



公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：090101Z208

行政院農業委員會農糧署101年度科技計畫研究報告

計畫名稱： 球根花卉健康種苗繁殖-海芋試管內植株再生
途徑之研究 (第2年/全程2年)
(英文名稱) Studies on healthy plantlet propagation
of flower bulb crops- *in vitro* plant
regeneration of *Zantedeschia aethiopica*

計畫編號： 101農科-9.1.1-糧-Z2(8)

全程計畫期間：自 100年1月1日 至 101年12月31日

本年計畫期間：自 101年1月1日 至 101年12月31日

計畫主持人： 陳麗如

研究人員： 林冠宏、熊同銓、黃子彬、陳昱宇

執行機關： 中國文化大學





一、執行成果中文摘要：

建立海芋試管內植株再生途徑以培育及生產健康種苗，是海芋產業永續發展的重要課題。現已完成白花海芋 (*Zantedeschia aethiopica* L.) 無菌消毒條件的建立、體胚誘導及直接芽體器官發生途徑。以5% H_2O_2 處理後接續NaOCl消毒，可降低瓶內污染率。切取白花海芋根莖含形成層的組織，培養於添加 1 mg l^{-1} 2,4-D 組合6% sucrose的MS基本培養基中，體胚誘導率為33%。切取帶主芽的根莖培植體，於添加 1 mg l^{-1} 2,4-D的MS基本培養基中，可顯著促進芽體的生長，切取其芽基盤培養於MS基本培養基中，可達3.5倍的芽體增殖率，分切後均可發育為完整植株。目前已建立白花海芋芽體器官發生途徑並誘導體胚形成，本計畫將接續探討促進試管內根莖種球形成的條件，未來將可開發試管內植株再生途徑以生產健康種苗及種球，並可作為基因轉殖的平台，以利分子育種的研究。





二、執行成果英文摘要：

The mass production of healthy rhizome bulbs of *Zantedeschia aethiopica* L. through *in vitro* micorpropation is an important issue for a sustainable development of calla lily industry in Taiwan. The aim of this study is to establish *in vitro* plant regeneration of white calla lily. Aseptic sterilization, somatic embryogenesis and direct organogenesis in *Z. aethiopica* L. have been established in this study. Pretreatment with 5% H₂O₂ for 5 min followed with 1% NaOCl for 15 min can decrease *in vitro* contamination. Supplemented with 1 mg l⁻¹ 2,4-D and 6% sucrose in Murashige and Skoog (MS) basal medium can induce somatic embryo formation (33.3%) on rhizome explants with cambium in *Z. aethiopica* L. MS basal medium containing 1 mg l⁻¹ 2,4-D can also promote the shoot/plantlet development of rhizome buds. After culture of 4 wk, the shoot basal discs were cut from plantlets and cultured in MS basal medium, in which condition shoots proliferated with 3.5 folds. All shoots can develop into healthy plantlets. We have established *in vitro* shoot organogenesis and induce the formation of somatic embryo. In this plan, we will further to find the optimal cultural conditions on *in vitro* bulb formation for establishing the healthy plantlet propagation of *Z. aethiopica* L.





三、計畫目的：

1. 探討白色海芋體胚誘導及發育的培養條件。
2. 篩選出適合白色海芋芽體發育的基本培養基條件。
3. 探討不同植物生長調節劑組合對白色海芋芽體增殖倍率的影響。
4. 探討白色海芋芽體發根的培養條件及後續馴化處理對植株生長的影響。
5. 經由芽體器官發生建立白色海芋的試管內植株再生途徑。
6. 彙整試驗結果及分析。





四、重要工作項目及實施方法：

一、植物材料

委託福埠實業股份有限公司自加州進口Callifornia Callus之四季海芋 (*Zantedeschia aethiopica* L. 'Childsiana') 種球 (10/12公分) 為試驗材料。

二、無菌消毒條件

將四季海芋根莖，經自來水洗淨，接續以70%酒精表面消毒30秒，置入5 % H₂O₂溶液中，以75 rpm搖洗5分鐘，再以無菌水清洗6次，再以1%次氯酸鈉溶液 (含0.05% Tween 20) 消毒15分鐘，以無菌水清洗6次，每次5 min，接續進行後續培養。

三、基本培養基

基本培養基組成為半量MS無機鹽類 (Murashige & Skoog basal salt mixture, PhytoTechnology Lab. Ltd., KS., USA)、0.5 mg l⁻¹ nicotinic acid、0.5 mg l⁻¹ pyridoxine HCl、0.1 mg l⁻¹ thiamine HCl、2 mg l⁻¹ glycine、100 mg l⁻¹ myo-inositol、1 g l⁻¹ peptone、30 g l⁻¹ sucrose 與2.8 g l⁻¹ gelrite (Duchefa Biochimie Inc., Haarlem, Neth.)。pH 於agar 加入前以1 N HCl 與1 N NaOH 調置pH5.8。培養容器為150×20 mm 試管，每管分裝10 ml 培養基，以鋁箔紙封口，利用殺菌釜121°C 高溫殺菌15 min 後，以斜面凝固。

四、體胚的誘導及增殖繼代條件試驗

切取消毒後之根莖培植體，約5~7 mm²，培養於添加0、0.5、1、2 mg l⁻¹ 2,4-D 組合3%、6% sucrose的 MS基本培養基中，以誘導癒傷組織及體胚形成。培養環境為25±1°C，相對濕度70%，暗培養。

五、體胚發育培養條件試驗

經體胚培養於含0或1 mg/l TDZ的 MS基本培養基中，培養容器為150×20 mm 試管，弱光培養一周後，移至光照環境，光源為40W 日光燈管 (FL30D/29, China electric MFG. Co., Taipei, Taiwan)，光強度13.5 mmol m⁻² s⁻¹，光週期16 hr，溫濕度設定為25±1°C、70%RH。

六、芽體增殖繼代條件試驗

切取消毒後之根莖芽體，約5~7 mm²，培養於添加2,4-D (0、1 mg l⁻¹) 組合BAP(0、0.5、1 mg l⁻¹) 的 MS基本培養基中，以探討其促進芽體發育及增殖倍率的影響。培養環境為25±1°C，相對濕度70%，弱光培養一周後，移至光照環境，光源為40W 日光燈管 (FL30D/29, China electric MFG. Co., Taipei, Taiwan)，光強度13.5 mmol m⁻² s⁻¹，光週期16 hr，溫濕度設定為25±1°C、70%RH。





五、結果與討論：

白花海芋是陽明山地區重要的經濟球根花卉作物，然而由於進口海芋種球昂貴，農民多以根莖種球分株，鮮少更新種球，在長期連作下，造成種球老化及病害的問題，在1995年曾經因大規模的細菌性軟腐病感染，重挫切花市場。近年來結合休閒觀光農業的發展，台北市政府每年舉辦海芋花季活動（3~4月），帶動相關休閒產業收益均逾1億元，實質推動地區性產業發展。然而，影響海芋栽培生產最重要的問題在於細菌性軟腐病及毒素病的危害，因此，長期保存健康種原及開發健康種苗供應體系，對海芋產業的永續發展，是相當必要的工作。傳統海芋繁殖法以塊莖或根莖分株為主，但分株傷口易遭受病毒及軟腐病感染，然而利用種子繁殖除受限於種子不易貯藏及取得困難外，實生苗易產生遺傳變異，優良性狀不易保存（何等，2000）。相較於傳統分株或實生苗繁殖，組織培養技術已成為快速繁殖健康花卉種苗的主流，行政院農業委員會種苗改良繁殖場因應國內彩色海芋栽培業者對組織培養苗的需量，已成功開發出組織培養苗大量生產技術，利用組織培養去病毒的技術配合機械自動化生產模式，供花農養球栽培切花或盆花之用（文，2001）。國內目前尚無白花海芋組織培養系統的相關研究，因此建立海芋試管內植株再生途徑以培育及生產健康種苗，是白花海芋產業永續發展的重要課題。

白花海芋的主要繁殖體為根莖種球，因此本研究選擇以根莖種球為主要培植體，然而無菌消毒不易為白色海芋組織培養的限制因素。白花海芋因濕地栽培，其根莖培植體雖可利用高濃度NaOCl或預先以加熱或殺真菌劑處理以移除培植體的外部污染源，但均會導致培植體的存活率低，並且根莖部位多因內生菌污染，而不易建立其無菌培養環境，需伴隨抗生素的使用（Kritzinger et al., 1998）。Kritzinger等人（1998）提出若先除去白花海芋根莖外皮，再以自來水沖洗1小時後，以殺真菌劑及抗生素共同預處理根莖培植體至少24小時，接續以70%酒精處理5分鐘，再浸泡至2% NaOCl 約5分鐘後，以無菌水沖洗三次，可控制其污染率。本研究利用5% H₂O₂處理白花海芋根莖培植體5分鐘後，經無菌水洗淨，接續1% NaOCl消毒15分鐘，可降低瓶內污染率，控制在35%（Table 1）。不同植物對於培養基的基本需求均有所差異，為篩選出適合白花海芋根莖芽體發育的適合基本培養基條件，本研究以半量、全量或二倍MS無機鹽類組合3%或6%蔗糖的培養基進行試驗。觀察到白花海芋根莖芽體培養於全量MS無機鹽類組合3%或6%蔗糖的培養基中，芽體發育情形顯著較佳（Table 2）。

本研究中，切取帶主芽的白花海芋根莖培植體培養於含0、1 mg l⁻¹ 2,4-D組合0、0.5、1 mg l⁻¹ BAP的MS基本培養基中，觀察添加1 mg l⁻¹ 2,4-D可顯著促進芽體的生長（Fig. 1）及根形成的數目（Fig. 2），切取其芽基盤培養於MS基本培養基中，可達3.5倍的芽體增殖率，分切後均可發育為完整植株（Fig. 3）。Ebrahim（2004）利用白色海芋的根莖芽經BA及kinetin二階段培養，可促進芽體增殖，後續在生長抑制劑Na-dikegulac及高濃度的蔗糖（60 g l⁻¹）下可促進芽體形成根莖，且根莖發芽後可成功培育出健康種苗，然而，根莖具有發育潛力的芽體數目有限，其繁殖倍率亦受限。從組培苗生產種球到養成開花球，其間需兩個生長季，每一生長





季約需16~24週的時間，然而取得組織培養繁殖倍率與組培苗種球品質間的平衡是組培苗生產的關鍵性技術（莊等，2005；文，2001）。莊等人（2005）進行彩色海芋莖頂培養研究，生產組織培養苗，觀察到發根苗的苗高、苗鮮重及苗根指數對其後續養球階段球徑大小呈正相關性。亦有報告指出利用BA或TDZ可誘導彩色海芋（*Z. albomaculata* ‘Black Magic’）的莖頂形成叢生芽，增殖倍率約3.2~3.8倍（Chang, 2003）。

彩色海芋（*Zantedeschia hybrid*）塊莖經BAP及NAA誘導可經由直接體胚發生形成體胚，接續在 1 mg l^{-1} 6-s-s-(dimethylallylamino)-purine (2iP)條件下可發育為小植株（Duquenne et al., 2006），然而並未清楚說明體胚轉化的成功率。本研究中，切取白花海芋根莖含形成層的組織，培養於含2,4-D組合3%或6%蔗糖的培養基中，均可誘導鬆散狀、白色或乳黃色的癒傷組織形成，其中培養於添加 1 mg l^{-1} 2,4-D 組合6% sucrose的MS基本培養基中，可形成結構完整的體胚，體胚誘導率為33%（Fig. 4），後續移至不添加植物生長調節劑或添加 1 mg l^{-1} TDZ的MS基本培養基中，目前持續觀察體胚發育情形。芋頭（*Colocasia esulenta* var. *esculenta*）與海芋同屬為天南星科植物，Deo等人（2009）將芋球莖切片經外加 2 mg l^{-1} 2,4-D培養20天接續 1 mg l^{-1} TDZ二階段式培養後，可誘導緊實、乳黃色的胚性癒傷組織形成，後續移至不添加植物生長調節劑的1/2 MS基本培養基中，可促進體胚形成，約有72%體胚可發育為健康小植株（Deo et al., 2009）。目前已建立白花海芋芽體器官發生途徑並誘導體胚形成，本計畫將接續探討促進試管內根莖種球形成的條件，未來將可開發試管內植株再生途徑以生產健康種苗及種球，並可作為基因轉殖的平台，以利分子育種的研究。





六、結論：

1. 白花海芋經由根莖芽基盤誘導芽體增殖的方式可獲得健康的種苗，本研究將繼續探討影響白花海芋試管內根莖種球形成的關鍵因素，培育發育一致性的健康種球，未來將可透過自動化量化及養球模式，建立健康種球供應體系，以減輕產業上連作障礙及病害的問題，並擴充運用到其它球根花卉生產，以推動精緻農業，促進產業昇級。
2. 細菌性軟腐病是影響全球海芋產業發展的主要限制因素，配合國科會研究計畫 NSC101-2313-B-034-001 『海芋抗細菌性軟腐病機制之功能性基因研究』，篩選可能影響白花海芋抗軟腐病危害的關鍵基因，應用本研究建立的白花海芋試管內植株再生途徑，探討海芋與病原菌在生物性防禦機制上的交互關係，以了解其分子作用機制，可為未來改良球根花卉增加生物性逆境抗性的重要參考指標。





七、參考文獻：

1. 文紀鑾. 2001. 彩色海芋組培苗大量繁殖技術. 農政與農情 106: 85-88.
2. 何陽修、劉明宗、陳駿季、沈再發. 2000. 海芋. 實用花卉栽培技術專輯 (三) pp. 29-63.
3. 莊淑貞、陳駿季、廖玉珠、王小華、張義弘、陳宗禮、宋濟民. 2005. 彩色海芋組培苗生長勢與品質評估之研究. 中國園藝 51: 249-258.
4. Chang, H. S., D. Chakrabarty., E. J. Hahn., and K. Y. Paek. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via in vitro shoot tip proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: 129-134.
5. Deo, P.C., R.M. Harding, M. Taylor, A. P. Tyagi, and D. K. Becker. 2009. Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 99:61-71.
6. Duquenne, B., T. Eeckhaut, S. Werbrouck, and J. Van Huylenbroeck. 2006. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zantedeschia* hybrids. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 87: 329-331.
7. Ebrahim, M. K. H. 2004. Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of in vitro cultured calla explants. Science Horticulturæ 101: 305-313.
8. Kritzinger, E. M., R. J. V. Vuuren, B. Woodward, I. H. Rong, M. H. Spreeth, and M. M. Slabbert. 1998.





Table 1. The effect of H₂O₂ on sterilization of rhizome explants of *Zantedeschia aethiopica* L.

H ₂ O ₂ concentration	Contamination
0	73%
0.5	100%
1	78%
5	35%
10	60%

Fifteen to twenty replicates were taken for each treatment and data were scored after 5 weeks of culture. Contamination percentage was calculated with number of contaminated explants divided by total number of explants.





Table 2. Effect of MS salt and sucrose level on shoot growth of *Zantedeschia aethiopica* L. after culture of four weeks.

MS	Sucrose (g l ⁻¹)	Shoot growth (%)	Shoot length (cm)	Expansion (%)	Etiolation (%)
Half	30	100	0.61 ± 0.22 ^{ab}	50	0
	60	100	0.82 ± 0.56 ^{ab}	30	0
Full	30	100	0.81 ± 0.48 ^{ab}	50	10
	60	100	0.94 ± 0.32 ^a	20	0
Double	30	100	0.57 ± 0.28 ^b	11	44
	60	100	0.64 ± 0.25 ^{ab}	25	44

The indicated letter is not significantly different at $P < 0.05$ according to LSD. There was more than 6 replicates in each treatment.



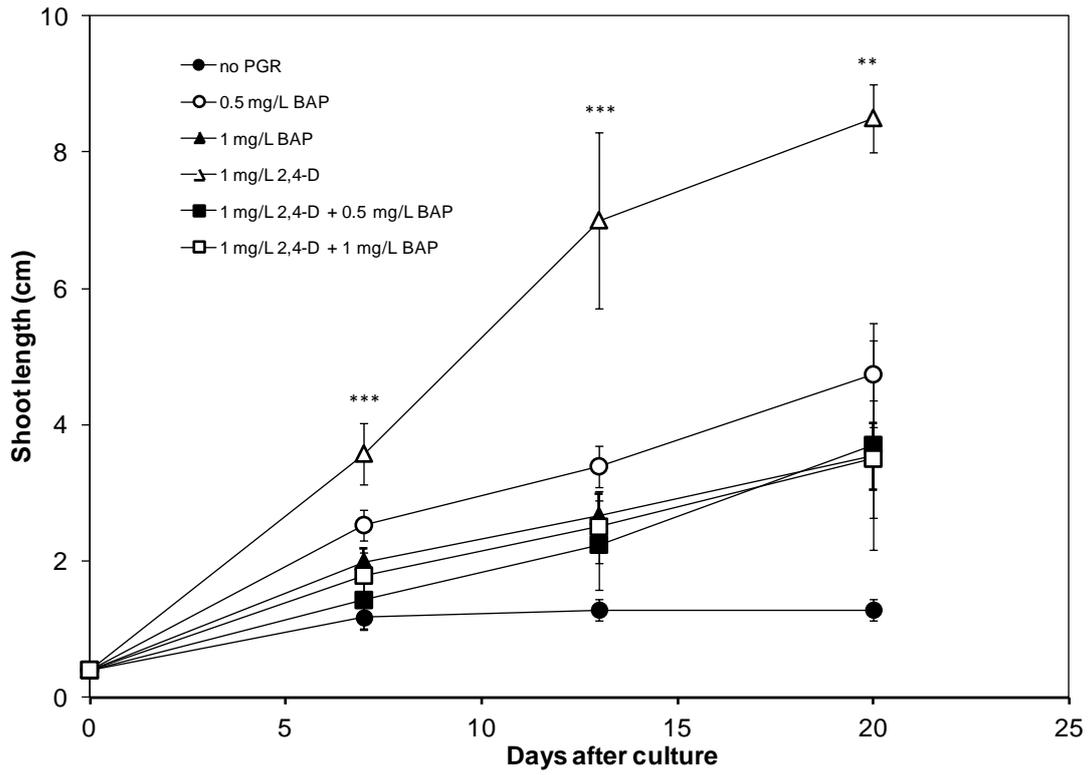


Fig. 1 Effect of BAP combined 2,4-D on shoot growth in *Zantedeschia aethiopica* L.



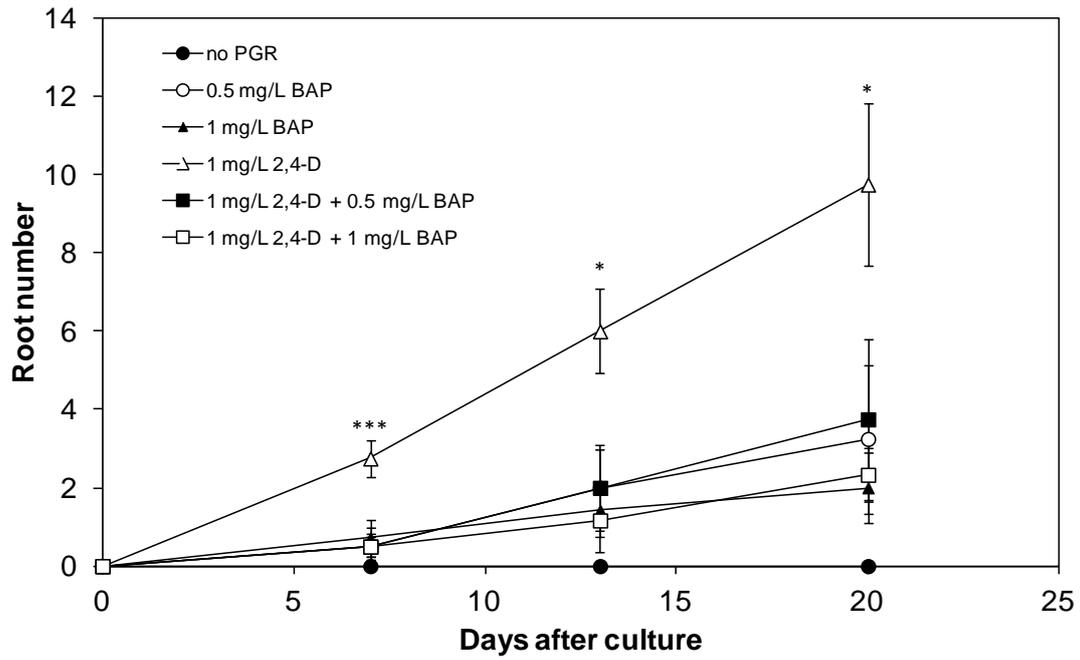


Fig. 2 Effect of BAP combined 2,4-D on root formation of shoot in *Zantedeschia aethiopica* L.





In vitro organogenesis and somatic embryogenesis in *Zantedeschia aethiopica*

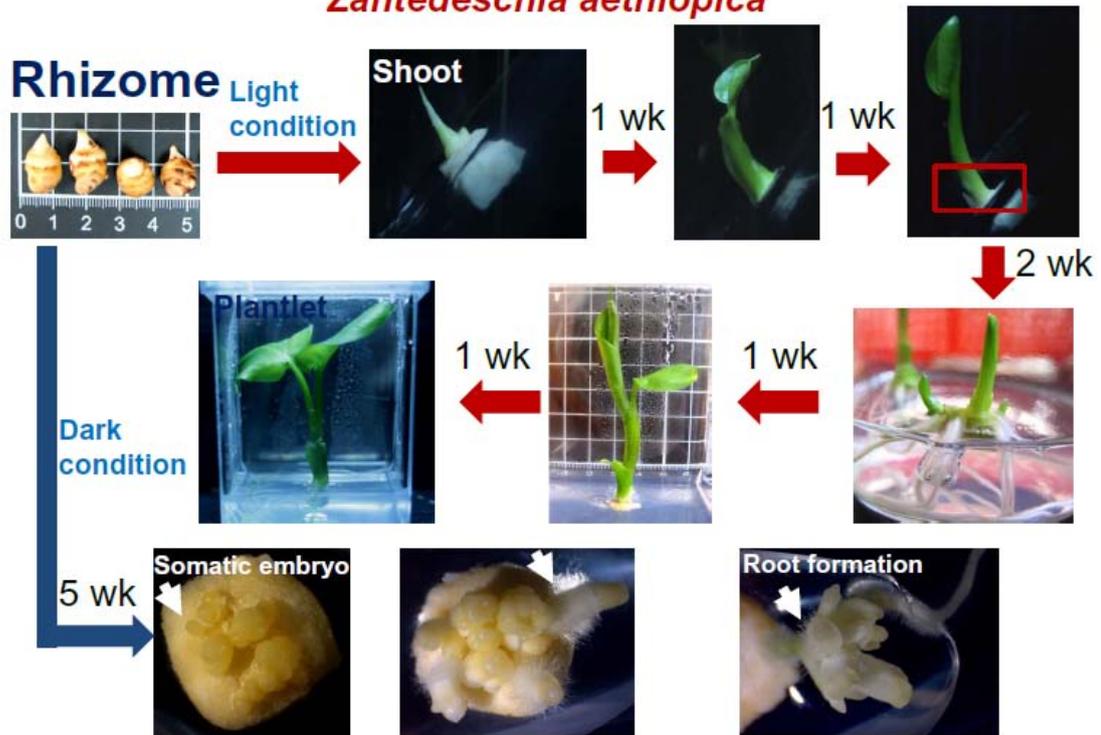


Fig. 3 *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis in *Zantedeschia aethiopica* L.



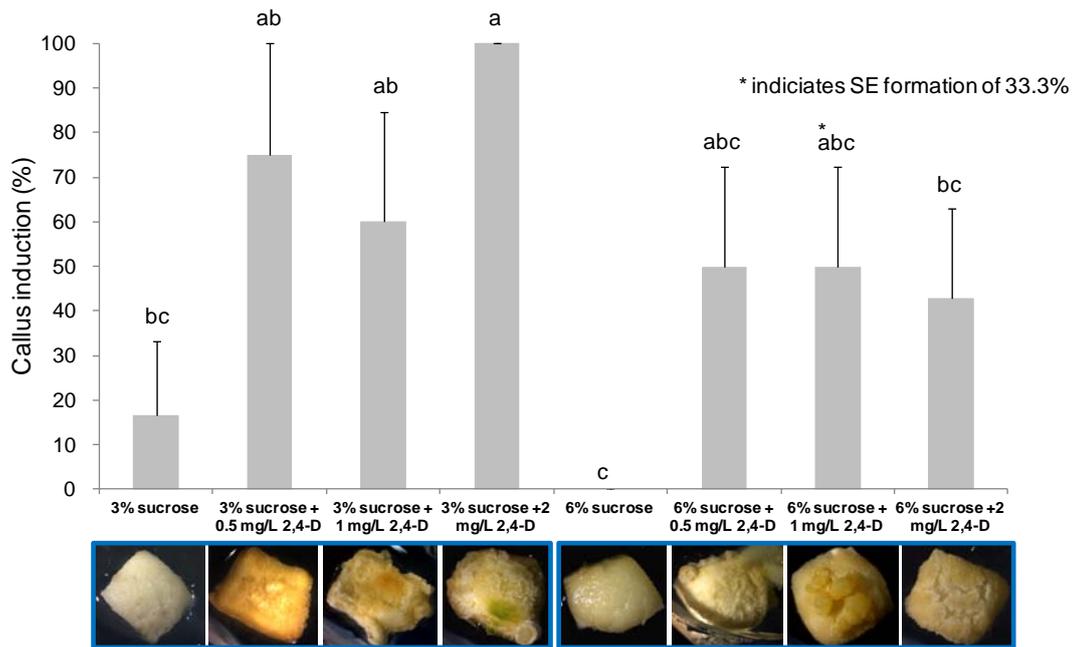


Fig. 4 Effect of different concentrations of 2,4-D combined with sucrose on callus induction and somatic embryo formation in *Zantedeschia aethiopica* L.

