



竹類組織培養

吳馥卉、徐振權、廖德智、林崇熙
中央研究院農業生物技術研究中心

一、前言

竹的繁殖方法多以分株及高壓為主，但其獲得再生植株的效率較差。因利用組織培養方法繁殖竹苗，可供給無病毒健康苗株，並且建立再生系統以利後續的研究，目前許多學者皆進行相關的研究。現今所建立的組織培養系統有微體繁殖、體胚再生及器官再生等。成功的品種以叢生型竹種為主，如麻竹及綠竹。但在組織培養的過程中容易造成白化及矮化等突變現象。如何減少繼代的次數及對突變體的偵測是未來發展的方向。

目前台灣地區竹林面積約152,300公頃，佔林地面積的7.2%(行政院農業委員會林務局年報，2004)。竹為單子葉植物，因莖節中空酷似蘆葦且花序與禾草相似，故歸屬於禾本科(Gramineae)。另竹稈木質化，葉片基部收縮成葉柄狀，葉片與葉鞘間有節，老化後兩者分離等特徵與禾草不同，因此將竹類歸屬於禾本科中的竹亞科(Subfamily Bambusoideae, 呂，2001)，亦有將竹類獨立為竹科(Bambusaceae, 張，1996)。全世界竹類約有65屬、1,200多種，除了歐洲地區之外，亞、非、美、澳等四大洲都有竹的自然分布(呂，2001)。

竹類的自然分布自熱帶、亞熱帶到溫帶，最北達北緯46°、最南到南緯47°；南北回歸線之間為竹類分布最多的地帶，但主要的產地仍為溼潤的熱帶地區、赤道兩旁到南北迴歸線範圍尤多。通常竹類混生於闊葉林或針葉林中，自成優勢種純林，自平地迄高山，垂直分布可達4,200公尺(葉，2000)。台灣有北回歸線貫穿，高溫多濕，正好適合竹類生育，不僅有熱帶型的叢生竹類，也有溫帶型的散生竹類，共計有20屬85種(呂，2001)。

竹類的生命週期中甚少開花，有性繁殖的成功率低，即使開花相當繁盛卻不一定能夠結實，推測可能具有自交不親和性，所以難有種子有性繁殖，因此竹苗多為營養繁殖(呂，2001)。由於竹類地下莖及竹稈皆有生長年限(即該器官的壽命)，因此，為了竹林建造及更新林園，必須不斷供給竹苗(呂，2001)。

二、竹的組織培養

雖然現在的竹類栽培已經從傳統的分株法，改進為可分出最多竹苗的高壓法繁殖，但是一棵母竹一年能獲得的竹苗有限。以麻竹及綠竹為例，病害危害較嚴重的竹類嵌紋病(又稱為褐條病)，

是由竹類嵌紋病毒(Bamboo mosaic virus, BaMV)所引起，常與萎凋病複合發生，使竹林受害更為嚴重。本病是因病毒所引起的系統性病害，因此蔓延相當迅速(張，1996)。竹叢一旦罹患本病，竹筍產量銳減，同時竹筍肉質木質化、組織堅硬無法食用，不但竹筍無法銷售，亦無法培養良好竹材，致使竹林趨於衰敗(呂，2001)。BaMV屬於馬鈴薯X病毒屬(potexvirus, Lin and Hsu, 1994)，主要藉由機械傳播，因此若農具接觸到病株或枝葉相互摩擦，即有可能將病毒傳染給健康株，又因BaMV為系統性病害，一旦有一株罹病，就會藉由地下莖傳遍整個竹叢(張，1996；鄭和葉，2002)。這種病害亦會以傳統無性繁殖傳播，所以開發一個高效率的無病毒健康苗繁殖方法非常重要。

目前竹類組織培養已有多篇文獻(梁，1996；林，1998；Yeh and Chang, 1986；Hirimburegama and Gamage, 1995；Arya et al., 1999)，多種竹類可藉體胚再生及芽體微體繁殖獲得大量植株以供造林及食用竹園之用。藉由核酸探針法檢測BaMV感染與否並利用頂端分生組織技術可建立無病毒竹苗以供給健康苗株(Hsu et al., 2000)。

以下為不同的繁殖方式進行介紹：

(一)微體繁殖

從1984年起，竹類研究學者就使用種子為培植體進行微體繁殖的研究(Nadgir et al., 1984)。許多學者也陸續將這個方法利用在其他的竹種上(Nadgauda et al., 1990；Saxena, 1990；Chambers et al., 1991；Prutpongse and Gavinlertvatana, 1992)。但以成熟枝條為繁殖材料進行繼代時卻有芽體增殖倍率低及不易發根的問題。張唯勤教授實驗室利用棉花除葉劑—thidiazuron (TDZ, Arndt et al., 1976)建立高效率烏腳綠竹芽體增殖的微體繁殖體系(Lin and Chang 1998, 圖1)。但這個培養系統並不能利用在重要的蔬菜作物—綠竹

(*Bambusa oldhamii*)上。在綠竹微體繁殖枝條會發生木質化而造成增殖倍率低的問題。利用液體培養的方式我們建立了綠竹無病毒苗的微體繁殖系統(Lin et al., 2007)。首先我們對於培植體母竹進行病毒的檢測，以無病毒母竹的側芽頂為材料，放置於含有 $0.45 \mu\text{M}$ thidiazuron (TDZ)的MS固體培養基來誘導叢生芽體。但在芽體增殖時則靜置於液體培養基，其增殖倍率及植物生長情形明顯較置於固體培養基佳。培養基中的cytokinin對於芽體增殖非常重要，尤其在長時間的培養中，TDZ是一個較穩定及有效的cytokinin。這些叢生芽在含有 $10.74\text{--}26.85 \mu\text{M}$ α -naphthaleneacetic acid (NAA)的培養基中培養一個月可以有83%的發根率，且發根的植株移植到田間後有很好的生長勢。相對於高壓苗有較佳的生長並在15個月內可以產筍。但由於母竹有開花的現象，所以子代皆有開花的現象。

(二)體胚再生

體胚再生被認為是由單一細胞再生所得，所以廣泛被利用在基因轉殖上。部份竹的體胚再生系統在25年前已建立，但所使用的培植體是利用生殖器官，而竹的不易開花使其利用性降低。所以如何利用營養器官做為培植體材料一直是竹類體胚再生的重要課題。近來本實驗室發展了一個方法，先利用營養芽為材料建立微體繁殖系統，再以試管內枝條為培植體進行體胚再生。我們利用試管內包括節及節間部份的叢生芽，將其培養在含有 $9.2 \mu\text{M}$ kinetin (KN), $13.6 \mu\text{M}$ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.1% (v/v) 椰子水及6% (w/v) 蔗糖的MS培養基中。經過修正培養基的成份後，我們改善其培植體褐化的問題。我們以 $0.046 \mu\text{M}$ TDZ取代 $9.2 \mu\text{M}$ kinetin並降低蔗糖的濃度至3% (w/v)讓褐化情形獲得很大的改善。另一方面，TDZ也可以促進竹體胚的發芽，在含有 $0.455 \mu\text{M}$ TDZ的培養基中，其發芽率達

80%以上。另嘗試用NAA進行培養，則產生負面的結果。這些再生植株如同微體培養的植株一樣，可以成功的移植到田間並獲得良好的生長勢。有趣的是，由於之前所選擇的培植體是試管內正常發育的材料，並不像以田間材料作為培植體時會有白化苗的產生，但是仍有少部份的再生植株會有試管內及移植後開花的情形。

(三)花序增殖

在試管內，我們可以依照我們的需求進行植物不同器官的培養及繁殖。如枝條、根及癒傷組織等。但花及果實等生殖器官並不能在組織培養中繁殖。大多數的多年生植物需要經過幼年期(營養期)才能具有開花的能力，不同的植物因其幼年期的長度有所不同。而竹的幼年期約在30到60年之間。在我們實驗室中，我們開發了一個繁殖系統可以使烏腳綠竹及人參的生殖器官花序無需經過營養生長即可在試管內增殖(Lin et al. 2003)。烏腳綠竹的試管內花序培養在含有MS及 $0.046 \mu\text{M}$ TDZ的培養基中可以達到增殖的效果。除了正常的花序可以增殖，白化突變種的花序亦可在相同的培養基中培養。

三、組織培養中突變體的發生

竹類在組織培養繼代過程中易出現白化苗。之前組織培養中白化苗成因的研究均以花藥培養之體系為材料。諸如Day and Ellis (1984) 在小麥小孢子體組培之白化苗材料，以限制酶酶切片斷及比對白化苗的cDNA片段研究推論:葉綠體中因其基因組為環狀且具有兩個序列相同、方向相反的inverted repeat區域，所以在葉綠體基因組複製及重組互換的過程中遺失部分基因組片段進而造成基因缺失，導致葉綠體無法正常發育的白化苗。在烏腳綠竹微體繁殖過程中，我

們分離了兩個白化苗品種: ab1及ab2。利用穿透式電子顯微鏡觀察發現其葉綠體皆發育異常，且這些現象並不能因為培養環境的改變而獲得回復。為能了解其葉綠體基因組的完整性及其突變的機制，我們設計了20對葉綠體基因組基因的引子以進行基因組及反轉錄的聚合酶連鎖反應(genomic PCR and RT-PCR)。觀察到只有NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4L (ndhE)及ribosomal protein S7 (rps7)是在兩個突變種及野生種中具有保留性並且未發生改變。其他的基因在不同的突變種有不同的情形。在ab1有10個基因而ab2有11個基因發生缺失。而photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 (psaA), NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 4 (ndhD), chloroplast 50S ribosomal protein L14 (rpl14), 及ATP synthase beta chain (atpB)在兩個突變種中皆有缺失的現象。在基因表現方面，有17個基因與其genome重覆數的情形相同，但有3個基因30S ribosomal protein S2 (rps2), ATP synthase CF0 A chain (atpI),及ribosomal protein S19 (rps19)與預期的不同。所以我們認為，這些白化苗的產生是由於葉綠體基因組的缺失所造成的(Liu et al.

四、結論

利用莖頂培養，我們可以建立綠竹及烏腳綠竹的微體繁殖系統。利用這些試管內的材料，可以建立體胚再生及花序繁殖等系統而解決因生殖器官材料不易取得所造成的困擾。在繁殖的過程中，隨著繼代的過程會有白化苗突變種的發生。如能了解其發生的機制，則可以利用簡單的PCR方式進行檢測。



圖1.田間烏腳綠竹側芽微體繁殖過程中試管内培植體之形態發生及幼苗的發育

- 1-1.田間植株之側芽莖頂在含有TDZ的培養基中形成叢生芽(bar = 5 mm)。
- 1-2.綠色叢生芽在含有TDZ的培養基中大量增殖(bar = 5 mm)。
- 1-3.在繼代的過程中形成白化苗(bar = 5 mm)。
- 1-4.從圖1-3得來之白化苗可以在相同的培養基中繼代增殖(bar = 1 cm)。
- 1-5.試管内枝條在含有TDZ及 2,4D的培養基中形成不定根，並可發育成可移出成活之植株(bar = 1 mm)。
- 1-6.枝條在TDZ培養基繼代12次(10個月)後初見試管内開花(bar = 1 cm)。
- 1-7.白化苗經過2年的繼代後也有試管内開花的現象(bar = 5 mm)
- 1-8.經芽體增殖所得之烏腳綠竹植株試管外開花現象。
- 1-9.經芽體增殖所得之植株在溫室生長2個月的情形。

參考文獻

- 呂錦明。2001。竹林之培育及經營管理。行政院農業委員會林業試驗所。臺北。p.11-132。
- 林維治。1961。臺灣竹科植物分類之研究。臺灣省立林業試驗所。臺北。p.35-176。
- 林崇熙。1998。烏腳綠竹組織培養與試管内開花之研究。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文。94pp。
- 梁群健。1996。綠竹、麻竹和蓬萊竹的組織培養。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。71pp。
- 張添榮。1996。林維治先生竹類論文集。臺灣省林業試驗所。臺北。p.35-38。
- 葉英晉。2000。好竹連山。大地地理出版事業股份有限公司。臺北。p.24-31。
- 楊宏志。2004。行政院農業委員會林務局年報。行政院農業委員會林務局。臺北。p.11。
- 溫太輝。1993。中國竹類彩色圖鑑。淑馨出版社。臺北。339pp。
- 劉廣泉。2005。高溫促進綠竹生長、出筍及壓條育苗之發根。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。89pp。
- 鄭安秀、葉忠川。2002。無嵌紋病毒綠竹苗繁殖體系之建立與推廣。植物病理學會刊 11：169-172。
- Arya, S., S. Sharma, R. Kuar, and I. Dev Arya. 1999. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. Plant Cell Rep. 18:879-882.
- Chambers S. M., J. H. R. Heuch, and A. Pirrle. 1991. Micropagation and in vitro flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27:45-48.
- Hirimburegama, K. and N. Gamage. 1995. Propagation of *Bambusa vulgaris* (yellow bamboo) through nodal bud culture. J. Hort. Sci. 70:469-475.
- Hsu, Y. H., A. P. Annamalai, C. S. Lin, Y. Y. Chen, W. C. Chang, and N. S. Lin. 2000. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem tip cultures. Plant Path. 49:101-107.
- Lin C.S. and W. C. Chang. 1998. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Rep. 17:617-620.
- Lin C. S., C. T. Chen, C. C. Lin, and W. C. Chang. 2003. A method for inflorescence proliferation. Plant Cell Rep. 21:838-843.
- Lin C. S., C. C. Lin, and W. C. Chang. 2003. In vitro flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72:71-78.
- Lin C. S., K. Kalpana, N.S. Lin, and W. C. Chang. 2007. Improving multiple shoot proliferation In BaMV-free *Bambusa oldhamii* Munro propagation by liquid culture. HortSci. 42:1243-1246.
- Lin, N. S. and Y. H. Hsu. 1994. A satellite RNA associated with bamboo mosaic potexvirus. Virology 202:707-714.
- Liu N. T., F. H. Wu, H. S. Tsay, W. C. Chang, and C. S. Lin. 2007. Chloroplast genome aberration in micropropagation-derived albino mutants, ab1 and ab2. Plant Cell Tissue and Organ Culture 88:147-156.
- Nadgauda R. S., V. A. Parasharami, and A. F. Mascarenhas. 1990. Precocious flowering and seeding behavior in tissue cultured bamboos. Nature 344:335-336.
- Prutpongse P. and P. Gavinlertvatana. 1992. In vitro micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. HortScience 27:453-454.
- Saxena S. 1990. In vitro propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep. 9:431-434.
- Yeh, M. L. and W. C. Chang. 1986. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). Theor. Appl. Genet. 72:161-163.