

盤固草與尼羅草無菌試管苗量產之模式

93 農科-3.1.4-畜-L2

一、中文摘要

盤固草A254(*Digitaria decumbens*)為本省最重要的栽培品種，尼羅草台畜一號(*Acroceras macrum* Stapf)為畜產試驗所新育成之牧草品種，兩者花粉皆不稔，主要以走莖繁殖，繁殖效率低。不論是傳統育種或基因轉殖改良的品種，皆需具完善的種苗生產模式，以達商品化生產之目標。本研究利用盤固草之無菌試管苗為母瓶，以固液體浸潤培養方法，可改善傳統三角瓶之固體培養法，由 15 株/每瓶(直徑 9 cm)，增加至 148 株/每盆(直徑 15 cm)，且採用層架堆疊的方式(60 盆/100cm²)，提高無菌試管苗單位面積的生產量至 9,000 株/100cm²，較傳統三角瓶培養法 1,500 株/100cm²，效率提昇 6 倍以上，有效提高無菌試管苗的繁殖效率，可供業者生產加工利用。

關鍵字：盤固草、尼羅草、癒合組織、植株再生

Key words : *Digitaria decumbens*、*Acroceras macrum* Stapf、callus、plant regeneration

二、前言

盤固草不僅適合放牧及製成乾草，並能調製成各式青貯料，其應用性相當廣泛為本省乳牛芻料的重要來源(Chen *et al.*, 1994; Buu *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1991; Buu and Shy, 1993; Shy *et al.*, 1995)。盤固草及尼羅草的種植方式，通常利用舊有之草地，以分株苗進行扦插，或剪取地上部草苗以灑播的方式種植，無法以種子繁殖的方式建立新草地。這樣的繁殖方式，往往造成雜草(古拉丁、星草、強生草)或病原菌(鏽病孢子)等，經由人為運送的方式，由甲地傳播至乙地，造成新牧區雜草或病原菌的污染。因此，生產潔淨無雜草或病原菌污染之健康種苗，為目前牧草栽培管理上急待解決的問題。

植物種苗的大量繁殖，通常可利用生長點、莖頂或芽體作為培植體，加入不同的植物生長劑於培養基，誘導培植體細胞分裂，形成芽體或癒合組織。依細胞增殖的路徑，可簡易區分為(1)先誘導培植體產生癒合組織，再促使癒合組織分化成植株。(2)由原有之分生組織部位，誘導大量的芽體產生。方法(1)的繁殖方法，雖短時間內可獲得大量的癒合組織與擬胚性細胞團，但不適當的荷爾蒙刺激常發生體

細胞變異，較少應用於種苗商品化之生產，但因培植體誘導的癒合組織或擬胚性細胞，具表現外來基因之潛能，可作為基因轉殖的表現載體，因此常用於基因轉殖之研究(Chang *et al.*, 2003; Dayal *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002)。方法(2)的繁殖方法，初期繁殖速度雖較慢，但因植物體係由母體之小側芽或葉原體分切繁殖，遺傳上產生變異的機會極小，因此常用於植物種苗商品化之生產。在種苗量產過程，亦可利用短暫浸潤的方式，促進芽體的增殖(Etienne-Barry *et al.*, 1999; Escalona *et al.*, 1999)。本研究主要利用盤固草及尼羅草之無菌試管苗為母瓶，利用固體及液體交互培養方式與短暫浸潤等培養方法，建立無菌試管苗大量生產之模式，期提供優良之種苗供業者生產利用。

三、試驗材料與方法

盤固草與尼羅草經組織培，誘導胚狀細胞團產生，並分化完整植株，利用此無菌試管苗，建立可量產之母瓶，包括添加不同濃度與種類的細胞分裂素或發根劑於培養基。每三週繼代培養一次，並以固態培養基及液態培養基，交換繼代培養，以維持母瓶植株的生長優勢及活力。

四、結果與討論

盤固草及尼羅草台畜一號為本省牧草種植品種之一。應用植物組織培養技術及適當的培養基，可誘導盤固草及尼羅草的體細胞進行細胞分裂，形成具高分化能力的胚狀細胞團，胚狀細胞團經適當的培養條件可分化成完整植株，此組織培養技術可應用於無菌試管苗之生產。利用傳統直徑 9 cm 三角瓶作為容器，每盆可增殖至 15 株。藉由固液體浸潤培養法，直徑 15 cm 的浸潤器，每盆可增殖至 148 株，且浸潤器可以採堆疊的方式節省培養架空間(圖 1)，有效提高單位面積的生產量。唯須配合具有空氣過濾雙標準 P2 無菌培養室，及提高操作人員潔淨度要求(圖 2)，方能減少浸潤器發霉污染的機率，達到無菌苗大量生產之目標，進而應用於以牧草作為生物反應器之生產流程。

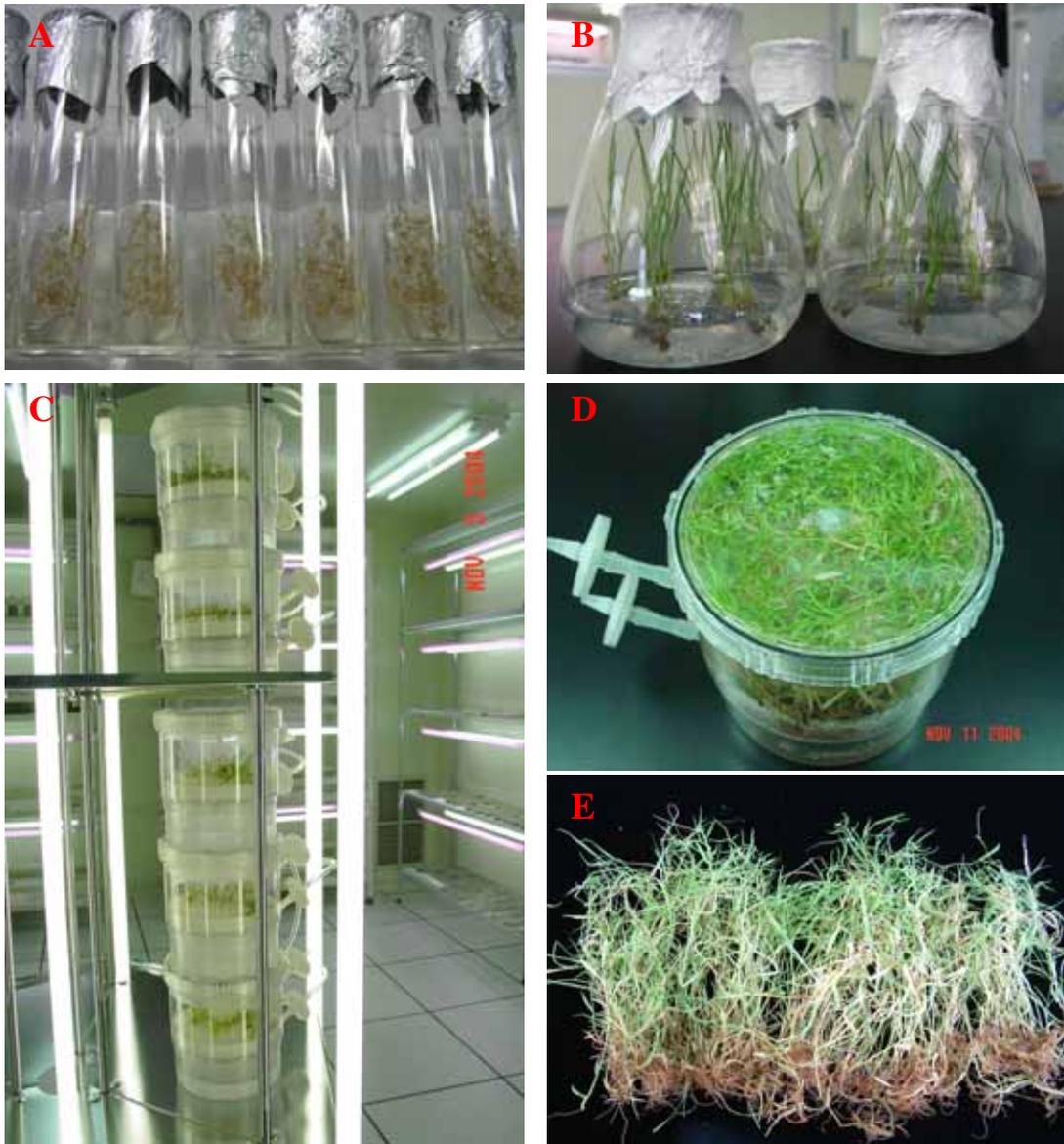


圖 1.無菌試管苗大量繁殖方法

- A. 未成熟花穗培養
- B. 試管苗母瓶(15 株/瓶)
- C. 固液體浸潤培養 4 週
- D. 浸潤器外觀
- E. 以浸潤器增殖之無菌苗(148 株/盆)

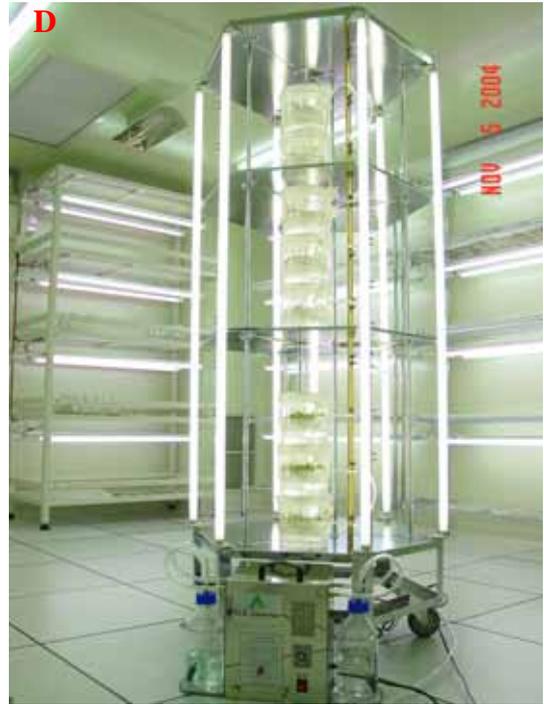


圖 2. 標準 P2 無菌室設施

A. 培養基配置室

B. 無菌接種室

C. 試管牧草培養室

D. 固液體浸潤培養設備

五、結論與建議

利用固液體浸潤培養方法，可改善傳統三角瓶之固體培養法，由 15 株/每瓶(直徑 9 cm)增加至 148 株/每盆(直徑 15 cm)，且採用層架堆疊的方式(60 盆/100cm²)，提高無菌試管苗單位面積的生產量至 9,000 株/100 cm²，較傳統三角瓶培養法 1,500 株/100 cm²，效率提高 6 倍以上，唯固液體浸潤培養的方法，需藉由外界氣體壓力進行液體浸潤時間的控制，對組織培養室與操作方法潔淨度的要求，較傳統方法要高出許多，因此具空氣過濾效果的組培室與操作管理，可減少固液體浸潤培養法發霉的機率，有效提高無菌試管苗的繁殖效率，進一步達到生物反應器之生產目標。

六、參考文獻

- Buu, R. H., Y. M. Shy, C. P. Chen, and M. C. Chen. 1993. Effects of different cutting stages on forage yield, chemical composition and nutritive value of pangola grass. *J. Chin. Anim. Sci.* **22**:373-386.
- Chen, C. P., T. W. Yang, R. H. Buu, Y. M. Shy, S. J. Lee, and M. C. Chen. 1994. Feeding value of pangola hay and haylage for milking cows. *J. Taiwan Livestock Res.* **27**:227-236.
- Escalona, M., J. C. Lorenzo, B. Gonzalez, M. Daquinta, J. L. Gonzalez, Y. Desjardins, C. G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* **18**:743-748.
- Etienne-Barry, D., B. Bertrand, N. Vasquez, H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep.* **19**:111-117.
- Lee, C. F., R. H. Buu, Y. M. Shy, and M. C. Chen. 1991. The nutritive value of pangola grass A254 at different stages of growth. *J. Taiwan Livestock Res.* **24**:59-65.
- Shy, Y. M., R. H. Buu, and C. K. Liao. 1995. Effects of phosphorus and potassium fertilizers on forage yield, quality and mineral composition of pangola grass. *J. Agric. Associ. China.* **171**:57-70.
- Wang, Z., D. Lehmann, J. Bell, A. Hopkins. 2002. Development of an efficient plant regeneration system for Russian wildrye (*Psathyrostachys juncea*) *Plant Cell Rep.* **20**:797-801.