



植物組織培養與技術

上野洋一郎・柯俊良・陳怡菁・郭順宇・郭榮烈・陳泓志・胡威文・張傳偉／編譯 楊美桂／校閱



藝軒圖書出版社





<http://www.yhsient.com.tw>
e-mail:yhsient@ms17.hinet.net

ISBN 957-616-584-9



9 789576 165849

植物組織培養與技術

上野洋一郎・柯俊良・陳怡菁・郭順宇
郭榮烈・陳泓志・胡威文・張傳偉

／編譯

楊美桂 / 校閱

藝軒圖書出版社

國家圖書館出版品預行編目資料

植物組織培養與技術／上野洋一郎等編譯。

--第一版。--臺北市：藝軒，2000

面；公分。

參考書目：面

含索引

ISBN 957-616-584-9 (平裝)

1. 植物組織與細胞 2. 生物技術

361.2

89004298

本書任何部份之文字或圖片，如未獲得本社書面同意，
不得以任何方式抄襲、節錄及翻印

新聞局出版事業登記證局版台業字第一六八七號

植物組織培養與技術

(平裝)特價新臺幣 元

校閱者：楊美桂

編譯者：上野洋一郎·柯俊良·陳怡菁·郭順宇

郭榮烈·陳泓志·胡威文·張傳偉

發行所：藝軒圖書出版社

發行人：彭賽蓮

總公司：台北縣新店市民權路 98 號 9 樓

(捷運新店線大坪林站·同仁醫院出口)

電話：(02)2219-2577

傳真：(02)2219-8511

網址：[//www.vihsient.com.tw](http://www.vihsient.com.tw)

E-mail:yihisient@ms17.hinet.net

總經銷：藝軒圖書文具有限公司

台北市羅斯福路三段 316 巷 3 號

(台大校門對面·捷運新店線公館站)

電話：(02)2367-6824

傳真：(02)2365-0346

郵政劃撥：0106292-8

台中門市

台中市北區五常街 178 號

(健行路 445 號宏總加州大樓)

電話：(04)206-8119

傳真：(04)206-8120

國際書局

台中市學士路 187 號

(中國醫藥學院附近)

電話：(04)201-5386

大夫書局

高雄市三民區十全一路 107 號

(高雄醫學院正對面)

電話：(07)311-8228

本公司常年法律顧問／魏千峰、邱錦添律師

二〇〇〇年四月第一版

ISBN 957-616-584-9

本書如有缺頁、破損或裝訂錯誤，請寄回本公司更換。

讀者訂購諮詢專線：(02) 2367-0122

序 文

這十年來的植物組織培養上進展令人瞠目驚視。以其背景，有自本世紀初起參與研究開發的多數前人之不斷努力。隨著研究方法的開發，其應用範圍更擴大至植物學上的基礎研究、農業、園藝、植物育種部門，有關生產有用物質的基礎研究及其應用等。而且如此其應用範圍擴大的結果又促進新技術的開發。因而遂漸累積成果。這些成果已經在國內外出版為多數書籍。

一方面，對最近熱門的植物生物技術來說植物組織培養成為不可缺少的方法，引人注目。因有了以上背景，最近想要學習植物組織培養而利用於研究及實際應用的人愈來愈多。因此迫切期待出版適當書供這些初學者參考。

這本書為包括初學者在內，以想利用植物組織培養方法於研究及實際應用的人員為對象，編輯為根據正確的知識，學會培養技術而為相當有實用性。所以這本書中提到有關組織培養的任何項目，即如材料、器具的操作方法等有關組織培養的基本事項，以及有關器官、組織、細胞培養之基本和應用的實驗背景，實驗過程，注意事項等等。

一般來說，實驗方法、技術上通常伴同憑實際經驗的知識。因此僅根據理論所寫的實驗課本真乏趣。編輯這本書時，考慮到以上問題而請目前實際運用這些技術的最尖端研究人員寫稿。因為關於個個目的，選出已建立出技術的實驗材料並具體地加以解說，所以即使初學者也只要照其說明而進行操作就可得到良好結果。不過若使用不同實驗材料，則當然需要改變操作過程。

著者們希望先參考這本書而學會基本方法後，開發出適合於個個目的、實驗材料的方法。若這本書可協助要開始學習植物組織培養，編輯者們就覺得高興。出版這本書的目的，到底是當做實驗課本，所

以有關植物組織培養詳情，則要參考其他專業書籍。

編輯者們向慨然應允我們的要求而寫稿的著者們衷心道謝，同時向出版上麻煩到細節的朝倉書店編輯部的人員也要感謝。

編輯者

編譯者之序言

著書是一直從事水產動物的組織培養而進行有關病毒方面的研究工作。所以對著者來說植物組織培養並不是專業的。但植物組織培養使著者非常感興趣。關於其利用，大致上有兩大方面。

其一是經濟上的問題。就是植物組織培養實驗上所需要的經費只少比動物組織培養低許多。動物組織培養上花費最多的項目是血清和塑膠製培養瓶。植物組織培養上就不需要這些，可節省相當大的部分。實際上多數人在家裏進行蘭花等的組織培養。

另外一個理由是其應用範圍。植物組織培養除了園藝方面以外，又可應用於農藝方面的品種改良，即如開發穀物等的新品種以便提高收穫量。如此說不定可解決愈來愈嚴重糧食問題。當然培育出各種花卉，生活上提供風趣。

因此著者們希望這本書對初學者有幫助，學會植物組織培養技術。

在此處，特別要聲明的是有關這本書中有些內容。也就是說有些文中提到罌粟。此植物產生鴉片。著者非常明瞭中國一直受鴉片的災害，極痛憤鴉片的事實。但如原著者所說提到鴉片生物鹼或許不太適當，不過，如罌粟等，以組織培養法生產流動於乳管中乳液等，偏在於特殊部位之成分的嘗試，物質生產上需要分化出特殊器官時，可提供參考。若用罌粟為實驗材料時，必須要遵守有關法令規定。

著者們非常感激藝軒圖書出版公司的董先生和他的同僚，及提供非常寶貴諍言的，尤其是幫助校對的曾薰小姐。這本書的最後校正是在日本神戶進行的。著者謹向提供場所及文書處理機的安田敏明、章子夫妻衷心感謝。最後這本書獻給著者的愛妻，羅茉莉小姐。

本書的翻譯、編輯上雖已力求慎重，但恐仍有疏漏之處，懇請讀

目 次

序文	i
編譯者之序言	iii
1. 進行植物組織培養所需要的準備及基本知識	1
1-1 器具之沖洗	2
a. 使用鉻硫酸溶液的方法	2
b. 使用清潔劑的方法	3
c. 超音波沖洗法	4
d. 玻璃器具之保管	5
1-2 實驗器具之滅菌	5
a. 乾熱滅菌法	5
b. 高壓滅菌法 (autoclaving)	6
1-3 培養基之配方	8
a. 貯藏溶液 (MS 培養基)	8
b. 培養基之配製法	11
c. 添加物	12
1-4 無菌操作	15
a. 材料植物之滅菌	15
b. 基本無菌操作	17
2. 癒傷組織之誘發、繼代培養	19
2-1 胡蘿蔔	19

a. 誘發癒傷組織	20
b. 繼代培養	21
2-2 水稻	23
a. 誘發癒傷組織	24
b. 繼代培養	25
2-3 松樹類之癒傷組織培養	26
a. 種子之殺菌及發芽	28
b. 誘發癒傷組織	29
2-4 杉樹之癒傷組織培養法	31
a. 種子	31
b. 莖頂	32
3. 由癒傷組織中再生植物體的方法	35
3-1 菸草	35
3-2 胡蘿蔔	38
3-3 水稻	42
4. 液體培養法	45
4-1 長春花細胞之同步培養	45
4-2 胡蘿蔔細胞之分批培養(batch culture)	50
a. 液體(懸浮)培養之誘發	51
b. 液體培養之繼代(繼代培養)	51
c. 分批培養細胞之增殖及增殖量之測定	52
5. 單細胞培養	55
5-1 單細胞游離法	55
5-2 釣出單細胞的方法	57
5-3 微量培養(microculture)	58
a. 微量培養(I)	58

b. 微量培養(2).....	59
5-4 哺育培養(nurse culture, Miur 氏法).....	61
5-5 飼養層(feeder layer)法.....	63
6. 原生質體之單獨分離、培養法.....	65
6-1 菸草(葉).....	65
6-2 黃豆(培養細胞).....	70
6-3 玉米葉肉細胞和維管束鞘細胞之分離.....	73
7. 根端培養法(水稻).....	81
a. 種子之殺菌.....	83
b. 種子之無菌發芽.....	84
c. 插秧.....	84
d. 培養.....	84
8. 胚芽、胚珠、子房培養法.....	87
8-1 柑橘類(胚芽).....	87
a. 實驗材料之殺菌操作及準備.....	89
b. 胚芽之取出.....	89
c. 胚芽之種植.....	89
d. 種植後之管理.....	90
e. 種植至花盆.....	90
8-2 菸草(胚珠).....	91
8-3 子房培養法.....	94
9. 試管內受粉法(菸草).....	99
10. 體細胞雜交法.....	103
10-1 細胞融合法.....	103

10-2 雜種細胞之選拔	108
10-3 植物體之再生	110
11. 遺傳工程學	113
11-1 土壤桿菌 Ti 質粒之利用	113
a. 抽取出 Ti 質粒的方法	115
b. 冠症瘤組織之無菌培養法	117
11-2 細菌及其球狀原生質體(spheroplast)之利用	118
11-3 遺傳訊息之攝入	124
a. 配製原生質體	126
b. 使用 TMV-RNA 而進行的原生質體轉入	126
c. 是否導致原生質體轉導之檢驗	127
12. 細胞選拔法	131
12-1 利用突變的方法	131
a. 照射 γ 射線而誘發突變	132
b. 利用化學物質而誘發突變	132
c. 利用自然突變的方法	133
12-2 用胺基酸類似物的抵抗性細胞株之選拔	135
12-3 耐鹽性植物株之選拔	140
12-4 抗病性	144
12-5 耐低溫性	146
12-6 光自營營養	148
13. 花藥培養法	153
13-1 水稻	153
13-2 馬鈴薯	157
14. 花粉培養法(菸草)	163

a. 花藥之前培養	164
b. 用蒸餾水所進行的花藥之前培養	166
15. 莖頂培養法	167
a. 芽之殺菌	169
b. 解剖、種植	169
c. 培養、繼代	170
d. 發根	170
16. 無病毒植物之培育	173
16-1 康乃馨(荷蘭石竹, <i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	173
16-2 馬鈴薯(<i>Solanum tuberosum</i> L.)	178
16-3 草莓(荷蘭草莓, <i>Fragaria chiloensis</i> Duch var. <i>ananassa</i> Bail)	182
16-4 病毒之檢驗法	186
a. 康乃馨之病毒檢驗法	187
b. 馬鈴薯之病毒檢驗法	188
c. 草莓之病毒檢驗法	188
17. 大量增殖法	191
17-1 蘭花之生長點培養	191
a. 卡特來蘭之生長點培養	191
b. 舟蘭(<i>Cymbidium</i>)屬, 鉤蘭(<i>Oncidium</i>)屬及 <i>Miltonia</i> 屬之生長點培養	196
17-2 大丁草(<i>gerbera</i>)之生長點培養	199
17-3 百合花之生長點培養	205
17-4 蘋果之生長點培養	209
a. 幼苗增殖	210
b. 發根	211

c. 種植於花盆・馴化	211
18. 生長點之冷凍保存法	213
a. 階段式冷凍法	215
b. 連續冷凍法	217
19. 大量培養法	221
20. 物質生產	227
20-1 鴉片生物鹼	231
20-2 皂角苷(saponin)(高麗人蔘皂角苷, ginsenoside)	232
20-3 泛醌-10(ubiquinone-10)	238
20-4 酚(phenol)(花色素苷, anthocyanin)	242
21. 物質轉換	247
21-1 毛地黃毒苷配基(digitoxigenin)	247
21-2 併用放射性同位素的轉換實驗例	250
21-3 生物鹼(reticuline), 可待因轉換實驗	257
a. 誘發癒傷組織	259
b. (R、S)-reticuline 工轉換	259
c. 轉換 codeinone 實驗	262
22. 生物合成	265
22-1 生物合成酚(echinatine)之實驗例	265
22-2 類固醇(steroid)及類三萜烯(triterpenoid)	272
23. 酵素	277
23-1 葡萄糖基轉移酶(glucosyltransferase)	277
23-2 甲基轉移酶(methyltransferase)	285

參考文獻	293
附表 1 主要培養基之無機鹽組成表	309
附表 2 維生素及其他微量有機物質之組成表	311
附表 3 胺基酸混合物之組成表	312
索引	313

第 1 章

進行植物組織培養所需要的準備及基本知識

簡單說起來植物組織培養就是切出植物體一部分，並在培養容器內進行培育的方法。以細胞為單位的話，高等植物體是多數細胞之集團，且這些細胞互相有關聯而行生活的細胞社會。由植物體中切出其一部分的結果，可自如此複雜的細胞社會中隔離出特定細胞，並使實驗條件單純化。當然，必須要排除與其他微生物間之關連。由此觀點來說無菌操作就是最重要的技術。很幸運的是組織培養進步的結果，不只可進行小組織的培養，亦可將單獨細胞增殖成多數細胞，所以可進行遺傳上具有均勻特質之細胞集團的操作。

如同上述生物環境之單純化，組織培養之另一目的，在於人為設定物理性或化學性環境條件。和當初所說“在培養容器內進行培育”就指自由設定如光線、溫度、濕度等物理性條件，以及培養基之鹽類組成，pH 值、維生素等，化學或生物化學上條件，並依照本身的實驗計劃而進行培養。由於生物體對這些環境條件引起微妙反應，故為了獲得良好的再現性，需要將條件一直保持不變。

任何技術具有如下的兩個側面，即開發技術本身而進行的研究以及應用所開發出來的技術來提高至實用階段而進行的研究。組織培養，相對於前者，大多把培養條件單純化即可達成，而後者是實際應用，所以有時即使是尚未知的複雜條件也可供實用。以下的各章中，由基本立場及應用立場，詳細記述各有特徵的培養技術。

1-1 器具之沖洗

組織培養上大量使用如試管，角型培養瓶，培養瓶及培養槽等玻璃製培養容器，或如吸量管、燒杯、量筒等配製培養基用玻璃製器具等多種玻璃製產品。當然亦使用各種塑膠製及金屬製器具，但數量上不能與玻璃製器具做比較。因此，在此處僅說明玻璃製器具之沖洗法。

a. 使用鉻硫酸溶液的方法

鉻硫酸溶液是重鉻酸鉀($K_2Cr_2O_7$)和濃硫酸之混合溶液，具有非常強烈的洗淨能力。不過，由於鉻會混入至廢水中，所以為了預防公害，有廢水處理設施或可行廢液處理的地方才可使用。

【器具、器材】

1. 酸性硫酸槽(氯乙烯(vinyl chloride)製)，為了沖洗吸量管，就要準備直型硫酸筒。
2. 適合於各容器的耐酸性籠子或網袋。
3. 虹吸管式自動沖洗器。

【藥品】

重鉻酸鉀、濃硫酸，皆使用工業用規格產品即可，數量就視硫酸槽容量而定。

【鉻硫酸溶液之配製法】

用相當大型容器，配製重鉻酸鉀之飽和水溶液。

在 20°C 處，重鉻酸鉀之溶解度是每一公升水中為 43 公克。

對如此配製的飽和水溶液中一些些地添加濃硫酸。濃硫酸和飽和溶液間之混合比率最後為 1:1。當添加濃硫酸時，發出相當高溫，所以需要一邊冷卻配製用的容器，一邊慢慢添加硫酸，等到冷卻後移至硫酸槽內。