

## 肆、組織培養的準備工作

組織培養的成功與否，除摘取符合目的的植體很重要外，有否良好的人工培養環境(包括培養基、容器、燈光、溫濕度控制及在無菌狀態下操作等)亦是非常重要的決定因素。

主要的組織培養作業有：器具的洗滌、培養基的配製、材料(外植體)的取得、培養後植體的健化與移植等，其作業過程如圖1。以下針對作業過程，依序介紹重要的軟硬體設備與器材，可依自己的主客觀條件、選擇適當的設備與操作方法進行。

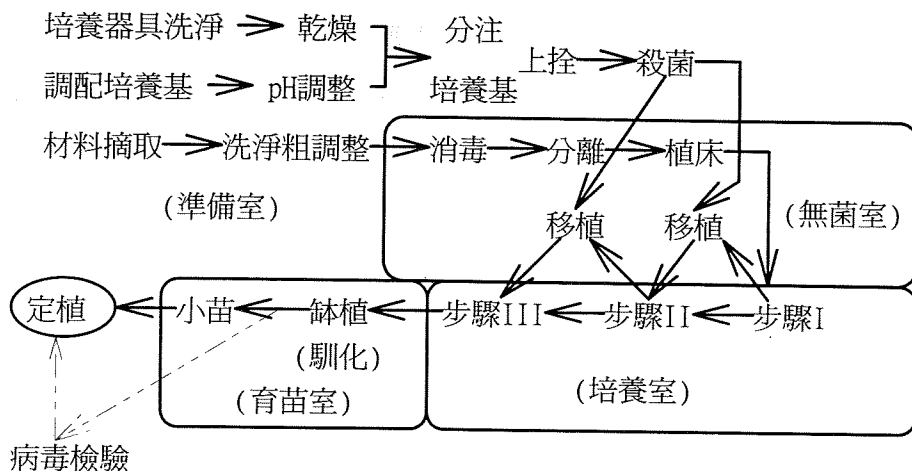


圖1. 組織培養的主要作業過程

## 一、工作房

理想的工作房設備，應區分為三部份，即準備室、無菌室及培養室(如圖1)。

### (1). 準備室：

準備室係供器具洗滌、乾燥、培養基的調配及殺菌等作業之用，故應具有自來水、電源與瓦斯等設備。並且為工作便利起見，尚應設置大型作業平台，與大型的洗滌槽。

### (2). 無菌室：

無菌室係供無菌操作之處，故應噴灑酒精，以消毒室內空氣。頂棚、牆面及地板等，均應採用防潮及抗藥性的材料。

室內作業台、電源插座、自來水、空氣輸送與淨化除菌裝置，以及沖洗排水設備等，均應一一列入考慮。為防止空氣污染，經由進出口處進入室內，應有空氣噴射(air shower)裝置或雙門設備。

### (3). 培養室：

培養室，係培養瓶內培養組織順利發育成長之處，關於其溫度、光線、濕度及空氣靜化程度等，均需詳加考慮。

(a)溫度：利用空調設備調節，所設定的溫度，雖因培養材料而有不同，但以20~25°C範圍內為宜。適當的溫度，因植物而有差異，有時尚需另行設置15°C、20°C、25°C或30°C的定溫箱(incubator)。溫度變化較大時，因培養瓶內空氣的移動，即有導致污染的可能。

(b)濕度：相對濕度，以保持在70~80%程度為宜(自然濕度狀態)。

(c)光線：以普通的日光燈或植物燈2,000~3,000 lux照度，照射培養瓶上，每日照明16~24小時。若在植物生長燈光長日照射下，則可易於吸收營養、促進生長。

(d)空氣：盡量注意保持室內空氣潔淨，污染的培養瓶，應立即移走，準備室亦然，且應設置大型的空氣過濾裝置。

## 二、儀器及設備

### (一)必要儀器和設備

#### 1. 無菌操作箱

無菌操作箱之設計一般有垂直送風式和水平送風式二種類型，就大小而論，亦有單人用及雙人用等多種。無菌操作箱是利用粗過濾網以馬達抽風過濾空氣中之大小顆粒灰塵，再以高效率過濾網(HEPA filter)隔絕粒子在 $0.3\ \mu\text{m}$ 以上之微生物與微塵。因此利用無菌操作箱可以進行無菌接種工作。使用前，應使用酒精棉花擦拭台面及四週之灰塵，外層粗過濾網需要經常清洗或更換，如此可以保持高效率過濾網使用之耐久性。

## 2. 高壓蒸氣滅菌鍋

用以進行培養基、操作器械或培養器具的滅菌工作，一般需能達到 $121^\circ\text{C}$ ，壓力 $1.05\ \text{kg}/\text{cm}^2$ ( $15\ \text{lb}/\text{in}^2$ )之條件。

## 3. 天平

稱量微量元素和植物生長調節劑時，需要精密度較高的電動天平，稱量大量元素或蔗糖、洋菜時，可選用普通天平；天平盡量避免搬動並注意清潔維護，使用時要注意歸零及水平定位，並且使用稱藥紙以避免藥品直接接觸秤盤。

## 4. 冰箱

各種維生素、植物生長調節劑及培養基原液的貯藏、細胞組織和試驗材料的保存及需低溫處理的材料等，使用家庭冰箱即可達到上述目的。但是有機溶劑必須密閉收藏，有些藥品的貯藏條件必須放在冷凍櫃中。

# (二)次要儀器和設備

## 1. 微細孔過濾器(membrane filter)

培養基溶液中有時必須加入如激動素(GA)、維他命C、一些抗氧化劑、酵素等易被高溫破壞而降低活性的物質，此時必須利用事先滅菌過的微細孔過濾器(孔徑小於 $0.45\ \mu\text{m}$ )過濾，可以得到無菌的濾液，再行加入培養基內。

## 2. 酸鹼度測定儀(pH計)

用於測定培養基的酸鹼度，亦可用酸鹼試紙代替。酸鹼度測定儀的用法可參考所購買的各類型測定儀的使用說明。

## 3. 解剖顯微鏡

採用莖頂培養、胚培養等方法時，用以觀察並解剖植物的各器官和組織，進行微細培植體的分切，並可利用於觀察培植體中的芽體、類分生組織、類胚體等形態發育情形，也可從培養瓶外部觀察細胞或組織的生長情況。

#### 4. 搖床或轉床

在微細培植體大量繁殖或進行細胞培養及液體培養時，常採用搖床或轉床，可以增加其繁殖速率。一般之搖床或轉床均可依需要調整其旋轉速率。

#### 5. 其他

包括定量分裝器、溫濕度記錄器、空氣濾清器、空調設備等等。

### (三)玻璃器皿

包括盛放培養基原液、植物生長調節劑的玻璃瓶，配製培養基用之燒杯、量筒、定量瓶、吸管，及盛放培養基的試管、培養皿、三角瓶等。

### (四)用具和器械

#### 1. 鑷子

可依需要選取適當的鑷子，如小形尖頭鑷子適用於剝取花藥、胚、胚珠，及撕去葉片下表皮；槍形鑷子可用於轉移植物組織塊及小植物等培養物；而扁頭鑷子則適宜於鑷取蓋玻片及薄形的植物組織，便於剝離所需組織。一般使用之長度最好比培養容器長一倍，在移植材料時，避免手指碰到瓶口，確保無菌操作進行。

#### 2. 解剖刀

常用的解剖刀有長柄與短柄二種，以長柄為佳，用於分切組織塊，刀片變鈍後可以更換。需削成薄片的組織，則常用單面刀片。

#### 3. 剪刀

常用的有解剖剪刀和彎頭剪，用於剪開質地比較硬的組織。

#### 4. 小鐵架

用以放置經酒精燈滅菌後的上述用具及器械，常放置於無菌操作箱內。

#### 5. 酒精燈

在無菌操作過程中，各種用具和器械均可在酒精燈上燒烤，利用高溫以達到滅菌之效果。



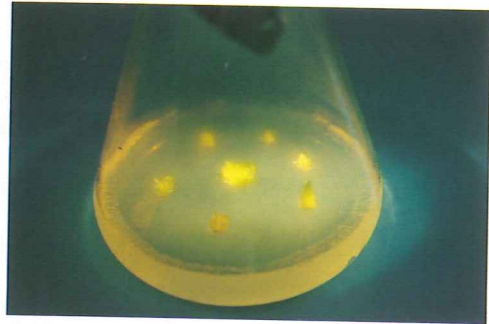
開放式無菌操作台，內裝HEPA高效能過濾網以維持無菌狀態。



高壓殺菌釜，裝有定溫控制器，以維持殺菌條件為  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  及壓力  $1.05\text{kg/cm}^2$ ，15~20分鐘。



搖床(左)與轉床(右)，常用於液體培養或培植體初代培養，有利於誘發大量不定芽。



操作完成之組織培養瓶。



培養室，一般常用之條件，光度為  $1,500\sim 3,000\text{ lux}$ ，日夜溫調控在  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，或依作物而有其適宜培養條件。



培養完成之培養瓶，於植株移植出瓶前，先置於半陰處使之先行健化適應外在環境變化。

## 6. 試管架

可置放已接種及待接種之試管，以利於無菌操作之進行。

## 三、器材洗淨與消毒

1. 高壓蒸氣滅菌器(autoclave sterilizer)：有用電及瓦斯兩種形式，可使用 $120^{\circ}\text{C}$ 的高溫，加熱15~20分，一次完成殺菌工作，故甚為便利。若殺菌時間較長，洋菜(agar)即難以凝固。
2. 酒精燈及燃燒器等：供刀具與鑷子等的殺菌之用。
3. 細孔黏度過濾器：高溫狀態下容易分解的激勃素(GA-gibberellin)與秋水仙鹼，不可用高壓蒸氣滅菌，只要使其通過過濾器後即可使用。但細孔黏度過濾器，使用前需利用高壓蒸氣滅菌器消毒。
4. 量瓶(measuring flask)與吸量管(pipette)等量測用之玻璃器具：需先浸泡於洗滌劑內相當時間後，再行清洗。此時，不宜使用刷子，應以較細的橡膠管接於水龍頭上，沖洗內側。洗後毋須加溫乾燥，宜自然陰乾。
5. 皿盤類(玻璃製及鋁製)：針對各項用途，應備妥大小不同的皿盤，以供材料保存與移植時之用。
6. 燒杯：供材料消毒調配培養基之用。

組織培養時，必備的工具與器皿甚多，依據所需之器皿的用途與使用方法，分別加以標示，一旦習慣，即使同一器具，亦可作各種不同用途，故可按使用者的意向，使用認為方便者。

玻璃器具，一般利用自來水沖洗，即可達到相當的潔淨程度；唯實驗及精度較高的測試中，即使僅殘留有微量的異質，仍會產生不良影響，故務必徹底洗淨，並保持其乾燥。新購用的燒瓶，應先以1%的稀鹽酸洗滌，再用清水沖洗，俟其乾燥後，方置於加溫乾燥處。

## 四、培養基之成分與調配

### (一)培養基的基本成分

培養基主要由水、無機鹽類(大量元素、微量元素)、蔗糖、維生素、植物生長調節劑及洋菜所組成。但是因培植體的特殊需要，有時會補充一些天然有

機物，如氨基酸、水解酪蛋白(casein hydrolysate)、椰子汁、酵母抽取物、番茄汁、香蕉泥、馬鈴薯汁等。

### 1. 水

進行原生質體或花藥培養時，需用二次蒸餾水或去離子水；一般繁殖時採用市售蒸餾水即可。對水質純度的需求，依不同培養材料而定。

### 2. 無機鹽類

包括氮、磷、鉀、鈣、硫、鎂、等大量元素及鐵、銅、鋅、硼、鉬、鈾、錳、氯等微量元素。

在培養基中常以硝酸態氮提供氮素，也有以硝酸態氮為主，補加銨態氮，以適合喜酸性植物的需要。

培養基中加入硫酸鐵，常因酸鹼值升高，形成鐵的沉澱物，近年來，鐵以與螯合劑結合的形式(Fe-EDTA)加入，以避免因沉澱而產生缺鐵現象。

### 3. 有機化合物

#### (1). 蔗糖

糖類是植物培植體不可缺少的碳源和能源。其中蔗糖是最常用的碳源和能源，其次是葡萄糖和果糖。在培養基中加入一定濃度的蔗糖，即可作為碳源，又可維持一定的滲透壓。因植物種類、培植體的不同，最適蔗糖濃度亦不同，一般使用濃度為每公升20~50公克。

#### (2). 維生素

培養基中添加維生素能增進培植體健康而快速的生長。添加到培養基中的維生素大多為B族維生素，濃度約每公升培養基含0.1~10毫克之間。另外肌醇(myo-inositol)本身之代謝過程雖仍未知，但有助於細胞壁的形成，一般用量在每公升培養基含50~100毫克。

#### (3). 氨基酸

水解酪蛋白是多種氨基酸的混合物，對培養物的不定胚、不定芽的分化有良好的促進作用，因此近年來培養基中每公升常添加300~2,000毫克，或甘氨酸(glycine)2~3毫克。

#### (4). 植物生長調節劑

植物生長調節劑對於培養中培植體的形態形成，有重要而明顯的作用；其中影響最顯著的是生長素(auxin)和細胞分裂激素(cytokinin)。添加時應根據

不同植物種類、不同培養部位及不同培養目標，採用不同種類的植物生長調節劑和不同比例濃度，以達到預期的目的。另外，激勃素(GA)可以促進莖之伸長。離層酸(ABA)在人工種子製成過程中，可以延長休眠之時間，有利運輸及貯存。乙稀(ethylene)因為是氣體荷爾蒙，利用較為不易，但對於組織培養過程中產生之乙烯及其作用，則亦有相當多的研究。

#### 4. 其他天然有機物質

此類物質中最常用者為椰子汁，用量為每公升培養基含100~150毫升；在買不到椰子的地區，可用酵母抽取物、蘋果汁、麥芽抽取物、香蕉、馬鈴薯等替代椰子汁，常能獲得不錯的效果。但這類物質內含成分複雜且不穩定，在試驗中若非必要，仍以不加為宜。

#### 5. 洋菜

此物質不能被植物細胞利用，但具有無毒害、遇熱液化、冷卻後凝固化之特性，至今仍是較理想的固體支持物。固體培養基之洋菜一般用量為0.6~1.0%，液體培養基則不須添加。

#### 6. 活性碳

活性碳可以吸收培養基中植物所分解之褐化及有害物質，進而促進植物之生長；組織培養以用粉末狀活性碳為佳，一般用量為每公升培養基加入1~10公克。但是因為其亦會吸附培養基中 useful 之物質，若非必要，仍以不加為宜，一般在培植體較易褐化之情況下使用。

### (二)常用培養基之配方

常用之基本培養基如下表所示，其中以MS培養基及B5培養基二種最為常用，蘭花大量繁殖上常使用KC培養基、VW培養基等。亦可將MS培養基減半使用，其基本配方之比較如下表(表一)。



表一、幾種常用培養基的成分比較(mg/l)

成分	Murashige & Skoog (1962) MS	Gamborg (1968) B5	White (1963)	Nitsch & Nitsch (1967)	Knudson C (1964) KC	Vacing & Went (1949) VW
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134			500	500
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	250	720	125	250	250
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			200			
KCl			65			
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	150				
KNO <sub>3</sub>	1,900	2,500	80	125		525
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O			300	500	1,000	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650					
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		150	16.5			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170			125	250	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8			27.85	25	250
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3			37.25		
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	10(1水鹽)	7	25	7.5	7.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	2	3	10		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025		0.025		
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>			2.5			
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025				
KI	0.83	0.75	0.75			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3	1.5	10		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25		0.25		
Fe-EDTA		40				
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>						200
酒石酸鐵						28
蔗糖	30,000	20,000	20,000	20,000~30,000	20,000	20,000
myo-Inositol	100	100		100		
Nicotinic acid	0.5	1.0	0.5	5		
Pyridoxine HCl	0.5	1.0	0.1	0.5		
Thiamine HCl	0.1-1	10	0.1	0.5		
Biotin				0.05		
Glycine	2		3	2		
Cysteine			1			
葉酸				0.5		
pH	5.7~5.8	5.5	5.5	5.4	5.0~5.2	5.0~5.2

目前有市售之MS混合粉劑培養基，可直接加水使用，對一般少量使用者較為便利，唯售價較高。

### (三) 培養基原液配製要點

經常使用的基本培養基可配成10~1,000倍濃度的原液，將多次配製所需之量，一次稱量，配製成數瓶原液，放在冰箱或冰庫中保存，用時按需要稀釋，使用上較每次配製逐項稱量方便。一般大量元素可配成10~50倍原液，微量元素則配成100倍，維生素分別配成100倍，使用時按比例添加。

配原液之用水應採用二次蒸餾水或煮過的去離子水，植物生長調節劑亦可依需要配成0.1~0.5 mg/ml的原液，此濃度即便於計算所需用量，也可以避免冷藏時結晶的析出。

配原液時要注意下列幾項原則：

1.  $\text{Ca}^{+2}$ 和 $\text{SO}_4^{-2}$ 或 $\text{Ca}^{+2}$ 、 $\text{Mg}^{+2}$ 和 $\text{PO}_4^{-3}$ 混合會產生沈澱，宜避免配在同一瓶原液中。
2. NAA、IAA或IBA等植物生長素類 (auxin)，宜先用1N NaOH、KOH或酒精溶解後再加水定體積；細胞分裂激素類 (cytokinin) 如 Kinetin、BA或2-ip，宜先用1N HCl溶解後再加水定體積。
3. 配製好之原液應盡速用完，無機鹽類以不超過一個月為宜，其他有機物或植物生長調節劑則多有一定之保存期限，宜多加注意。
4. Fe-EDTA易因光而氧化，失去其活性，不能為植物所利用，宜用深色瓶保存。

### 五、植體材料的評估、分離與植床

組織培養時所使用的材料，常因栽培條件的不良，而有雜菌污染的情況，故應留意下列各事項：

- (1) 梅雨期至夏季，材料污染程度較高。
- (2) 以溫室內的栽培較佳(可在最適當的光線與溫度環境條件下管理)。
- (3) 鉢內的土壤，需使用經過消毒者；栽培時，宜利用化學肥料。
- (4) 若係栽植於地面，則需採用蛭石與化學肥料。
- (5) 定期噴灑藥劑，從事無病蟲害苗株的管理。
- (6) 外植體培養的成功率，以栽培於適當環境下，發育旺盛期內的幼嫩組織最佳。

(7) 無病毒(virus free)個體再生的前處理(熱處理)，係在37~38°C溫度下栽培2~4週，獲得無病毒個體的成功率較高。

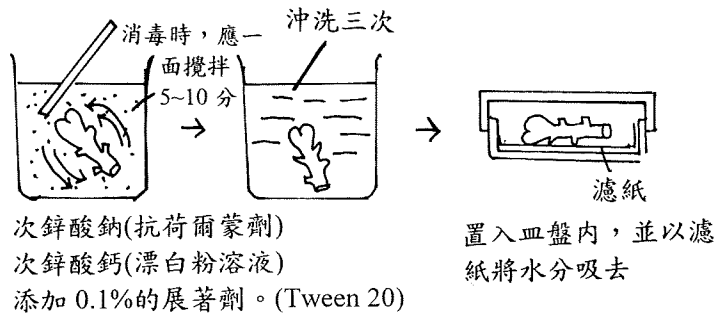
【外植體的培養部位】

植物體上，得以摘出外植體、執行培養的各部位，如下圖所示。  
摘出部位，依培養目的而定。



2. 材料的消毒(材料的移動，均應利用鑷子)

① 表面殺菌      ② 清洗(殺菌液)      ③ 保存

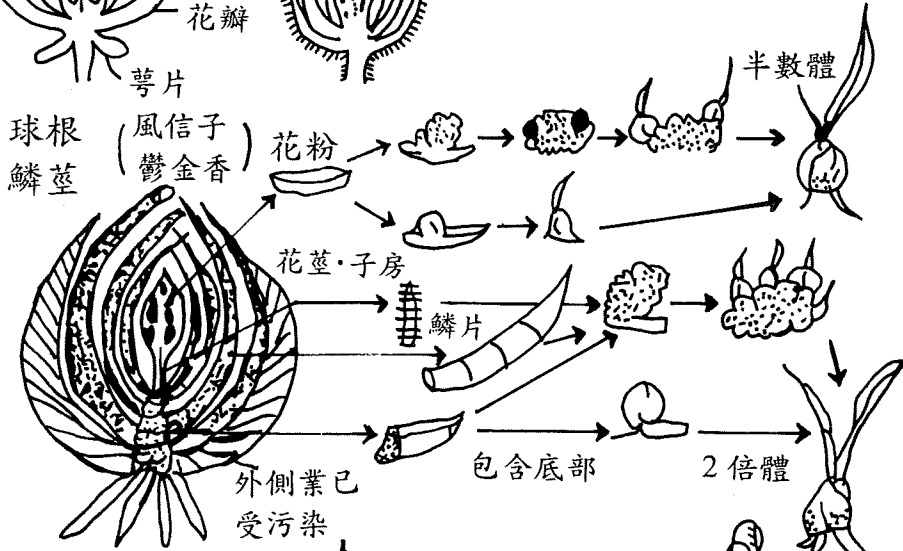
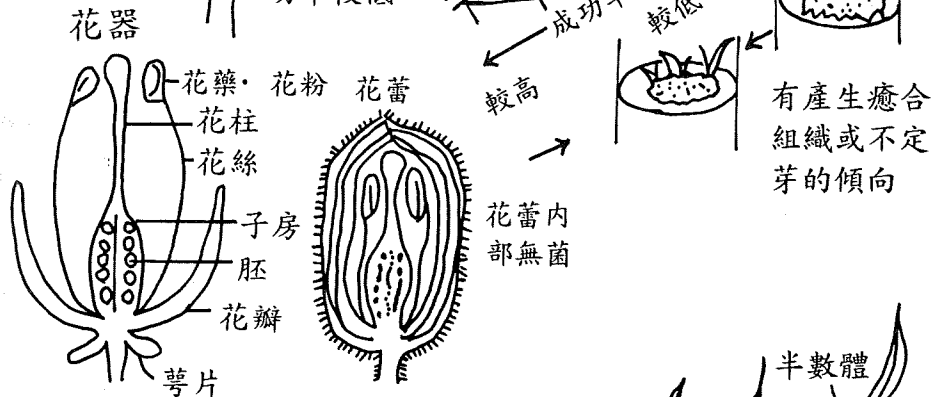
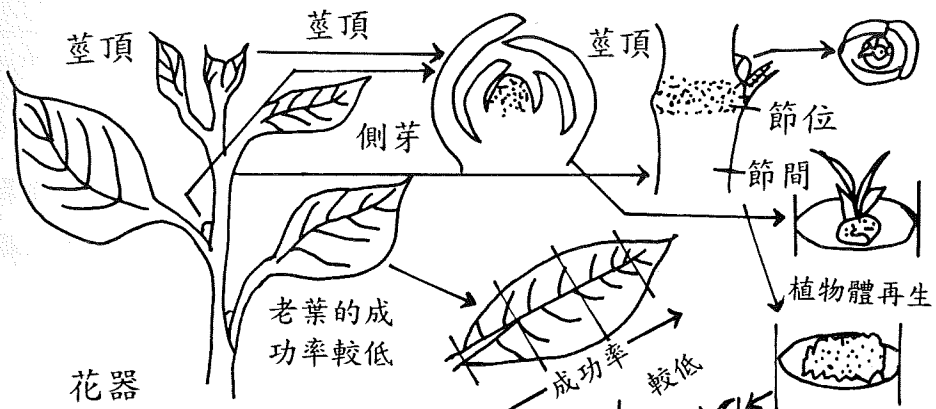


(1) 無病毒個體的再生

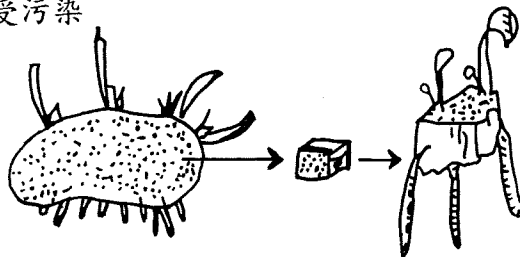
以採取莖頂部位為主，經癒合組織再生的個體中，亦有消除病毒的實例。另一方面由草莓花藥的培養上，經由癒合組織再生的個體，亦證明具有成效。

(2) 營養系的大量增殖

可使用無病個體的花器、莖、葉、莖頂、球根或根等各部位，以進行培養。材料的消毒與分離，則可按下列圖所示行之。



塊莖(仙客來)



球莖(劍蘭)

