

植物組織培養與人工種子

森林生物系 | 黃怡菁

一、組織培養與其發展簡史

植物組織培養技術顧名思意即利用植物體上的各種器官、組織或細胞作為培植體：大如根、莖、葉、芽、花序、子房、胚珠、花藥、花粉、胚等，小如懸浮細胞、原生質體、生長點等，無菌培養於透光的容器內，並於容器內提供無機鹽類、碳素、維生素、胺基酸或其他有機成分及生長調節物質，同時控制培養的環境因子諸如溫度、光線或氣體成分等，使培植體生長分化及再生甚至養成獨立個體小植株(plantlet)的這一系列操作，又可稱為體外培養技術(in vitro technology)。

組織培養乃是科學、技藝及藝術之結合，以其基於細胞全能性(cell totipotency)的理念，即以為每一個體細胞均具有與受精卵相同之遺傳物質，若給予適當的誘導條件便可使其再生為新個體的能力。因此以人為的方式，利用各種不同的誘導條件促使培植體細胞生長、分化、再生，以達多量繁殖及複製的目的。因為是基於遺傳、生理基本理念，加上其他學問的配合因此為一門科學，然而用各種人為方式加上各種不同之條件控制，因此也涵蓋了部分技藝及藝術的概念。

組織培養自早期1902年Haberlandt及Hannig等開始由十字花科、豆科，乃至1943年Kundson於蘭科非共生發芽無菌播種成功等漸次蓬勃發展。加以在1960年代由於植物荷爾蒙功能的揭曉及應用，而Murashige及Skoog於1962年以煙草癒合組織檢定系統開發出完整的人工培養基，即目前廣用的MS配方，奠定了組織培養的基礎技術，從此有更多學者加入研究，終於促成在極短的時間內快速進步，達到目前應用的盛況。在這短短的參、肆拾年內，組織培養的再生系統由逆分化、再分化演進到直接分化及轉型，由器官發生(organogenesis)途徑跨進體胚發生(somatic embryogenesis)。由於體胚形成具有雙極性，有如有性胚一

般，具有完整的胚芽及胚根的分化，而且高品質體胚的必備條件為同調發育大小一致、分立之單胚、胚芽胚根發育正常、高胚苗轉換率、具遺傳穩定性及耐貯藏與高活力。比如現今已知香蕉懸浮細胞體胚再生系統，在細胞表現最適期以一個125ml的三角瓶，含50ml培養液，就可以生產至少4萬個體胚，可供應10-13公頃栽種之需要。而且若加以規模化的生產，如使用懸浮細胞及生物反應器的生產模式則效率更高。以聖誕紅而言，1公斤的懸浮培養可以培育出十萬個體胚；苜蓿以氣升法作為攪拌系統，每毫升的育胚率可達228個。因此使用體胚再生系統顯然具有無性大量繁衍目的植物的潛能，惟美中不足的是體胚再生系統常缺乏種皮或胚乳等包被的構造，體胚含水量又較高，容易失水，不耐縮水乾燥及保持活力，因此為配合中長期貯存運輸及機械播種，裸露的體胚就需要加以保護。

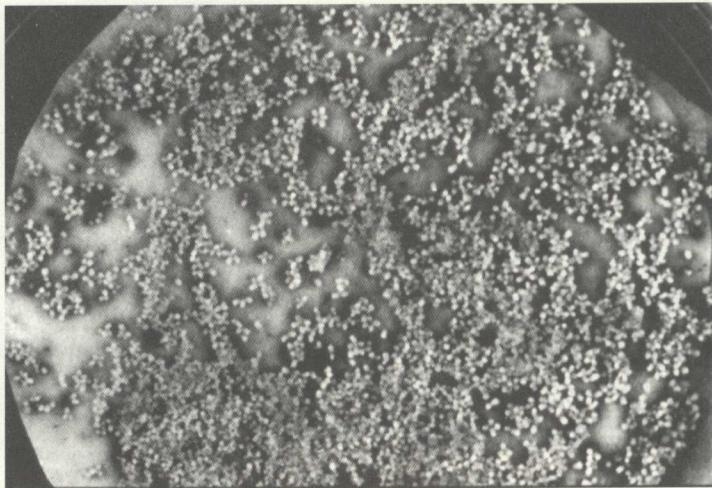
二、人工種子定義的起源及其擴充經過

而有關上述體胚發展潛能及需要，早在1977年就由Murashige正式提出，他定義人工種子的概念為利用組織培養中所得到的每一個單一體胚，外面包上一層人工種皮，形成狀如種子的繁殖體，以供運輸、貯存及播種用，而且這人工種子可經試管內或試管外培養而轉換成小植株。由於人工種皮必需對體胚無害且具保護作用，甚至攜帶養分、生長控制劑和其他有助於體胚發芽及轉換成植株的成分，因此需要相當的技術與研究，至今這個人工種子(artificial seed)或合成種子(synthetic seed)的概念已從未來的理想，漸次發展為真實田間的試驗及研究，期盼在不久的將來更可以成為產業的實際生產模式。

由於Murashige的原始定義是針對雙極性的體胚系統，對於許多不能或不易形成體胚的植物而言，就造成限制，因此Bapat等人在1987年時提出擴充人工

種子定義的建議，主張人工種子(合成種子)除了體胚外亦可以用側芽作為包被的對象。從此非體胚系統的培植體作為人工種子構成成員的報告便陸續增加，至今有關人工種子包被成功的例子，已不僅是體胚甚至是原球莖體(proto-corms)、葉上著生芽(epiphyllous buds)、小鱗球(microbulbs)、根莖段(rhizome fragments)、頂芽(apical buds)、不定芽(adventitious buds)、莖頂(shoot tips)、不定莖原體(adventitious shoot primordia)、細胞團(cell aggregates)、各種時期的根切段(root fragments at different stages)、類原球莖體(proto-corm-like bodies)、莖原體(shoot primordia)等。雖然如此人工種子概念發展受限於Murashige的原始定義依然有數年之久，直至1993年，數篇有關非體胚繁殖體的人工種子報告之被引用，這種廣博的定義才被國際科學組織所接受。因此在1995年Aitken-Christie等人就對人工種子作了一個更詳細的定義即以為合成種子乃是包括了以體胚、莖或其他的組織，加上了人工的外皮包被而形成可以在試管內或試管外的情況下播種者。這個定義使人工種子的概念可以延伸至任何型式的營養繁殖體，只要可以被包被而形成種子狀的結構都可以稱之。並為了使這個定義更加完全，Piccioni在1997年特別強調補充要求這個繁殖體在播種後一定要能轉化或長成小植株才能稱之為人工種子。

由於人工種子在實用上具有許多微體繁殖的好處，諸如高生產效率、完美的植物清潔狀況，可以減少所需求的繁殖體大小及空間，以及容易處理、具有貯藏性、運輸性及機械化的潛能，不但可以合理的成本大量生產繁殖高價值的營養系作物、人工授粉雜種、遺傳轉殖植物，尤其是不穩定不孕性基因型植物，而且可以作為特殊優良目的植物或瀕危植物基因

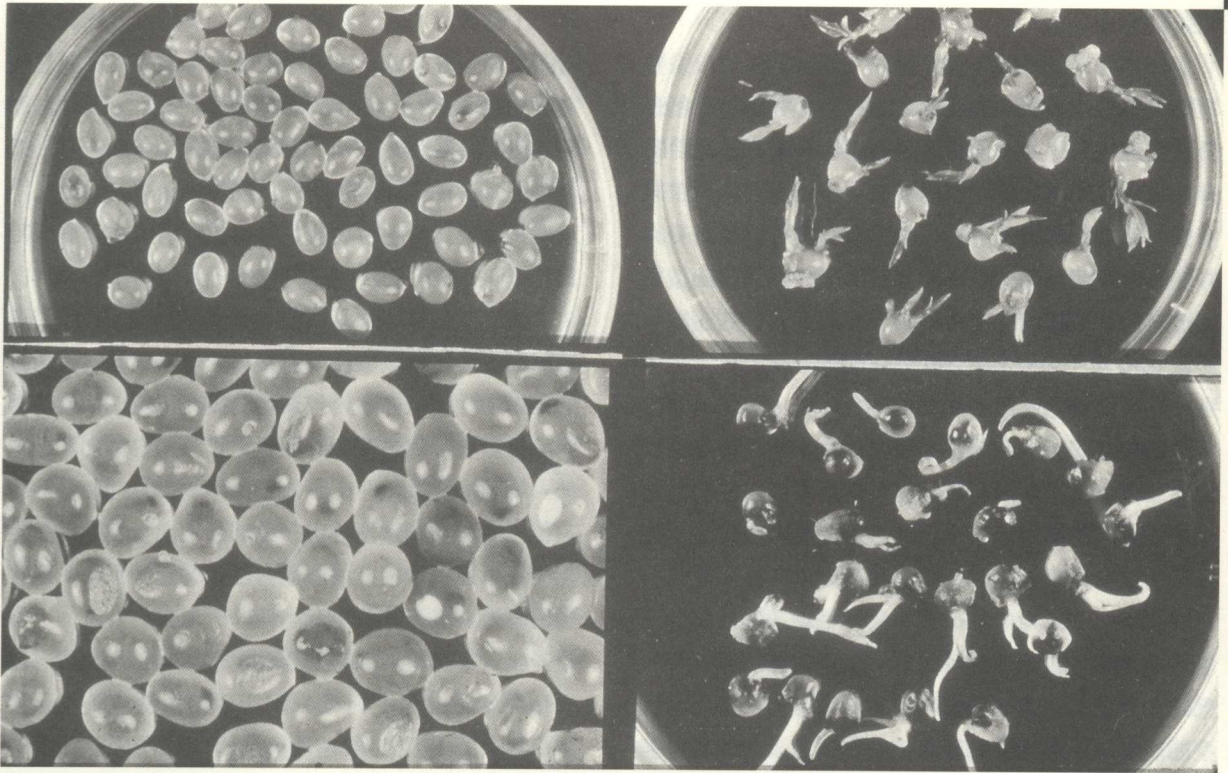


香蕉胚性懸浮細胞以濾紙橋平板培養形成體胚的情形

質的繁殖及保存方法之一，又可方便無菌無污染物質在實驗室間的交換，因此一直被許多學者所看重並強調。

三、人工種子的分類

據Redenbaugh及滕式所言，目前人工種子依其包被的方法及型態可以分為五種，即1.粉圓型人工種子(gel-coat) 2.膠囊型人工種子(capsule).3.半流體狀人工種子(fluid-drilling).4.乾燥未經包埋體胚型人工種子(desiccated uncoated embryo).5.乾燥且包埋的體胚團人工種子(desiccated coated embryo clumps)。其中粉圓型人工種子為目前研究使用最多的方式，該法是由加州遺傳公司研究員Redenbaugh於1984年所發明，乃是使用親水性凝膠(hydrogel)，包括天然與合成的聚合物將材料包被起來，屬於潮溼型人工種子，最常使用的凝膠為含納的矽藻酸鹽(Na-alginate)，即用含藻酸鹽的水溶液將培植體包被起來，再滴入含氯化鈣的水溶液中，以離子交換的方式使包被物質形成含鈣的藻膠聚合物，聚合後再用水把多餘的氯化鈣溶液洗掉。此型種子的缺點是形成的膠囊通常較濕，彼此



a、b 單極性繁殖體之例-樟樹，c、d 雙極性繁殖體-體胚系統之例-香蕉

- a.樟樹之莖段腋芽包被於3.5%藻酸鈉中，形成含枝條切段的藻酸鈣膠粒
- b.樟樹莖段腋芽包被人工種子發芽的情形
- c.香蕉體胚包被於2.5%藻酸鈉形成人工種子
- d.香蕉體胚包被人工種子發芽的情形

可能相互黏在一起，且水溶性養分容易流失，不易進行氣體交換造成呼吸作用受阻而影響培植體的發芽、轉換率。因此就有許多研究來加以改善，如1986年Redenbargh就在膠囊表面加上一層疏水的介面以減少此型種子的黏性並增加對乾燥的抵抗性。此型種子至2000年已有多種重要樹種如馬鈴薯、木瓜、蘭花、彌猴桃、蘋果、橄欖、白桑、小葉桑、黑桑及柑橘類等包被成功的例子。其次為膠囊型的人工種子，此型人工種子包括獨立的人工種皮與人工胚乳。人工種皮常是由透水性的膠囊加上塗覆在膠囊內壁的防水層所組

成，而人工胚乳常放置在人工種皮內而且不佔滿膠囊內部所有空間，以使膠囊保有氣室，繁殖體一般放置在人工胚乳上，部分裸露於氣室中。此型種子的構造包括膠囊本體及膠囊蓋，製作時先將內壁塗覆防水層，再把人工胚乳及繁殖體依次放入膠囊本體，最後再蓋上膠囊蓋，其種皮上的防水層可以防止水分散失，而氣室的設計可以使培植體的呼吸不受阻礙，此型種子在柑橘及蘋果上亦有成功應用之例。

四、人工種子包被繁殖體之分類

至於人工種子的包被繁殖體，依1998年Standardi及Piccioni的分類，可以分為兩大類即1.雙極性的繁殖體亦即體胚系統2.單極性的繁殖體，又可細分為三小類：(a)自然的單極性繁殖體。(b)微體插穗。(c)分化中的繁殖體。現就各繁殖體系統對人工種子的發展及限制

分述如下：

1. 雙極性的繁殖體-體胚系統：體胚再生可以說是組織培養最令人驚奇的成就，由於具有雙極性，是根及莖軸同時分化，不但證實了高等植物細胞全能性的存在，也因此再生了完整的植株，是作為人工種子繁殖體最完美的體系。然而一般在每一種植物內具有良好胚性再生能力的，都常只限於少數的幾個基因型，或是起始的培植體必需限於有性胚或是幼年的組織，因此體胚再生系統常不適用於選優營養系的大量選殖，此為限制體胚應用的第一因子。而人工種子在類似土壤的基質中播種時胚品質及轉換率常表現低下則為第二限制因子，再伴隨體胚大量再生而可能有的體細胞變異則為第三因子。因此近年來有關體胚的研究大都著重於再生過程的特殊階段及關鍵，諸如探討有性胚及體胚間的可能相似性、體胚細胞起源及其與母體組織或癒合組織或懸浮培養中周圍細胞的關連性、隔離和創傷的概念、原始培植體的形態和年齡、基因型的重要性、荷爾蒙和營養素的影響以及如何檢定並避免可能伴隨的體細胞變異及包被系統對體胚高轉換率的改善等等。另外如何使用生物反應器及自動化的系統來作為體胚人工種子系統的選別、包被及傳運也是人工種子產業規模化的研究重點。儘管現在體胚人工種子系統仍不能取代傳統的微體繁殖系統，但卻強烈暗示著以體胚合成種子系統的經濟競爭性，比如(1)用於雙雜交種子的生產，以苜蓿為例，以體胚人工種子系統作為選定親本構建自交營養系的大量繁殖方法可以克服親本顯著自交弱勢的困擾。(2)用於極珍貴基因質尤其是限量植物來源的轉殖個體的大量繁殖或只能用營養系繁殖作物的大量商業生產。

2. 單極性的繁殖體-由於非胚性單極性繁殖體的應用，使人工種子應用的領域有了新的前景，尤其對於無法獲得體胚系統的植物而言更是重要。此種單極性繁殖體種類的選擇一定要配合不同植物種類及其生產

目的，比如使用試管外播種系統則需考慮繁殖體轉化的能力，若只於試管內進行則僅需考慮具有發芽之能力即可。一般而言，此類繁殖體均有容易取得的優點，但其主要缺點有四：1.有位置優勢(topophysis)即來自不同位置的相同組織其分化能力不同2.休眠性3.早熟生長4.缺少強健的直根系。此類繁殖體依其形態特質又可細分為三小類，依次敘述。

(a).自然的單極性繁殖體：比如微鱗莖、根莖、球莖、葉上著生芽及珠芽等，這些繁殖體本來就是由自然界中演化而來作為營養繁殖的媒介，所以常容易轉換而且具有貯藏的組織，因此一般不需要特別誘導處理，甚至相反的還要加上 ABA或其他處理以抑制早熟生長，而且由於這些器官一般都是經由直接器官發生而來，所以很少甚至沒有遺傳上不穩定的風險。此類應用成功的例子有百合及蘭花等。

(b).微體插穗：如帶著頂芽或側芽的節、莖段。由於微體繁殖體系一旦建立則此種培植體十分容易獲得，因此這是目前單極性繁殖體中使用最廣泛的方式。但本系統常存在三個重要的問題，首先是本類繁殖體常與使用的器官性質相關，就以植物體之營養切段為例，常缺乏貯藏的組織，因此只能適應於試管內的培養情況，第二由於缺少根端，所以繁殖體常不能同時形成根系，第三整個微體繁殖系統的附加成本常比較高。由於微體插穗微弱的環境適應力，因此在試管內生長的繁殖體需要高濕度及適當營養的供應，且在其移出時需保持相當優良的環境直至繁殖體有了新的器官如新莖或葉以適應試管外的環境，因此正是此種微體繁殖小植株在溫室馴化時最大的困擾。然而這種困擾現可因包被的保護小滴如含Na的矽藻酸鈣複合體的發明而獲得舒解。因為這種包被的系統可以提供繁殖體適當的環境及營養，因此有關如何建立有效包被系統的研究，諸如包被介質的種類、包被方式、通氣性及養分供應組合等便持續進行中，甚至至今仍

為發展微體插穗人工種子的限制因子。另外為了貯藏的需要，此類人工種子常需具有人工胚乳，而此人工胚乳一般含有大量及微量營養元素、有機物(如氨基酸、維他命等)、生長調節素、碳水化合物、活性炭、殺虫劑及抗氧化劑甚至繁殖體在微體繁殖過程中所需的特殊培養基成分等。本類繁殖體系一般十分耗費人力尤其對不易發根的培植體系更明顯。另由最近的研究顯示，繁殖體包被的時期甚至可以決定本類人工種子系統的成敗，以蘋果的微體插穗系統而言，若在繁殖體以Auxin引發處理後立即包被，則會抑制發根，反之若在處理後放置幾天待根原體形成後再包被，則可獲得具有高轉換率的合成種子。此種微體插穗人工種子除了耗費人工外，目前尚有一個限制就是本型人工種子常需在洋菜固體介質中播種才能具有高的轉換率，而且在此種試管的發芽環境下，人工種子就是經過一段低溫的冷藏也還能維持極高的轉換率。但若是直接播種在類似土壤的介質或是在試管外的環境下，除非是在包被介質中加入特殊處理，比如加入抗微生物物質，或是包被介質本身具有吸濕及營養的理化特性，否則轉換率甚低。雖然本類系統有以上之缺點，但若以本系統作為植物體在實驗室或國家間的交換、聯絡或運送，以其體積小，十分容易攜帶，而且可減少植物衛生及檢疫的問題。因此綜合以上分析，只要在未來可以開發出低人工生產系統及有效包被之自動化系統則本類人工種子系統仍然具有相當的發展潛力。

(c)分化中的繁殖體：包括未成熟的組織如擬分生組織(meristemoids)、細胞團及原基(primordia)，這一類的繁殖體常不若自然單極性繁殖體及微體插穗那樣的均質，一般言本種繁殖體可以進一步發育為前二者之任一型態。此類繁殖體成功的例子如1994年由Uozumi等人所發展的辣根(*Armoracia rusticana*)根分化莖原基系統，此系統顯示如果在原基約26天大時包

被，可以成功的作成人工種子系統，反之太早包被則轉化失敗，太晚則形成叢生枝。其後也有多位學者陸續建議並歸納此種繁殖體之最適包被時機-包括各種繁殖體形態及年齡並強調其重要性。此外本類繁殖體系在自動化的過程中，尚需注意營養系純度的保證，也就是要避免在再生過程中所發生的任何變異的風險。當然本類繁殖體亦可做為基因改良遺傳種質的遞送及轉移的方式，如1996年Yoshida 就以增殖並包被培養所得的再生莖原基作為體外繁殖系統，大量繁殖選拔的雜交稻米。至於高價值及稀有植物的微體繁殖，蘭花之微體繁殖可視為此類人工種子應用的一個特有成功的例子，以其單一植物的高價值及可以直接播種於類似土壤介質的潛能。

五、結語

總之，回顧有關人工種子的研究迄今已有二十多年的歷史，也已經獲得許多有價值的結果，雖然以體胚系統作為人工種子生產系統仍為目前應用發展的主流，然而延伸包被技術至單極性繁殖體尤其是不能形成體胚發生的種類，也已經漸受重視。前瞻在二十一世紀的今日，顯然已經進入所謂的細胞農業世代，而若要形態轉型細胞農業及遺傳轉殖細胞農業完全發揮其生產及應用的潛能，必需先使作為其基礎生產方法的人工種子系統達到商業化，即需有低成本的穩定再生、轉化系統及有效包被自動化生產系統。雖然目前有效人工種子系統仍存在一些限制商業化使用的問題，但深信在二十一世紀科學的快速進步下，定然在不久的將來可以獲得解決。一旦這些問題解決，則人工種子必然會很迅速明確的進入種子市場及植物育種的領域，而屆時有效率的大量人工複製目的植物就不再只是理想，期待在不久的將來，這個人工種子的技術，不只是限於高價值的種類，而且可以廣泛的使用於大多數的植物種類。