

## 伍、組織培養的程序與操作

### 一、培養基之製作

今以MS培養基和花寶培養基之調配為範例，希望初學者能明瞭培養基之製作方法，所用的材料有化學藥品、生長調節劑、蔗糖、洋菜、三角瓶、試管、燒杯、吸管、量瓶、量筒等。

#### 1. MS培養基之調配（以香石竹莖頂培養為例）

- (1). 依表二先配製MS培養基之原液。
- (2). 將原液1, 2, 3, 4, 5按表一中每配一公升應取原液之量，分別加入裝水約500ml之一公升容量的燒杯中，再加入NAA原液0.2ml、Kinetin原液20ml及蔗糖30公克，攪拌均勻後，以量筒定體積至一公升。
- (3). 利用酸鹼度測定儀測定其pH值，以1N HCl或1N KOH調整其pH值至 $5.7\pm 0.1$ 。
- (4). 稱取洋菜8公克加入溶液中，在水浴中加熱使洋菜完全溶解後再分裝於試管；分裝後以鋁箔紙或橡皮瓶塞封閉瓶口。
- (5). 將分裝好之培養基，放入高壓蒸氣滅菌鍋中滅菌，在溫度 $121^{\circ}\text{C}$ ，壓力 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 下維持15~20分鐘即可，關閉加熱電源或瓦斯。
- (6). 待壓力自然下降至0時，開啓放氣閥，打開鍋蓋，取出培養基，放在乾淨的貯藏櫃中備用。

表二. MS培養基原液之配製法

編號	原液名稱	成分	稱量 (g)	配製法	每配1公升培養基的取量
1	大量元素	KNO <sub>3</sub>	19	將3種鹽一起溶於800 ml水中，然後定體積至1,000ml	100 ml
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5		
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7		
		CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4.4	溶解並定體積至1,000 ml	100 ml
		MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.7	溶解並定體積至1,000 ml	100 ml
2	微量元素	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	將7種微量元素先溶於800 ml水中，然後定體積至1,000 ml	1 ml
		ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6		
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2		
		KI	0.83		
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25		
		CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025		
		CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025		
3	維生素原液	Thiamine-HCl	0.1	4種物質先溶於80 ml水中再定體積至100 ml	1 ml
		Pyridoxine-HCl	0.05		
		Nicotinic acid	0.05		
		Glycine	0.2		
4	myo-Inosital原液	myo-Inosital	1.0	溶解並定體積於100 ml	10 ml
5	Fe鹽原液	Na <sub>2</sub> -EDTA	3.73	兩種物質分別溶解在200 ml水中，分別加熱煮沸。然後混和兩種溶液繼續加熱煮沸。冷卻定體積至500 ml	5 ml
		FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.78		
6	NAA原液	NAA	0.01	先以95%酒精(註1)溶解並定體積於100 ml	(註2)
7	Kinetin原液	Kinetin	0.01	先以1N HCl溶解並定體積於100 ml	(註3)

註1：每 100 mg/l之量以不超過 5ml酒精為宜。

註2：利用MV=MV，可計算出應添加之原液用量

香石竹莖頂培養用之培養基應含 0.02 mg/l NAA及 2 mg/l Kinetin  
 計算 NAA原液之用量如下： $0.01 \text{ g}/100 \text{ ml} \times V = 0.02 \text{ mg}/l \times 1 \text{ 公升}$   
 $V = 0.02 \text{ mg} \times 100 \text{ ml} \times 1/10 \text{ mg} = 0.2 \text{ ml}$

註3：計算 Kinetin 原液之用量如下： $0.01 \text{ g}/100 \text{ ml} \times V = 2 \text{ mg}/l \times 1 \text{ 公升}$   
 $V = 2 \text{ mg} \times 100 \text{ ml} \times 1/10 \text{ mg} = 20 \text{ ml}$

## 2. 花寶培養基之調配(蘭花無菌播種用)。

- (1).在一公升容量的燒杯中、加入500毫升蒸餾水。
- (2).稱取3公克花寶一號(7-6-19)、砂糖20公克、加入燒杯內溶解，並定體積至1公升。
- (3).加入2公克活性碳後，以1 N HCl或 1 N KOH調整pH值至5.0，再加8公克洋菜，在水浴中加熱使洋菜充分溶解後分裝於三角瓶內，並以鋁箔紙或橡皮瓶塞封閉瓶口。
- (4).將分裝好之培養基，放入高壓蒸氣滅菌鍋中滅菌，在溫度121°C，壓力1.05 kg/cm<sup>2</sup>下維持15~20分鐘即可，關閉加熱電源或瓦斯。
- (5).待壓力自然下降至0時，開啓放氣閥，打開鍋蓋，取出培養基，放在乾淨的貯藏櫃中備用。

## 二、影響培植體之生長途徑及器官分化之主要因子

### 1、培養基中植物生長素(auxin)及細胞分裂激素(cytokinin)的濃度與比例：

植物生長調節劑對培養中培植體之器官分化有很明顯之作用，其中影響最顯著者為植物生長素和細胞分裂激素之濃度比，比值大時，有利於根之形成，比值小時可促進芽之形成。植物生長素中最常用者為 IAA、IBA、NAA 及 2,4-D，其中IAA屬植物自生之植物生長素，具有誘導發根之效果；IBA誘導生根之效果更好；而NAA除有利發根及癒合組織誘導外，更有利於單子葉植物的分化；低濃度之 2,4-D 則有利於胚狀體之形成，但卻阻礙胚狀體之進一步發育。細胞分裂激素中較常用者為Kinetin、BA、Zeatin 及 2ip，皆具有促進細胞的分裂和分化效果，可延遲組織之衰老。激勃素(GA)不利於芽之分化，但能促進芽的伸長生長。

2、培植體大小：培植體愈小，再生能力則愈弱；培植體愈大，較易自然地誘發芽體發生。

3、培植體之生理年齡：幼年期較成熟期的組織容易再生，生長中之部位較休眠的部位再生能力強，因此木本植物常利用強剪，以產生幼年性枝條利於培養。

4、不斷進行繼代培養，會降低器官分化的能力及增加突變的機率。

- 5、培養基內氧之高低：當氧之供給降低時，有助於枝芽之形成；增加含氧量，則有助於發根。
- 6、光質與光強度：光譜中藍光可促進芽之形成；而紅光有助於生根。

### 三、培植體褐化之預防

切取培植體時造成之傷口，常會引起組織之褐化，針對較易褐化之培植體，有下列幾種預防方法：

- (1).培養基添加活性碳、椰子汁等。
- (2).降低培養基之pH值。
- (3).在黑暗中培養一段時間後再移至光亮處。
- (4).提高培養基中鉀及銨離子之濃度。
- (5).先在液體培養基中振盪培養一段時間後，再移至固體培養基。
- (6).培養初期(1~2星期)以稍低之溫度(如20°C)為宜。
- (7).以抗氧化劑，如新鮮配製之100 mg/l ascorbic acid或150 mg/l citric acid溶液處理2~16小時。

### 四、人為染色體倍加

#### 【秋水仙鹼之配製】

- 1.配製原液(stock solution)：將4克秋水仙鹼粉末與2ml DMSO(dimethyl sulfoxide)，0.2 mg GA和0.1 ml Tween 20充分攪拌至完全溶解後，加蒸餾水全量至100 ml，調整pH值為5.7(此原液濃度為含秋水仙鹼40,000 ppm)。
- 2.在配製含有秋水仙鹼之洋菜培養基時，先配置基本培養基，置於高壓殺菌釜(autoclave)中殺菌後，在無菌操作台上冷卻至60°C以下，加入經0.45  $\mu$  millipore membrane過濾之秋水仙鹼溶液(因60°C以上可使秋水仙鹼失去生化活性)，攪拌均勻後，分別盛裝於經殺菌過之容器中。

#### 【秋水仙鹼之處理法】(蘆筍花葯培養)

- 1.培養基法：配製如0.4%濃度秋水仙鹼之MS培養基(含3% sucrose)，培養約2~3 mm之單倍體莖頂。一個月後，繼代培養於不含秋水仙鹼之繁殖培養基。

2. 浸漬法：將5mm長的單倍體莖頂浸漬於0.4%秋水仙鹼溶液中，浸漬2小時，再切取1mm莖頂培養於不含秋水仙鹼繁殖培養基。
3. 液體振盪：切取5mm長之單倍體莖頂，於不同濃度(0.001~0.005%)秋水仙鹼溶液中行振盪培養(suspension culture)，振盪速率為150 rpm，10~15天後，切取3mm莖頂培養於不含秋水仙鹼之繁殖培養基。
4. 羊毛脂塗抹法：將1.2%秋水仙鹼溶液與羊毛脂(lanolin)充分拌均勻後，塗抹於3~4個月齡盆栽單倍體幼苗新發出之分蘖芽頂端，每日處理一次，連續六次。
5. 棉花點滴法：以棉花沾取1.2%之秋水仙鹼溶液，點滴於盆栽單倍體幼苗新長出分蘖芽之頂端，每日處理一次，連續六次。
6. 經由癒合組織誘致的染色體倍加法：切取約2~3 mm長之單倍體莖頂，培養於含有1~2 mg/l 2,4-D或2 mg/l NAA之MS培養基，置於黑暗中培養，待癒合組織生成後，再繼代培養於含有1 mg/l NAA、0.5 mg/l BA、40 mg/l Adenine sulfate、170 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、500 mg/l Malt extract、2.5% sucrose及MS基本鹽類之分化培養基誘導植物體形成。形成之植株進行外表型及染色體倍數性調查。

## 五、健化與瓶苗移植

利用組織培養大量繁殖之最終目的即為移出瓶外生產種苗，而瓶苗移植前後之生長條件差異很大(表三)。因此使瓶苗適應這種環境變異，為提高成活率之關鍵，一般將培養瓶放置床逐漸增加光線強度，使瓶苗逐漸適應溫度、光質、光線強度之變化，慢慢產生保護構造，這一系列之操作即稱為健化(hardening)。

一般經1~2週之健化後即可將瓶苗取出，洗淨附在植物體上之培養基，種植於清潔無病蟲之介質，並以噴霧或塑膠布保持濕度，一些未發根之瓶苗可以NAA或IBA處理促進其發根。

表三、瓶苗移植前後之生長條件差異

項目	試管(瓶)內	試管外自然環境
溫度	常為恆溫或變化小，22~27°C	溫度日、夜變化大，15~35°C
光線強度	弱(約100~200呎燭光)	強(約1,000~10,000呎燭光)
光質	人工燈光，光譜範圍窄	自然日光，光譜範圍廣
相對濕度	近於100%	變化大，60~90%
根系	不需要	必須長新根
光合作用	不需要或效率低	需光合作用營生
生長素	以培養基外加為主	主要由植物體內自然合成
環境	無菌狀態	有菌狀態
保護構造	蠟質、角質等發育少、植株容易失水	植株需產生保護構造，以減少失水

進行瓶苗移植之前後應注意下列幾點：

1. 苗之高度約需3~5公分，培養基內細胞分裂激素之濃度應降低，以利幼苗之生長而不再分生苗體。
2. 移植後不易發根之植物，可於培養基內添加植物生長素發根劑，以誘導發根；而移植後容易發根之植物，則不須於瓶內誘導發根。
3. 移植後必須保持適當的溫濕度，並遮陰保護幼苗。