

圖解

蘭花組織培養入門

嘉德利亞蘭・喜姆比蘭・萬代蘭・
石斛蘭・蝴蝶蘭・堇花蘭及其他蘭



園藝世界出版社 出版

圖解蘭花組織培養入門

編 譯：園藝世界出版社

出 版：園藝世界出版社

發行人：尤崇魁

地 址：台北市 10920 東園街 85 巷 4 弄 1 號

電 話：02 3074443

郵 撥：1046704 — 0 園藝世界出版社

經銷處：梅花園藝中心 · 02 9116204

新店市中正路 328 巷 43 號 1F

興隆園藝 · 02 3918397

台北市愛國東路 116 巷 11 號

印 刷：明進印刷公司

地 址：台北市寶興街 224 巷 4 號

登記證：新聞局局版台業字第 3513 號

定 價：新台幣 150 元

中華民國七十五年五月初版

七月再版

前 言

邇來在生物工程界忽然受人矚目的組織培養，雖然稱不上最新的技術，惟值得稱讚的是，此項組織培養或細胞融合的技術，被企業或研究機構所採用，並試圖應用於解決二十一世紀的糧食問題上。

自古以來，曾經有過扦插法（紀元前三千年）或嫁接法（紀元前一千年）等技術之開發，對農業生產方面，其貢獻亦頗大。繁殖或育種技術的開發也是促進生產迅速成長的契機。如今分生苗的生產技術，對花卉或蔬菜的生產更有莫大的貢獻。

法國的莫勒魯氏所開發的分生苗技術，在日本最早由狩野邦雄氏引進。經過不斷的研究之後，首先實現了經由莖頂培養使喜姆比蘭大量繁殖。繼之應用於康乃馨、菊花、草莓等類的無病毒之育成，因而對改善今天的草花或蔬菜的生產體系之貢獻頗巨。遺憾的是，狩野氏在研究的中途即離開人間，實為園藝界的一大損失。

利用分生苗的技術，我們可以獲得品質均一的優良苗，並且可以廉價取得遺傳上均一的個體，可供生理方面研究的材料。同時經過試驗研究的結果，解開了蘭科植物的開花生理。大量生產的分生苗，在有計劃的栽培下所生產的開花株，不但可以與一般草花一樣處理，而且由已往被視為高不可攀的花，成為人人養得起的庶民之花，這都是引進新技術的成果。

如今始於莖頂培養的這項技術，不但廣泛的應用於莖頂以外的根、莖、葉、花等各器官的培養。更進一步發展到藉細胞融合而達成體細胞雜種的育成。本來以繁殖技術爲目的，由無病苗之育成開始的培養技術，到頭來却應用於育種方面。不久的將來可望把無法藉交配育種的異種之間，經由細胞融合而產生新的品種。或許有一天瓜蔓上會結出茄子。

展望未來的二十一世紀，爲解決人口增加和糧食不足等最大的問題，在稻、麥等穀物或蔬菜的育種方面，可望應用細胞融合或遺傳因子的替換技術，並且從這些育成的雜種個體中，挑選耐病、耐寒、耐暑、耐旱、耐濕、耐鹽性等的個體，因而可以在惡劣環境的土地上栽培作物。

荻原時雄氏（研究牽牛花遺傳的專家）曾說過，一項技術之完成費時十年左右。依此類推，則細胞融合的育種技術於二十一世紀中葉即可實用化。

本書專爲有志著手無菌培養或組織培養的初學者，特地邀約幾位年青的研究者，分別執筆有關培養技術的初步並加以整理。因此書中儘量圖解說明無菌操作的原理與原則，讓無高級設備者亦可利用自製的器材加以培養。打鐵趁熱，想做就是實行的時候。但願本書多少有助於作業上的參考。惟本書付梓倉促，恐有疏誤之處，敬請讀者指正。

目 錄

前言.....	1
I 組織培養的準備.....	4
1. 組織培養的現況與應用.....	5
2. 設備與器材	10
3. 培養基的組成與調配.....	29
4. 培養用的外植體部位.....	51
5. 培養的程序與操作要點	54
6. 毒素病的檢定	62
II 組織培養的實際操作	67
1. 概論	69
2. 嘉德利亞蘭	74
3. 喜姆比蘭	94
4. 萬代蘭.....	103
5. 石斛蘭.....	109
6. 蝴蝶蘭	115
7. 堇花蘭及其他蘭.....	126
III 組織培養的應用.....	129
1. 以秋水仙鹼培養倍數體.....	130
2. 原形質體的培養.....	133
3. 無菌播種.....	148

I 組織培養的準備

1 組織培養的現況與應用

將植物體的器官、組織及細胞自植物體分離，在適當的培養環境下，加以無菌培養，使之再生為完全具備植物體應有的機能之另一個體，此項一連貫的技術稱為『組織培養』。換言之，組織培養乃一種在科學的人為環境下，所施行的繁殖技術。

組織培養的初期研究，始自懷特（ 1936 ），而園藝方面的運用則由莫勒魯進行。起初著手大理花、馬鈴薯的莖頂組織培養（生長點培養），並且獲得無病個體之再生。接著從事蘭科（喜姆比蘭）的莖頂組織培養，成功地得到 Pro-tocorm Like Body（原塊體樣組織體，簡稱 PLB）的再生。繼之以分割繁殖而開發出可大量繁殖遺傳上均一性幼苗之技術。於是組織培養一躍而為受人矚目的育苗技術。其所生產的苗，以分生苗之名稱銷售於市面上甚為廣泛。

此項技術，如今不但應用於草花、蔬菜等草本類方面，甚至已推廣及於果樹、花木、樹木等木本類。

在日本，由狩野邦雄氏於一九六二年引進的此項技術，經過衆多學者的研究，業已鞏固了可以營養繁殖的園藝作物，例如蘭科、康乃馨、菊花、百合、滿天星及草莓等的育苗生產技術，對園藝生產方面有很大的貢獻。雖然該項技術尚未完全成熟，同時未知之部門尚多，却是值得發揚光大。

1. 培養的部位與目的

組織培養分下列各項進行：

(1)實生

實生乃將蘭科等植物之無胚乳種子，播種於人工培養基上使之發芽成爲一個植物體。此項技術由納德遜所完成，爲蘭科植物育種上不可或缺的育苗技術。

(2)胚培養

胚培養係指把胚珠內的胚摘出後加以培養的技術。一般我們在雜交育種的過程中，往往因受精胚的退化而有不稔的情形。柑橘類的多胚性品種中，亦有類似原因而遭遇育種困難的情形，因此改以培養摘出之受精胚以育成新植物體。

(3)器官培養

器官培養係指植物體的各器官，如莖頂、莖、葉、球根、花器（花瓣、花萼、雄蕊、花藥、子房、胚珠）等，經過培養使之再生遺傳上相同的個體。這種技術以營養繁殖無病苗的育成及育種爲其主要目的。

(4)組織培養

分離器官的一部份組織加以培養的組織培養，其困難較多。以莖頂栽培爲例，僅培養莖頂分裂組織，其成功之機率微乎其微，但是改以培養包括葉原基的組織片後即可得成功之例子。

有時把培養時所得的癒合組織，再加以培養亦可促使植物的再生。這都是爲誘導無毒化的個體或變異個體等之目的而培養。

(5)細胞培養

細胞培養的方式有二：一爲以液體振盪培養癒合組織使其

細胞遊離。二爲以酵素消化植物體的細胞壁，使原形質體呈遊離狀態並培養之。同時也試驗過經由體細胞的融合，培育新個體的方法。雖然目前爲止，尙無具體的結果，但是將來凡是不能交配育種的配對，可以藉此方法造就全新的個體，因而有益於糧食的生產。

2. 園藝方面的應用

(1) 繁殖

由莫勒魯所開發的蘭科植物的營養繁殖，對園藝方面苗木生產技術與栽培技術的提昇均有莫大的貢獻。在實用上最具體的例子，就是繁殖率較低的蘭科植物，因利用莖頂培養而能在短期內大量繁殖新苗。惟此方法並不一定適合所有的蘭科植物。換言之，喜姆比蘭（洋蘭）以外的蘭科植物，因其培養基組成或培養技術尙未完備，無法適用此方法。同屬於蘭科植物國蘭系統中的寒蘭或春蘭，因未詳部份甚多而尙未建立組織培養的繁殖體系。

在一般草花或觀葉植物的方面，利用液體振盪培養其繁殖組織形成多芽體，或者在添加荷爾蒙劑的培基，誘發多芽體以利大量繁殖幼苗。無論採取任何方式，十萬株幼苗的育成，需要十萬次的切割與移植的作業，頗費勞力。

如此育成的幼苗，雖然在遺傳上應具均一性，但是與大量生產的結果一樣，偶而也有發生變異的危險。此乃因由一芽生長的多數苗易受自然界芽條變異的影響，或添加藥品引起的異常分裂所導致者。上述之變異個體，必須在育苗的階段儘早從形態上去發現並除去，否則等開花或採收期始發現

，則後果不堪設想。

由組織培養產生的苗，常有回春的現象，因此與一般的營養繁殖苗相比，可獲生育旺盛而品質優良的產品，不過繼續栽培，則提早老化，因此必須及早更新其苗。

至於觀葉植物等可以用分株或扦插繁殖的種類，似無應用組織培養之必要，但是以羊齒類或橡膠樹為例，利用組織培養所得的苗，不但比扦插分株所得的苗更整齊而均等，而且具備大量生產的優點。今後在應用方面的開發值得加強。

球根類的仙客來，或多年生草本的櫻草花等，以種子繁殖的植物，由於遺傳的分離使其產品缺少均一性，而且採收量少，亦有優良品種的種子不足等問題。因此以種子繁殖的一、二年生草本植物，為求其成品的均一性，宜考慮將優良的個體利用組織培養法繁殖。

採種用母株的保存與維持，或以種子繁殖的蔬菜，或草花中生產性較高的 F_1 個體，藉組織培養繁殖以利供應營養繁殖系之苗亦甚為值得考慮者。已將以往的種子繁殖而改以營養繁殖的技術，在美國雖然業已實用化，但是在日本則尚未實用化。

(2) 育種方面

培養的技術可以應用於各項育種方面。

① 胚或子房的培養

在進行交配育種時，受精胚在形成種子之中途，枯死而無法產生種子時，可以培養其未發達的胚或子房而獲得植物體。又自花不授粉或欲求非親本的兩屬間雜交育種時，可以先

在試管內的培养基上受粉後，加以無菌培養即可獲得新植物體。假使育種的個體不稔時，亦可藉上述之營養繁殖體系繁殖。

最近經由體細胞雜交法的試驗，獲得育成新個體的實例。此法將屬於種子繁殖系的兩株無性的相異植物，分離其各別的細胞並融合後，挑選雜種細胞使之再生植物體。

更有應用細胞選擇法，試用於選擇抵抗鹽性株、抗病性株、抗低溫性株等。亦有挑選突然變異之個體並加以繁殖之例。若植物體的某部份發生突然變異時，可將該部份分離培養育成新個體。

②花藥及花粉的培養

在這一方面，曾經利用試驗經由花藥或花粉之培養，再生植物體，因而育成了半數體之個體，再加倍該個體之染色體後獲得育種上利用價值甚高的同型接合體。

③病理方面

植物體通常易患的不治之病，有毒素病及各種病菌引起的導管病等。因患這些病而絕滅的優良品種為數不少。迄今尚有甚多品種未能充分發揮其品種之特性，主要原因為毒素病為害。為此將病菌較少的莖頂組織加以分離，培養所得之個體，經證實可再生為無病體或近似無病（弱毒個體）的植物。

馬鈴薯、大理花、唐昌蒲、百合、康乃馨或菊花等，利用營養繁殖的種類，因引進無病的苗而穩定了其生產性能。

2 設備與器材

組織培養的成功與否，端賴把所要培養的外植體摘出後，置於合適的人工培養容器內，在適當的環境下培養而得，最重要的是這些培養必須在無菌的狀態下操作。

主要的作業有器具洗淨，培养基的調整，材料（外植體）的種植與移植。其作業的過程如附圖 1。以下按作業過程依序介紹必要的設備與器材。包括從初步的簡易無菌操作到嚴密的試驗或研究用者，因此讀者可依自己的程度，選擇適當的內容參考。

1. 工作房

理想的工作房由準備室、無菌室及培養室等三個隔間構成。其佈置如附圖 3。

(1) 準備室

在準備室必須有水、電、煤氣等設備，以利器具的洗淨、乾燥，培养基的調整及殺菌等作業。作業用的寫字枱及洗淨用的水槽均宜配備大號者。由於使用高壓滅菌器，因此牆面及地板應採用耐水性的材料，並且裝置抽風機。

(2) 無菌室

在無菌室內爲了無菌操作，通常噴灑酒精消毒室內的空氣。因此天花板、牆面、地板等應使用耐藥性的材料。

室內擺設工作枱和瓦斯、電氣插座、自來水以及淨化室內空氣用的傳送除菌空氣的裝置，並考慮沖洗室內的排水問題。進出口應裝設空氣淋浴器或雙層門戶，以防空氣污染。

附圖 2 無菌培養設備的配置圖

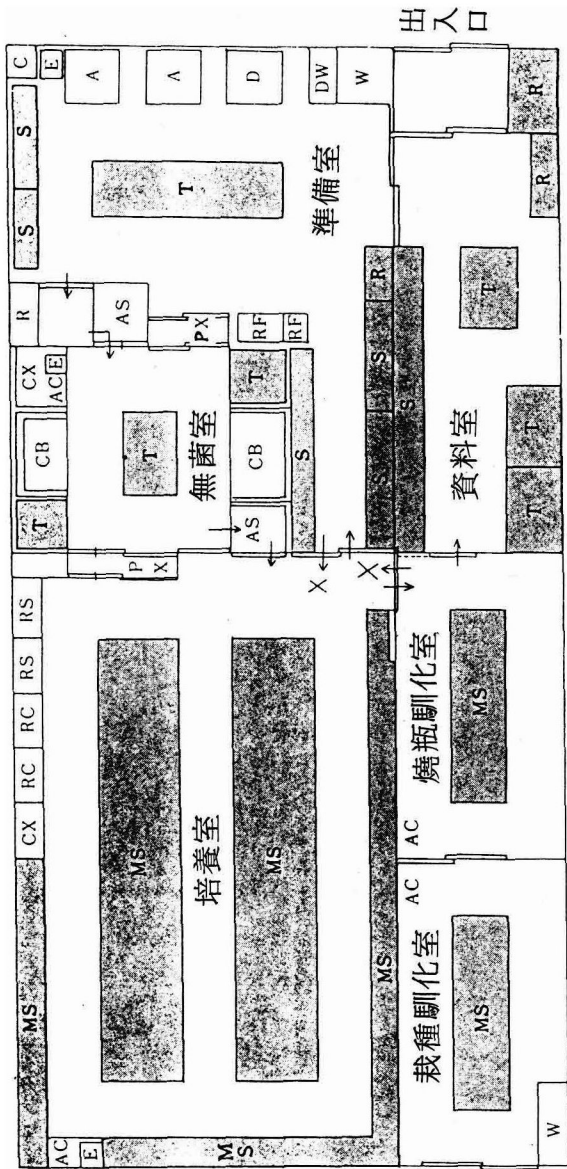
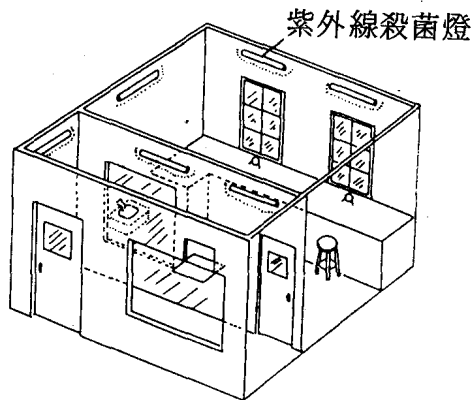


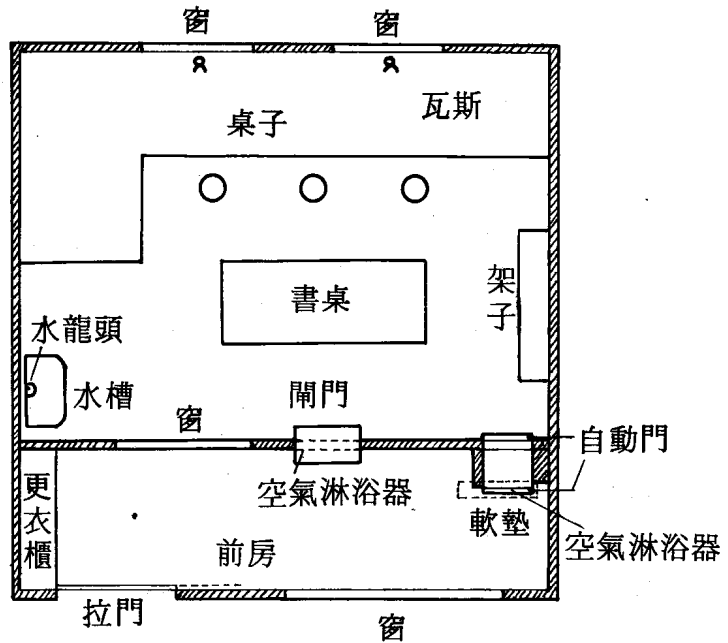
圖 2 所示，出入口全部使用拉門，目的在於減少進進出出而產生的空氣壓力上變化。推動式門所產生的空氣壓力變化較大。

順著箭頭方向出入，逆向出入則會構成污染。

- (1)準備室 A：高壓滅菌器 C：冷氣設備 D：加熱乾燥器 DW：蒸餾水製造裝置 E：電氣吸塵器 PX：（燒瓶用）傳遞箱 RE：冷藏庫（其中一台為藥品專用）S：儲藏架（藥品用、器具用、材料用）T：寫字枱 W：水槽（大型）
- (2)無菌室 AC：空氣調節器 CX：清潔箱 AS：空氣淋浴器 CB：無菌枱 R：（衣服、鞋子等的）櫃子 PX：（燒瓶用）傳遞箱
- (3)培養室 MS：燒瓶培養架 RC：回轉培養機 RS：振動培養機
- (4)馴化室 玻璃房（遮光 50 % ~ 70 %）

附圖 3 理想的房間佈置





(3)培養室

培養室乃讓培養瓶內的組織得以順利生育的場所，因此必須考慮溫度、光度、濕度及空氣中的無菌度。

溫度：利用室內溫度調節器，因應培養材料調節溫度。通常設定在 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 的範圍內，並儘量保持最小的溫差。由於各種植物的適應溫度不盡相同，可能需要分別裝置為 15°C 、 20°C 、 25°C 、及 30°C 等的恒溫培養裝置。因為溫差甚大時，容易引起燒瓶內空氣的移動而構成污染的發生。

濕度： $70 \sim 80\%$ 左右的相對濕度最為適當（自然的濕度狀態）。

光度：使用普通晝光日光燈照射燒瓶面，在 2,000 ~ 3,000 lx 照度下，一天照明 16 ~ 24 小時爲宜。因爲長日條件下容易促進營養生長。

空氣：儘量保持清潔，如有污染的燒瓶應立即除去。準備室亦應採相同措施。正式的話應設置大型的細菌濾過裝置。

【簡便的設備】

對無菌操作，若能從污染的避免下手研究，則利用簡便的設備亦能獲得成功。

準備室：利用可以沖洗的廚房中，在使用瓦斯與電氣的旁邊，擺設一張桌子即可。

無菌室：無需另設房間。只要利用空氣不易流動的場所，如下圖塑膠布罩成的圍室，或衣櫃內作業即可。如果能使用下述的無菌箱或無菌枱，則效果更佳。

培養室：利用自製的塑膠布罩蓋箱子即可，惟必需有光線與溫度。光線可藉日光燈的照明，而溫度則可利用電熱線加溫。但是必須附裝保溫器以便調整。當氣溫上升至 25° C 以上時，對生育尚無影響，但是達到 35° C 以上則有不良的影響。因此夏季應注意通風，並留意不讓日光燈的熱氣滯留在室內。

培養室內除了裝置小型的抽風機之外，亦應考慮上下的空氣對流。

在簡易無菌箱中作業應注意之事項如：空氣由下而上對流。應使外面的空氣儘量保持靜止，並關閉室內的門戶。風