中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）45(3)：241～249（1996）

甘藷葉片誘導再生植株之研究[1]

羅 淑 芳[2]　蔡 新 聲[3]

摘要：不同基因型的甘藷葉片培養於不添加任何植物生長調節劑之MS 培養基，誘導根的形成及再生植株的能力較葉柄佳；0.2～1.0mg/l thidiazuron（TDZ）雖可使葉片及葉柄癒合組織誘導率達100%，但對根及植株之再生無效；以30天葉齡的組織培養試管苗葉片基部，較有利於根的形成、植株的再生及癒合組織的誘導。MS 基本鹽類添加0.1～0.5mg/l NAA 的培養基，可誘導85%以上的葉片形成根，癒合組織誘導率亦達92%以上，而添加0.1mg/l NAA 則可使植株再生率高達78%。

關鍵詞：甘藷、葉片、植株再生。

甘藷是熱帶國家最重要的雜糧作物之一，因甘藷有自交不親和性，對傳統育種是一大障礙。近十年來，多位學者嘗試以標識基因（marker gene）或報導基因（reporter gene）進行基因轉移[6,21]，但其前提必須能再分化成完整之植株，才能達到基因轉殖之最終目的。有些報告指出甘藷的莖、莖頂、花藥、葉柄及葉片均可誘導癒合組織形成，但植株再生率偏低[2,14,20]。

自 *Ipomoea* 體細胞雜交（somatic hybridization）成功後[11,12]，使甘藷種原能被更寬廣的利用；甘藷因不同基因型而致體胚（somatic embryo）形態也不同[3,5,8,9]；Ritchie and Hodges 指出體胚系統已經被應用於轉殖植物及人工合成種子[19]，而甘藷體胚已被建立[5,8,9,22]。Prakash *et al.* 已成功的將 *gusA* 基因導入甘藷的葉片及葉柄組織[18]。Prakash 則報導甘藷之農桿菌轉殖系統已被建立，可移入外來基因如 *npt II*、*bpt*，*bar* 及 *dbfr*，但再生植株沒有成功[17]。Otani *et al.* 指出甘藷植株再生率低因而限制轉殖基因的發展[14]。因此本研究之目的爲提高甘藷不同來源培植體誘導再生植株的比率，以利於基因轉殖之工作。

材料與方法

本試驗所選用的材料，包括甘藷品108（Pin 108）、臺農57號（TNG 57）、臺農63號（TNG 63）、臺農64號（TNG 64）、臺農65號（TNG 65）、臺農66號（TNG 66）、臺農67號（TNG 67）等無病毒苗的莖段。培養基配方爲 Murashige and Shoog（1962）基本無機鹽類添加0.4mg/l Thiamine・HCl、100mg/l inositol、lmg/l IAA、3% sucrose 及0.8% Difco agar 之改良式 MS 培養基。培植體置於25±1°C 恒溫，光照1,500 lux，光期16小時之環境下培養，取展開葉片及葉柄，進行下述各項試驗：

一、取展開葉片（15～20mm）及葉柄（10mm）培養於基本 MS 培養基添加0～1.0mg/l TDZ、3% sucrose 及0.8% Difco agar，pH＝5.7±0.1。

---

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第1858號。
2. 本所嘉義農業試驗分所助理。臺灣省　嘉義市。
3. 本所農藝系研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

二、取不同基因型甘藷的展開葉片及葉柄，培養於基本 MS 培養基，添加3% sucrose 及 0.8% Difco agar, pH=5.7±0.1。

三、不同葉齡及位置的葉片對再生植株的影響：甘藷的莖段培養10天、20天及30天，分別取展開葉片，再切成上、中及下等不同位置，培養於基本 MS 培養基，添加3% sucrose 及 0.8% Difco agar, pH=5.7±0.1。

四、取甘藷莖段培養30天的展開葉片，培養於不同濃度 BA 及 NAA 的基本 MS 培養基，添加 3% sucrose 及 0.8% Difco agar, pH=5.7±0.1。

五、資料的統計分析

根分化率、植株再生率及癒合組織形成率等，以二項分佈（Binomial distribution）95%信賴區間檢定處理間之差異。

結　果

一、不同品種間葉片及葉柄之植株再生率

表1顯示甘藷品108品種之葉片及葉柄，培養於不添加任何植物生長調節劑之 MS 培養基，誘導根的形成率分別爲46%及6%，其中僅葉片所誘導的根節上有10%植株再生率（圖1）；當培養基內添加0.2～1.0mg/l TDZ，可使葉片及葉柄癒合組織之形成率達100%，但對根的形成及再生植株卻有不良的影響。

表 1. 甘藷品108葉片及葉柄培養植株之再生率

Table 1. Regeneration rate in leaf and petiole explants of sweet potato (*Ipomoea batata* L. cv. Pin 108) [z]

Explants	Thidiazuron concentration (mg/l)	No. of explant cultured	Root formation		Plantlet induced from differentiated root		Callus formation	
			No.	%	No.	%	No.	%
Leaf	0.0	33	15	46(29～63)[y]	3	10(0～20)	12	36(20～53)
	0.2	42	0	0	0	0	42	100
	0.4	43	0	0	0	0	43	100
	0.6	50	0	0	0	0	50	100
	0.8	43	0	0	0	0	43	100
	1.0	43	0	0	0	0	43	100
Petiole	0.0	33	2	6(0～14)	0	0	8	24(10～38)
	0.2	42	0	0	0	0	42	100
	0.4	43	0	0	0	0	43	100
	0.6	50	0	0	0	0	50	100
	0.8	43	0	0	0	0	43	100
	1.0	43	0	0	0	0	43	100

[z] Basal medium : MS basic salts, 3% sucrose and 0.8% Difco agar, pH=5.7. Culture duration was 150 days.

[y] Data in parentheses are 95% confidence limits of Binomial Distribution.

將不同基因型甘藷品種的葉片培養於基本 MS 培養基，結果以臺農65號根的形成率最佳達94%，其餘品種或多或少亦均有根形成（表2）。葉片再生植株的方式品種間稍有不同，品108可自根節誘導6%再生植株，臺農57號、臺農63號、臺農65號及臺農67號等的葉片基部可直接誘導植株形成，其中以臺農63號及臺農67號的效果較佳分別達22%及19%。以葉柄爲培植體對根的形成及再生植株的效果不佳，僅臺農57號及臺農65號兩品種有少許根形成，而再生植株則未見產生（表3）。綜合以上

結果得知，不同品種間誘導葉片形成根及再生植株的效果較葉柄佳，癒合組織則以品108、臺農63號及臺農67號等品種較易形成，對再生植株似有幫助。

表 2. 不同甘藷品種葉片培養之植株再生率

Table 2. Regeneration rate in leaf explants of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) from different genotypes z

Genotype	No. of leaf cultured	Root formation		Plantlet regeneration		Callus fromation	
		No.	%	No.	%	No.	%
Pin108	36	21	58(42～ 74)[y]	2	6(0～13)	11	31(16～46)
TNG57	50	19	38(25～ 52)	1	2(0～ 6)	0	0
TNG63	41	30	73(60～ 87)	9	22(9～35)	4	10(1～19)
TNG64	32	1	3(0～ 9)	0	0	0	0
TNG65	33	31	94(86～100)	2	6(0～14)	0	0
TNG66	29	5	17(27～ 63)	0	0	0	0
TNG67	43	20	47(32～ 61)	8	19(7～30)	16	37(23～52)

[z] Basal medium : MS basic salts, 3% sucrose and 0.8% Difco agar, pH=5.7. Culture duration was 60 days.
[y] Data in parentheses are 95% confidence limits of Binomial Distribution.

表 3. 不同甘藷品種葉柄培養之植株再生率

Table 3. Regeneration rate in petiole explants of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) from different genotypes[z]

Genotype	No. of petiole cultured	Root formation		Plantlet regeneration		Callus fromation	
		No.	%	No.	%	No.	%
Pin108	36	0	0	0	0	0	0
TNG57	50	1	2(0～ 6)[y]	0	0	0	0
TNG63	41	0	0	0	0	8	20(8～32)
TNG64	32	0	0	0	0	3	9(0～19)
TNG65	33	2	6(0～14)	0	0	0	0
TNG66	29	0	0	0	0	0	0
TNG67	43	0	0	0	0	16	37(23～51)

[z] Basal medium : MS basic salts, 3% sucrose and 0.8% Difco agar, pH=5.7. Culture duration was 60 days.
[y] Data in parentheses are 95% confidence limits of Binomial Distribution.

二、不同葉齡及位置葉片之植株再生率

表 4 顯示臺農63號及臺農67號兩品種均以葉片基部形成根的效果較佳，其中20～30天葉齡的葉片又比幼嫩葉片（10天）效果好；植株再生方面則臺農67號10～30天葉齡的葉片基部（base）再生植株效果較臺農63號佳，且顯示臺農67號不同葉齡對植株再生效果，依序爲30天＞20天＞10天，而癒合組織亦以30天葉齡的老葉較易形成；綜合以上結果得知，將來進行基因轉殖時取材，應以較老熟葉片之葉基爲佳。

表 4. 不同葉齡和位置的甘藷葉片培養之植株再生率

Table 4. Effects of age and position from leaf explants of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) on regeneration rate[y]

Cultivar/leaf age	Position of leaf	No. of explant cultured	Root formation		Plantlet regeneration		Callus formation	
			No.	%	No.	%	No.	%
TNG63								
	tip	62	4	7(0～13)[z]	0	0	0	0
10days	middle	60	2	3(0～ 8)	0	0	0	0
	base	62	27	44(31～56)	2	3(0～ 8)	0	0
	tip	29	2	7(0～16)	0	0	0	0
20days	middle	26	3	12(0～24)	0	0	0	0
	base	29	15	52(34～70)	0	0	0	0
	tip	48	10	21(9～32)	0	0	0	0
30days	middle	49	6	12(3～21)	0	0	2	4(0～10)
	base	50	27	54(40～68)	2	4(0～ 9)	1	2(0～ 6)
TNG67								
	tip	41	7	17(6～29)	0	0	2	5(0～12)
10days	middle	41	4	10(1～19)	0	0	0	0
	base	41	13	32(18～46)	4	10(1～19)	2	5(0～12)
	tip	40	6	15(4～26)	0	0	1	3(0～ 7)
20days	middle	38	5	13(2～24)	0	0	0	0(0～ 8)
	base	40	31	78(65～90)	7	18(6～29)	21	53(37～68)
	tip	46	25	54(40～69)	0	0	21	46(31～60)
30days	middle	47	15	32(19～45)	0	0	24	51(37～65)
	base	47	39	83(72～94)	14	30(17～43)	32	68(55～81)

[z] Basal medium : MS basic salts, 3% sucrose and 0.8% Difco agar, pH=5.7. Culture duration was 60 days.
[y] Data in parentheses are 95% confidence limits of Binomial Distribution.

三、植物生長調節劑對葉片再生植株之影響

表 5 顯示培養基中不添加任何植物生長調節劑，臺農67號甘藷葉片形成根的比率爲71%，葉片基部誘導植株再生率爲18%，癒合組織的形成率爲57%。培養基中添加0.1～0.5mg/l NAA 後，可提高葉片形成根及再生植株的效果，其中又以添加0.1mg/l NAA 之處理，可提高葉基再生植株率爲78%最佳（圖 2），而添加0.5mg/l NAA 之處理，則54%可自葉基或根節再生植株（圖 3）；培養基中添加 BA，雖癒合組織形成率可達100%，但對於根的形成及植株再生則有不利的影響。

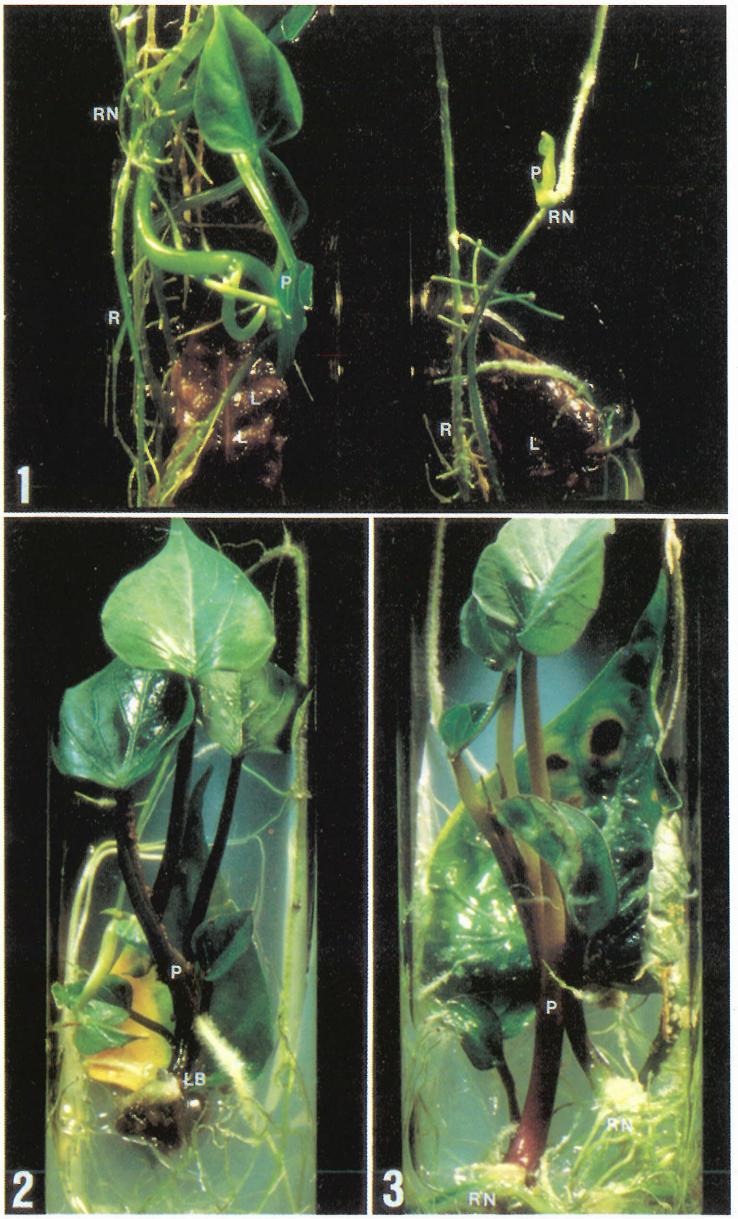


圖 1. 甘藷品108葉片(L)培養於基本MS培養基先誘導根(R)形成，再由根節(RN)上再生植株(P)

Fig. 1. Roots (R) were induced from cultured leaves (L) of Pin108. Plant regeneration (P) was observed from these induced root node(RN) continuously cultured on MS basal medium.

圖 2. 甘藷(臺農67號)葉片培養於基本 MS 培養基添加0.1mg/l NAA二個月，自葉基部(LB)再生植株(P)

Fig. 2. Plant (P) was directly induced from leaf base (LB) of TNG67 when leaf was cultured on MS basic salts supplemented with 0.1mg/l NAA for 2 months.

圖 3. 甘藷(臺農67號)葉片培養於基本 MS 培養基添加0.5mg/l NAA二個月，自葉基部或根節(RN)再生植株

Fig. 3. Plant regeneration was observed both on leaf base and leaf-derived root node (RN) when leaves of TNG67 were cultured on MS basic salts supplemented with 0.5mg/l NAA for 2 months.

表5. 不同 BA 及 NAA 濃度對臺農67號30天葉齡的葉片再生植株的影響

Table 5. Regeneration rate in 30 day-old leaf of sweet potato(cv. Tainung 67)cultured on MS medium containing varying concentrations of BA and NAA[y]

Concentration (mg/l)	No. of leaf cultured	Root formation		Plantlet regeneration		Callus fromation	
		No.	%	No.	%	No.	%
CK	49	35	71(59～ 84)[z]	9	18(8～29)	28	57(43～ 71)
BA 0.1	49	0	0	1	2(0～ 6)	49	100
BA 0.5	50	0	0	0	0	50	100
NAA 0.1	50	47	94(87～100)	39	78(67～90)	46	92(85～100)
NAA 0.5	48	41	85(84～ 86)	26	54(40～68)	45	94(87～100)
BA0.1+NAA0.2	49	0	0	0	0	49	100

[z] Basal medium : MS basic salts, 3% sucrose and 0.8% Difco agar, pH=5.7. Culture duration was 60 days.

[y] Data in parentheses are 95% confidence limits of Binomial Distribution.

討 論

Pido *et al.* 曾報導以甘藷 jewel 品種之葉片誘導不定根產生，再將不定根片段培養於不添加任何植物生長調節劑之 B5 無機鹽類及 MS 有機鹽類培養基，可獲得約10%的植株再生率[16]；本研究也有類似之結果，可自葉片所誘導之根節上產生再生植株（圖 1）。Antonelli(1990)指出以 2,4-D 處理甘藷根段及葉片，有助於器官的形成[1]；Prakash 以甘藷葉柄爲培植體分二階段培養，第一階段 MS 基本培養基添加0.2mg/l 2,4-D，第二階段以0.2mg/l TDZ 替代2,4-D，結果植株的再生率幾乎達100%[17]。Gosukonda *et al.* 亦報導將葉柄分二階段培養，第一階段將葉柄平放於 MS 添加 0.2mg/l 2,4-D 培養三天，第二階段將葉柄垂直移至 MS 培養基添加 0.05mg/l 2ip 及 0.05mg/l TDZ，可使八個不同基因型甘藷植株再生率最高達67%，單獨使用 TDZ 則對於葉柄再生植株的效果不佳，同時指出甘藷葉柄的培養方向，與植物生長調節劑運轉有關[7]。本研究使用 TDZ 於葉片及葉柄對再生植株的效果不佳，可能與品種、葉柄培養方向及未採用兩階段培養有關（表 1）。Jarret *et al.* 指出甘藷不同基因型所誘導胚的形態決定植株的再生率[8]；Liu *et al.* 以甘藷野生種（*Ipomoea triloba* L.）不同部位組織，誘導再生能力的順序爲莖＞葉片＞葉柄[10]。本研究結果也發現基因型決定植株再生率，七個不同基因型中以臺農63號及臺農67號的葉片基部，植株再生的效果較佳，同時發現不同基因葉片的再生能力均優於葉柄，與上述學者有類似的結果（表 2，3）。Antonelli 報導薔薇科成熟葉片誘導植株再生的效果較幼嫩葉片佳[1]；本研究亦發現較成熟的葉片，再生植株的效果優於年輕葉片；同時不同葉齡的葉片基部（base）形成根的效果優於葉中間及頂端位置；品種間有同樣的趨勢（表 4）。Ozias-Akin and Perera 指出 BA 有抑制不同基因型甘藷品種植株再生的作用[15]。然而有些學者有不同的看法，Pido *et al.* 以甘藷 jewel 品種之葉片誘導不定根產生，再將不定根片段培養於 B5 無機鹽類及 MS 有機鹽類，單獨添加 0.1～0.4mg/l BA，30%以上可形成再生植株，但沒有根的形成；而添加 0.2mg/l NAA 及 0.1mg/l BA，可獲得45%的再生植株[16]。Liu*et al.* 認爲 BA 對於不定根形成芽體可能扮演著重要的角色[10]。BA 也被應用於 *I.*

trichocarpa ELL 的葉片培養[13]。本研究爲提高葉片再生植株的比率，培養基中添加 0.1～0.5mg/l NAA，促使植株再生率提高至78%，顯示 NAA 對甘藷葉片再生植株有助益；不同濃度的 NAA 對葉片再生植株的部位稍有不同，較低濃度的 NAA 處理，使再生植株皆自葉基部產生（圖2），較高濃度的 NAA 處理，可形成較粗大之根，再生植株可自葉基部或根節上產生（圖3）；添加 0.2 mg/l NAA 及 0.1mg/l BA，僅對癒合組織的形成有利，但不利於根的形成及再生植株，顯示 BA 對於甘藷葉片再生植株有抑制作用。

引用文獻

1. Antonelli, M.1990. The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on*Prunus Canescens* Bois. Acta Hort. 280 : 45—51.
2. Carswell, G. K. and R. D. Locy. 1984. Root and shoot initiation by leaf, stem and storage root explants of sweet potato. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 3 : 229—236.
3. Cavalcante, J. M. A., D. Sihachakr, M. Allot, S. Tizroutine, I. Mussio, A. Servaes and G. Ducreux. 1994. Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Plant Cell Rep. 13 : 437—441.
4. Ch'ee, R. P., J. R. Schultheis and D. J. Cantliffe. 1990. Plant recovery from sweet potato somatic embryos. HortSci. 25 : 795—797.
5. Desamero, N. V., B. B. Rhodes, D. R. Decoteau and W. C. Bridges. 1994. Picolinic acid-induced directed somatic embryogenesis in sweet potato. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 37 : 103—111.
6. Draper, J., R. Scott and J. Hamil. 1988. Transformation dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the Ri plasmid of *A. rhizogenes*. In : Plant Genetic Transformation and Gene Expression-a laboratory manual (J. Draper, R. Scott and P. Armitage, eds) . pp. 77—160. The Alden Press, Oxford.
7. Gosukonda, R. M., C. S. Prakash and A. P. Dessai. 1995. Shoot regeneration *in vitro* from diverse genotypes of sweet potato and multiple shoot production per explant. HortSci. 30 : 1074—1077.
8. Jarret, R. L., S. salazar and R. Fernandez. 1987. Somatic embryogenesis in sweet potato. HortSci. 19 : 397—398.
9. Liu, J. R. and D. J. Cantliffe. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). Plant Cell Rep. 3 : 112—115.
10. Liu, Q. C., T. Kokubu and M. Sato. 1990. Plant regeneration in stem, petiole and leaf explant cultures of *Iopmoea triloba* L. Jpn. J. Breed. 40 : 321—327.
11. Liu, Q. C. 1992. Shoot regeneration from protoplast fusions of sweet potato and its related species. Jpn. J. Breed. 42 : 82—88.
12. Murata, T. 1993. Plant regeneration from fused cells of sweet potato. Jpn. J. Breed.43 : 20—21.
13. Otani, M. and T. Shimada. 1988. Plant regeneration from leaf calli of *Ipomoea trichocarpa* ELL. Jpn. J. Breed. 38 : 205—211.
14. Otani, M., M. Mii, T. Handa, H. Kamada and T. Shimada. 1993. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*.Plant Sci. 94 : 151—159.
15. Ozias-Akins, P. and S. C. Perera. 1992. Regeneration of sweet potato plants from protoplast-derived tissues. In : Sweet potato technology for the 21st century. (W. A. Hill, C. K. Bonsi and P. A. Loretan, eds.) pp. 61—66.Tuskegee University, Alabama.
16. Pido, N., Y. Kowyama., K. Shimonish and M. Karube. 1995. Plant regeneration from adventitious root

segments derived from leaf disks of sweet potato cultivar jewel. Plant Tiss. Cult. and Bio. 1 : 81—84.

17. Prakash, C. S. 1995. Boitechnological approaches to sweet potato improvement at Tuskegee University. Bio. Adv. Commission. pp. 5—7.
18. Prakash, C. S. and U. Varadarajan. 1992. Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Rep. 11 : 53—57.
19. Ritchie, S. W. and T. K. Hodges. 1993. Cell Culture and Regeneration of Transgenic Plants. In : Tansgenic Plants, vol. I, Engineering and Utilization. (Kung, S. and R. Wu, eds.) Academic Press, San Diego. pp 147—194.
20. Tsay, H. S., P. C. Lai and L. J. Chen. 1982. Organ regeneration from anther callus of sweet potato. J. Agric. Res. China 31 : 123—126.
21. Weising, K., S. Jeff and K. Gunter. 1988. Foreign genes in plants : transfer, structure, expression and application. Annu. Rev. Genet. 22 : 421—477.
22. Zheng, Q. I., A. P. Dessai and C. S. Prakash. 1996. Rapid and repetitive plant regeneration in sweet potato via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 15 : 381—385.

In Vitro Plant Regeneration from Cultured Leaves of Sweet Potato[1]

Shu-Fung Lo[2] and Hsin-Sheng Tsay[3]

Summary

The ability of roots formation and plant regeneration from leaf was higher than that of petiole in different sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties when the explants were cultured on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplement with 3% sucrose and 0.9% agar. The frequency of callus induction was as high as 100% when leaf or petiole was cultured on the MS medium containing 0.2~1.0mg/l thidiazuron (TDZ). However, TDZ has no effect on root formation and plant regeneration. The basal part of 30 day-old leaves dissected from plants derived from node culture was found to be a good source for both organ regeneration and callus formation. Using leaves cultured on a medium containing MS salts and 0.1~0.5mg/l NAA more than 85% root formation and 92% callus induction rates were recorded. As high as 78% plant regeneration rate was observed when leaves were cultured on a MS medium containing 0.1mg/l NAA.

Key words : Sweet potato, Leaves, *In vitro* plant regeneration.

1. Contribution No. 1858 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Research Assistant, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI, Chiayi, Taiwan, ROC.
3. Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.