

植物組織培養

壹、教材內容綱要

前言

一、植物組織培養之發展歷史

二、植物組織培養之基本原理

三、植物組織培養的部位與目的

四、培養基的組成

五、滅菌的方法

六、微體繁殖進行步驟

七、植物組織培養技術的應用

八、台灣的蘭花產業

貳、探討活動：大豆、豌豆之無菌播種實驗

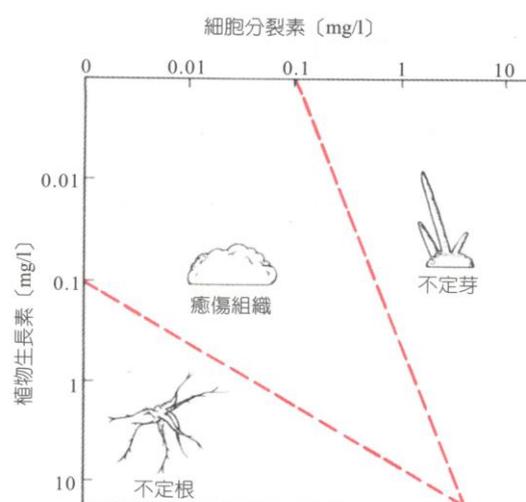
想一想

台灣近年來，蝴蝶蘭年外銷量突破八百萬株，而有蝴蝶蘭王國的美稱，你知道這些數量龐大的蝴蝶蘭是怎麼來的呢？

植物組織培養為一種基本的生物技術。指將植物體的細胞、組織、器官或個體經過消毒滅菌，於無菌環境下，人為提供植物所需的無機養分、醣類及生長調節劑等物質，在控制光線、溫度等因子之環境促使植物生長發育以完成其生長、繁殖或保存的目的。無論植物之大量繁殖、無病毒植株的生產、植物育種、二次代謝物的大量生產、植物生長、形態、生理、遺傳、病理學等研究，均可利用此技術為工具。而且具有不受限於氣候影響、在較小的空間中即可進行的優點。

一、植物組織培養之發展歷史

最早在 1902 年德國植物生理學家 Haberlandt 嘗試將高等植物的組織培養於人工培養基上，雖並未獲得成功，但卻開啓了組織培養的扉頁。直到 1934 年才由 P. R. White 利用酵母菌的抽出物成功進行蕃茄根尖的繼代培養。至此，可讓植物在人工培養基中順利生長。1948 年 Skoog 和 Tsui 利用煙草為研究材料提出要培養產生不定根、不定芽或癒傷組織，其關鍵取決於生長素 auxin 與細胞分裂素 cytokinin 的比例(圖一)。1954 年 W.H. Muir 成功的進行單細胞培養。1962 年 Murashige 與 Skoog 提出之 MS 培養基配方成為現今植物組織培養中廣泛使用之培養基。



圖一：植物生長素和細胞分裂素的比例對器官分化的影響

二、植物組織培養之基本原理

植物組織培養之所以可順利進行的基本原理為植物細胞具有分化的全能性 (totipotency)，全能性 totipotency 一詞最早在二十世紀初由德國植物生理

學家 Haberlandt 提出，指任何單細胞擁有與母本相同的遺傳組成，可形成完整植物體之遺傳訊息，具有發育成與母本相同性狀的潛能。他也將割傷後的馬鈴薯傷口長出來的組織定名為「Callus」，中文稱為「癒傷組織」，用以指一群未分化的細胞群，沒有一定的生長方向，宛如動物癌細胞一般，具有極強的增殖力。但是，一直到 1958 年才由 Steward 以胡蘿蔔韌皮部組織誘導出癒傷組織，再由此癒傷組織分化成小苗，證明了高等植物活細胞具有分化全能性。

三、植物組織培養的部位與目的

植物體的各部位皆可作為組織培養的材料，而培養的部位與培養的目的有密切的關係，其關係如下表一

表一：植物組織培養之培養部位與培養目的之關係表

培養部位		培養目的
完整植物體		增加存活率
胚		保留優良性狀之無病毒植株 育種：使雜種胚可存活
器官或片段	葉片、表皮薄層、嫩莖片段、子葉和胚軸、Young needle fascicles、花莖上未成熟的花、儲存構造	無性繁殖
	子房、胚珠、花藥、花粉	育種
組織： 癒傷組織 分生組織		誘發變異 無菌化
細胞（液體懸浮培養）		誘變育種、體胚發生、提供原生質體培養、生產二次代謝產物
原生質體		品種改良 基礎細胞學研究

四、培養基的組成

培養基的內容常隨植物種類及部位而有所不同，基本成分為水、有機物、醣類、無機鹽類、維生素及激素。

1. 水

水是生命所必不可缺少的，是細胞的組成成分之一。也是細胞中各種生理、生化反應的介質，可維持細胞一定滲透壓與膨壓並為植物體提供氫、氧元素。

2. 大量元素

主要為碳、氫、氧、氮、磷、鉀、硫、鈣、鎂。植物體所需之碳、氫、氧元素主要來自空氣中之二氧化碳與水。氮元素可提供植物體作為合成胺基酸的原料，在培養基中常以 KNO_3 ，或 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 等硝態氮或補加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (氨態氮)，以提供氮源。而組織培養研究中常用之 MS 培養基主要以 NH_4NO_3 的形式，在培養基中既引入硝態氮，又引入氨態氮。

磷是植物必需元素之一，參與植物生命過程中的核酸合成、蛋白質合成、光合作用、呼吸作用以及能量的儲存、轉化與釋放等重要生理生化過程。因此，在組織培養中，培養物需要大量的磷。而鉀、鈣、硫、鎂等因會影響培養物的酵素活性故進而影響新陳代謝過程。

3. 微量元素

係指植物對這些元素需量極微，而且多了有毒，但缺乏了又會產生代謝障礙。培養基中僅需添加低於 $10^{-5}\sim 10^{-7}\text{M}$ (克分子濃度) 即能滿足需要，稍多即發生毒害(植物細胞酵素失活、代謝障礙、蛋白質變性、導致組織死亡)。包含鐵、銅、硼、鋁、鋅、錳、鈷、鉬等對植物生命活動都有重要作用。

4. 蔗糖

糖類是植物培養物不可缺少的碳源和能源。其中蔗糖是最好的碳源和能源，其次是葡萄糖和果糖，蔗糖又可維持一定的滲透壓。因植物種類，培養目的的不同，最適蔗糖濃為 1.5-2.0% 不等。

5. 維生素

植物自身具有合成維生素的能力，但無法滿足快速生長的需要。培養基中添加之維生素以維生素 B 群為主，如維生素 B_1 (thiamine, 硫胺素)、維生素 B_6 (pyridoxine, 吡哆醇)、菸鹼酸 (nicotinic acid)、生物素 (biotin)、葉酸 (folic acid)、泛酸 (pantothenic acid) 等，主要功能為扮演輔酶與酵素共同催化化學反應。添加到培養基中的維生素濃度約在 0.1 — 1.0mg 之間。

7. 有機物—天然生長促進物質

最常用的是椰子汁 (CW)，其他如酵母 (YE)、牛肉分解物、麥芽胚乳、大豆子葉、蘋果、香蕉等萃取液或柑桔汁、番茄汁、黃瓜汁等。

8. 植物激素

植物激素對於培植體的分化(如不定芽、不定胚、不定根、花芽等的分化)，有重要而明顯的作用。其中影響最顯著的是生長素(包括二氯苯氧基乙酸 2,4-D、萘乙酸 NAA、吲哚乙酸 IAA、吲哚丁酸 IBA) 和細胞分裂素(包括激動素 kinetin、玉米素 zeatin 等)，通常認為生長素細細胞激動素出值大時，有利於根的形成;比值小時，則促進芽的形成。故應根據不同植物的種、品種，不同的培植體，以及不同的培養目標，採用不同種類的植物激素和比率，以便達到預期的目的。吉貝素 (GA) 通常不利於芽的分化，但能促進已分化的芽的伸長生長。

9. 瓊脂

海藻中提取出來的一種物質，植物細胞不能利用它，並由於它具有無毒害，可塑性，遇熱液化，冷卻後固化，可使各種可溶性物質均勻地擴散分布等的特性。至今仍是一較理想的固體支撐物。

想一想

在自然環境中，一般植物生長需要哪些物質？請思考培養基成分與上述物質有何異同？

五、滅菌的方法

在試管繁殖過程中，爲了防止霉菌、細菌等污染，使試管苗健康地生長，必須採用有效的方法，將所用培養器皿、培養基、操作工具、培養材料、接種間進行滅菌。滅菌可分物理方法和化學方法兩類。需視滅菌物品的特性採用適當的滅菌方式

1. 培養基及培養器皿的滅菌

通常採用高壓蒸汽滅菌法滅菌，對於遇熱易分解的物質，可用細菌漏斗過濾法去除細菌。也可採用乙醚處理乾燥的熱不穩定物質半小時。玻璃器皿可採用烘箱乾熱滅菌法滅菌。

2. 金屬用具

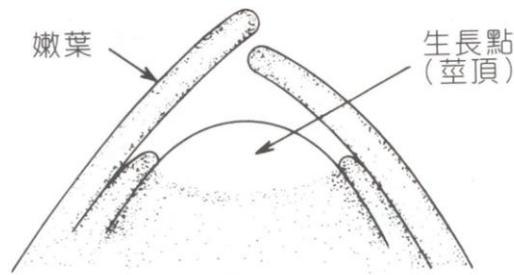
接種用的刀、鑷子、剪刀等，使用前需用酒精棉花擦拭乾淨，然後在火焰上灼燒。冷卻後，在無菌條件下，將器具在 95% 酒精中浸一下，取出後放在酒精燈上燒一下，安放在玻璃架上，待冷卻後使用。

六、微體繁殖進行步驟

1. **Establishment** 建立：即建立無菌培養的系統，是植物培養的基本操作。

一般在自然環境生長的植物常受到病毒與細菌的感染，而無病毒化的植物能生長的較好，作爲農作物產量較高，整體經濟價值高。目前常用讓植物無菌化的方法爲莖頂培養法或稱爲生長點培養法，因感染病毒的植株在生長點會保持無病毒的狀態（圖二），其原因可能爲生長點分裂增殖旺盛導致細胞密度較高，使得病毒不易入侵。且實驗材料常用莖頂的生長點，故稱爲莖頂培養法。

植物組織培養最初的培養材料稱爲培植體（*explant*），選擇適當的培植體後須進行培植體消毒，消毒的方式爲利用漂白水以進行培植體表面的滅菌，並在無菌環境中，將培植體接種在適當的培養基上，使其能正常生長。



圖二：植物生長點（莖頂）病毒分布示意圖

2. **Multiplication** 增生：在此階段誘發已建立培養系統之培植體分化，促進芽的大量繁殖，可分為旁芽形成與不定芽形成。利用適當激素比率的培養基促進旁芽與不定芽的形成。並將這些快速生長的培植體移至新的培養基中培養。若此不定芽是由癒傷組織誘發產生，與其他方式形成的新芽所培育出的植物體相較較容易發生變異。
3. **Root Formation** 發根：促進植物體根部的生長，以便將上一步驟增殖的植物芽體能順利成長為完整的植物體，此一步驟可在試管內或試管外進行。Fig?
4. **Acclimatization** 馴化：為將植物體轉移至環境變化明顯的自然環境中，逐漸使植物體適應乾燥或強光等環境條件並同時由提供糖分的營養環境轉換為自營生活的操作

七、植物組織培養技術的應用

1.大量繁殖

(1)有性繁殖：如無菌播種技術。因蘭花種子的構造較原始，故在自然界中的萌發率很低，可利用無菌播種的技術大大提高其萌發率。

(2)無性繁殖：利用生長點、花梗節腋芽培養或誘導產生癒傷組織或擬原球體（Protocorm Like Body, PLB）增殖



圖三：蝴蝶蘭之擬原球體

註：擬原球體（Protocorm Like Body, PLB）為在蝴蝶蘭營養器官誘導或無菌播種時會經過的階段，此時增生能力強，增殖速率快，其型態與種子發芽時所形成之球狀細胞團（Protocorm）類似，故稱之

2.無病毒種原建立：在自然界生長的植物常易受到病毒的感染，利用生長點培養出無病毒的種苗，因其品質與產量均較高，具有較高的經濟價值。

3.育種

(1)胚培養：克服雜交不親合的現象，提高雜交種子發芽的機會。或縮短林木種子育種的時間

(2)誘變育種：在培養細胞、原生質或癒傷組織時，添加特定物質或提供逆境以引導變異的產生。

(3)花藥培養：用以產生單倍體的植株，再經染色體加倍處理即可得到純化的品系，可縮短育種年限。

(4)原生質融合：可用以產生親源關係較遠的雜交種，甚至利用基因體的導入創造全新的品種。

4.二次代謝物的生產：可在人工控制的環境下大量生產，而不必砍伐植物體，且不受氣候、季節的限制。

想一想

認識了植物組織培養這項技術之後，你想用此技術生產何種產品或從事何種研究？

八、台灣的蘭花產業

台灣因地理位置與氣候條件適合許多生物生存，故具有豐富的生物資源，原生種蘭花種類繁多，再加上台灣種植蘭花已有一百年歷史，近二十年來產業發展迅速，使得台灣的蘭花品種豐富且多元，在國際蘭花市場，台灣掌握五成以上的蝴蝶蘭種源、四成核心生產技術，並因此發展出外銷為導向的蘭花產業，成為供應全世界蘭花市場的重要產地。

台灣為全球最大的蘭花輸出國。近兩年來，蝴蝶蘭年外銷量突破八百萬株，位居台灣花卉及種苗出口之首，更高居世界第一位。蘭花雖只占台灣花卉栽種面積的四%，所創造的產值卻占了二三%，因此被視為花卉黃金產業。