



公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：090101Z209

行政院農業委員會農糧署102年度科技計畫研究報告

計畫名稱：海芋健康種球量產技術之開發 (第1年/全程2年)
(英文名稱) Development on healthy rhizome bulb
production of *Zantedeschia aethiopica*

計畫編號：102農科-9.1.1-糧-Z2(9)

全程計畫期間：自 102年1月1日 至 103年12月31日

本年計畫期間：自 102年1月1日 至 102年12月31日

計畫主持人：陳麗如
研究人員：熊同銓、黃子彬
執行機關：中國文化大學



1022090



一、執行成果中文摘要：

海芋是陽明山國家公園重要的經濟球根花卉作物，因此建立海芋健康種球量產技術，是海芋產業永續發展的重要課題。在White calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L.) 芽體量化試驗中，已建立芽體增殖及發育二階段的芽體量化流程，以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，在TDZ及BAP的組合培養基中，篩選出含 0.5 mg L^{-1} TDZ及 0.5 mg L^{-1} BAP的MS基本培養基為最佳的芽體增殖培養基，期間經光照培養4周後，平均可達5 倍的芽體增殖倍率，接續分切芽體繼代培養於MS基本培養基，光照培養4周，芽體發育後再重覆分切出芽基盤進行芽體增殖。而在2,4-D與BAP組合對White calla lily 芽體生長影響的試驗中，篩選出 1 mg L^{-1} 2,4-D可顯著促進芽體生長及根形成數，莖頂培植體經20天光照培養後，平均芽長達8.5 cm，平均根數為9.75。前人研究指出茉莉酸透過影響細胞分裂及生長可調控種球形成，因此經建立White calla lily 芽基盤芽體增殖及發育培養流程後，現正接續探討蔗糖和茉莉酸處理對根莖種球形成的影響。

二、執行成果英文摘要：

White calla lily (*Zantedeschia aethiopica* L.) is an important economic flower crop in Yang-Ming-Shan National Park. For sustainable development of calla lily industry, we plan to develop the production of healthy rhizome bulb in this two-year plan. In the first year we have established a two-stage process of shoot proliferation in white calla lily including shoot formation and development. Shoot disc without meristem was used to induce shoot formation on MS basal medium containing TDZ and BAP in the light. A five-fold increase in number of shoots was observed in the combination of 0.5 mg L^{-1} TDZ and 0.5 mg L^{-1} BAP after 4 weeks of culture. Then shoots were separated individually and cultured on MS basal medium for shoot development in the light. After 4 weeks of shoot development, shoot disc can be cut off for next two-stage shoot proliferation. The combinations of 2,4-D and BAP were used to evaluate the effects on the shoot growth. After 20 days of culture, 1 mg L^{-1} 2,4-D only was observed to stimulate shoot growth and root formation with an average shoot length of 8.5 cm and root number of 9.75. Jasmonic acid was reported to control bulb and tuber formation mediated by cell division and expansion. We continue to develop mass production system of healthy bulblet formation of white calla lily. The combination of different concentrations of sucrose and jasmonic acid will be used to find out a suitable condition for bulblet development.





三、計畫目的：

1.

白花海芋陽明山竹子湖地區最具發展優勢的球根花卉作物，栽培迄今已有40-50年的歷史。目前在竹子湖栽培的海芋品種約有3-5個品系，結合休閒觀光農業的發展，每年於3~4月海芋花季活動期間，帶動相關休閒產業收益逾1億元，實質推動地區性產業發展。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。細菌性軟腐病尚無有效藥劑可以克服，現已知白花海芋較彩色海芋稍耐細菌性軟腐病，如何育成抗軟腐病之品種為海芋經濟栽培之重要關鍵因素（何等，2000）。近年來，當地農民又再度發現品種老化及氣候暖化的影響，造成軟腐病提前發生，產量銳減。為促進海芋產業的永續發展，維護農民收益，台北市農業發展基金補助計畫已將竹子湖海芋種苗更新及品種試驗計畫列為重要項目，更顯示海芋產業永續發展的重要性。品種改良現為海芋產業發展之重要課題，主要的育種目標為多元化的觀賞及生育性狀改良、育成抗細菌性軟腐病品種及克服節間（intersection）育種障礙。試管內植株再生途徑及根莖種球量產技術的建立有利於健康種球供應體系的發展，亦是海芋分子育種的平台基礎。

2.

前期研究計畫以白花海芋根莖芽基盤為培植體，直接經由芽體器官發生已成功建立試管內植株再生途徑。然而，根莖種球大小是影響海芋切花生產最重要的決定因素，一般開花球養成需時二年。因此，本二年期研究計畫將接續探討促進海芋根莖種球形成的關鍵因素及培養條件，建立健康根莖種球量產技術，提供給農民品種更新的來源，以減輕產業上連作障礙及病害的問題。在本年度目標中，包括（1）評估以白花海芋根莖芽基盤生產健康芽體的最適繼代周期及增殖倍率、（2）規模化生產白花海芋健康芽體，以收集足夠的植物材料進行養球及（3）評估液體或固體培養方式對白花海芋試管內芽體發育的影響。

四、重要工作項目及實施方法：

一、植物材料

以自加州Callifornia Callus公司進口之白花海芋（*Zantedeschia aethiopica* L. 'SW33-09'）種球為試驗材料。

二、無菌消毒條件

取白花海芋根莖帶芽小球，直徑約8 mm，芽高度小於2 mm，經自來水洗淨，以70%酒精表面消毒30秒，置入5 % H₂O₂溶液中，於無菌操作台內，手搖3-5分鐘，以無菌水清洗6次，每次3-5 min，接續再以1%次氯酸鈉溶液（含0.05% Tween 20）消毒15分鐘，再以無菌水清洗6次，每次3-5 min，進行後續培養。

三、基本培養基

基本培養基組成為MS無機鹽類（Murashige & Skoog basal salt mixture, *Phyto* Technology 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與 30 g l^{-1} sucrose，pH 5.8。液體培養容器為250 ml錐形瓶。固體培養基需加 2.8 g l^{-1} gelrite (Duchefa Biochimie Inc., Haarlem, Neth.)，pH 於gelrite 加入前調至5.8，培養容器為蘭花瓶，以殺菌釜 121°C 高溫殺菌15 min，凝固後使用。

四、白花海芋芽體量化及生長試驗

切取根莖芽基盤（直徑約8 mm）培養於MS基本培養基，光照培養使其發育為健康小苗，接續切取其根莖芽基盤（去除生長點）為培植體培養於含TDZ (0 、 0.5 、 1 mg L^{-1})及BAP (0 、 0.5 、 1 mg L^{-1})組合的MS基本培養基，觀察其芽體增殖情形。芽體接續繼代於含2,4-D(0 、 1 mg L^{-1})及BAP(0 、 0.5 、 1 mg L^{-1})組合的MS基本培養基，觀察其芽體生長情形。培養環境為 $25\pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度70%，光照培養，光源為40W 日光燈管 (FL30D/29, China electric MFG. Co., Taipei, Taiwan)，光強度 $13.5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，光週期16 hr，溫濕度設定為 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、70%RH。

五、白花海芋種苗大小與試管內形成根莖種球的關係試驗

將白花海芋種苗依主莖直徑區分為大、中、小，培養於 MS基本培養基中，光照培養，培養環境為 $25\pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度70%，觀察記錄根莖種球形成的情形。

六、白花海芋芽體形成根莖種球的條件試驗

將白花海芋芽體培養於含3、6或12% (w/v) sucrose組合 0 、 0.5 、 1 mg l^{-1} JA的 MS基本培養基中，以液體或固體培養方式，黑暗培養，培養環境為 $25\pm 1^\circ\text{C}$ ，相對濕度70%。

七、石蠟切片觀察

石蠟切片方法以蔡（2000）的方法為主，經部份修改，觀察組織細胞結構，其步驟依序如下：取約 $0.6\times 0.4\times 0.4 \text{ cm}^3$ 之材料，置於F.A.A固定液（福馬林：冰醋酸：70%酒精=5：5：90），固定30分鐘，真空抽出組織氣體，使樣品下沉為止，靜置4小時或隔夜；以70%酒精，每隔15分鐘清洗一次，共5次，用70%酒精清洗去除多餘F.A.A固定液，再置換70%酒精靜置4小時，再更換為95%酒精靜置24小時；接續經TBA系列脫水，由低濃度至高濃度，每步驟間隔1小時45分，將組織內水分排出；再經浸臘，將瓶內樣品放入烘箱，溫度維持恆溫 60°C ，分3次加入臘粒，直至t-butanol完全蒸發，再加入2次純蠟後包埋、切片及脫臘；切片前先準備塗佈黏著劑的載玻片，將載玻片用95%浸泡3分鐘，待乾後，塗上0.5% gelatin風乾，滴上數滴去離子水，再放入 $10 \mu\text{m}$ 蠟帶 (LEICA RM 2135型) 並鋪平，待水分乾後進行脫臘，將樣品放入xylene 浸泡30分鐘及各酒精濃度3分鐘系列溶臘，過程中分別用1% Safranin 及0.5% fast green 進行細胞組織染色，最後xylene 浸泡5分鐘，脫臘完乾燥後，蓋上蓋玻片，週邊用透明指甲油封片，並於光學顯微鏡 (Leica DM LB2 microscope, Leica, Germany) 下觀察及照相記錄。

五、結果與討論：

白色海芋是陽明山具經濟發展代表性的球根花卉作物，但相關的組培研究相當有限。相較於傳統分株或種子繁殖，組織培養技術已成為快速繁殖健康花卉種苗的





主流，Chang (2003) 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。Duquenne等人 (2006) 利用BAP及NAA誘導彩色海芋 (*Zantedeschia hybrid*) 塊莖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，然而並未清楚說明體胚轉化的成功率。行政院農業委員會種苗改良繁殖場已成功開發彩色海芋組織培養苗大量生產技術，利用去病毒技術配合機械自動化生產模式，降低生產成本，可在短期內大量生產健康無病毒瓶苗，年生產量60萬苗以上，供花農養球栽培切花或盆花之用 (文，2001)。在本期研究計畫中，已建立白花海芋 (*Zantedeschia aethiopica* L.) 芽體增殖及發育二階段的芽體量化流程。為篩選出芽體增殖培養基，以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，培養在含0、0.5、1 mg L^{-1} TDZ及0、0.5、1 mg L^{-1} BAP組合的MS基本培養基，光照培養，觀察到0.5 mg L^{-1} TDZ組合0.5 mg L^{-1} BAP的MS基本培養基對誘導形成的芽體生長較佳，培養3週後，平均誘導芽體數為3.4 (圖1)，而培養4週後，平均芽長可達6.3公分(圖2)。因此，以0.5 mg L^{-1} TDZ及0.5 mg L^{-1} BAP的MS基本培養基為主要的芽體增殖培養基。去除生長點的根莖芽基盤為切除全部環狀莖部的芽基盤，約5 mm厚，將其平均分切為上、下二部分，進一步觀察其芽體誘導的情形，在芽體增殖培養基中，經光照培養4周後，上部的芽基盤培植體平均可誘導5.8 個以上的芽體形成，下部的芽基盤培植體平均可誘導2.6個以上的芽體形成，接續分切芽體繼代培養於MS基本培養基，光照培養4周，芽體發育後再重覆分切芽基盤進行芽體增殖(圖3)。在探討2,4-D與BAP對白花海芋芽體生長影響的試驗中，觀察到1 mg L^{-1} 2,4-D可顯著促進芽體生長及根形成數，莖頂培植體 (長度約0.4 cm) 經20天光照培養後，平均芽長達8.5 cm (圖4)，平均根數為9.75 (圖5)。在評估液體或固體培養方式對白花海芋試管內根莖芽體發育影響的試驗中，以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，分別以固體培養(圖6A)及液體振盪培養(圖6B)方式，培養於含0.5 mg L^{-1} TDZ及0.5 mg L^{-1} BAP的MS基本培養基，經光照培養，觀察到經由液體振盪培養，轉速120 rpm，形成的芽體有白化及膨大的情形，因此接續以固體培養方式進行後續實驗。

雖已可建立海芋無菌苗的繁殖途徑，但種球形成是許多球根植物商業生產的關鍵。從彩色海芋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)。Chen等人 (2000) 將彩色海芋 (*Z. elliottiana* Spreng cv. Super Gold) 組培苗依芽直徑區分為大 (7-10 mm)、中 (4-7 mm)、小 (<4 mm)，發現7-10 mm的小植株只需1個生長季即可形成開花球。莊等人 (2005) 亦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。Jasmonic acid (JA)除參與植物的防禦機制外，經由刺激細胞分裂及促進細胞擴增，亦參與控制球根植物的種球形成。Santos和Salema (2000)以添加1 mg l^{-1} JA組合1 mg L^{-1} 2-ip或0.2 mg L^{-1} NAA的MS基本培養基培養水仙 (*Narcissus triandrus* L.) 芽體，可於試管內促進種球的形成，但在只單獨添加JA的條件下，直徑大於5 mm的種球形成數最高，平均數8.7個。以5 μM JA組合5 g





L⁻¹ sucrose可誘導50%的球根型地生蘭*Pterostylis sanguinea*幼苗形成種球 (Debeljak et al., 2002)。Kim等人 (2003) 將大蒜 (*Allium sativum* L. c.v. 'Danyang') 芽體培養於含2% sucrose及0.5 mg L⁻¹ 2-ip的MS基本培養基，以液體懸浮培養方式可提高芽體增殖率，後續將芽體培養於含11% sucrose、0.1 mg L⁻¹ NAA及10 μM JA的MS基本培養基，液體培養9周後，平均每個芽體可形成135個小種球。利用生長抑制劑CCC、B-9或ABA處理亦可促進大蒜種球的形成及生長，暗培養也有促進的效果 (Kim et al., 2003)。細菌性軟腐病是海芋栽培的主要限制因子，目前尚無有效藥劑可以克服，Yip等人 (2007) 利用農桿菌轉殖法，將攜帶甜椒 ferredoxin-like protein gene (pflp) 的農桿菌C58C1與彩色海芋根莖芽基盤 (shoot basal discs) 共感染，成功獲得抗*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 細菌性軟腐病的彩色海芋植株，此為利用基因改良技術來增進海芋品質的成功例子。JA是重要的植物荷爾蒙，除了促種種球形成外，其透過調控防禦基因的表現亦參與植物與病原菌的交互關係及植物對環境逆境的反應。Luzzatto 等人 (2007) 於白色海芋葉片感染軟腐病菌*Pectobacterium carotovorum* 24 h後，葉噴施用10 mM methyl jasmonate可長效性地完全抑制病原菌發展，可能是經由jasmonate/ethylene訊息傳導途徑引發海芋對病原菌的防禦機制 (Luzzatto et al., 2007)。現已透過二階段的芽體量化流程，量化1000個以上的海芋芽體/瓶苗，接續正進行不同濃度的蔗糖及JA組合對試管內根莖種球形成的探討。

六、結論：

在第一年期計畫中已建立二階段的芽體量化流程，包括芽體增殖及發育，現將繼續探討蔗糖及茉莉酸是否為影響白花海芋試管內根莖種球形成的關鍵因素。細菌性軟腐病是影響全球海芋產業發展的主要限制因素，在國科會研究計畫NSC101-2313-B-034-001『海芋抗細菌性軟腐病機制之功能性基因研究』中，觀察到噴施10 mM茉莉酸可增進白色海芋葉圓片對*E. carotovora* subsp. *carotovora*的抗性，顯著降低軟腐病菌的感染率至5.6%。因此，在探討茉莉酸是否可促進海芋試管內根莖種球形成外，亦可能增加其對病原菌的防禦能力。本研究將繼續探討JA及sucrose對白花海芋根莖種球形成的影響，找出促進根莖種球形成的關鍵因素以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，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。

本研究承行政院農業委員會102農科-9.1.1-糧-Z2(9)計畫經費的支持，謹此致謝。

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. 蔡淑華. 2000. 植物組織切片技術綱要. 台北茂昌圖書, 72pp.
5. 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.
6. Chen, J.J., M.C. Liu and Y.H. Ho. 2000. Size of in vitro plantlets affects subsequent tuber production of acclimated calla lily. *HortScience* 35(2): 290-292.
7. Debeljak, N., M. Regvar., K.W. Dixon and K. Sivasithamparam. 2002. Induction of tuberisation in vitro with jasmonic acid and sucrose in an Australian terrestrial orchid, *Pterostylis sanguine*. *Plant Growth Regulation* 36: 253-260.
8. 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.
9. Kim, E.K., E.J. Hahn, H.N. Murthy and K.Y. Paek. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 73: 231-236.
10. Luzzatto, T., M. Yishay, A. Lipsky, A. Ion, E. Belausov, and I. Yedidia. 2007. Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in calla lily provided by the plant activator methyl jasmonate. *Plant Pathol.* 56: 692-701.
11. Santos, I. and R. Salema. 2000. Promotion by jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. *Plant Growth Regul.* 30: 133-138.
12. Yip M.K., H.E. Huang, M.J. Ger, S.H. Chiu, Y.C. Tsai, C.I. Lin and T.Y. Feng. 2007. Production of soft rot resistant calla lily by expressing a ferredoxin-like protein gene (pflp) in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 26: 449-457.



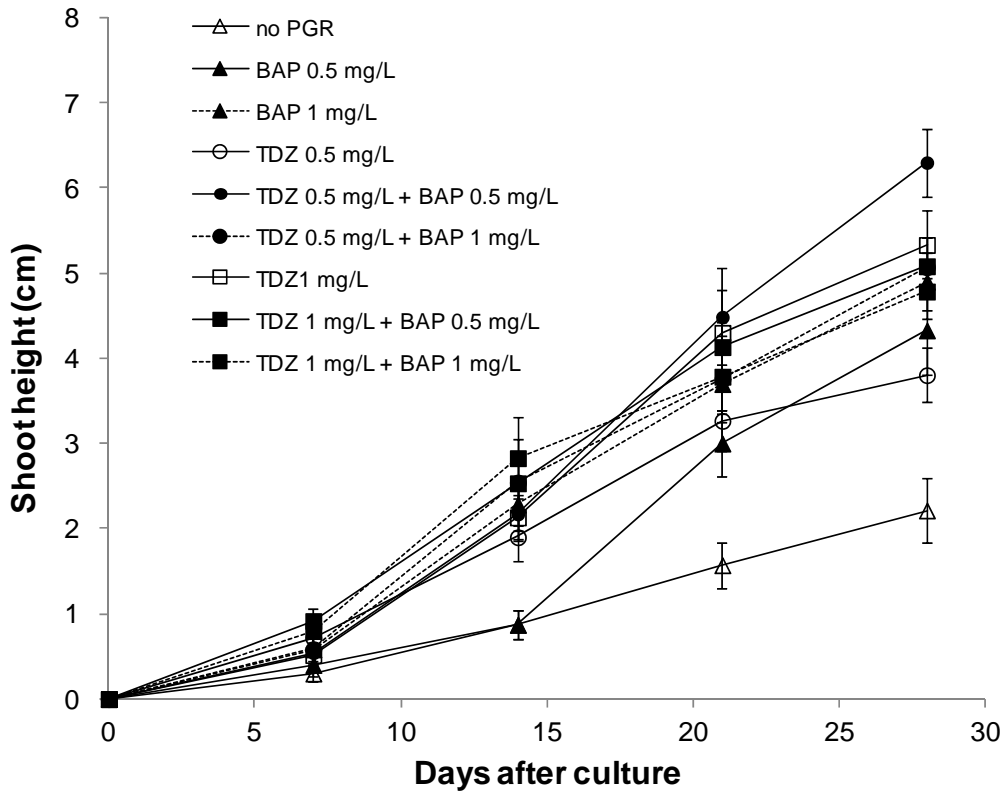


圖 1. TDZ 及 BAP 對白花海芋根莖芽基盤誘導形成的芽體生長影響。以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，培養在含 0、0.5、1 mg L⁻¹ TDZ 及 0、0.5、1mg L⁻¹ BAP 組合的 MS 基本培養基，光照培養，觀察其芽體生長的情形。



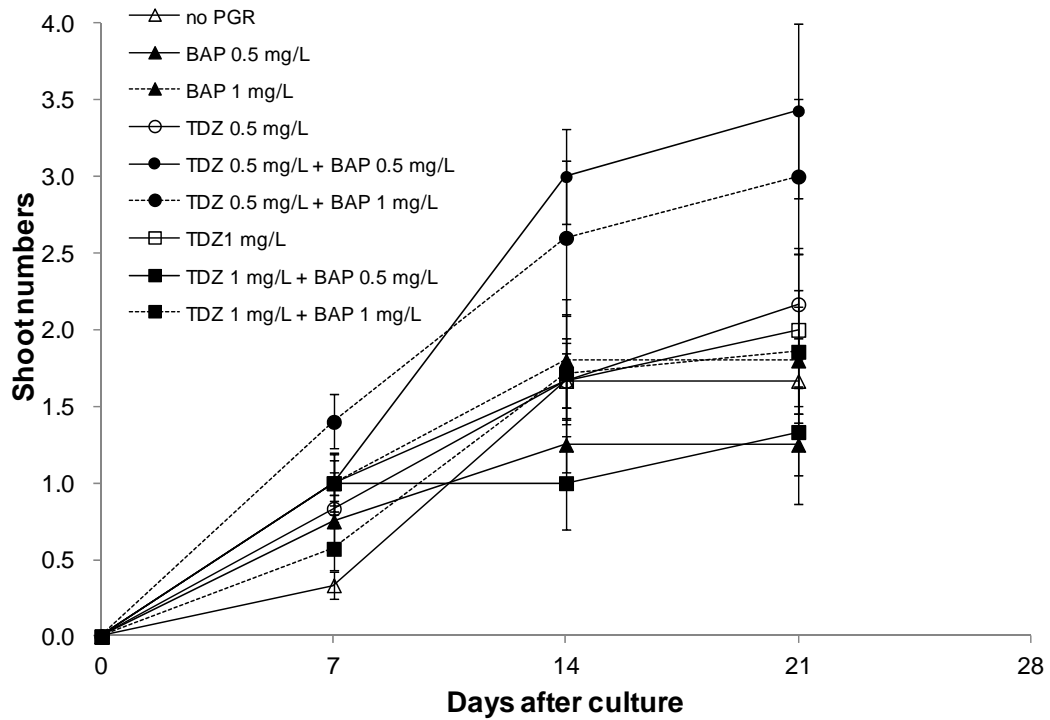
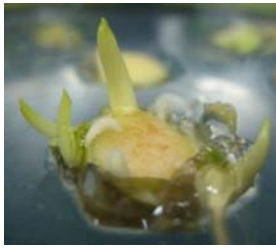


圖 2. TDZ 及 BAP 對白花海芋根莖芽基盤誘導形成的芽體數目影響。以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，培養在含 0、0.5、1 mg L⁻¹ TDZ 及 0、0.5、1mg L⁻¹ BAP 組合的 MS 基本培養基，光照培養，觀察其芽體增殖的情形。





Shoot proliferation in MS basal medium containing 0.5 mg/L TDZ and 0.5 mg/L BAP



4 wk



4 wk

Subculture of shoots in MS basal medium

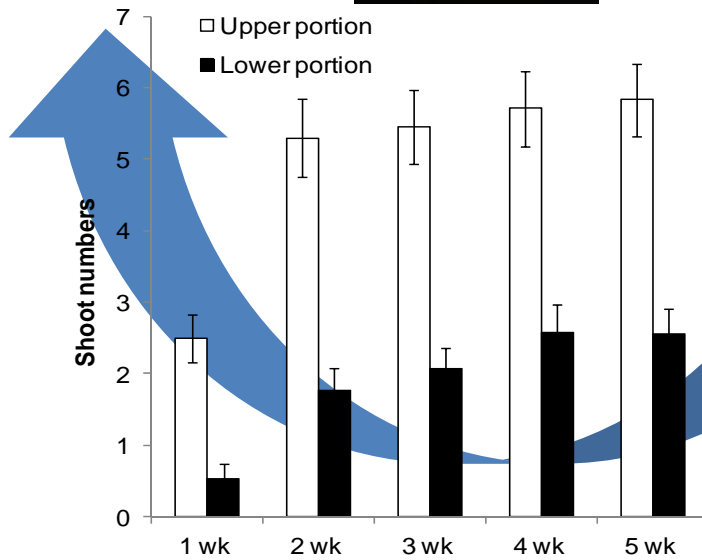


圖 3. 白花海芋芽體形成及發育二階段的芽體量化流程。以根莖芽基盤誘導形成的無菌苗為植物材料，進行第二次芽體增殖試驗，切取去除生長點的根莖芽基盤分為上、下二部分，培養在含 0.5 mg L^{-1} TDZ 及 0.5 mg L^{-1} BAP 的 MS 基本培養基，光照培養，觀察其芽體形成的情形。接續分切芽體繼代培養於 MS 基本培養基，光照培養 4 周，芽體發育後再重覆分切芽基盤接續下一流程。



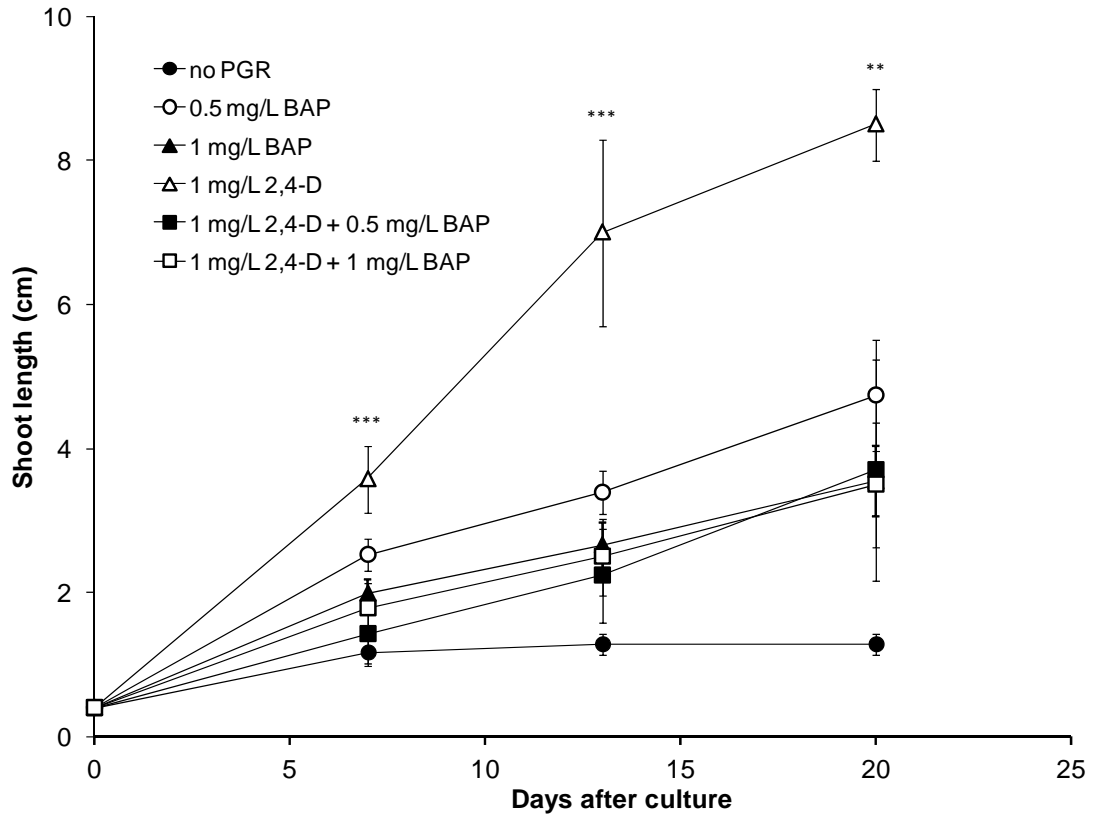


圖 4. 2,4-D 與 BAP 對白花海芋芽體發育-芽長的影響。白花海芋莖頂培植體 (長度約 0.4 cm) 在不同濃度的 2,4-D 及 BAP 組合下，經光照培養，觀察其芽體發育情形。



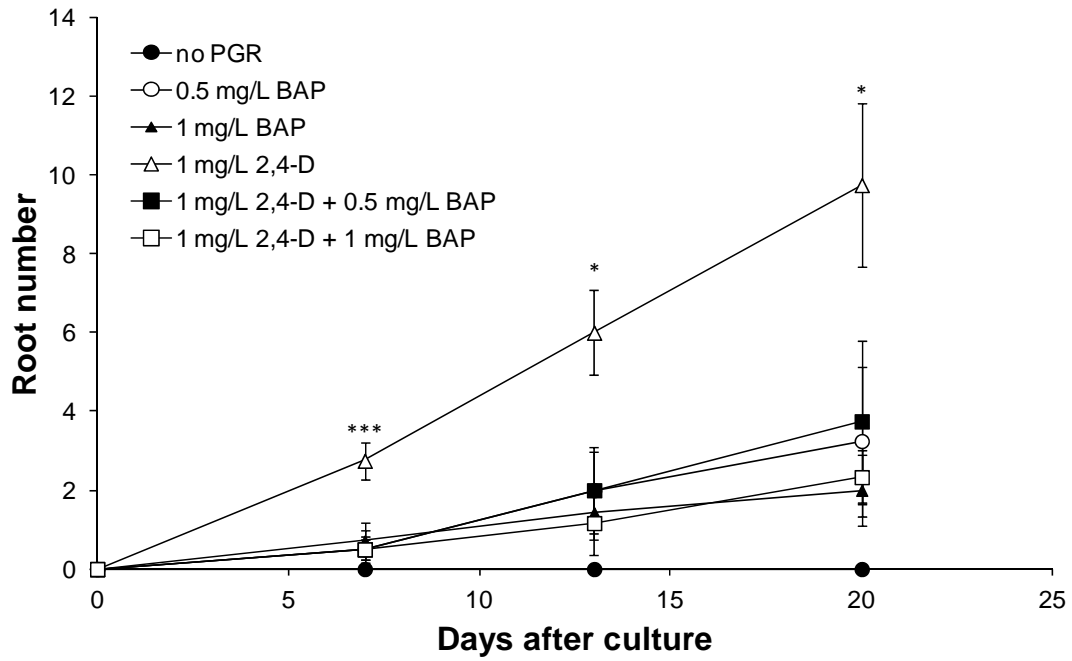


圖 5. 2,4-D 與 BAP 對白花海芋芽體發育-根數的影響。白花海芋莖頂培植體 (長度約 0.4 cm) 在不同濃度的 2,4-D 及 BAP 組合下，經光照培養，觀察其芽體發育情形。





圖 6. 評估液體或固體培養方式對白花海芋試管內根莖芽體發育的影響。以去除生長點的根莖芽基盤為培植體，分別以固體培養(A)及液體振盪培養(B)方式，培養於含 0.5 mg L^{-1} TDZ 及 0.5 mg L^{-1} BAP 的 MS 基本培養基，經光照培養，觀察其芽體發育情形。

