

蔬菜組織培養技術

張有明

台灣省農業試驗所

植物組織培養的定義：

利用植物具有分化全能(totipotency)的特性，在人為調控的無菌環境下，供應人工調配的養分，進行植物器官、組織或細胞培養的一種技術。

組織培養在蔬菜上之應用：

一、基本的研究：

1. 提供組織、器官發生之研究。
2. 遺傳(體細胞遺傳)上之研究。
3. 寄主、病原菌間相互關係之研究。

二、經濟上的利用：

1. 作物品種的改良—
 - (1) 珠心胚及未成(雜交)熟胚培養。
 - (2) 自然突變或人為誘變育種。
 - (3) 花藥或小孢子培養等單倍體育種。
 - (4) 原生質體培養—體細胞融合之雜交育種。
 - (5) 植物基因轉移的應用。
2. 無病(毒)苗的生產
3. 無菌播種或營養系的大量繁殖
4. 育種材料或種原的保存與交換

組織培養的配備：

一、設備與器具：

1. 操作室：可放置純水製造機(或蒸餾水製造器)、高溫高壓殺菌釜、冰箱、水槽等。
2. 接種室：放置無菌台等、超音波振盪器、解剖顯微鏡……等。
3. 培養室：培養材料、振盪器等放置室，可控制不同的溫度、光線等培養條件。
4. 精密儀器室：放置解剖顯微鏡、倒立顯微鏡、高倍率光學顯微鏡、pH 測定計、精密天平與離心機等。
5. 藥品保存室：乾燥冷涼之場所，保存可放置室溫的藥品。
6. 作業室：調配及分裝培養基的場所
7. 所需器具：玻璃器皿—試管、三角瓶、培養皿…等，操作工具—解剖刀、鑷子、剪刀、挑針…等，及消毒、擦拭和標示…等用品。

二、培養基成分：

1.水：二次蒸餾水或去離子水。

2.無機鹽類—

大量元素：N,P,K,Ca,Mg,S …

微量元素：Fe,Mn,Zn,Cu,Cl,Co,Mo,B,I …

3.有機鹽類—

維生素或有機酸類：thiamine HCl, pyridoxine HCl, nicotinic acid, folic acid, ascorbic acid, Vitamin A, Vit. B₁₂, Vit. D₃; malate, citrate…等。

氨基酸類：Glutamine, Glycine, Tryptophan 等。

複合有機物：Casein hydrolysate, Yeast extract, Malt extract, Ginseng powder, Calf serum, 椰子汁、香蕉泥、蘋果泥…等。

4.碳源：蔗糖、葡萄糖、果糖、甘露蜜醇(mannitol)、木酮糖(xylose)、山梨糖醇(sorbitol)、肌醇(inositol)…等。

5.植物生長調節劑：

生長素類(auxins)：IAA, NAA, IBA, 2,4-D, picloram, PAA (penylacetic acid)…等。

分裂素類(cytokinins)：kinetin, BA, 2ip, thidiazuron, zeatin, BPA,…等。

其他生長調節劑：激勃素(gibberellins), ABA, CCC, C₂H₄, ancymidol, colchicine, jasmonic acid …等。

6.固態培養：洋菜(agar),gelrite, agarose …等。

7.其他添加物：活性碳(charcoal), PVP, MES(2-[morpholino] ethanesulfonic acid)…等。

8.常用之基本培養基配方—

Knudson C (1946)

MS (Murashige & Skoog, 1962)

White (1963)

Nitsch & Nitsch (1967)

B5 (Gamborg,1968)

SH (Schenk and Hildebrandt,1972)

N6 (Chu,1975)

Kao & Michayluk (1975)

WPM (Lloyd and McCown,1980)

三、培植體：

分生組織 (meristem)(生長點)—莖頂、側芽、葉尖、根尖…等。

生殖器官—花藥、胚珠、珠心、子房、花梗、花蕊或花序…等。

具再生能力之組織或器官：莖段、葉片、葉柄、珠芽、鱗片、走莖(rhizome)或根段…等。

四、滅菌方法：

培養基與培養器皿：高溫高壓滅菌 (121°C , 1.05 kg/cm^2 , 15-25 mins)。

操作器具：酒精擦拭、噴灑及酒精燈熱燒或紫外線照射。

培植材料：種植在乾淨環境(如溫室中)，採摘培植體前先進行病蟲害防治；培植體的表面滅菌—75%酒精、次氯酸鈉、雙氧水或抗生素…等。

五、培養環境：

溫度：一般約 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，但依作物不同會有變化。

光強度：培養—暗培養或 1000-3000 lux 光照，健化時提高光照—3000-10000 lux。

光週期：12-16 hrs 較普遍。

光質：日光燈，植物生長燈。

微氣候：封蓋種類、封閉程度和材質。

實習操作：

供試材料

一、甘藍花藥培養：

1. 莖粗一公分以上的甘藍植株，可進行低溫春化處理($5-8^{\circ}\text{C}$ 約一個月)
2. 當抽苔後，摘取 3-4 公分長的花序頂端(只有花蕾不含已經開的花)；摘除尖端小花蕾，用紗布包好。
3. 置乾淨的燒杯中，先以 70-75% 酒精消毒 30 秒，再用無菌水清洗 2-3 次。
4. 換上加有數滴 tween 20 的 1% 次氯酸鈉(約稀釋 5 倍的 chlorox) 溶液，置超音波震盪器中處理 3-5 分鐘，接著用無菌水清洗 2-3 次；同樣步驟重複兩次。
5. 消毒過的材料置無菌操作台中，摘下大小 2-4 mm 的花蕾，用鑷子剝去外苞片，每剝一次鑷子就要消毒一次。
6. 露出花藥，將花藥取下，置入平放在培養基上，花藥開裂線向下。
7. 每一試管放入 6-10 個花蕾後封口，並標示日期、品系及處理代號。
8. 置 37°C 高溫下暗處理 1-2 天，再移到的 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培養室中暗培養。

二、原原種馬鈴薯的繼代培養

1. 在無菌操作台上，由原培養試管中取出馬鈴薯枝條；置於滅菌過的培養皿中，每 1-2 公分切成一小段，每段至少有兩個節以上(內含有兩個以上側芽)。
2. 將切下之莖段，移至新的培養基中，約埋入三分之一的莖段。
3. 燒管口及鋁箔封紙，再以鋁箔紙封好口並標示日期、品系...等。

培養基的配製

一、調配母液：

Murashige 和 Skoog (1962) 配方

	1 X	10 X	50 X
1. NH ₄ NO ₃	1,650 mg/l	16,500 mg/l	82.5 g/l
KNO ₃	1,900	19,000	95.0
2. MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3,700	18.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	86	0.43
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	223	1.115
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25	0.00125
3. CaCl ₂ .2H ₂ O	440	4,400	22.0
KI	0.83	8.3	0.042
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.25	0.00125
4. KH ₂ PO ₄	170	1,700	8.5
H ₃ BO ₃	6.2	62	0.31
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	2.5	0.013
5. Na ₂ -EDTA	37.3	373	1.865
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	278	1.39
6. Thiamine-HCl (B ₁)	0.4	4	0.02
Nicotinic acid (F)	0.5	5	0.025
Pyridoxine-HCl(B ₆)	0.5	5	0.025
Glycine	2.0	20	0.1
7. Myo-inositol	100	1000	5
8. Sucrose	30,000		
9. Agar	9,000		
10. 高壓殺菌前的 pH 值	=5.7±0.1		

二、濃度的換算：

1. 摩爾濃度(M):

$$1 \text{ 摩爾濃度(M)} = \frac{1 \text{ 摩爾重量(克)}}{1 \text{ 公升的蒸餾水}}$$

2. mg/l (ppm):

$$1 \text{ mg/l} = \frac{1 \text{ 毫克(mg)的藥品重}}{1 \text{ 公升(l)的蒸餾水}}$$

3. 由摩爾濃度 (M) 轉換成 mg/l (ppm):

$$\text{摩爾重量(克)} \times \text{摩爾濃度(M)} \times 1000 = \text{mg/l (ppm)}$$

4. 從母液稀釋到所需要的濃度和溶液量:

$$m_1 \times V_1 = m_2 \times V_2$$

(m = 濃度, V = 體積, $_1$ = 母液, $_2$ = 所需要的溶液)

三、配製培養液步驟：(以配製 1 公升的 MS 培養基為例)

1. 母液(stock solu.)一般是配製成 50 或 100 倍；不耐高溫消毒物質者(如 zeatin, GAs …等)的母液配製，要用 0.45 μm 以下的微孔過濾膜(millipore)過濾，並裝入經高溫高壓殺菌過的無菌瓶中《※均要在無菌操作台中執行》。
2. 取 1.5-2 公升大小的燒杯，先只加入 500-600 毫升的蒸餾水或去離子水。
3. 第一步先加入無機鹽類(1-5)母液，取的量、稀釋的原則和方法依照步驟二濃度換算進行。
4. 再加入有機鹽類(6,7)母液。
5. 加入生長調節劑(auxins, cytokinins, …等)和其他成分(例如：peptone, casin hydrolysate, yeast extract, 香蕉泥, 蘋果泥…等)《※ 但不能耐高溫高壓消毒者須除外》。
6. 攪拌完全均勻後，再加入蔗糖或葡萄糖…等糖類。
7. 最後加入蒸餾水到總體積近 1 公升的量。
8. 用 1N 的 HCl 或 NaOH, KOH 將 pH 值調到 5.7 ± 0.1 。
9. 若為固態培養基則加入洋菜粉…等，並利用微波爐加熱將洋菜融解。
10. 分裝至試管、培養皿或三角瓶中，並標示之《※ 需加入不耐高溫消毒物質者可暫時不必分裝》。
11. 置高壓殺菌釜中，進行 121°C (15 lb/in^2) 的高溫高壓殺菌 15-20 分鐘；器皿消毒可延長 10-20 分鐘時間。
12. 殺菌後迅速取出直立或斜放至所需的斜面或角度，使冷卻至室溫，並標示之。
13. 需加入不耐高溫物質的培養基，則當溫度冷卻至 60°C 以下時迅速加入不耐高溫物質並攪拌均勻後，再分裝至試管、培養皿或三角瓶中(均要在無菌操作台中執行)。
14. 配好的培養基暫時不用可包封，置 10°C 以下，約可保存 3-6 個月。

附表一 組織培養所需之基本設備、儀器及藥品

設備、儀器或藥品	參考價格
無菌操作(接種)台	單人操作約 2 萬元，2-3 人操作約 5-6 萬元
高溫高壓殺菌釜	中型約 3-4 萬元，大型約 10-20 萬元
蒸餾水製造機	約 5-10 萬元，亦可用逆滲透(RO)濾水器(約 1-2 萬元) 代替或向蒸餾水製造商買蒸餾水
微量天平	小數點二位以下(約 3-8 萬元)
酸鹼值測定器(pH 計)	簡易型約 2000-4000 元
解剖顯微鏡	簡易型約 2-4 萬元(視需要採購)
液態培養震盪器	大型，價約 5-6 萬元(視需要採購)
冷氣機	市價(依坪數大小)
大型冰箱	家用冰箱即可(需含有冷凍室，以不自動除霜者為佳)
培養架	角鋼組合(1.5 公尺 x 0.6 公尺 x 2 公尺)五層，連網架、 燈座每組約 8000-12000 元
試管及試管架 (壓克力材質)	試管約 5 元/支，試管架約 50 元/個(可放 10 支試管)
三角瓶(蘭花瓶)	蘭花瓶每支約 8-10 元
玻璃培養皿	約 15-20 元/個
培養基(液態)分裝器	一支約 2000-3000 元
量筒	20,50,100,250,500,1000 cc 各 2-3 組
燒杯	100,250,500,1000,2000 cc 各 3-5 組
玻璃瓶	500,1000,2000 cc 各 3-5 組保存母液或濃縮(stock)液
酒精燈及支架	約 200-300 元/組
鋁箔紙	約 60-90 元/卷
鑷子、剪刀、解剖刀	常用解剖刀片 10,11,21 號，刀柄 3,4,7 號(依需要選號)
95%酒精	公賣局約 40 元/公升
蔗糖	台糖的「細粒白特砂」可也
MS 鹽類	Sigma 公司有配好的大量及微量元素混合液販售
漂白劑(Clorox)	5%次氯酸鈉，約 15-20 元/公升
活性炭	粉末狀
洋菜粉	2500-3500 元/磅或水晶洋菜(gerlite) (Sigma)
花寶(Hyponex)一號	(N:P:K=7:6:19)台和園藝公司賣
植物生長調節劑(賀爾蒙)	NAA, IAA, IBA, Kinetin, BA, 2,4-D, GA ₃ ,...
其 它	消毒網籃、耐高溫消毒袋、棉花、橡皮筋、紗布、濾 紙、電源插座、油性簽字筆、棉手套、標示帶、...

附表二

荷爾蒙溶解方法

藥 品	常用母液濃 度	溶解條件
2.4-D	100mg/l	95% Alc.
2.4.5-T	100mg/l	95% Alc.
2ip (millipore 較佳)	100mg/l	1N NaOH
ABA (millipore)	100mg/l	1N NaOH
BA	100mg/l	1N NaOH
BPA [n-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)-adenine]	100mg/l	95% Alc.
GAs (millipore)	500mg/l	1N NaOH
IAA (millipore)	100mg/l	95% Alc.
IBA(millipore 較佳)	100mg/l	1N NaOH
Jasmonic acid (millipore)	500mg/l	95% Alc.
Kinetin	200mg/l	0.5N HCl
NAA	200mg/l	1N NaOH
Picloram (似 2.4-D)	100mg/l	100% Alc.
TIBA (2,3,5-Triiodobenzoic acid)	100mg/l	1N NaOH
Zeatin (millipore)	200mg/l	1N NaOH

