

芋 *Colocasis esculenta* 癒合組織誘導與植株再生之研究

黃柄龍、蔡奇助¹

摘 要

取芋高雄一號健康種苗側芽及莖頂分生組織，培養在含有 2mg/l NAA 及 3% 蔗糖的 1/2MS 鹽類基本培養基，經 1 個月照光培養，芽體可發育形成植株。將分生苗之根、葉、葉柄及球莖部分組織切下進行癒合組織的誘導，結果僅葉柄、球莖培植體可以形成癒合組織，其中又以含有 1mg/l 2,4-D 及 0.1mg/l BA 之培養基的誘導率最高，分別為 30% 及 55%。芽體分化時，大部分的 NAA 與 BA 或 kinetin 組合，極易形成根原體，只有在 NAA 1 mg/l 配合 kinetin 0, 0.5, 2.5mg/l，其芽體誘導率分別為 6.7%、16.7%、3.3%，可由癒合組織的表面形成 1 個至多數個數目不等的芽體，約 3 個月後形成一完整的植株。

關鍵語：芋、癒合組織、植株再生

前 言

全世界芋每年種植面積超過 100 萬公頃，為部分熱帶及亞熱帶國家重要主食之一⁽¹¹⁾。在台灣每年約有近 3000 公頃栽培面積，其中又以高屏地區種植面積最多⁽⁷⁾，為南部地區重要作物之一。由於芋經濟栽培品種鮮少能開花結實，其繁殖方法一般是利用塊莖、母芋分蘖子芋芽或母芋採收完後殘留土中莖節上休眠芽，經適當處理後的子芽，因此方法容易造成病毒或是系統性病害傳播及蔓延^(16,19)。利用生長點微體繁殖技術，大量繁殖營養體，已廣泛應用在芋 *antiquorum* 亞種^(14,15) 及 *esculenta* 亞種⁽²⁰⁾ 的種源保存⁽¹⁷⁾ 與無病毒種苗提供上。然而截至目前為止，尚無芋基因轉殖或誘變育種之相關報導，主要原因是芋癒合組織再生系統仍未有效建立，尤其是 *esculenta* 亞種。目前台灣主要栽培種均為 *esculenta* 亞種，因此，欲利用基因轉殖或誘變育種方法改良芋特性，首要之務即是建立穩定的組織培養植株再生系統。Yam 等人^(19,20,21,22) 在培養基中添加塊莖抽出物，可有效誘導癒合組織形成並再生植株，並進一步發現不同鹽類濃度與植物荷爾蒙，對癒合組織誘導效果有明

¹ 高雄區農業改良場助理研究員、副研究員。

顯不同。此外，Sabapathy 和 Nair^(15,16) 指出添加多元胺(polyamine)合成前驅物 arginine 與 ornithine 有助於芋植株再生及再生株之生長，若添加 spermine 則有利於二次芽體產生(secondary plantlets)。本試驗之主要目的為以台灣主要栽培品種高雄一號為材料，探討不同部位培植體對癒合組織誘導之影響，篩選具高度分化能力之癒合組織團，建立穩定的癒合組織植株再生系統，以應用於誘變處理，直接篩選具染色體變異之植株，不需藉由開花授粉步驟，達到芋等營養繁殖作物品種改良的目的。

材料與方法

本研究選用的芋材料係為高雄一號母芋用品種，本品種植株高大，葉色較濃綠，平均每株分蘖數 4~8 支^(3,6)。首先選取外型健康、大小適中的芋植株，以自來水洗淨外部泥土，切除地下部球莖及地上部葉柄部位使其僅剩基部 3~5 cm 左右，利用 1%次氯酸鈉(NaOCl)溶液，加 2 滴/100ml 展著劑 Tween-20，激烈振盪進行表面消毒 20 分鐘，以無菌水沖洗數次後，挑取莖基部側芽及莖頂分生組織，培養於含有 NAA(α -naphthaleneacetic acid) 2mg/l、Thiamine·HCl 0.1mg/l、Pyridoxine·HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Glycine 2.0mg/l、3%Sucrose 及 0.8%Merck agar 的減半 MS(Murashige and Skoog)⁽¹³⁾基本培養基上，於光度 1,750 lux，光週明期為 16 小時，暗期為 8 小時，溫度 25±2°C 之培養室內進行初代培養，待初代培養的芽體發育成植株後，進行以下的試驗。

一、不同 2,4-D 與 BA 濃度組合對癒合組織誘導率的影響

將再生植株之根、葉、葉柄及基部球莖組織等切成長度 0.5 cm 作為培植體，培養於含有 Thiamine·HCl 0.1mg/l、Pyridoxine·HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Glycine 2.0mg/l、Glutamine 200mg/l、3%Sucrose 及 1.0%Merck agar 的 MS 固體培養基上 (pH = 5.3)，配合 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0, 0.5, 1, 5, 10 mg/l 及 BA(6-benzyladenine) 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/l 等比例生長調節劑組合下，每一處理 4 個重複，每個重複培養 10 個培植體，培養二個月後調查癒合組織之誘導率。癒合組織誘導率為計算未褐化死亡、培植體表面增生黃綠色或土黃色癒合組織團所佔的比率。

$$\text{癒合組織誘導率} = \frac{\text{表面產生黃綠色或土黃色癒合組織之培植體個數}}{\text{培植體總數}} \times 100\%$$

二、不同濃度 NAA 與 BA 或 kinetin 對癒合組織分化及植株再生的影響

將葉柄、球莖組織於 1mg/l 2,4-D 及 0.1mg/l BA 濃度下所誘導及增殖而

得的癒合組織，切成長、寬各約 1.0 cm，培養於含有不同濃度 NAA(0, 0.1, 0.5, 1 mg/l)及 BA(0, 0.5, 2.5, 5, 10 mg/l)或 NAA(0, 0.1, 0.5, 1 mg/l)及 kinetin(0, 0.5, 2.5, 5, 10 mg/l)的 MS 固體培養基上，探討不同濃度對芋癒合組織分化及植株再生的影響，每種處理 4 重複，每重複 10 團癒合組織，二個月後調查癒合組織之芽體分化率。芽體分化率估算方式為計算由生長良好的癒合組織表面直接再生器官者。分化產生的芽體並令其於含有 ABA 0.05mg/l 之 1/2 MS 培養基中成長，誘導成苗。

芽體分化率 = (形成芽體之癒合組織團個數) ÷ (癒合組織團總數) × 100%

三、組織切片觀察：

在分化初期，癒合組織形成器官分化的芽體與胚狀的根原體，以肉眼觀察其外表形態極為類似，不易區別；利用石蠟切片觀察其細胞內部構造，可由植物形態發生的極性現象早期區分為體胚分化，抑或是器官分化。本試驗組織切片技術係修改自蔡之方法⁽⁸⁾，其步驟如下：癒合組織以 FAA 固定液固定至少 12 小時(配合真空抽氣 30 分鐘，直到樣品沈至瓶底且無氣泡冒出為止)；接著以 50%乙醇清洗 3 次，再利用三級丁醇(t-butanol)與乙醇(ethanol)一系列混合液(TBA-series)進行組織脫水；之後於 55~58°C 烘箱內操作，進行滲蠟，滲蠟至少隔夜，待三級丁醇完全揮發，更換一次新蠟。繼續滲蠟 3 天後進行埋蠟。切片厚度 8~9 μm，以 1%藏紅(safranin)染色 3 小時，0.5%Fast-green 染色 5 分鐘後，以 Merck Entellen 膠封片，於光學顯微鏡下觀察及照相記錄。

結 果

一、不同 2,4-D 與 BA 濃度組合對癒合組織誘導率的影響

由圖 1 結果顯示，無生長調節劑存在下，所有培植體皆無法產生癒合組織，而根及葉部位組織即使在有 2,4-D 及 BA 時，亦無法誘導形成癒合組織。葉柄及球莖部位組織，分別經 2,4-D 0.5 mg/l 與 BA 0.05 mg/l、2,4-D 1 mg/l 與 BA 0.1 mg/l、2,4-D 5 mg/l 與 BA 0.5 mg/l 及 2,4-D 10 mg/l 與 BA 1 mg/l 等比例組合誘導後，其癒合組織誘導率分別為 0%、30%、20%、10%與 22.5%、55%、32.5%、5%，誘導產生的癒合組織呈黃綠色至土黃色(圖 2)，且二者當中又均以 1mg/l 2,4-D 及 0.1mg/l BA 之組合的誘導率最高，而隨著生長調節劑濃度的提高反而不利於癒合組織的產生。因此，誘導芋癒合組織的形成，以 1mg/l 2,4-D 及 0.1mg/l BA 濃度的效果為最佳，誘導產生的癒合組織，經分切後，並能在此相同的培養基中進行無限量的增殖，可同時作為癒合組織增殖用培養基。

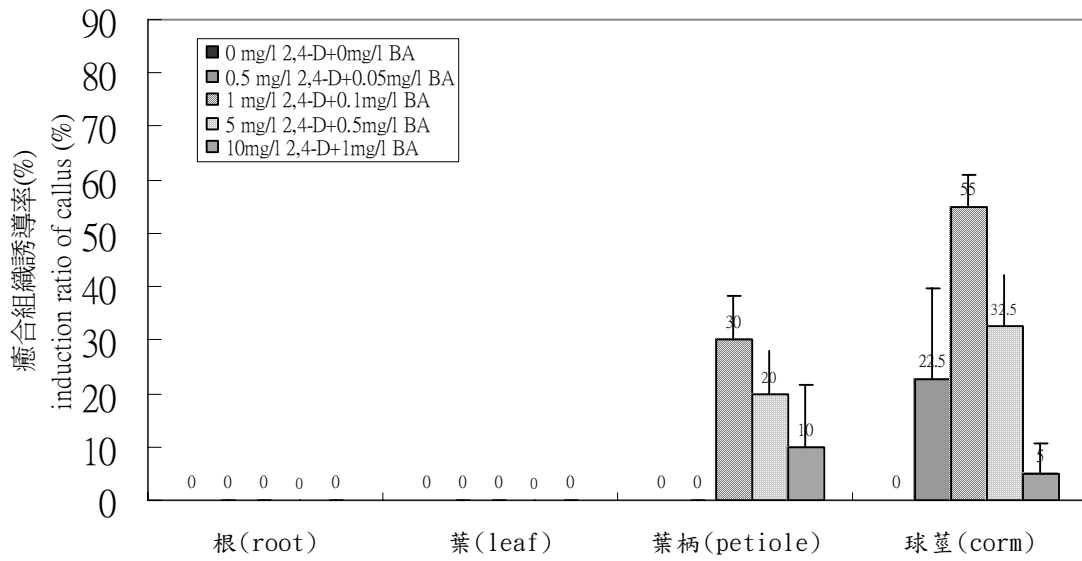


圖 1.不同濃度組合之 2,4-D 及 BA 對芋癒合組織誘導率的影響

Fig1. Effect of different combination of 2,4-D and BA supplemented to MS basal medium on callus induction from taro culture

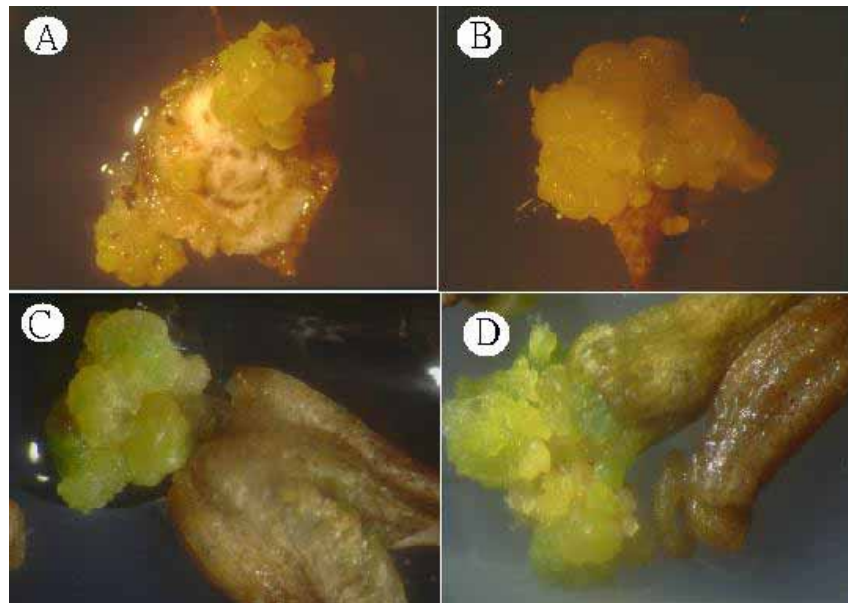
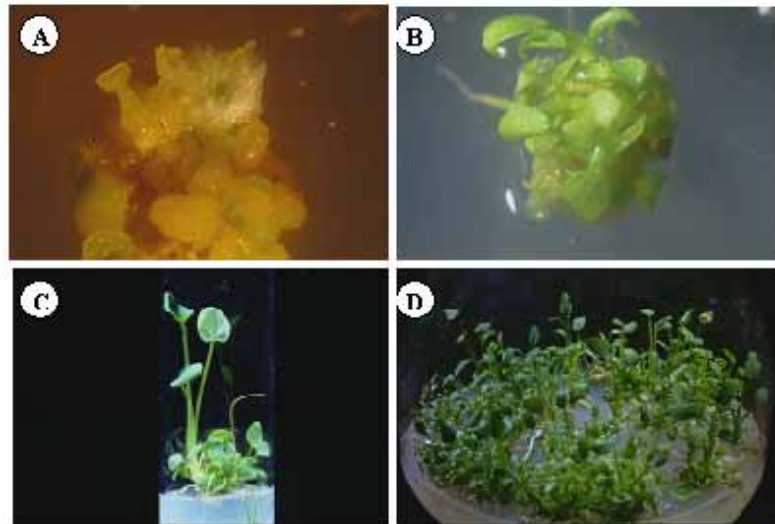


圖 2. 芋誘導形成之癒合組織(A)(B)球莖基部產生之癒合組織(C)(D)葉柄產生之癒合組織

Fig 2. The taro calli. (A)(B)Callus inducing from corm explants (C)(D)Callus inducing from petiole explants

二、不同濃度 NAA 與 BA 或 kinetin 對癒合組織分化及植株再生的影響

在誘導癒合組織分化方面，利用 NAA 與 BA 二種生長調節劑處理下，不論其組合濃度為何，均無法誘導癒合組織進行芽體分化，但可使癒合組織外觀轉變成深綠色，並極易由其表面產生數量多、初期形狀極似胚狀的根原體(圖 3A)，且隨著培養時間的增加，根原體形成長度約 0.5-2.0 cm 不等的根包覆蓋癒合組織。而 NAA 0, 0.1, 0.5 mg/l 與 kinetin 0, 0.5, 2.5, 5, 10 mg/l 不同濃度組合時，同樣無法誘導芽體的分化，部分處理亦產生根；只有在 NAA 1 mg/l 及 kinetin 0, 0.5, 2.5mg/l 三種組合下，可由癒合組織的表面形成 1 個至多數個數目不等的芽體(圖 3B)，其芽體誘導率分別為 6.7%、16.7%、3.3%，以 NAA 1 mg/l、kinetin 0.5mg/l 之組合的效果最佳，其次為只添加 NAA 1 mg/l 及 NAA 1 mg/l、kinetin 2.5mg/l 之濃度組合。挑取分化產生的芽體，移植至含有 ABA 0.05mg/l 之 1/2 MS 培養基中培養，約 3 個月後形成一完整的植株(圖 3C)，隨即可以泥炭土為介質假植至穴盤，達到短時間內大量繁殖的目的(圖 3D)。



的(圖 3D)。

圖 3. 芋癒合組織芽體分化與植株再生之過程 (A)似胚狀之根原體 (B)芽體分化 (C)植株再生及(D)分生苗大量繁殖

Fig 3. The shoots differentiation and plantlets regeneration of taro via tissue culture. (A)Embryo-liked root primordium. (B)Shoots differentiation. (C) The normal regenerated plantlet. (D) Mass propagation

三、組織切片觀察

圖 4 顯示芽體由癒合組織的表層分化產生。初期，在周皮細胞(peripheral cells)由一群具分裂能力旺盛之細胞群形成類似分生組織(meristemoids)的單極性結構，且隨著培養時間的增加，分生組織漸突起，分化形成芽體，發育的芽體具有明顯再分化成完整植株之潛力，有別於體胚產生時⁽¹⁰⁾，胚性細胞具體積小、細胞質濃密、細胞核大並有明顯核仁、液泡大及富含澱粉粒，並具有封閉的維管束組織等雙極性的特徵。

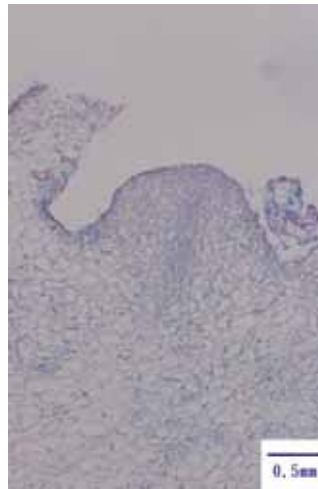


圖 4. 芋組織切片觀察，形成似單極性不對稱分生組織的結構

Fig4. The paraffin thin section of a taro callus. It formed a asymmetry monopolar meristemoids-like structure

討 論

有關芋組織培養之研究，國外學者曾有多篇報告發表，不過大都侷限在 *antiquorum* 亞種。Yam 等人^(19,21,22)曾極力主張在培養基中添加塊莖抽出物，可有效誘導癒合組織，同時認為芽體的形成只發生在含有 25mg/l 以上塊莖抽出物之培養基中，形成的植株在含塊莖抽出物之培養基中可促進根、葉的生長。不過，塊莖抽出物的來源不一，製備過程繁雜，且使用不易，修改培養基組成份即可克服抽出物的添加，達到誘導的目的，這與 Yam 等人的主張不同。推測差異的原因可能為：(1)品種的不同：因為其是利用 *antiquorum* 亞種，而本研究使用的材料為 *esculenta* 亞種，由於品種間差異大，而產生不同的培養結果；(2)誘導方法不同：Yam 等人係由側芽為材料直接誘導癒合組織，而本試驗則是先培育莖頂分生組織及側芽成再生植株後，再由各部位

組織進行培養，不僅試驗材料增多，亦可降低田間污染率的發生。誘導產生的癒合組織可於含 2,4-D 1mg/l 及 BA 0.1mg/l 之原誘導培養基中生長良好，但因未進行 2,4,5-T(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid)方面之研究，無法得知 2,4-D 誘導癒合組織的能力與 Yam 等⁽²⁰⁾利用 2,4,5-T 進行試驗比較，何者的效果較佳？而在癒合組織分化方面，只有在 NAA 1 mg/l 及 kinetin 0~2.5mg/l 時，可由癒合組織的表面形成 1 個至多數個數目不等的芽體，這與 Sabapathy 和 Nair⁽¹⁶⁾認為芋植株再生需 0~2mg/l kinetin 的結果相近。

癒合組織是一群未分化的薄壁細胞團(cell cluster)，可藉由繼代培養大量增生，也可再分化為各種組織、器官或植株，形成一高效率的無性繁殖體系^(2,18)；器官分化係由鄰近細胞之荷爾蒙及營養物質相互作用整合發展而成的，同時由細胞培養的不對稱性及極性原理，早期區分體胚及器官分化，對於不同形態發生的培養環境需求極為重要⁽¹⁰⁾。由組織切片判斷，芋癒合組織係呈現單極性的芽體分化，這與黃和蔡利用單一培養步驟誘導胡瓜體胚形成⁽⁴⁾，及利用體胚形成進行薑花之微體繁殖試驗⁽⁵⁾等具明顯的雙極性現象有著極大的不同，可避免誘導分化時被癒合組織表面許多形狀極似胚狀的根原體所誤導。

本研究已建立一個芋癒合組織植株再生系統，透過癒合組織的誘導及篩選具分化能力之癒合組織團，可誘導產生叢生狀芽體，再促使其萌發為葉柄組織，發根後即成為一完整植株。根據國際原子能總署(IAEA, International Atomic Energy Agency)統計，至 2000 年為止全世界經誘變產生的植物品種有 2252 個⁽¹²⁾，因此，若能應用此一組織培養系統並結合誘變技術，即可於短時間內量產誘變試驗所需之大量初始培植體材料，並於實驗室階段中產生大量具有變異性狀的植物體，提供芋這類營養繁殖作物一強有力的育種工具，克服傳統雜交育種上所無法達成的目的⁽⁹⁾，加速台灣在芋品種改良上之進展，這與林和蔡⁽¹⁾企圖結合組織培養與放射線照射以培育鳳梨新品種有著相同的意義。

參考文獻

1. 林學詩、蔡月夏. 2005. 結合組織培養與放射線照射誘導鳳梨變異之研究. 中國園藝. 51(3) : 241-248.
2. 陳榮五、黃勝忠、許謙信、陳彥睿. 1996. 花卉組織培養實用技術手冊. 台灣省台中區農業改良場編印。
3. 黃賢喜. 1993. 芋之栽培. 農業推廣教育教材. 行政院農業委員會、臺灣省政府農林廳編印。

4. 黃柄龍、蔡奇助. 2001. 利用單一培養步驟誘導胡瓜體胚形成之研究. 高雄區農業改良場研究彙報. 12(2):15-24.
5. 黃柄龍、蔡奇助. 2002. 利用體胚形成進行薑花之微體繁殖. 中國園藝. 48(3) : 239-246.
6. 黃賢喜、韓青梅. 1994. 芋. 雜糧作物各論Ⅲ.根及莖類. 臺灣省高雄區農業改良場編印。
7. 農業統計年報. 2004. 行政院農業委員會。
8. 蔡淑華. 1975. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書有限公司出版. 台北。
9. Ahloowalia, B. S. and M. Maluszynski. 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118:167-173.
10. Esau, K. 1976. Anatomy of seed plants 2nd edition. California U. S. A. pp.7-16.
11. FAO (1990) Production yearbook. Food and Agriculture Organization, Rome. pp 185.
12. Maluszynski, M., K. Nichterlein, L. Van Zanten, and B. S. Ahloowalia. 2000. Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA Database. Mut. Breed. Rev. 12:1-84.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
14. Nyman, L. P., E. L. Webb, Z. Gu, and J. Arditti. 1986. Structure and *in vitro* growth of zygotic embryos of taro (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*). Annal of Botany 57: 623-630.
15. Sabapathy, S. and H. Nair. 1992. In vitro propagation of taro, with spermine, arginine, and ornithine. I. Plantlet regeneration from primary shoot apices and axillary buds. Plant Cell Rep. 11: 290-294.
16. Sabapathy, S. and H. Nair. 1995. In vitro propagation of taro, with spermine, arginine, and ornithine. II. Plantlet regeneration via callus. Plant Cell Rep. 14: 520-524.
17. Takagi, H., N. T. Thinh, O. M. Islam, T. Senboku, and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoots tips of taro(*Colocasia esculenta* (L) Schott)by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Rep. 16: 594-599.
18. Walden, R. and W. Ruth. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. TIBTECH. 13:324-331.

19. Yam, T. W., G. I. Hsu, and J. Arditti. 1990a. Plant regeneration in vitro of South Pacific taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* cv. Akalomamale, Aracea). *Plant Cell Rep.* 9: 229-232.
20. Yam, T. W., S. Ichihashi, and J. Arditti. 1991. Callus growth and plantlet regeneration in taro, *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L) Schott (Aracea). *Annal of Botany* 67: 317-323.
21. Yam, T. W., E. L. Webb, and J. Arditti. 1990b. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro. *Planta* 180: 458-460.
22. Yam, T. W., J. L. P. Young, and J. Arditti. 1990c. Induction of callus from axillary buds of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*, Araceae). *Plant Cell Rep.* 9: 459-462.

Studies on the Callus Induction and Shoot Regeneration of Taro (*Colocasia esculenta*)

Ping-Lung Huang and Chi-Chu Tsai¹

Abstract

Axillary buds and shoots tip meristem obtained from healthy plantlets that cultured in half-strength modified MS medium supplemented with 2mg/l NAA and 3% sucrose were used to establish an *in vitro* development for the future materials of *Colocasia esculenta* var. *esculenta*. Among different organ explants, only petiole and corm cultured in MS medium containing 1mg/l 2,4-D、0.1mg/l BA and 200mg/l glutamine for 2 months resulted in a maximum rate of callus formation. There are 30% and 55% respectively. For adventitious shoots regeneration, the most combination of NAA and BA or kinetin led to form root primordium easily. MS medium supplemented with 1mg/l NAA and kinetin(0, 0.5, 2.5mg/l) could induce shoot formation(6.7%, 16.7%, 3.3%). It produce lots of shoots per culture directly from the surface of calli, and the shoots could develop into intact plants with vigorous appearance after 3 months in culture.

Key words: Taro (*Colocasia esculenta*), Callus, Shoot regeneration

¹ Assistant Researcher and Associate Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station.