

紅檜組織培養之應用

一、前言

紅檜(*Chamaecyparis formosensis*)屬於柏科(Cupressaceae)扁柏屬(*Chamaecyparis*)林木，樹齡長久，是台灣常見的神木。此樹種分佈於台灣 1280~2800公尺海拔山區，常形成大面積純林。在早期伐木時代，由於優良之材質及防腐防蟲的能力，為台灣賺取龐大的外匯，因此紅檜人工造林之技術研究與推廣乃現今林務單位著重的重點。一般傳統之紅檜造林多採用實生苗造林與天然造林兩法，實生苗造林法之苗木乃由苗圃育苗後，再將成苗運送至造林預定區進行造林；而天然造林法則是利用造林地內現存的母樹，經由天然下種的方式進行造林。此兩種方法各有利弊，天然造林法經由篩選出之母樹，供應造林材料，紅檜成林後往往通直完滿，如在棲蘭山之紅檜天然造林地，就是一個很成功的案例。其缺點是要有現存母樹，不像實生苗造林，苗木經苗圃育苗後可載往各地進行造林。但台灣進行紅檜實生苗造林成功的案例不多，主要原因在於紅檜實生苗在小桿材期分岔嚴重，樹形不若天然造林法完整，原因眾說紛紜，但可肯定的是苗木之種源、基因型是一個很大的因素。林木生長緩慢，早期不易觀察其基因型之好壞，故在育苗篩選上不如一般作物容易，因而無性繁殖育種即顯得格外重要。然而傳統之扦插育苗法礙於材料限制、物種之特性等因素，實無法大量供應苗木造林，故為因應未來之紅檜推廣，唯有應用組織培養技術，提供大量優質苗木，解決現今紅檜人工造林地林相不佳之問題。

二、組織培養技術用於苗木之生產

利用生物技術量產植物種苗之相關技術研究成果中，對種苗產業影響最大者，應為植物組織培養

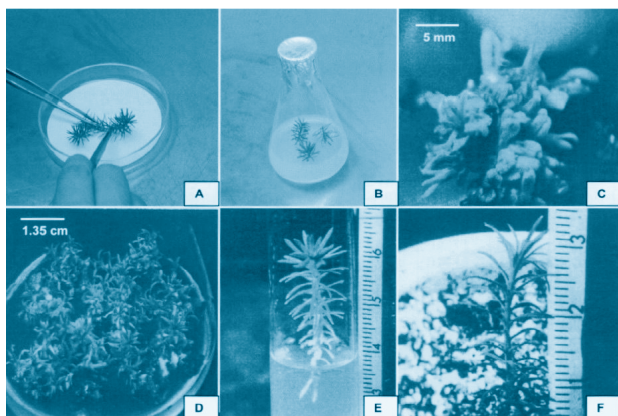
技術進行健康種苗大量增殖。由於可快速繁殖健康種苗，近年來已成為台灣苗木生產業之主流。隨著組織培養技術不斷地演進，以及大量的人員投入研究，許多具商業價值之物種開始以組織培養進行商業化生產，如國蘭、中草藥植物以及多種觀葉植物等之種苗生產，皆已建立完善的商業化生產流程，技術已殊成熟。然而在林木種苗之生產方面，由於市場與政策上之因素，林木種苗之生產仍採傳統之種子與扦插方式。其實在國外以組織培養方式致力在林木種苗生產上，許多具經濟價值之樹種，尤其是紙漿供應材，如得達松、桉樹、樺樹、挪威雲杉等其有關組織培養的研究相當多。

微體繁殖乃是現今組織培養技術用於生產苗木最實用的方法，其包括 4 個 stages：Stage 0- 培植體選擇，篩選優良母系具有分化全能性之部位，通常是生長點、帶節之幼嫩莖、分生組織等做為培植體，此 stage 之重點在於母系之選擇。Stage I- 表面消毒，將培植體導入無菌培養系統，此stage之重點在於如何在能維持分生活力下達到培植體無菌，培植體採取實之環境狀況扮演很重要的因素。Stage II- 芽體誘導，無菌培植體在適當環境培養條件下，可進行大量分化增殖，此階段的目標在於儘量提高單一培質體可誘導的芽體數，且維持每一循環芽體誘導的穩定數。Stage III- 誘導根系發生，需更換培養基組成，有時尚須變更培養環境，如暗培養，使小苗發根，形成完整植株。Stage IV- 植株馴化（硬化），植株移至溫室，以逐漸改變環境濕度、光照之方式馴化植株，使期能適應外界環境，增加出栽之成活率。

三、紅檜之微體繁殖

紅檜之微體繁殖技術（如圖一）在實驗室方面

之研究已殊成熟，利用成熟母株之萌蘖帶節又嫩莖或頂端分生組織為培植體，可克服老熟植株反應對植物生長調節劑反應不佳的問題。Stage I的表面消毒需視培植體取樣時之環境而異，但通常以70%酒精消毒1分鐘，再移入2% NaOCl (加 0.01% Tween20) 10分鐘，再以6% H₂O₂ 消毒5分鐘，最後以無菌水沖洗4-5次，表面消毒的成功率可達70-80%，若在表面消毒前以乾淨蒸餾水清洗植物體表面，則可稍微提高消毒成功率。另若以頂端生長點為材料，則經清水沖洗後，以70%酒精消毒1分鐘後，隨即在無菌操作台上以無菌水沖洗3次，直接在解剖顯微下將生長點分離、取出。由於紅檜生長點極小，此方式需較高且熟練的技術。Stage II芽體誘導之培養基為WPM (woody plant medium)，有別於一般常用之MS培養基，WPM培養基之鹽濃度較低，適合許多針葉樹植物組織培養，若以高鹽濃度培養基培養紅檜帶節莖段，則會誘導癒傷組織發生。芽體誘導之生長調節劑組合為0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA，pH值調至5.5-5.6之間。在25℃恆溫，光照強度27 μmol·m⁻²·S⁻¹，16小時光週期培養條件下，約25天培養後可觀察到培植體表面有芽體發生，培養至30-32天後，每一培植體(約0.8-1 cm)可發生10-30個芽體(圖一)，此時需將培植體連同芽體分成數等分，移至不含生長調節劑之WPM培養基，避免芽體被持續誘導出，而發生競爭作用。移至新培養基的芽體可持續抽長，待芽體抽長至3 cm左右，則可進行Stage III。發根用之培養基為

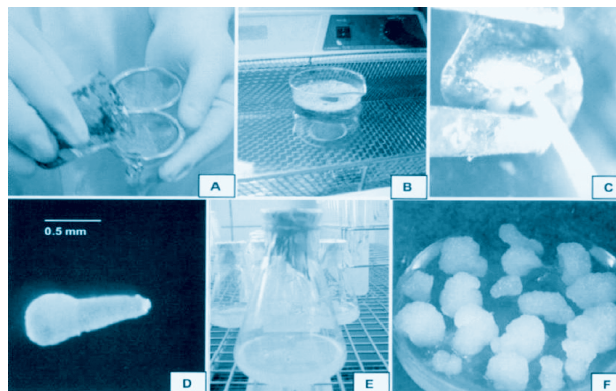


圖一 紅檜微體繁殖技術：(A)切取培植體(B)誘導芽體之培養基(C)多芽體(D)芽體移植(E)發根培養基(F)馴化

WPM + 0.1 mg/L IBA，pH 5.6，暗培養，培養1個月，根長約佔植物體1/3-1/4時則可進行Stage IV，馴化植株可在一般簡易溫室進行，土壤介質採用蛭石、珍珠石、泥碳土等比例混合介質，馴化之重點在於環境濕度的調控，紅檜喜高濕環境，馴化組培苗時若相對濕度低於80%則苗株多不易存活，一般簡易溫室灑水系統定在每1.5-2小時灑水一次，每次灑水15分鐘就足夠，太潮濕反而容易使苗株感染白粉病。

四、紅檜體胚誘導

在組織培養條件下，植物可不必經由減數分裂及受精作用，直接由體細胞誘導形成胚體，稱之為體胚或擬胚(somatic embryo, embryoid)。體胚培養主要有以下優點：(1)根芽同步發生，可減少繼代次數與多次操作受污染之風險。(2)可高密度培養。(3)無需切割分離，簡化操作流程並減少對培植之需求。(4)可製成人工種子，利於貯藏運送。然而以體胚作為苗木生產仍有其限制，主要是因為體胚誘導和植物的基因型非常相關，只有少數種類植物具有體胚發生潛力，甚至同種植物，但基因型不同造成體胚誘導差異，在國外則有大型計畫對Loblolly Pine體胚發生之基因型差異進行研究，試圖找出調控體胚發生之基因(<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pine/index.shtml>)。在紅檜方面，以成熟胚為材料(如圖二)，B5培養基添加0.5-1 mg/L IBA可誘導胚源性癒傷組織，將癒傷組織繼代至WPM培養基含



圖二 紅檜胚原性癒合組織之誘導過程：(A)種子裝入濾球(B)超音波震盪(C)取出胚(D)成熟胚(E)胚接種於錐形瓶(F)癒合組織

0.5 mg/L NAA + 2 mg/L BA 可誘導體胚發育，待體胚發育至魚雷型胚階段，則需繼代至添加 1 mg/L ABA 之 WPM 培養基，促使體胚發育成熟。紅檜體胚應用在苗木生產上仍有許多待克服之處，如體胚誘導率低、體胚成熟時常會發生不正常發育現象、以及體胚成熟化時需使用較昂貴的生長調節劑 - ABA，故紅檜體胚之應用現今仍屬於實驗室方面的研究。

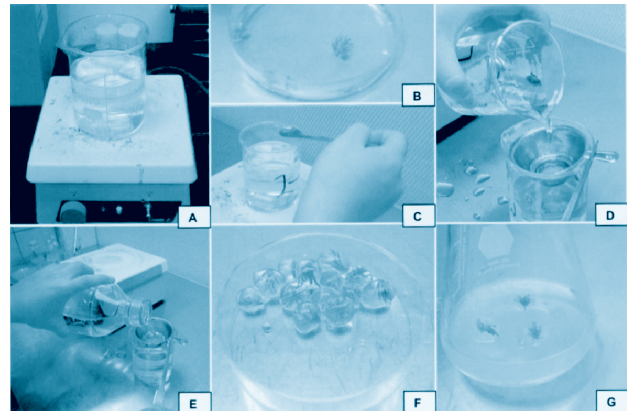
五、紅檜人工種子製造

體胚成熟後可以包埋至人工胚乳，製成人工種子，此舉有利於組培苗之保存與運送，人工胚乳之製作，需要考量體胚成熟及發芽時的養分供給、保水性、包埋介質是否會阻礙發芽、體胚發芽是否具同步性等因子。以紅檜人工種子製造為例(如圖三)，將已屆成熟之紅檜體胚加入含有 0.5 mg/L NAA 之 B⁵ 基礎培養基，加入藻膠酸鈉(Na-alginate)，製成之人工胚乳包埋後，置於 CaCl² 溶液中，以離子交換方式，製成適當硬度的粉圓型人工種子，將種子撈出，再以 B5 培養液清洗表面三次，人工胚乳表面可再塗抹一層植物油，防止水分散失，且播種後經過人工灑水或雨水沖洗，除去表面植物油，體胚與氧氣接觸，將可達到同步化發芽之效果。

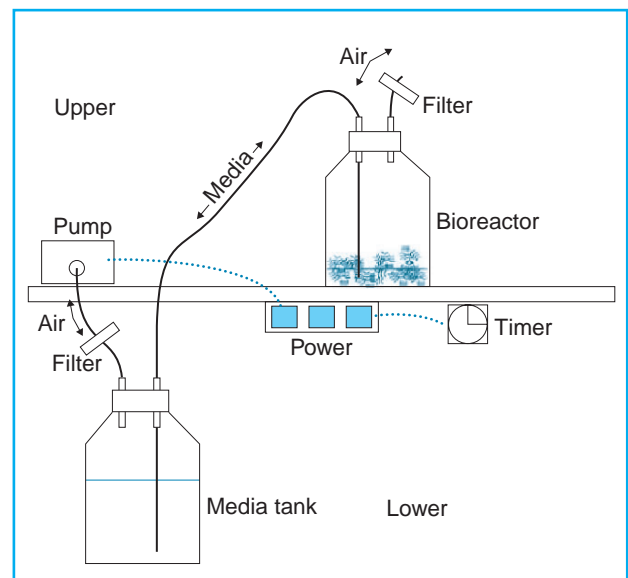
六、大量生產紅檜人工種苗之遠景

就現階段紅檜組織培養技術而言，欲生產大量組培苗仍以微體繁殖法為最適當，因紅檜在此方面之研究進展最完全。商業化經營之首要在如何控制產量與減少成本，欲大量培養則需導入生物反應器之應用，以紅檜而言可先利用生物反應器培養大量癒傷組織，再將癒傷組織移至誘導不定芽發生之固態培養基進行培養，此法雖可行，但流程上較為繁瑣，且由癒傷組織發生之芽體，其基因型較不穩定，不易做到品質控制。近年來發展出的潮汐式生物反應器，非常適合微體繁殖大量培養，其優點為不需更換培養槽，而只需更換培養液即可培養各種 stage 之組培苗，在鳳梨、人蔘、香蕉等作物已發展相當完善。潮汐式生物反應器(圖四)的設計原理是利用壓力差來控制培養液的流動，當 Pump 打氣

時，下方培養液儲存槽的氣壓較上方培養槽大，所以下方養液儲存槽內的液體為平衡壓力將流至上方培養槽；而一旦沒有打氣，因上方培養槽的水壓高於下方儲存槽，則培養液將逆流回儲存槽。打氣的時間則由 Timer 控制，間歇時間可設為每 10 分鐘或 15 分鐘進行一次培養液循環。如此生物反應器內之培植體不會持續浸泡在培養液內而窒息，且不必考慮剪應力、氣泡破裂、泡沫堆積等問題，而且電力不是持續消耗(和 air-lift bioreactor 比較)，故減少能源消費。

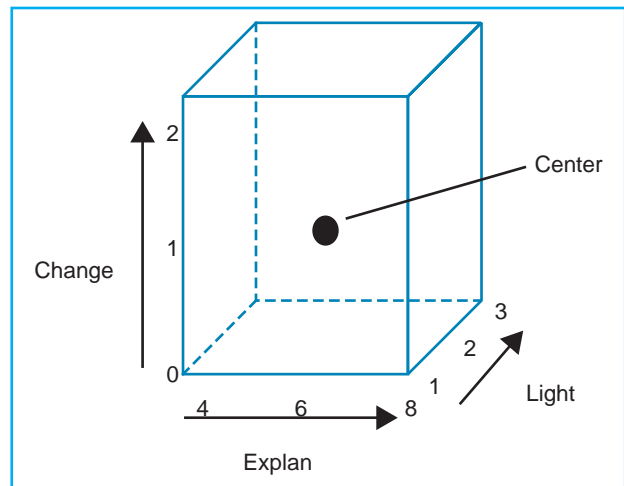


圖三 紅檜人工種子之製作流程：(A)電磁攪拌(B)人工胚乳(C)體胚與人工胚乳滴入燒杯(D)過濾(E)以基礎培養基洗淨(F)人工種子(G)播種於錐形瓶



圖四 潮汐式生物反應器

由瓶內培養轉換成生物反應器通常需要進行最佳化研究，依反應器形式、目的，可歸結出許多影響因子，在此僅以影響生產成本之因子，說明利用潮汐式反應器如何進行最佳化調整。設下列三種因子對誘導芽體發生具影響，且對生產成本影響頗大。(1)單位生物反應器一次培養之培植體數：生物反應器內之培植體數愈少，芽體發生率及培植體之芽體發生數可能增加，但培養液及生物反應器用量增加，同時勞力亦增加。(2)培養液更換次數：培養液更換次數之方式為，若整個誘導時間為40天，而培養基更換次數為1次時，表示20天換一次新培養基，同理更換次數為2，表示13天後更換新培養基。若更換次數對芽體發生率及培植體之芽體發生數具顯著影響，更換多次者可的較佳誘導效果，但相對的所需之培養液及勞力成本增加。(3)光照強度：增加光照強度可能促使芽體發生率及培植體之芽體發生數可能增加，但電力亦成本增加。利用 Evolutionary operations (EVOP)整合上述三種因子，並以生產單位芽體所需之成本(cost / shoot)為結果，求出最佳之生產條件。以上述的三項因子為例，EVOP之設計如圖五所示。changes為更新培養基次數(0、1、2次)；explants為單位培養容器置入之培植體個數(40、60、80個)；light為光照強度(140、200、310)，PPF為單位。此為一 $3 \times 3 \times 3$ 試驗，其解共有 $C_1^3 \times C_1^3 \times C_1^3 = 9$ 組解，若最佳條件組出現在角點上，則以此組條件為中心基礎點，往外設定條件範圍，重新進行一次EVOP，直到最



圖五 EVOP model

佳條件(最小cost of production per shoot)出現在中心點(center point)為止。

七、總結

由於台灣自70年代以來，一直採用禁伐政策，造林市場對林木種苗之需求日益萎縮，故開發新市場乃是當前林木種苗生產最需面對的問題。以紅檜樹型，狀似聖誕樹，且市面上出現許多雜交品系，在市場上價值甚高，若能將各品系收集，以組織培養技術生產優質苗木，無論是提供造林之所需，或推廣國內外園藝市場，都具有非常實質之意義。

王亞男 台大森林環境暨資源學系 教授

參考文獻

1. 成寧(2000)台灣鐵杉之組織培養。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。
2. 池仲藝(1991)人工種子。種苗通訊 5: 7-9。
3. 林敏宜(1995)台灣扁柏與紅檜原生質體融合與人工種子製作之初步研究。國立台灣大學森林學系碩士論文。
4. 林敏宜(2001)利用細胞懸浮培養進行紅檜體胚誘導及台灣扁柏人工種子研製。國立台灣大學森林學系博士論文。
5. 陳喜瑩(1998)以植物細胞培養生產二次代謝物 L-DOPA 之培養條件及生物反應器操作策略。國立台灣大學化學工程學研究所博士論文。
6. 黃淑珍(1991)台灣扁柏與紅檜體胚培養。國立台灣大學森林學研究所碩士論文。
7. 蔡佳蓉、江家華、王亞男(1991)紅檜懸浮培養誘導體胚發生。中華林學季刊 24(1): 77-82。
8. 蔡佳蓉(1990)台灣扁柏與紅檜體胚之發生。中華林學季刊 23(4): 3-19。
9. Arya, S., R. K. Kalia and I. N. Arya(2000)induction of somatic embryogenesis in *pinus roxburghii* Sarg. Plant Cell Rep. 19: 775-780.

參考文獻

10. Bapat, V. A., M. Minal, and P. S. Rao(1988)Sandalwood plantlets from synthetic seeds. *Plant Cell Rep.* 6: 434-436.
11. Yu, W. C., P.J. Joyce, N. C. Cameron and B. H. McCown(2000)Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Rep.*19: 407-413.
12. Jenny, A. K(1995)Automation and environmental control in plant tissue culture. Academic Press, dordrecht, Netherlands.
13. Lin, T. C., J. M. Fang and Y. S. Cheng(1999)Terpenes and lignans from leaves of *Chamaecyparis formosensis*.*Phytochemistry* 51:793-801.
14. Ramarosandratana, A., L. Harvengt, A. Bouvet, R. Calvayrac, and M. Paques(2001)Influence of the embryonal-suspensor mass sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. *Plant Science* 160:473-479.
15. Sun, X. and J. C. Linden(1999)Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.*22(1)44-47.
16. Umehara, M.,Kamada M(2005)Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis.*Plant Biotechnology*22:253-260.
17. Vinocur, B., T. Carmi, A. Altman and M. Ziv(2000)Cell biology and morphogenesis:Enhanced bud regeneration in aspen roots cultured in liquid media.*Plant Cell Rep.*19:1146-1154.
18. <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pine/index.shtml>.