l 2,4-D和 1.0 mg/l BA，約 78%葉片、58%葉柄、18%根培植體有芽體再生。Pierik等(1974)，以 1/2 MS培養基，加上 1 mg/l PBA 及 0.1 mg/l NAA可促進不定芽長根；又於 1/4 MS培養基中，添加葡萄糖 30 g/l，並去除細胞分裂素，能促進不定芽生根。Rosario及 Lapitan(1981)將不定芽置於MS培養基，25%的椰子水，能促進不定芽長根。Atta-Alla(1989)將組培產生的叢生芽，置於 1/2 MS培養基，並含IBA 0.25 mg/l處理，有 94%培植體有長根情形，由上述討論可以看出，培養基添加生長素及細胞分裂素有利於火鶴花不定芽的再生。

楊等(2002)以 1/2 MS 為基本培養基，添加 0.5 mg/l TDZ，T2 營養系不定芽形成率為 42.5%，而本試驗以同量 TDZ 添加於培養基中，和 TDZ 與 Picloram、2,4-D 組合試驗相比之下，不定芽再生率亦較高；單獨 Picloram 或 2,4-D 處理，不易誘導不定芽；單獨 TDZ 處理較 picloram 或 2,4-D 和 TDZ 組合處理易促進火鶴花不定芽的形成，且低濃度下癒合組織也較小，而單獨使用 2,4-D 或 picloram 之處理，縱使經過長時間培養，亦無法促進不定芽及不定根形成。

二、葉片培植體誘導產生癒合組織

Soczek 及 Hempel (1989)使用細胞分裂素能促進火鶴葉片癒合組織形成，Kuehnle 及 Sugii (1991) 或 Rosario 及 Lapitan (1981)使用生長素及細胞分裂素促使形成淡黃色、堅硬的癒合組織，照光後顏色轉綠，本實驗以 TDZ 及 2,4-D (0~0.5 mg/l)組合顯示亦可有效促進癒合組織的形成。Hamidah 等(1997)以 *A. scherzerianum* 組培葉片為材料，添加 0.5~1.0 mg/l NAA、IBA、IAA，癒合組織的顏色為黃褐色；添加 1.0 mg/l 2,4-D，會形成似根狀的構造，卻無典型的不定根產生。本試驗單獨處理 2,4-D 及 picloram (1mg/l)，少數培植體形成癒合組織，其初期為綠色，隨著培養時間增加轉為褐色，並無器官形成；而癒合組織顏色變化如同 Hamidah 等(1997)處理 IBA、IAA、NAA 之結果。本實驗以 1/2 MS 和 MS 鹽類於濃度固定的細胞分裂素和不同濃度的生長素相比較，前者癒合組織形成率較大，約 79%。

目前以組培苗葉片培植體與生長調節劑組合的再生系統，已用於農桿菌轉殖基因系統上。Chen 等(1997)取 5 種基因型火鶴花試管苗植株的根為培植體，以農桿菌轉殖，結果顯示其中一基因型有芽體再生，效率為 1.3%，其它 4 種基因型經轉殖過程並沒有不定芽形成。該試驗中使用 2,4-D 及 kinetin 的組合，而且都先產生癒合組織然後再生轉殖芽體。由於再生效率低，顯示火鶴花的組織培養再生系統仍有待改進。

本試驗結果顯示以 0.5 mg/l TDZ 濃度不定芽形成率較高，但所需時間較久，若能於 TDZ 培養基中加入適量之 2,4-D 或 Picloram，促進早期形成癒合組織，然後轉移到只含細胞分裂素培養基，因此未來可能可以使用含 TDZ 及 2,4-D 之癒合組織誘導培養基於共培養後之篩選培養基，或將之前建立的轉殖程序 (Chen and Kuehnle, 1996) 進行修改，在組織適當的發育階段添加 TDZ 於農桿菌轉殖系統及促進不定芽再生。

參考文獻

1. 邱錫欣、陳殿義、許秀惠. 1999. 火鶴花健康種苗與病蟲害. 火鶴花病蟲害及栽培管理. 台灣省政府農林廳編印. p.24-27.
2. 農業統計年報. 2000. 行政院農業委員會.

3. 楊苑欣、陳福旗、蔡巨才. 2002. 細胞分裂素對火鶴花試管苗葉片培養再生之影響. 中國園藝 48(4) : 371-378.
4. Atta-Alla, H., B. G. McAlister, and J. Van Staden. 1998. In vitro culture and establishment of *Anthurium parvispathum*. South Afr. J. Bot. 64:296-298.
5. Chen, F. C. and A. R. Kuehnle. 1996. Obtaining transgenic *Anthurium* through *Agrobacterium*-mediated transformation of etiolated internodes. J. Amer Soc. Hort. Sci. 121:47-51.
6. Chen, F. C., A. R. Kuehnle, and N. Sugii. 1997. *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens*- mediated gene transfer. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49:71-74.
7. Croat, T. B. 1992. Species diversity of *Araceae* in Colombia: preliminary survey. Ann. Mol Bot. Gard. 79:17-28.
8. Hamidah, M., A. G. A. Karim, and P. Debergh. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:189-193.
9. Kuehnle, A. R. and N. Sugii. 1991. Induction of tumors in *Anthurium andraeanum* by *Agrobacterium tumefaciens*. HortScience 26:1325-1328.
10. Kuehnle, A. R., F. C. Chen, and N. C. Sugii. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. Plant Cell Rep. 11:438-442.
11. Kuehnle, A. R., F. C. Chen, and N. C. Sugii. 2001. Transgenic *Anthurium*. p.3-15. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 48, Springer-Verlag, Berlin.
12. Matsumoto, T. and A. R. Kuehnle. 1997. Micropropagation of *Anthurium*. p.14-29. In: Bajaj, Y. P. S. (ed), Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 40, Springer-Verlag, Berlin.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
14. Orlikowska, T., I. Sabala, and E. Nowak. 1995. Adventitious shoot regeneration on explants of *Anthurium*., *Codiaeum*, *Dieffenbachia*, *Gerbera*, *Rosa* and *Spathiphyllum* for breeding purposes. Acta Hort. 420:115-117.
15. Pierik, R. L. M., H. H. M. Steegmans, and J. A. J. Van Der Meys. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. Scientia Hort. 2:192-198.
16. Rosario, T. L. and L. A. Lapitan. 1981. Callus and plantlet formation in *Anthurium andraeanum* Lind. Philip. Agr. 64:197-202.
17. Soczek, U. and M. Hempel. 1989. Effect of cytokinin on growth and development of *Anthurium ×cultorum* Birdsey shoot explants *in vitro*. Acta Hort. 251:249-254.

Abstract

A method of plant regeneration from *in vitro* lamina culture of *Anthurium* by supplementing thidiazuron with either 2,4-D or picloram is examined. Whole leaf blade of T2 lamina produced few callus on 1/2 MS medium supplemented with 2,4-D or picloram. A combination of 2,4-D (0.1~1mg/l) and TDZ (0.5mg/l) led to 10~30 % of the explants regenerating adventitious shoots. MS medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ and picloram (0.1~1mg/l) induced 0~70% shoot formation in T18 lamina. Reducing salt strength to one half promoted callus formation. Normal and rooted plantlets were recovered and subcultured on the same medium.

