

植物組織培養之擬胚化培養

◎ 農試所農藝組 陳威臣 夏奇鉍

一、前言

近年來，歐美國家種子公司紛紛致力於植物組織培養研究，可知組織培養技術與種苗生產事業已息息相關，利用組織培養技術發展的人工種子(artificial seeds、synthetic seeds、somatic seeds)極具潛力，假若體胚(somatic embryos)大量繁殖生產技術開發成功、遺傳變異受到控制、可進行同步化(synchronization)生產，且人工胚乳與種皮研製成功，則一般利用無性繁殖之作物亦可利用人工種子進行播種繁殖。組織培養利用再生大量繁殖方式可區分爲器官化(organogenesis)與擬胚化(embryogenesis)兩途徑，器官化途徑通常是芽體與根部分別誘導完成，需要兩個階段才能形成完整植株，而擬胚化途徑因類似種子之發育過程，則可一次發育成完整植株，因產生的體胚數量極爲龐大，更有利於作物的大量繁殖；其他如作物改良(篩選優良細胞再生、基因轉殖、體細胞雜交)、人工種子製作，以及遺傳質(種原)保存等農業上的應用，擬胚化培養技術均佔有相當重要之地位。本文即介紹種子胚與體胚形成過程之差異，並且闡述擬胚化培養於組織培養大量繁殖上所具有的重要意義及其利用。

二、種子胚與體胚之形成過程

一般而言，種子胚與體胚發生的形態變化並無明顯差異，然而其形成過程則是經由不同步驟，例如胡蘿蔔(*Daucus carota*)之種子胚與體胚形成過程並不全然相同。種子胚發育過程主要是指卵細胞受精後形成接合子(zygote)，而後接合子發生不均等分裂形成二個子細胞，其中較小但原生質濃厚者爲頂端細胞(terminal cell)；另一較大且液胞化者爲基部細胞(basal cell)；此後，頂端細胞形成原胚(proembryo)、原始皮層(protoderm)、表皮組織(dermal tissue)、原始形成層(procabium)與基本分生組織(ground meristem)；而基部細胞則形成懸柄(suspensor)與囊細胞(vesicular cell)；爾後，在雙子葉植物如阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)則有球型、長方型(oblong)、心型、魚雷型、子葉型及成熟乾燥期等階段之出現，而且更可將此過程細分多達20個步驟。然而，植物體胚發生是指在特定條件下雙或單倍體體細胞，未經配子融合而形成種子胚的途徑，亦即直接由任一組織之細胞發育成胚狀體的過程，此種體胚形成方式於自然環境下極爲罕見，例如孤雌生殖(apomixis)，然而絕大部分例子則是發生於組織培養過程。

植物組織培養研究上，部分學者利用體胚形成過程中外部形態的差異用以區別不同的發育階段，首先是一般體細胞經誘導而轉變成胚性細胞(embryogenic cell)，即原胚期(proembryonal)，隨之增殖並通過組織分化，進入類似種子胚發生的階段，此

作　　者：夏奇鉍副研究員
連絡電話：04-23302301轉108

後對於雙子葉與裸子植物來說則出現球型(globular)、心型(heart)、魚雷型(torpedo)及子葉型(cotyledon)，而單子葉植物則形成盾片型(scutellar)及胚芽鞘型(coleoptilar)，最後是成熟(maturation)及體胚再生成苗階段(regeneration, conversion)。表一即列出數種植物體胚的形成過程，例如延胡索(*Corodarlis yanhuso*)與菊花(*Dendranthema grandiflorum*)之球型、心型、與子葉型期；針葉樹之懸柄胚型(embryonal suspensor)、球型、心型、魚雷型與子葉型期；當歸(*Angelica sinensis*)、甘藷(*Ipomoea batatas*)與胡蘿蔔之球型、心型、魚雷型與子葉型期等階段。此外，部份學者則依其誘導發生或操作將體胚形成過程分爲數個階段，如體胚發生感受態獲得階段(embryogenic competence)、胚性細胞誘導(induction)與決定(determination)階段、胚性細胞增殖及組織分化階段，以及體胚成熟階段(maturation)；白雲杉(*Picea glauca*)體胚發育被區分爲誘導、增殖、成熟與再生階段；翼豆(*Psophocarpus tetragonolobus*)體胚發生過程則可分爲誘導、發育與成熟階段。von Arnold *et al.* (2002)則將體胚發育的操作過程區分爲誘導、增殖、預成熟(prematuration)、成熟與再生等五個階段。綜合以上所述，不同作物或試驗觀察之方式，其所定義的體胚發育階段雖然並不完全相同，但其過程則大抵相類似(表一)。

表一、 植物體胚發生方式與發生過程

作物	學名	體胚發生方式		體胚發生過程	引用文獻
		直接	間接		
甘藷	Ipomoea batatas	v	v	球型、心型、魚雷型、子葉型	Zheng et al., 1996
白雲杉	Picea glauca		v	懸柄胚型、球型、心型、魚雷型、子葉型期	Attree and Fowke., 1993
白雲杉	Picea glauca		v	誘導、增殖、成熟、再生	Attree and Fowke., 1993
延胡索	Corodarlis yanhuso	v	v	球型、心型、子葉型	Kuo et al., 2002; Sagare et al., 2001
胡蘿蔔	Daucus carota		v	球型、心型、魚雷型、子葉型	Toonen et al., 1996
胡蘿蔔	Daucus carota	v		球型、心型、魚雷型、子葉型	Nishiwaki et al., 2000
菊花	Dendranthema grandiflorum	v	v	球型、心型、子葉型	Tanaka et al., 2000
椰子	Cocos nucifera		v	(未說明)	Fernanado and Gamage, 2000
當歸	Angelica sinensis	v	v	球型、心型、魚雷型、子葉型	陳等，1998；黃等，1996
樅樹	Abies alba x A. cephalonica A. alba x A. numidica		v	(未說明)	Salajova et al., 1996
翼豆	Psophocarpus tetragonolobus	v		誘導、發育與成熟	Gupta et al., 1997

三、組織培養大量繁殖之擬胚化培養方式

組織培養經再生途徑之大量繁殖路徑有三種：(A)由原有之分生組織誘導大量芽體產生；(B)由培植體直接產生胚狀體，或是直接分化成不同器官，以及(C)先誘導培植體產生癒合組織，再促使癒合組織分化形成胚狀體或者分化成不同器官。若依培植體分化情形而言，路徑(A)屬於直接的器官發育培養；路徑(B)與(C)皆爲體細胞經由逆分化後之再生培養方式(regeneration)，此外(B)與(C)兩種途徑之植物體形成又可分爲器官化(organogenesis)與擬胚化(embryogenesis)分化方式；因此，路徑(B)屬於直接的(directly)擬胚化或器官化分化；而路徑(C)則爲間接的(indirectly)器官化或擬胚化分化過程。

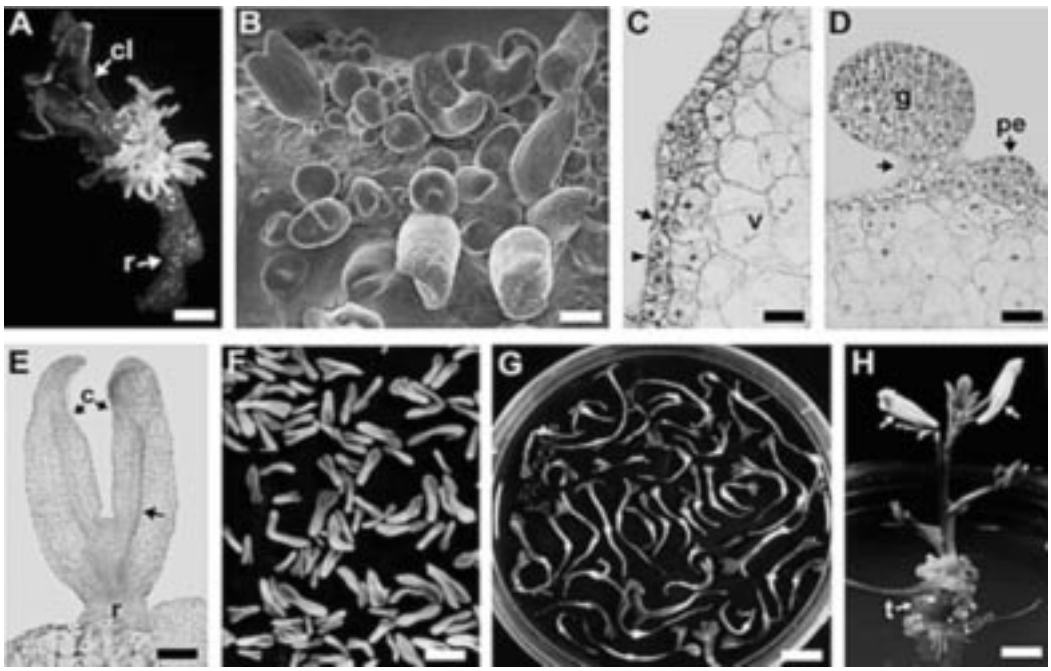
擬胚化培養的第一個步驟便是要由培植體誘得體胚，有些培植體只要於不含生長調節劑之基本培養基上就可產生體胚，此種培植體大都含有原胚決定細胞(proembryonal determinate cells; PEDCs)，只要條件合適便能直接產生體胚，如延胡索、當歸和甘藷等作物屬之；另一些體胚誘導需要較複雜的培養基組成，須藉由生長調節劑(auxins and/or cytokinins)誘導以促使其進行逆分化，形成誘導胚決定細胞(induced embryonic determinate cells; IEDCs)，此類作物往往以間接方式進行體胚發生，而且大部份的植物均屬此類(表一)。前述所謂的直接體胚發生是指，體胚直接從原培植體不經癒傷組織階段發育而成，而間接體胚發生則從癒傷組織、懸浮細胞或原生質體發育成爲體胚，有時也從體胚表皮細胞發育而成，此過程稱之爲重複體胚發生(repetitive somatic embryogenesis)，所形成的體胚則稱爲次生胚或二次體胚。延胡索(圖一)。此外，菊花、甘藷與當歸體胚發育過程則同時具有直接與間接兩種途徑。

就組織培養經再生途徑之大量繁殖而言，擬胚化培養方式具有下列幾項優點：(1)擬胚化培養由培植體誘導形成具有根與莖的體胚，一個步驟便能形成植物體；然而器官化培養須先誘導芽體形成，再改變培養基成分後誘使發根，需兩個階段才能完成；(2)擬胚化培養產生的體胚數量極爲龐大，而體胚又可再生二次體胚(secondary embryo)，更有利於作物的大量繁殖；(3)大量體胚經過適當包裹程序(encapsulation或coating)，便能形成無數人工種子；(4)透過休眠期的誘導，將人工種子乾燥或進行低溫保存(cryogenic preservation)可長期貯存體胚；(5)由於器官發生常是多細胞起源，並不利於性狀保存與純化，而大部分原起於單細胞之擬胚則無此缺點，尤其有利於生物技術的轉殖操作。

人工種子雖已廣泛應用於許多模式植物，包括胡蘿蔔、苜宿與甘藷等作物，但與眞實種子相較仍須克服許多問題，也因此使得人工種子在發展應用上仍有相當改進的空間。

四、結語

擬胚化培養或人工種子是組培研究者的熱門對象，雖已開啓另一應用大門，然目前仍只有少數植物應用人工種子繁殖，有些因商業價值無法獲得產業界青睞，但部份卻是因爲無法確實建立擬胚化培養之完整過程而放棄。本文僅針對種子胚與體



圖一、利用ABA誘導延胡索二次體胚發生之大量繁殖。

(Kuo等, 2002)

胚發育過程做一簡單描述，同時對於組織培養大量繁殖中之擬胚化培養也有初淺介紹，期能使讀者對於體胚與種子胚的區別與其應用有更進一步的認識。近年來，許多學者研究均指出種子胚與體胚發育過程中特殊基因的表現，若能充分了解且控制體胚發育過程，則利用生物反應器大量生產體胚之方式將指日可待，期能使得體胚發生與擬胚化技術成爲作物育種改良與繁殖上的有利工具。

五、參考文獻

黃漢龍、陳忠川、陳威臣、蔡新聲。1996。中華農業研究 45：156-163。

黃學林、李筱菊。2000。科學農業 48：120-127。

Dodeman, V. L., G. Ducreux and M. Kreis. 1997. J. Exp. Bot. 48: 1493-1509.

Fernanado, S. C. and C. K. A. Gamage. 2000. Plant Sci. 151: 193-198.

George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. the technology. 2nd edition, 574 pp. Exegetics Ltd.

Janick, J. 1993. Acta Horti. 336: 207-215.

Kuo, C. L., A. P. Sagare, S. F. Lo, C. Y. Lee, C. C. Chen and H. S. Tsay. 2002. J. Plant Physiol. 159: 423-427.

Nishiwaki, M., K. Fujino, Y. Koda, K. Masuda and Y. Kikuta. 2000. Planta 211: 756-759.

Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69: 233-249.