

第七節 植物組織培養考察

人類在很多世紀以來，一直試圖改變傳統的育種和選種的程序，以改進栽培植物的質量及產量⁽³³⁾。這些努力，已促進所謂“綠色革命”，並為人類努力提供明確的方向。尤其植物生物工程的興起，不僅為生理學、醫學、藥學、遺傳學及化學等科學的基礎理論研究提供了新手段；更為這些科學的發展及應用開闢了新途徑，因此受到世界各國高度重視，也興起了各國對「生物技術」(biotechnology) 研究的高度興趣。

生物技術廣泛來說，是一門包含植物學、微生物學、免疫學、分子生物學、生物化學、遺傳學、化學工程及電子工程學之綜合性科技⁽³⁴⁾，其一詞源於英文 bio (生命、生物) 及 technology (工藝、技術) 兩字，涵蓋了醫藥工業、食品發酵工業、化學工業、能源工業、礦業、農業及環境工程等。就應用層面而言，生物技術乃是指利用生物細胞或其代謝物質製造產品及改進人類生活品質的科學技術。因而蘇遠志教授將生物技術定義為：利用生物程序、生物細胞或其代謝物質來製造產品及改進人類生活素質的科學技術^(35,36)。

組織培養是生物技術的基礎，係利用植物體的細胞具有分化全能性 (totipotency)，即每個細胞具有該植物的全部遺傳信息的特性，以及離體細胞在一定培養條件下，具有發展成為完整植株的潛在能力，在人為的環境中以人工培養基，進行植物體的器官、組織、細胞增殖或分化培養之一種技術⁽³⁷⁻³⁹⁾。更詳細解釋即利用植物體之組織或器官為培植體 (explant)，如胚、花器、莖頂、生長點、芽體、葉、根、根莖、或其衍生的細胞及原生質體等，在含有無機鹽類、糖類、植物生長調節劑等人工培養基上，以無菌方式培養，並觀察其生理及型態之反應，得到大量的繁殖個體或進行育種、生理等之研究與改良⁽³⁶⁾。

植物組織培養的發展史可分成五個階段：第一階段是思想準備時

期，可追溯至 1667 年 Hooke 發現細胞開始，此為生物學中首次出現細胞的概念。其後 1756 年 Duhamel 發現癒合組織；1838 年 Schleiden 提出植物細胞學說；1839 年 Schwann 認為細胞學說亦可適用於動物細胞範疇，提出了細胞是生物體的基本結構，具有生理及發育上潛在全能性功能的論點，亦即每個細胞係一單位之生活物質團塊，此論點遂成為植物組織培養研究的思想基礎⁽⁴⁰⁾。第二階段為理論奠基時期，1902 年德國植物學家 Haberlandt 首次以人工分離培養植物單細胞，提出植物單細胞具有分化全能特性的理論，1908 年 Goebel 以薯蕷 (*Dioscorea* sp.) 及 罌粟科紫堇屬 (*Corydalis* sp.) 為材料進行試驗，發現切口上部發芽，而下部長根，同時發現其體細胞具有分化全能特性⁽⁴¹⁾。1904 年德國植物胚胎學家 Hanning 以胡蘿蔔為材料，首次獲得成功的胚培養，提早了植株的形成。1922 年 Knudson 報導將蘭花種子以無菌播種法成功的獲得植株。1925 年 Laibach 進行亞麻種間雜種幼胚培養，成功地得到了雜種植物。1933 年李等進行銀杏離體胚培養，可於 3 mm 以上之胚長成小植株，並發現胚乳抽出物能促進銀杏離體胚的生長，為後人利用植物體組織抽出液促進培養物之生長，提供了試驗的根據，此階段由於分化細胞全能性學說及許多學者的探索性實驗研究，獲得不少有價值的結果，讓後來的學者有所依據，而邁入第三階段⁽⁴⁰⁾。第三階段為技術建立時期，當 1934 年 White 用無機鹽類、糖類和酵母抽出物的培養基，進行蕃茄根尖離體培養，繼代培養建立了第一個活躍生長的無性繁殖系之後，1937 年 White 發現維生素 B 群對培養之離體根生長具有重要性，同時，Went 等發現 IAA 及其控制植物生長中之作用，1942 年 Overbeek 等首次利用椰子汁培養蔓陀蘿的幼胚，此液體胚乳含豐富滋養胚生長的養分外，並認為對細胞的增殖有極佳的效果，因此在培養基中添加未知成分的抽出物，該配方歸為自然培養基 (natural medium)，而椰子汁和其它抽出物至今仍被延用。此階段，由於 White、Gautheret 及 Nobecourt 等人，在基礎上建

立了植物組織培養的綜合培養基，其中包含無機鹽類、有機成分和生長調節因素，這是隨後創立的各種培養基的基礎，成為當今各種植物組織培養的技術基礎⁽⁴⁰⁾。由於植物實驗形態學方面的需求，組織培養進入探討調控細胞培養物器官分化之研究此為第四階段。1948年 Skoog and Tsuei 在煙草莖切段和髓培養研究中，發現腺嘌呤與腺 可以解除培養基中生長素 (IAA) 對芽的抑制作用，進而發現腺嘌呤與生長素的比例是控制芽體和根分化的決定性因素之一⁽⁴⁰⁾。1957年 Skoog and Miller 調節 auxin 與 cytokinin 的使用濃度，得到再生植株⁽⁴²⁾。1958年 Steward 等學者將細胞誘導成體胚⁽⁴³⁾。而後陸續建立 MS (Murashing and Skoog, 1962)、White (White's, 1963)、LS (Linsmaier and Skoog, 1965)、B₅ (Gamborg *et al.*, 1968)、N & N (Nitsch and Nitsch, 1969)、SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)、N₆ (Chu *et al.*, 1975) 與 WPM (Lloyd & McCown, 1980)等綜合性植物組織培養基⁽⁴⁴⁾。此階段從開始研究培養細胞的發生，同時證實細胞培養的全能性，這是植物組織培養的關鍵時期，也是組織培養的全盛時期。自 1950年獲得培養細胞分化成功後，證明植物分化全能的特性，以及每一個細胞均攜帶有完全的遺傳基因之理論，自此進入組織培養的應用研究時期的第五階段。組織培養發展至今，已建立了一套完整的植物組織培養技術，現正朝向擴大各種經濟作物上的研究，如加強細胞生長、生化機理和遺傳變異的研究，將傳統植物組織培養帶入另一個嶄新的遺傳工程世界^(40,44)。

Murashige 於 1974年提出植物組織培養可分成三大階段，如無菌培植體之建立、大量繁殖及移植前之馴化處理⁽⁴⁵⁾。由於植物組織培養具有：1.節省大量的空間及時間；2.培養過程不受外在環境因子的影響，且終年均可進行；3.可重複性等三大優點。因此常被廣泛推展與應用於下列範疇：1.利用莖頂培養技術於短時間內，可獲得無病毒苗及大量繁殖的植株；2.利用花藥培養單倍體及同質雙倍體植株，縮短

育種年限提高選拔效率； 3. 試管授精與胚培養技術，克服植物遠緣雜交不親合之障礙，以拯救瀕臨死亡或退化的幼胚； 4. 利用組織培養細胞從事誘變，以擴大親代種質或篩選有價值的新品種； 5. 細胞培養形成之擬胚體，可製造人工種子或應用超低溫冷凍保存技術貯存種子； 6. 利用原生質體分離、培養及融合可產生體細胞雜種； 7. 利用二階段培養，大量生產二次代謝物，應用於製藥、香料及色素等工業上，亦可結合農桿菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 基因轉殖，產生大量根毛 (hairy roots) 或生產二次代謝物，應用於製藥工業； 8. 利用 DNA 重組技術及農桿菌進行形質轉換，配合組織培養的方法，將有用的基因導入缺乏此基因之植株中，因此有效的縮短品種改良的年限。由於植物組織培養有著如此廣闊的應用前景，遂使植物組織培養技術倍受先進國家學者所熱衷研究^(35,38-40)。

近幾年來因生物技術的快速發展，使得組織培養技術日新月異。目前組織培養技術，已廣泛應用於農藝、園藝、林業、色素、香料、製藥及生物農藥等方面，更於遺傳工程及藥學研究上佔有一席之地。所謂一次代謝物，乃指生物體生長及存活不可或缺的要害；二次代謝物，則衍生自一次代謝物，其化學結構較複雜，由特殊遺傳形質所控制，非全部植物細胞均具合成二次代謝物之能力。植物體具有很強的合成能力，所合成的化合物種類繁多且範圍廣泛，目前已知的三萬多種天然化合物中，大約有 80% 來自植物。但近年來自然環境的被破壞，使得具經濟價值植物的開發與利用更加困難。由於利用植物組織和細胞培養的方法，可有效地縮短繁殖和栽培的時間，且培養的細胞於人工控制下，可進一步利用科學方法，提高代謝物之品質和產量。

目前在藥用植物上，已有不少高貴藥材被大量繁殖成功，例如：毛地黃⁽⁴⁶⁾、百脈根⁽⁴⁷⁾、柴胡⁽⁴⁸⁻⁵²⁾、紫草^(51,52)、茅蒼朮⁽⁵³⁾、芍藥⁽⁵⁴⁾、半夏⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾、黃耆^(59,60)、地黃^(61,62)、浙貝母⁽⁶³⁾、當藥⁽⁶⁴⁾、防風⁽⁶⁵⁾、人參⁽⁶⁶⁾、

山藥⁽⁶⁷⁾、白及⁽⁶⁸⁾、輪葉沙參⁽⁶⁹⁾、龍膽⁽⁷⁰⁾、青蒿⁽⁷¹⁾、黃蘗^(72,73)、何首烏⁽⁷⁴⁾及知母⁽⁷⁵⁾等。

利用癒合組織生產二次代謝產物，此產物具有藥用成分、前驅物或中間產物之潛力，並可能有產業經濟價值者有：黃芩 (*Scutellaria baicalensis*) 產生 baicalin、baicalein 及 wogonin⁽⁷⁶⁾；毛地黃 (*Digitalis purpurea* 與 *Digitalis lanata*) 產生 cardenolides⁽⁷⁷⁾；龍葵 (*Solanum eleagnifolium*) 產生 solasonine 及 solamargine⁽⁷⁸⁾；芍藥 (*Paeonia lactiflora*) 產生 paeoniflorin 及 albiflorin⁽⁵⁴⁾；番紅花 (*Crocus sativus*) 利用柱頭樣組織 (stigma-like tissue) 產生 crocin 及 picrocrocin⁽⁷⁹⁾等成分。利用農桿菌進行形質轉換，產生根毛及二次代謝物的藥用植物方面，則有人參 (*Panax ginseng*) 產生 ginsenoside (ginsengsaponin) ，比主根多 2.4 倍⁽⁸⁰⁾；顛茄 (*Atropa belladonna*) 產生比原植物體更多之 atropine 及 scopolamine⁽⁸¹⁾；長春花 (*Catharanthus roseus*) 產生 vincristine 及 vinblastine^(82,83)；曼陀羅 (*Datura candida*) 產生 19 種 tropane alkaloids (包括主成分 scopolamine)；*Datura candida* hybrid 產生較原植物高 1.6 倍及 2.6 倍之 scopolamine 及 hyoscyamine (Christen *et al.* 1989)^(84,85)；薄荷 (*Mentha citrata*)、甜菜 (*Beta vulgaris*) 及菸草 (*Nicotiana rustica*) 分別產生 terpenes、betalain 及 nicotin alkaloids⁽⁸⁶⁾等。

利用植物組織及細胞培養技術，藉由誘導癒合組織，進而細胞懸浮培養，以生產含有藥效成分之二次代謝產物，具有經濟價值者有：長春花 (*Catharanthus roseus*) 產生 vinblastine、vincristine 及 ajmalicine⁽⁸⁷⁾；日本黃連 (*Coptis japonica*) 產生 berberine⁽⁸⁸⁾；印度蘿芙木 (*Rauwolfia serpentina*) 產生 reserpine⁽⁸⁹⁾；紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 產生 shikonin 及其衍生物⁽⁹⁰⁾；罌粟 (*Papaver somniferum*) 產生 sanguinarine 及 morphine alkaloids⁽⁹¹⁾；柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 產生 saikosaponin⁽⁹²⁾；三角葉薯蕷 (*Dioscorea*

deltoidea) 產生 diosgenin⁽⁹³⁾；鐵海棠 (*Euphorbia millii*) 產生 flavone 及 anthocyanin⁽⁹⁴⁾；紅豆杉 (*Taxus brevifolia*) 產生 taxol⁽⁹⁵⁾；旱蓮 (*Camptotheca acuminata*) 產生 camptothecin⁽⁸⁶⁾等。

此外利用細胞懸浮培養技術，探討植物細胞內二次代謝產物之生合成路徑，如毛地黃 (*Digitalis lanata*) 之細胞懸浮培養，研究其強心配醣體 (cardiac glycoside) 之生合成關鍵酵素，與生合成路徑 (biosynthetic pathway) 之關係⁽⁹⁶⁾。利用細胞或組織培養之生物技術 (biotechnology)，乃藥學研究人員應具備之基本知識與技術，並應將此生物技術轉移至工業化，大量生產有價值之醫療用化合物，降低產品價格，嘉惠人類，為製藥工業開闢一條新的途徑。

影響植物細胞懸浮培養或分生組織大量繁殖的因子相當多，包括植物本身之特性、培養方式、培養環境及培養基之組成等，如何建立一個生長良好，且可提高二次代謝產物產量的培養方式，茲將所收集之相關文獻整理如下：

一、 培殖體之選擇

組織培養過程中，培殖體的選擇足以影響器官的分化能力。雖然植物細胞具有分化全能性，但有時只侷限於某些細胞。1977年 Murashige 認為選擇培殖體時須考慮：取材部位、培殖體大小、培殖體之年齡及採樣季節等因子⁽⁹⁷⁾。一般培殖體之選擇，需依材料特性及實際需要而定，除了培養系統的形式外，培殖體的選擇對產品的質與量有所影響。通常植物的分生組織及生殖器官如胚、未成熟胚、下胚軸、胚珠、花柄、未成熟子房、幼根、主根、葉柄等細胞分裂旺盛部位之培殖體，各具有不同之分化能力。一般研究顯示以莖頂為大量繁殖之培殖體，其成功機會遠較其他組織為佳。

不同的培植體、成熟度或季節所採取的材料，產生的芽體、癒合組織或體胚的能力可能也不同，甚至影響到活性成分的產生。1983 年 Hiraoka 等學者報導柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 近頂芽尖端之嫩芽，誘導癒合組織能力可達 100%，隨著葉片年齡增加，誘導率驟降，老葉幾乎喪失癒合組織之誘導力⁽⁹⁸⁾。1985 年 Jenny 等學者指出松 (*Pinus radiata*) 之子葉年齡，直接影響芽體形成，可能是較老的子葉，所含內生性 cytokinins 和 gibberellins 量少，不易形成分生組織⁽⁹⁹⁾。1991 年 Margarita and Margarita 指出毛地黃 (*Digitalis thapsi*) 以葉、根和下胚軸誘導的癒合組織中，以下胚軸為來源的癒合組織再生芽之能力最強⁽¹⁰⁰⁾；因此生長旺盛的培植體，是培養成功與否的重要因素。1981 年陳等學者指出，黃蘗在春天之癒合組織誘導率為 100%，培養三天後即可形成顏色透明嫩綠之癒合組織；夏天所採之培植體，則需一週始可誘導質地較硬之癒合組織；秋天則更遲⁽¹⁰¹⁾。一般認為經過低溫打破休眠，或生長週期之初，為最佳採樣與培養季節。Nigra *et al.* (1987) 指出茄科之 *Solanum eleagnifolium* 不同部位之組織，如下胚軸、子葉、根、葉及果實等，所形成之癒合組織，各有不同之生長速率，內含之 solasonine 亦隨著培養期間長短而有所變化⁽¹⁰²⁾；因此植物的再生能力與取材部位有極大之關係；其成分含量也隨取材部位而有不同。綜上所述，培植體的不同部位、大小或年齡，其組織分生能力不盡相同，因此培植體對組織培養的成敗，有著決定性的影響，如何選擇適當的培植體，是值得研究的重要課題。

二、培養基的組成

組織培養系統成功的被建立，除了培植體的選擇外，培養基的組成對植物之生長或繁殖影響甚鉅，隨著植物種類或生長時期

的不同，所需求之營養成分及濃度亦有差異，可利用不同培養基的組成或比例上的改變來達成目的。一般草本類植物之組織培養，使用最普遍的基本培養基為 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基⁽¹⁰³⁾，根據 1981 年 Evans 等學者統計，作物類有 70% 的培植體，皆由 MS 培養基誘導體胚⁽¹⁰⁴⁾；木本植物則以 WPM (Lloyd & McCown, 1980) 培養基最為常見⁽⁴⁴⁾。植物組織培養不同培養基內所含的成分大致可區分為：1.大量鹽類；2.微量鹽類；3.維生素；4.醣類；5.植物生長調節劑；6.未定組成之添加物；7.前驅物與誘導劑等七大類。

(一)大量鹽類

大量無機鹽類包括 N、P、K、Ca、Mg 及 S 等六種元素，此乃高等植物生長不可或缺的養分。1980 年 Wang and Hu 指出早期 White 培養基廣泛被應用於莖頂培養，後來學者繼續研究改進，發現提高 N、P、K 三種元素，及加入 EDTA 與鐵源產生螯合型態，可防止鐵離子於高 pH 時產生沉澱；在此觀念影響下研發出著名的 MS 培養基⁽¹⁰⁵⁾。MS 培養基總鹽類濃度為 93.41 mM，為含高濃度大量元素之培養基，以其優異組合作各種不同濃度稀釋，可適用於極多種類之植物。

1.氮源

氮 (N) 顯著影響植物的形態及生長，一般氮源可分成無機氮源與有機氮源，無機氮源包括硝酸鹽 (NO_3^-) 及銨鹽 (NH_4^+)，有機氮源包括了氨基酸及其衍生物，如 casein hydrolysate (CH)、tryptone、peptone、arginine、aspartic acid、glutamic acid 及 tyrosine 等。硝酸鹽是組織培養中氮源最重要的型式，吸收後可使培養基變為鹼性，若以銨態氮 (NH_4^+)

為氮源，則細胞吸收後使培養基變酸性，所以培養基中使用 NH_4^+ 、 NO_3^- 、銨鹽及少量硝酸鹽，一方面可當作氮源，另一方面可穩定培養基的 pH 值。1980 年 Gandaedaja 指出石斛 (*Dendrobium phalaeopsis*) 的頂芽試驗，發現 NH_4^+ 比 NO_3^- 的效果佳，但發根時卻以 NO_3^- 較佳⁽¹⁰⁶⁾。1981 年 Erdei 等學者指出 LS 培養基的氮含量改為 1/5 時，可縮短毛地黃 (*Digitalis lanata*) 的發根時間⁽¹⁰⁷⁾。1985 年 De-Ehnamkul and Ellis 指出紫草科之 *Anchusa officinalis* 的細胞懸浮培養，改變 B₅ 培養基的 NO_3^- 為 15 mM 時生長情形較佳，產生 rosmarinic acid 的量最多⁽¹⁰⁸⁾。Yamamoto and Yamada (1986) 指出印度蘿芙木 (*Rauwolfia serpentina*) 的培養基中 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ 的比例改變，生合成 reserpine 的量也不盡相同， NO_3^- 可以促進 reserpine 之產生⁽⁸⁹⁾。1988 年 Kim 等人發現大戟科鐵海棠 (*Euphorbia milli*) 的細胞培養於 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+ = 1$ 時，anthocyanin pigment 的生合成最迅速⁽⁸³⁾。1994 年陳等學者在白芷懸浮細胞培養中，發現 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+ = 1/2$ 時，imperatorin 產量最多⁽¹⁰⁹⁾。Cao and Tibbitts (1994) 指出 NH_4^+ 與 NO_3^- 配合使用，可使 pH 值之容許範圍增大，且效果比單獨使用者好⁽¹¹⁰⁾。

有機氮源包括氨基酸及其衍生物，如 casein hydrolysate (CH)、tryptone、peptone、arginine、aspartic acid、glutamic acid 及 tyrosine 等，較有利於體胚或器官的形成。Stuart and Strickland (1984) 指出苜蓿 (*Medicago sativa*) 培養基中添加 proline 可刺激體胚形成⁽¹¹¹⁾。CH 是最常用的有機氮源，Fonnesbech (1972) 指出 2-3 g/l CH 有助於蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 芽球之生長⁽¹¹²⁾。Siriwardana and Nabors (1983)⁽¹¹³⁾及 Raina (1987)⁽¹¹⁴⁾等人指出添加 240 μM 的 L-tryptophan，

可提高植物的生產率。因此於組織培養中，尋求適當的氮源、無機氮源或有機氮源，乃至此兩者的組合，極為重要。

2. 磷源

Smith and Krikorian (1990) 曾就磷鹽對植物體的影響，進行一系列的濃度測試，發現 1.25 mM 及 2.5 mM 磷酸有助於植物發根及發芽⁽¹¹⁵⁾。而磷對於植物懸浮培養產生的二次代謝物生合成，也扮演重要的角色，有些植物細胞懸浮培養產生之二次代謝物產量，會隨著磷離子濃度提高而增加，相反地有些則隨之降低。De-Eknankul and Ellis (1985) 指出紫草科之 *Anchusa officinalis* 產生的 rosmarinic acid，隨磷離子濃度提高而增加⁽¹⁰⁷⁾，Sasse *et al.* (1982) 認為芸香科之 *Peganum harmala* 產生的 β -carbolin alkaloids，隨磷離子濃度的下降而減少⁽¹¹⁶⁾。夾竹桃科之長春花 (*Catharanthus roseus*)⁽¹¹⁷⁾ 及 *Peganum harmala*⁽¹¹⁶⁾ 植物的細胞懸浮培養中，磷會抑制其二次代謝產物的生合成；在茜草科之 *Morinda citrifolia* 生產 anthraquinone⁽¹¹⁸⁾、*Digitalis purpurea* 生產 digitoxin⁽¹¹⁹⁾、*Anchusa officinalis* 生產 rosmarinic acid⁽¹⁰⁷⁾、白芷生產 imperatorin⁽¹⁰⁹⁾、當歸生產 ferulic acid 及 n-butylidene phthalide⁽¹²⁰⁾ 的細胞懸浮培養中，提高磷離子的濃度，二次代謝產物的產率隨之增加。

3. 鉀、鎂、鈣、硫等離子

1985 年 Paek 等學者指出蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 之擬原球體 (*Protocorm*) 的培養基中，添加 8 mM 的鈣離子，可提高芽的形成率及促進生長，4 mM 的濃度增強根的生長，8-12mM 反而降低組織中葉綠素 (chlorophyll) 的含量⁽¹²¹⁾。Irintoto *et al.* (1993) 利用 X-ray energy dispersive analysis，指

出培養基含 P K Ca S, 能促進癒合組織生長⁽¹²²⁾。此外 1982 年 Sasse 等人發現培養基中缺乏 K^+ 或 SO_4^{2-} , 會降低 serotonin 的形成; 若缺乏 Ca 及 Mg 則使 alkaloid 的生合成受到抑制⁽¹¹⁶⁾。1990 年 Fukui 等學者指出紫草懸浮細胞中提高 SO_4^{2-} 的濃度, 可使紫草懸浮細胞形成 shikonin 的產量增加三倍, 但會抑制細胞生長⁽¹²³⁾。

(二) 微量鹽類

培養基中的微量元素, 主要包括鐵、硼、錳、鋅及銅等五種, 其中以鐵源對體胚的影響最大。培養基中缺乏鐵鹽時, 蛋白質合成受阻, 細胞分裂無法進行。早期研究皆以硫酸亞鐵、酒石酸鐵或檸檬酸鐵等鹽類為鐵之來源, 但由於鐵鹽易沉澱, 並使培養基變為鹼性, 而無法被培植體吸收利用。Shepard and Street (1974) 首先將 EDTA 加入培養基中, 使鐵離子形成螯合物不易沉澱, 並維持適當的 pH 值及降低毒性⁽¹²⁴⁾。George and Sherrington (1984) 認為胡蘿蔔癒合組織之生長, 因硼的缺乏而減緩⁽¹²⁵⁾。Caboche (1987) 報導眾多微量元素中, Zn 及 Mn 可明顯提高菸草芽體之形成⁽¹²⁶⁾。Fukui *et al.* (1990) 指出紫草的懸浮細胞生成二次代謝產物中, 銅可刺激紫草的懸浮細胞生合成 shikonin⁽¹²³⁾。Andrijany 等 (1999) 以龍舌蘭為材料, 測試 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Mg^{2+} 等元素, 對癒合組織中 sapogenin steroids 的產率, 發現當培養基缺乏 Ca^{2+} 時, 有助於 sapogenin steroids 生成; 若 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Mg^{2+} 的濃度提高時, 反而抑制 sapogenin steroids 生成⁽¹²⁷⁾。其它如碘等微量元素或多或少影響植物之生長。

(三)維生素

培養基常用的維生素包括 Vitamine B₁ 及 Nicotine acid。實際上，植物本身雖具有合成維生素的能力，但於培養基上生長時，某些維生素的合成會受到限制，因此添加適量的維生素幫助植物生長是必需的。例如 ascorbic acid 可防止培養基中 thiamine . HCl 氧化而失去作用，並且延緩培殖體的褐化。葉酸 (folic acid) 於光培養時可促進組織增殖，但於暗培養則呈抑制的現象。陳等人 (1986) 於青蒿癒合組織培養基中，加入 Vitamine B₁₂，發現可提高不定芽形成根之能力，並縮短誘導時間，使根粗壯及促進生長⁽¹²⁸⁾。Sanchez (1988) 指出 thiamine . HCl 可促進 *Cytopodium* 根之形成及擬原球體 (protocorm like body) 分化芽的能力⁽¹²⁹⁾。Sauerwein and Becker (1989)在培養基內添加 Vitamine B₁₂，可促進地錢組織的生長⁽¹³⁰⁾。其它如 Vitamine C (ascorbic acid) 一般認為可防止培養基中 Vitamine B₁ 氧化，並延緩培殖體之褐化。1988 年 Richard 等學者指出 Vitamine C 能促進菸草癒合組織，於多次繼代培養後之生長活性⁽¹³¹⁾。

(四)糖類

培養基中添加糖類具有提供碳源，及培殖體生長所需之能量來源和調節滲透壓的功能，不同碳源對細胞懸浮培養二次代謝產物之產生有所影響。常用的碳水化合物有蔗糖 (sucrose)、葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose)、麥芽糖 (maltose) 及 D-甘露醇 (D-mannitol) 等，一般較常使用蔗糖，其濃度為 1-6% ，濃度過高時會抑制細胞的生長。Fujita (1981) 指出紫草於 2% 蔗糖濃度時，shikonin 產量會隨著蔗糖濃度升高而增加，但超

過 5% 則反成抑制⁽⁹⁰⁾。Arya *et al.*(1991)將人參的原生質體培養在不同的糖類中，發現 myo-inositol 之 plating efficiency 最佳，mannitol 最差⁽¹³¹⁾。1986 年 Yamamoto 等學者報導黃芩培養基中，5% 的麥芽糖取代 3% 的蔗糖時，其癒合組織的生長速率及 flavonoid 的含量明顯增加⁽¹³³⁾。Cabasson 等人 (1995) 於柑橘培養中，以半乳糖取代蔗糖成為單一碳源，可使 non-embryogenic callus 形成 embryogenic callus⁽¹³⁴⁾。1990 年周等學者以多醣和寡糖為碳源，探討紫草懸浮細胞生長及紫草素 (shikonin) 的形成，亦發現糖類濃度的差異，直接影響細胞生長和紫草素產量⁽¹³⁵⁾。1994 年陳等學者指出以葡萄糖為碳源，對白芷懸浮細胞之 imperatorin 的生成最佳⁽¹⁰⁹⁾。

(五)植物生長調節劑

植物生長調節劑是控制植物生長與分化的重要因子。一般而言，進行組織培養時，植物細胞本身雖能合成一些內源性的荷爾蒙，但生成量少，不足以供應植物生長所需，故需外加植物生長調節劑。植物生長調節劑約可分為 auxins、cytokinins、gibberellins、abscisic acid、ethylene、brassinosteroids 及 triconanol 等七大類，前四大類較常應用在植物組織培養上，而各類植物生長調節劑皆有其特殊的作用。

1. Auxins

Auxins 是最早被發現的植物生長調節劑，與植物的趨光性有關，其生理作用極為複雜，在組織培養中，常用於誘導癒合組織及根的形成。在植物體內生長分裂最旺盛的生長點部位含量最多，其餘部位僅有少量存在，可能係由生長點合成後，再運送到各部位之故。一般 auxins 類有促進植物細胞生長、

誘導細胞分裂及分化、促進發根、抑制花與果實脫落及控制開花與結果等作用⁽¹³⁶⁾。高濃度的 auxins 可誘導培植體形成癒合組織，而較低濃度或不添加 auxins 時則可產生胚狀體。常用於組織培養的 auxins 有 IAA、IBA、NAA 及 2,4-D，除了 IAA 為植物的內生荷爾蒙外，其餘均為人工合成。植物誘導癒合組織所需之的 auxins，隨植物種類不同而有所差別。在所有的 auxins 或是類似 auxins 物質的植物生長調節劑中，最常用的是 2,4-D。據 Evan 等學者於 1981 年的統計，大約有 57.1% 的體胚培養，皆由使用 2,4-D 所建立的⁽¹⁰³⁾。植物通常誘導癒合組織時，需要較高濃度的 auxins，降低 auxins 濃度則有利於體胚或高擬胚化癒合組織的形成。

2. Cytokinins

在 1950 年代發現 cytokinin 存在植物體內，在植物組織培養中，常應用於打破頂芽優勢產生不定芽，促進癒合組織生長，及原生質體融合後幼芽之誘導，過量則會抑制側根及不定根形成。在田間常應用於促進種子發芽、果實生長及著果等方面。常用的 cytokinins 有 BA、kinetin、zeatin、adenine、2ip 及 thidiazuron (TDZ) 等，其中 adenine、zeatin、2ip 為植物本身可合成，BA、kinetin 及 thidiazuron 則是由人工合成⁽¹³⁶⁾。Skoog and Miller (1957) 調整 auxins 與 cytokinins 比例，以誘導菸草癒合組織獲得再生植株⁽⁴²⁾。後人發現 auxin 與 cytokinin 高比率，可促進根及癒合組織形成；低比率則促進芽之分化。植物組織培養常以 auxin 與 cytokinin 兩者混合使用，例如 auxin/cytokinin >1 可誘導癒合組織或芽體形成根的分化；auxin/cytokoinin =1 可以形成癒合組織、器官或不定芽的分化，如適量的 auxin 及 cytokinin (濃度各為 2 mg/l) 可誘導培植體產生不定芽；auxin/cytokinin <1 則會促進癒合組織形成

芽體，將高濃度的 cytokinin (1-3 mg/l BA 或 kinetin) 配合少量的 auxin (0.2-0.5 mg/l NAA) 可誘導腋芽的形成，此時若將 cytokinin 降低或除去則可促進芽體大量發根。簡單述之，cytokinin 和 auxin 的比值增高時，可促進芽的分化；比值降低時，則可促進根及癒合組織的形成。

TDZ 最早在 1982 年被報導具有 cytokinin 的活性，可用於誘導不定芽及側芽之形成，尤其對木本植物極為有效，同時對體胚形成具有良好的助益。TDZ 不會被 cytokinin oxidase 所分解，穩定性較高，但材料如培養於 TDZ 的時間過長，會導致玻璃質化，並產生不正常的不定芽及發根受阻⁽¹³⁷⁾。

3. Gibberellins (GA₃)

Gibberellins 是一種天然的植物生長激素，於植株生長旺盛的地方含量最高。最常見的 gibberellins 是 GA₃，通常被應用於促進種子萌芽和打破休眠等方面。1990 年 Agnihotri 等學者報導 GA₃ 可提高十字花科之 *Brassica nigra* 的癒合組織產生擬胚化作用⁽¹³⁸⁾。Ghosh and Sen (1991) 報導 GA₃ 可使 *Asparagus cooperi* 的體胚成熟⁽¹³⁹⁾。Hunault and Maatar (1995) 於培養基中加入 GA₃，在茴香葉柄誘導 somatic embryogenesis 之試驗中，以 2.9 μM GA₃ 誘導形成植株的效果最好⁽¹⁴⁰⁾。

4. Abscisic acid (ABA)

Bennet and Keffor (1953) 首次於植物的乙醚抽出物中，找到一種具有抑制芽鞘生長的物質，稱 β-抑制劑。Miborrow (1968) 發現 β-抑制劑內含 ABA⁽¹⁴¹⁾。ABA 是一種生長抑制劑，具有促進種子休眠、葉片老化及果實後熟的作用，並具有抑制莖、葉的生長及種子發芽等生理作用⁽¹³⁶⁾。1983 年

Chandler 等學者發現加入 ABA，能增加 *Solanum aciniatum* 癒合組織所含 solasodine 的產率⁽¹⁴²⁾。Ammirato (1973) 於 *Carum carvi* 的培養中，提出 0.1 μM 10 μM ABA 濃度的作用有二：(1)使胚成熟且能抑制不正常增生。(2)抑制早熟性萌發，使體胚成長正常化⁽¹⁴³⁾。Attree and Fowke (1993) 提出 ABA 在體胚發育中為重要的荷爾蒙，如果缺乏 ABA，很少體胚能夠產生⁽¹⁴⁴⁾。Li and Wolyn (1995) 發現 ABA 和 ancymidol 比 uniconazol 及 paclobutrazol 更能促進體胚的發育⁽¹⁴⁵⁾。

5. Ethylene

Ethylene 於 1800 年代即被認為是 natural plant hormone。在電發明以前，煤燈被用於家庭或街上，但發現長於街燈附近的樹木常提早落葉及落花，而新芽亦提早抽出等現象，直至 1901 年 Neljubov 才發現是 ethylene 引起的現象。Ethylene 對植物之生理作用有：使植物之向地性與背地性、抑制單子葉植物幼苗與切離器官之生長、促進根之形成、葉之下垂生成 (epinatsy)、頂芽優勢、種子休眠、開花作用、葉片離層老化與脫落、果實成熟、使一些酵素活化 (如 peroxidases 與 PAL, phenylalnine ammonia lyase) 及芽體大量繁殖等。Ethylene 在常溫下呈氣體狀態，易導致植物褐化，且過量的 ethylene 易使形成的芽體產生玻璃質化，所以如何在不同培養時期，針對 ethylene 之濃度做適當的調控，對其應用極為重要⁽¹³⁶⁾，因此造成 ethylene 較少應用於組織培養。

(六)有機添加物

1942 年 Overbeek 等首次利用椰子汁 (CM) 培養蔓陀蘿

的幼胚，此液體胚乳含豐富滋養胚生長的養分外，並認為對細胞的增殖有極佳的效果，因此培養基中添加有機添加物，該配方歸為自然培養基 (natural medium)。椰子汁、活性碳 (activated charcoal)、人參煮液等抽出物，常被添加至培養基中，以促進生長分化、降低褐化率或促進二次代謝物之生成。雖然此等未定組成抽出物對植物生長之促進有一定程度之作用，但其詳細作用原理仍有待研究。

1. 活性碳

在培養基中加入活性碳可吸附植物所分泌的毒素，並可克服褐化現象。如添加 BA 使根的形成和生長受到抑制，但加入活性碳可改善此情形。1978 年 Fridborg 等學者指出在 *Daucus carota* 及 *Haplopappus gracilis* 細胞培養中，加入活性碳可促使癒合組織的體胚再生及根之形成。在不含活性碳之培養基中，可發現高含量的 PAA (phenylacetic acid) 及 *p*-hydroxybenzoic acid 會抑制 embryogenesis⁽¹⁴⁶⁾。而活性碳可吸附此二物質，故在含活性碳之培養基中不含 PAA 及 *p*-hydroxybenzoic acid。莊和李 (1980) 指出加入 2 g/l 活性碳，可促進台灣一葉蘭種子發芽及小苗發育與結球⁽¹⁴⁷⁾。活性碳對培植體的影響可能和吸附作用有關，其主要功能有：

(1) 可吸附酚類物質。分析添加活性碳的培養基，其酚類物質如 phenylacetic acid 和 *p*-hydroxybenzoic acid 的含量，均較不加活性碳的培養基低，酚類物質存在培養基中，會抑制體胚的形成。

(2) 可吸附植物生長調節劑。如 auxins、cytokinins 及 ABA 等，而影響培植體對培養基的反應。

(3) 可吸附體胚成熟所需要的天然物質。如生長促進劑，而阻礙體胚的成熟，而使其持續性增生。

(4)可吸附鐵的螯合物，如 Fe-EDDHA ，使體胚無法由球形期長成心臟期；但不會吸收 Fe-EDTA 。

2.其他添加物

椰子汁為椰子種子之胚乳，養分豐富且複雜，一般認為含有大量 cytokinin 類似物質，且具有緩衝 pH 之功能。1980 年莊和李指出椰子汁可明顯地促進台灣一葉蘭早期原球體及小苗之發育及鮮重；若添加 25-100 g/l 香蕉泥對早期原球體及小苗之發育略有促進作用，但明顯抑制小苗葉片之生長⁽¹⁴⁷⁾。陳(1986)在中草藥中指出，於青蒿癒合組織之培養基中，加入人參煮沸液，可提高芽分化率及縮短分化時間⁽¹²⁸⁾。其他添加物如柳橙汁、酵母抽出物、麥芽抽出物、蕃茄汁、蘋果汁、蘆薈抽出物、白麥精、香蕉汁、馬鈴薯泥、紅蘿蔔汁亦為常用之添加物，至於在培養過程中所扮演的角色，須更進一步研究。

(七)前驅物與誘引劑

提高二次代謝物產量的方法，除了從上述諸因子著手外，最常用的即是加入前驅物或誘引劑。

1.前驅物 (Precursors)

許多報告指出，添加前驅物可提高二次代謝產物的產量。由於細胞系的產率取決於細胞內部酵素的活性，因此原本具高產潛能的細胞系，藉著前驅物的加入，可使產能完全發揮。例如在金雞納 (*Cinchona ledgeriana*) 的根狀器官懸浮培養中，加入 L-tryptophan 可以得到近 5 倍的 quinoline alkaloid⁽¹⁴⁸⁾。在 *Digitalis lanata* 細胞懸浮培養中，加入 progesterone ，可得到更多量的 5- β -pregnanes 或 cardenolides⁽¹⁴⁹⁾。1986 年 Anderson 等學者建議於生長曲線的緩慢生長期 (lag phase) 加

入前驅物效果最好⁽¹⁵⁰⁾。目前有些學者利用此法探討細胞內合成的酵素及其路徑。

2. 誘引劑 (Elicitor)

為促使培養細胞生產二次代謝產物，除調整培養基成分，促進細胞分化外，目前常用的方法是在培養基內添加前驅物及誘引劑。許多報告提出在植物細胞培養中，加入某些誘引劑可以增加二次代謝產物之產量。Robin and Rhodes (1986) 在金雞納 (*Cinchona ledgeriana*) 的細胞懸浮培養中，添加一種高分子量樹脂類的吸附物質 XAD-7，可使 anthraquinones 的產量提高 15 倍⁽¹⁵¹⁾。此外添加吸附劑的量與時間，對大量生成二次代謝產物也極為重要，主要原因是誘引劑具有維持二次代謝產物在培養基內的濃度，並防止因產物濃度過高而抑制了細胞生長。1980 年 Shimokawa 等學者在 *Bupleurum falcatum* 毛狀根培養中，嘗試以 XAD-2、XAD-4、XAD-7 誘引 saikosaponin 的生合成，結果以 XAD-2 的誘引效果最好，且對細胞的生長及活力影響較小⁽¹⁵²⁾。1994 年陳等學者在白芷懸浮細胞培養中，亦發現於培養基中添加 20 g/l XAD-7，imperatorin 可使生合成大幅增加⁽¹⁰⁹⁾。此外 1987 年 Funk 等學者從酵母抽出物 (yeast extract) 分離出的碳水化合物提取物，也可誘引大豆生成 glycellin 和提高 *Thalictrum rugosum* 的 berberine 產量⁽¹⁵³⁾。1988 年 Tyler 等學者指出在 *Papaver somniferum* 細胞懸浮培養中，利用 fungal homogenate 可生成 sanguinarine 和 di-hydrobezophenanthridine oxidase⁽¹⁵⁴⁾。一般添加誘引劑的適當時機，為細胞生長周期中的快速生長期 (log phase) 後段或靜止期 (stationary phase) 前段。

三、培養方式

凝膠物質添加與否，可使植物組織培養之培養基，分為固體培養基及液體培養基二種。George and Sherrington (1984) 報導固體培養具有下列優點：1.適合培植體的生長與再生，2.不需要特殊的通氣設備，3.芽體與根之生長情形較規則，4.癒合組織不會散落而形成懸浮培養⁽¹²⁵⁾，故固體培養為大多數研究人員所採用，而液體培養則具有加速癒合組織和器官之生長分化、排泄廢物與減少褐化之優點。Kandeel and Hughes (1988) 發現生長於試管內之馬鈴薯植株，經振盪培養後有較多的節形成，而且長得較高⁽¹⁵⁵⁾。Ichihashi and Kako (1977) 報導洋蘭採用液體培養，可有效地抑制莖頂褐化，此乃固體培養常有異常代謝物蓄積，而液體培養則因沖洗效果而減少褐化現象⁽¹⁵⁶⁾，但亦有例外之情形如 1985 年 Hasegawa 等學者將 *Cymbidium faberi* 之莖頂以液體方式培養，則培植體全部死亡⁽¹⁵⁷⁾。有效的將固體培養基和液體培養基混合使用，常使微體繁殖法得到斐然的成果。如先以固體培養誘導出嫩芽，然後移至液體培養基中可使芽體快速的發育。1989 年 Tsay 等學者以半夏珠芽為材料進行大量繁殖，採用固體及液體交互培養的方式，發現可使繁殖倍率恆久不變⁽¹⁵⁸⁾。

雖然液體培養對促進培植體的生長及分化能力，遠較固體培養為佳，但它亦有一些缺點，如 Earle and Langhans (1974) 指出除蟲菊(*Chrysanthemum cinerariaefolium*) 之芽體以液體培養會導致培植體產生玻璃質化，葉片呈不正常寬厚，若照光芽體受損更嚴重⁽¹⁵⁸⁾；1994 年古等學者指出康乃馨進行液體培養時，芽體會有玻璃質化的現象，即芽體呈現腫脹、濕透及易碎的狀態，葉片則

出現不正常的肥厚且透明狀，葉面無蠟質，乾燥稍久或照光會使受損更嚴重，無法健化移植⁽¹⁵⁹⁾。

四、培養環境

(一) pH 值

一般認為 pH 值與植物形態之發生與生成有密不可分關係，尤其對培養基的軟硬度、鹽類沉澱與否及培植體生長發育有很大影響。pH 值具有維持鹽類可溶的形式、影響培養基梯度的吸收、生長調節劑的酸性及促進洋菜之膠絮等作用。在培養基配製時 pH 值大多調整在 5.2-5.8 之間（固體培養基 pH 值約為 5.7；液體培養基約為 5.2）。若 pH 值太高則會形成固體培養基太硬；pH 值太低則產生不易凝結現象。1986 年 Skirvin 等指出培養基經高溫高壓殺菌或長時間的培養皆會使 pH 值降低⁽¹⁶⁰⁾。Rose and Martin (1975) 指出降低培養基的 pH 值，可促進硝酸態氮的利用量，而提高 pH 值則使銨態氮利用率提高⁽¹⁶¹⁾。auxins 類物質於細胞膜內外的 pH 梯度差越大，會加快膜外的植物生長調節劑被吸收到膜內的速度。如培養基中的 pH 值低於 6.0，IAA 進入細胞的作用即停止。在細胞的生長與分化上，需要不同濃度的 auxins，因此 pH 值對植物生長調節劑的影響，會間接的表現在細胞的生長與分化上。Smith and Krikorian (1990) 指出懸浮培養中以 1 μM 之 NH_4^+ 為單一氮源時，培養期間培養基的 pH 值會下降，而使體胚維持於 preglobular stage proembryos (PGSPs)，而無法進一步成熟發育⁽⁹⁷⁾。近年來為大量生產二次代謝產物，及克服產物之分離不易，1990 年蘇等指出利用培養基 pH 值之改變，使細胞將空泡內代謝物釋出以利於抽取，能促使植物細胞二次代謝物釋出，以利工業化大量生產⁽¹⁶²⁾。

(二)振盪速度

液體培養時，震盪速率與空氣交換是影響培養效果之兩大因素。一般振盪速率約在 50 至 150 rpm。振盪速率太慢或培養液太多，則培植體呈淹水狀態；速率太快，培植體又因彼此快速撞擊而損傷，所以尋求一適當震盪速度十分重要。1958 年 Steward 等學者報導振盪速率會影響胡蘿蔔細胞生長，轉速愈快，細胞與培養基接觸及空氣交換的機會越多，使生長更旺盛；轉速越慢則有助於細胞進一步分化為體胚⁽⁴³⁾。1987 年 Shoyma 等學者發現 *Lilium japonicum* 鱗莖之形成數目，以轉速 60 rpm 之增殖率最高⁽¹⁶³⁾。

(三) 凝膠物質 (gelling agent)

培養基中常用瓊脂 (agar) 來支持培植體，常用濃度在 0.5-1% 間。1981 年 Fujita 等學者指出在紫草細胞培養中，以固體培養可以獲得 shikonin，但在液體培養時則 shikonin 停止合成。在 30 ml 之液體培養基中加 1.5 g 的 agar powder，則可產生 shikonin，於是學者開始探討凝膠劑對成分形成之影響⁽⁷⁹⁾。Hiraoka (1990)指出不同種類及廠牌的凝膠物質，如 gelrite (Kelco)、purified agar (Difco)、agar (Nakarai)、phytagar (Gibco) 及 phytagar (commercial grade, Gibco)，用在紫草細胞培養中發現，只有 gelrite (Kelco) 及 purified agar (Difco) 能顯著增加 naphthoquinone pigments 之生成，約較其他的凝膠物質增加 6-9 倍的產率⁽¹⁶⁴⁾。

(四)光源

George and Sherrington (1984) 指出使用適當的光源照射

植物，有助於植物的生長，但在誘導癒合組織時，大多不照光⁽¹²⁵⁾。『適當的光源』通常又可分：1.光照的強度，2.光週期，3.光譜性質。1987年 Economou 指出最適當的光強度，依所培養的組織或器官，其培養階段、培殖體型式及植物品種而定⁽¹⁶⁵⁾。光強度太高則會抑制根部的生長。一般實驗室以14/10小時的光/暗週期為主。1978年 Mantell 等學者指出 *Dioscorea alata* 及 *D. rotundata* 小苗之形成率，在16小時光照下為12小時光照之4倍，但在癒合組織形成方面，則12小時光照較16小時光照佳⁽¹⁶⁶⁾。Chee and Pool (1989) 作一系列光源對植物體的影響，指出藍光有助於莖頂培養之芽體誘導；紅光則有助於生成不定根⁽¹⁶⁷⁾。所以一般實驗室常以藍光及紅光二種植物生長燈搭配使用，或使用全太陽光植物生長燈。光源對於某些細胞在某方面的生合成途徑，扮演極重要角色，如 flavonoid、cardenolide 及 betacyanins 的生合成即受到光線的影響。植物細胞懸浮培養之照光與否，與二次代謝產物生合成有關，1987年 Nigra 等學者發現 *Solanum eleagnifolium* 在照光下可使 solasodine 的產量提高⁽¹⁰¹⁾。1990年 Takio 等學者亦指出以光照射 *Barbula unguicula* 可提高 chlorophyll 的產量⁽¹⁶⁸⁾。但有些作物則相反，如1989年 Malingre 等學者指出 *Podophyllum hexandrum* 暗培養下，其 podophyllotoxin 的產量較光培養為高⁽¹⁶⁹⁾。這些結果可能因細胞對光反應的生理狀態所造成。

(五) 生長曲線

生長曲線的建立，有助於了解芽體、癒合組織或懸浮細胞在培養基中生長的情形，以選擇繼代培養和分離原生質體之最佳時期，或可探討生長日數與代謝產物量的關係，甚至

用來選擇加入前驅物或誘導劑的最佳時期，所以細胞培養生長曲線的建立不可或缺。一般生長曲線可分為緩慢生長期 (lag phase)、快速生長期 (log phase) 及生長靜止期 (stationary phase)，培植體與培養基之種類或量的不同，均能影響生長曲線和各種生長期的時間長短，所以預先了解生長曲線，有助於組織及細胞的培養。生長曲線的測定可用實際測量細胞數目 (cell counting)、重量法 (fresh weight or dry weight) 或堆疊體積法 (Packed cell volume, PCV) 來表示。

生長曲線的高峰期，與二次代謝物之最大量，並無絕對之關係。張等 (1991) 在白芷 (*Angelica dahurica*) 細胞懸浮培養中，發現 imperatorin 含量約在第 20-24 天時達最高⁽¹⁷⁰⁾。闕等 (1993) 於當歸 (*Angelica sinensis*) 細胞懸浮培養中，發現 ferulic acid 含量約在第 12 天時達最高，而 n-butylidene phthalide 含量約在第 24 天達到高峰⁽¹²⁰⁾。細胞培養物中有效成分產量與細胞生長關係，大抵可分三型：

1. 平行型：有效成分生長曲線與細胞生長曲線呈平行關係，如恩昆類及阿拖品類成分。
2. 延遲型：有效成分生長曲線比細胞生長曲線稍延遲，如皂類。
3. 相斥型：有效成分產量往往在細胞停止生長或死亡後達到最大值，如多酚類，紫草素。⁽¹⁷¹⁾

(六) 溫度與相對濕度

George and Sherrington (1984) 指出在組織培養研究中，大多數培養室皆維持恆溫狀態，尤以 25 ± 2 最為普遍⁽¹²⁵⁾。1979 年 Lane 指出當培養室溫度超過 28 時，水分會聚集於植物及容器壁上，對培養效果呈負面影響⁽¹⁷²⁾。部份

學者採取日夜不同溫度以達特殊目的，Gautheret (1969)在 *Helianthus tuberosus* 研究中，以 26 之晝溫及 15 之夜溫進行變溫處理。此乃因較高的日溫有利於形成層新生細胞之形成；而較低之夜溫則有利分生細胞分化成初生根⁽¹⁷³⁾。1986年 Hatano 等學者報導半夏癒合組織若貯存於 4 ，而後恢復為常溫，其癒合組織之繁殖與再生能力，皆比貯存於 0 者為高⁽⁵⁵⁾。大多數的培養室之相對濕度並未控制，一般以 70% 最常用。濕度高易滋生黴菌及微生物，或造成玻璃質化現象。Arnold and Eriksson (1984)報導 *Picea abies* 之玻璃質化及移植之存活率，與濕度高低有關⁽¹⁷⁴⁾。1991年 Ritchie 等學者報導高濕度會提高 *Beta vulgaris* 之玻璃質化現象⁽¹⁷⁵⁾。

(七) 透氣與通氣

一般培養器常使用鋁箔封蓋，但其空氣之流通性較差，如改用棉栓、瓶蓋或藥包紙等，可促其空氣之流通，或由外界提供新鮮的氣體，可有效改善培養容器內之氣體含量。Hendre (1975) 指出玉蜀黍 (*Zea mays*)、小麥 (*Triticum aestivum*) 及高粱 (*Sorghum bicolor*) 以液體振盪培養，發現培養基中通入氧氣，其癒合組織增殖旺盛並產生不定芽。在空氣交換方面，Cheng *et al.* (1978) 建議在液體培養基中，通入新鮮無菌空氣，可刺激芽體生長速率，其效果遠比用振盪器為佳⁽¹⁷⁶⁾。Biebel (1986) 發現通入含 10% CO₂ 之空氣比一般空氣，有利於 *Petunia* 與 *Cattleya* 小苗之發育⁽¹⁷⁷⁾。Johansson (1984) 指出 CO₂ 的增加能促進 embryogenesis⁽¹⁷⁸⁾。另有 CO₂ 和 O₂ 自由調節比例通氣，如培養藜科藜屬 (*chenopodium*) 之細胞，用 MS 培養基不加糖，並通入 1% CO₂，於白色光 (19w/m²) 培養 18 天後，細胞重

量增加 165 % 。1979 年原田宏等指出，菸草之癒合組織培養，於 MS 培養基不加糖，而加入 1.6 μM NAA 和 1.5 μM IPA (iso-pentenylamino purine) ，在 120-235 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 之光源下，5 個月後增殖 1.5-3.0 倍，但通入 1 % CO_2 三週後又增殖 3 倍，而通入適當濃度之 CO_2 ，因刺激植物細胞之光合作用，加速其新陳代謝，而促進培植體之生長或增殖⁽¹⁷⁹⁾。Linus (1986) 指出供給充分之 O_2 ，能刺激 potato tuber 芽體對 O_2 之吸收，並快速生長⁽¹⁸⁰⁾。1989 年 Kobayashi 的報告顯示，供給充分之 O_2 ，能刺激唐松草 (*Thalictrum minus*) 懸浮細胞形成 berberine 之代謝產物⁽¹⁸¹⁾。1998 年陳等探討康乃馨組織培養大量繁殖系統試驗，指出配合藥包紙封口高透氣法的處理，可有效抑制玻璃質化、促使玻璃質化苗回復及增加瓶菌的品質⁽¹⁸²⁾。2001 年 Sagare *et al.* 等亦指出以透氣的棉栓培養雙鋸齒葉玄參 (*Scrophularia yoshimurae*)，可得生長良好之植株⁽¹⁸³⁾。