

在開始閱讀這篇文章之前，一定有人會問什麼是「體胚」？這是一個好問題，是一個可以讓當初在植物細胞中發現這個現象的科學家，連夜從千里之外趕來與你促膝長談的好題目。要解釋「體胚」這個名詞必須先了解我們一般所認知的「胚」，「胚」是在有性繁殖的機制之下，由經過減數分裂的生殖細胞（精子及卵子或是花粉及胚珠）完成授精作用而孕育產生的。在高等植物體中，胚藏在種子裡面，當種子成熟散布之後，適當的環境讓種子萌芽，胚就搖身一變從種子中伸展出來成為一棵小植物，一肩挑起延續這種植物生命的重要大任。



試管中的森林

—簡述針葉樹體胚發生的組織培養技術

文圖 | 廖宇賡 嘉義大學森林暨自然資源學系副教授

誘導體細胞獲取大量體胚

「體胚」(somatic embryo) 是「體細胞胚」的簡稱，它和一般所謂的胚一樣，都可以經過發芽這個動作而成長為一棵小植物。不過體胚的起源是來自體細胞，這是它和一般的胚第一個不一樣的地方。在植物體只要是完成授精作用之後的細胞（有雙套染色體）都可以稱為體細胞，從最原始的授精卵開始計算，一直到發育完成的胚甚或發芽中的小苗，或是成長中的大樹（根、莖、葉），都是由體細胞組成的。這些不同階段及不同生理年齡的體細胞在特定條件誘導之下，可以經由逆分化作用 (redifferentiation) 再回復成原始的胚，這種特性稱為細胞的全能性 (totipotence)，而且在這個過程中還有讓細胞增殖的可能，使得藉由少數的體細胞可以獲得大量的體胚。

理論上，每一個植物細胞都應具備上

述所提之特性，但是比較不同生理年齡的細胞時，例如比較胚的子葉細胞和生長在大樹上的葉肉細胞，還是以前者這種越年輕的細胞越容易發生。這項「第一個不一樣」讓我們在發展體胚的誘導技術時，獲得許多好處。例如要以一般的胚（種子）來繁殖植物，必須是在植物達到成熟年齡，有能力開花時才有可能進行。有些植物這個條件在短時間內就能達成，例如在台灣大部分地區 1 年可以收穫 2 次的水稻，從播種插秧到開花結穗，只要幾個月，所以要用胚（結種子）來繁殖這種植物就沒有太大的困難。但是有些植物（特別是森林樹種）從種子萌芽開始計算，要等到開花需要 5 - 10 年甚至更久，這就未免太冗長了。所以如果我們可以從一棵剛剛發芽的紅檜小苗上取到體細胞，誘導它變成體胚而進行大量繁殖，你可以想見這會省下多少時間。

保有親本優良性狀

「體胚」和「胚」第二個不一樣在於它不是有性繁殖的產物，所以它又擁有了一些「胚」所不及的特性。要形成一般所謂的「胚」需要經過有性繁殖這個過程，有性繁殖的特點是來自雙親的特徵在經過基因的分配及重組之後（孟德爾遺傳定律），會使後代的遺傳變異趨向多樣化，因此造就了我們這個花花世界，專業一點的說法就是生物多樣性。但是在某些時候我們並不希望後代的遺傳特徵被改變，舉例來說果農在種植果樹的時候，都知道樹苗要用扦插或嫁接的方法來繁殖，才能保持原來果樹的遺傳特質，這種操作方式就是讓繁殖體不要有遺傳變化的無性繁殖。

「體胚」的形成由體細胞誘導而來，完全沒有經過有性繁殖那一套基因分配及重組的過程，因此由體胚繁衍而來的小植物，就像扦插繁殖出來的植物一樣，會和原來的母體擁有完全一樣的遺傳組成，保留和原來母體一樣的遺傳特徵，這在農業栽培上是絕對有需要的。但是體胚繁殖的增殖效率會遠遠超過傳統的扦插繁殖，因此要大量製造遺傳性狀穩定的無性繁殖個體，非使用體胚繁殖莫屬。

針葉樹體胚繁殖技術的發展其實起步比農、園藝作物要晚，在 1985 年同時有 3 個不同的研究團隊針對挪威雲杉 (*Picea abies*) 及落葉松 (*Larix decidua*) 2 種不同的樹種發表了成功的案例報告，從此開創了一系列的研究。早期的誘導技術受限於材料的選擇，必須要挑選最能發揮細胞全能性的組織，因此都先從十分接近原始胚胎的體細胞著手，取其有較低的生理年齡；分化程度低而有較佳的成功機率。於是從未成熟的種子中將發育不完全的胚細胞分離，並且給它幾種植物生長調節劑的刺激，例如 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 及 6-苯氨基腺嘌呤 (6-benzylaminopruine, BAP)，就能得到胚原性的組織 (embryogenic culture) (圖 1)，再經過一個增殖的階段使組織數量增



圖 1. 透明具有黏性的胚原性組織從濕地松 (*Pinus elliottii*) 未成熟種子中擴大增殖而出，接著在洋菜培養基上繼續生長的情形

加，就可以用離層酸 (abscisic acid, ABA) 及高濃度的糖分誘導體胚成熟 (圖 2)。

不過嚴格來講，這種方法只是延續種子裡面正在發生的生理及分化過程，並沒有實質上讓細胞有太多逆分化的機會，因此在誘導過程中成功的機率比較大。但是這種誘導模式卻要在胚的發育過程中適時介入取材，為此每年將近 6 - 7 月間要從樹上將還是青澀的毬

果摘下來，消毒乾淨以後將沒有成熟的種子從毬果中取出來，移到無菌的培養基上進行誘導處理。採集的時間如有提早或是延遲都會使誘導試驗失敗。讓人更感到困擾的是，每年的氣候冷熱不定，影響種子裡面胚發育的時間表。

為了確切掌握正確的取材時間，研究人員只好在預計的取材時間前後幾個星期，每隔幾天就要到樹上採集一些毬果來觀察種子的發育情形。又因為地區之間氣候變化也很大，在不同地區就要由當地的研究人員自己去觀察，才能產生只適用於當地的種子發育時程表。因此整個夏天 (暑假) 中最讓人想出遊的時段都必須在研究室裡度過，新鮮毬果含水率高不耐冷藏 (會脫水或發霉)，於是要每次少量摘採而摘採後又要立即處理，所以到了夏天，研究人員幾乎沒有休息



圖 2. 胚原性組織增殖到預定的數量之後，用離層酸及高糖分的培養環境誘導，體胚就開始進行成熟分化，細胞中開始堆積不溶性養分及蛋白質，體胚出現白色或淡黃色的外觀

的機會。但是等到夏天過去，一年中的其他 10 個月就沒有任何誘導試驗可以進行，因為沒有材料可以供應。

前述這種不便還僅僅是材料供給上的困擾，這種誘導方式另外還有一個讓人批評的缺點，就是從沒有發育完全的胚組織取得體細胞，我們並無法預知這些細胞的遺傳組成是好是壞，尤其是這個種子如果是開放授粉 (對提供花粉的雄性親本不作管控) 產生的後代，很可能會得到來自雄親本 (花粉) 中的不良性狀。在沒有確認基因組成的好壞之前，就把胚組織拿來作為體胚繁殖的材料，如果不幸在花費了許多時間及精力之後，才發現由體胚繁殖所形成的後代，具有我們想淘汰的基因遺傳缺陷或不良性狀，這當然是商業生產者所不樂見的情形，因此這種方法必須要加以改良，而首先

讓人想到的方法就是到成熟的植物體上去找誘導用的材料。

取樣技術大躍進

就在 1992 - 1995 年之間，學者發現生長在中美洲及墨西哥一帶的蘇鐵科角狀藏米亞屬 (*Ceratozamia*) 植物，可以使用成熟葉片誘導出體胚，不過這種樹種並不屬於生產木材的經濟性林木，他們的發現只是為研究學者帶來了一絲解決問題的希望。所幸在其他研究學者的努力之下，逐步掌握了體胚誘導的關鍵，在林業經營上很重要的雲杉屬樹種，誘導材料的選擇可以從沒有成熟的胚朝向成熟胚演變 (圖 3)，這一進展大大提供了研究的方便性。因為大部分針葉樹成熟的胚 (種子) 可以在較乾燥的狀態下以低溫保存一段極長的時間，誘導材料

一旦可以被保存起來，要進行誘導試驗就隨時有材料可用，那種夏天要被羈絆在研究室裡的窘境就因此紓解，不過這種發展在針葉樹裡還是有樹種之間的差異，有些樹種 (例如松樹) 仍然要以未成熟胚作為材料，使用成熟胚的成功機率還不能有效提高。

不過從種子中取用成熟的胚作為誘導體胚的材料還是無法知道其遺傳性狀是否符合我們的要求。這就有點像是到醫院的新生兒育嬰室去挑選馬拉松選手一樣，在時間點的選擇上實在是太早了。後來這個誘導技術不斷的被突破，開始有人報告可以延遲取材的時間點到種子發芽以後，從發芽的子葉上取用體細胞作為誘導材料，接著更有人宣稱發芽 2 周的小苗也能採集葉片作為誘導體胚發生的材料。

最近一篇由印度學者 Ravindra *et al.* 在 2004 年提出的報告則是從完全成熟的松樹 (*Pinus kesiya*) 上採取春季萌生的新芽作為誘導材料，並且獲得成功的結果。這個進展已經完全克服了取材時間點太早的問題，換句話說我們已經可以到大學運動競賽會場上去挑選運動選手了，這些成年選手的表現已經足夠

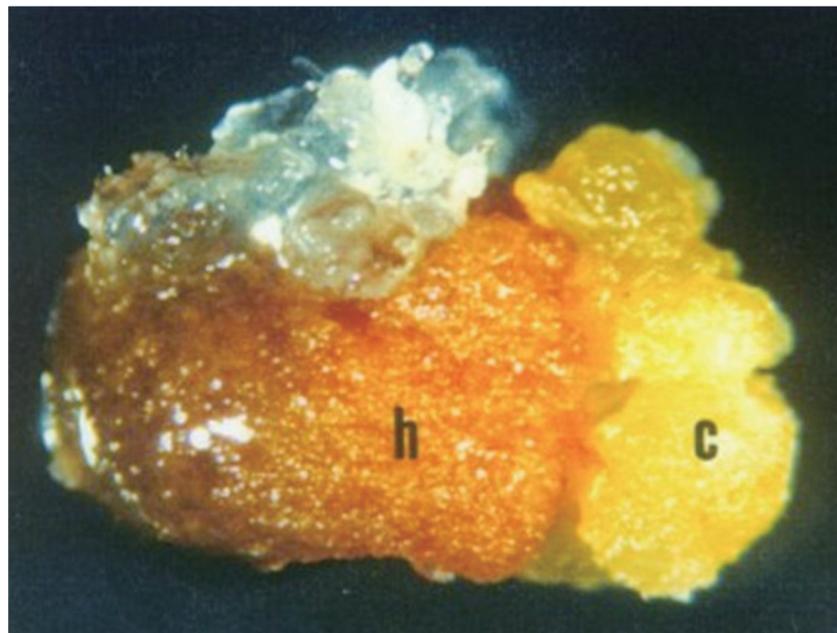


圖 3. 台灣雲杉 (*Picea morrissonicola*) 的成熟胚經過誘導之後，也能從胚的表面形成胚原性組織，圖中 c 所標示的是子葉的部分，h 標示的是胚軸

穩定到讓我們的選擇不致偏差或失誤太遠。從成熟松樹上採取誘導材料的成功也使我們可以先期逐一檢視這些樹木個體，藉由林木育種技術中使用的後裔檢定技術，我們可以在正確選擇我們需要的個體之後，再將其透過體胚繁殖技術大量培育。用這種模式進行體胚誘導發生並且大量繁殖個體，可說是完全解決了無法控制遺傳性狀的缺點，不過這篇報告中運用的方法目前只見發生在 *Pinus kesiya* 這種松樹上，其他眾多的針葉樹種都還未見有研究成果發表，顯然我們進步的空間仍舊寬廣。

可大幅降低生產成本

筆者就蒐集到的文獻中整理得知，目前針葉樹中已有冷杉屬 (*Abies*)、貝殼杉屬 (*Agathis*)、南洋杉屬 (*Araucaria*)、蘇鐵屬 (*Cycas*)、三尖杉屬 (*Cephalotaxus*)

、角狀藏米亞屬 (*Ceratozamia*)、檜木屬 (*Chamaecyparis*)、柳杉屬 (*Cryptomeria*)、銀杏屬 (*Ginkgo*)、落葉松屬 (*Larix*)、雲杉屬 (*Picea*)、松屬 (*Pinus*)、黃杉屬 (*Pseudotsuga*)、世界爺屬 (*Sequoia*)、紅豆杉屬 (*Taxus*)、藏米亞屬 (*Zamia*) 等植物可以用不同的方法達成體胚的發生。這是一個重要的里程碑，因為在某些溫帶地區林業發達的國家中，針葉樹是重要的森林生產用樹種，他們對掌控優良遺傳性質而可以大量生產樹苗的技術，有極大的研發興趣與動機。

有研究學者針對體胚發生這項繁殖技術做過量化的分析，它應該是目前植物組織培養中增殖效率最高的一種方法。以筆者的研究室為例，我們可以在 1 張直徑 7 公分的濾紙上 (置於一個直徑 9 公分的培養皿中)，一次養成大約 400 個台灣雲杉 (*Picea morrissonicola*) 的體胚 (

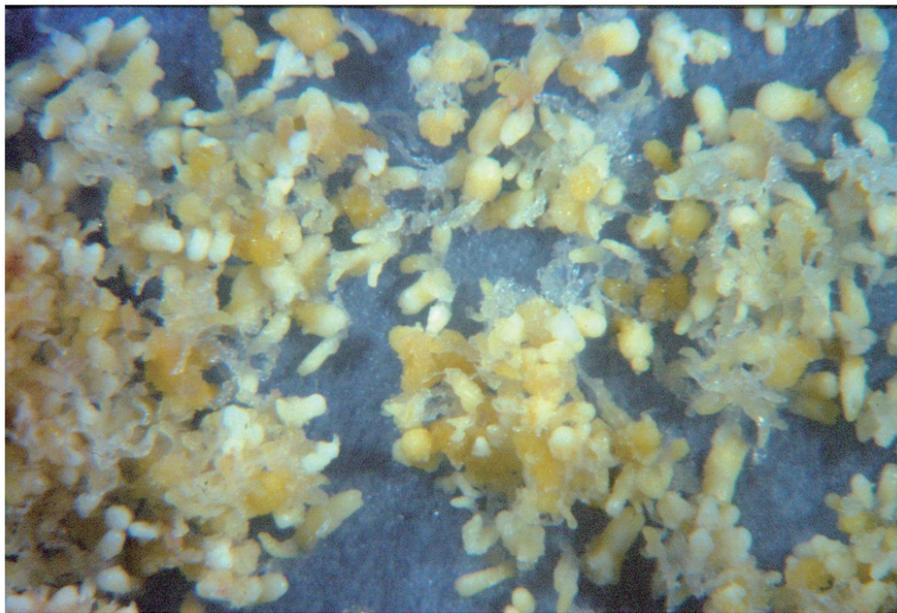


圖 4. 台灣雲杉的體胚平攤在濾紙上進行成熟分化的情形，由於是近攝的特寫照片，其視野範圍大約是一張濾紙的 1/9

圖 4)，經過推算在一張書桌（ $100 \times 70 \text{ cm}^2$ ）的面積上可以平放 88 個培養皿，那就是可以培養出大約 35,200 個體胚，如果培養皿再經疊放為 2 層，體胚數目就增加為 7 萬個。這種驚人的增殖效率是讓植物組織培養能降低生產成本，並讓它與一般繁殖方法互作比較時具有競爭力的優勢條件。

植物組織培養在增加細胞的增殖效率方面，還有一些其他的配套方法，例如將培養環境從固體的洋菜培養基改變成完全是液體的懸浮培養。這個概念是源自發酵反應所使用之發酵槽，在一個龐大的（100 公升以上）無菌容器中培養細胞，經過通氣、攪拌、控溫及培養液的循環更換，可以讓培養的細胞都能均勻接觸空氣及養分，在沒有壞死細胞堆積、生長空間受限或是有害物質及氣體

累積的困擾之下，體胚發生及增殖的情形又可以再放大幾倍。不過在針葉樹種，這種完全在液體環境中培養出成熟體胚的方法還沒有被報告過，筆者的研究室中能將台灣雲杉的體胚在液體培養基中懸浮培養到特定的階段（圖 5），但是最後還是要脫離液態培養環境並移到濾紙上才能進行最後的成熟分化過程。

創造時光節約奇蹟

在誘導針葉樹體胚發生的研究當中，前文及圖 1 中已描述過在早期大都採用未成熟的胚作為誘導材料，當時大家的做法是直接將一整個未成熟的種子剝去外殼後就置放到誘導培養基中，此時會形成體胚的組織就會從種子中擴展出來進行細胞分裂與分化這些動作。在植物解剖學上針葉樹種子剝去外

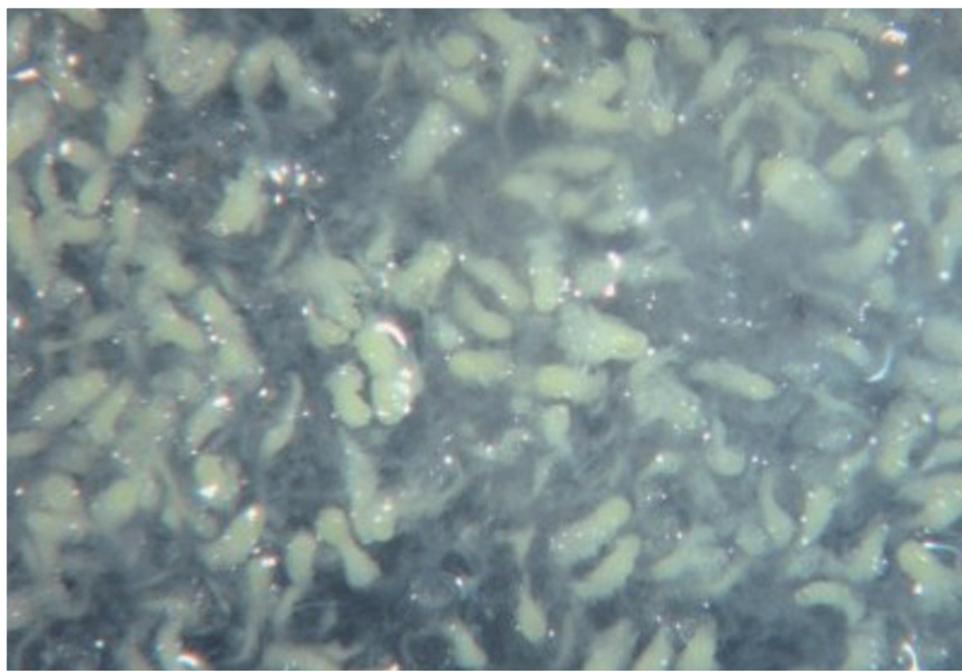


圖 5. 筆者研究室中在完全液態的培養環境中，將台灣雲杉的體胚培養到接近成熟的狀態，圖片中的體胚樣本是從大約 2.0 ml 的培養液中所取得的

殼後裸露的部分稱為雌配子體 (female gametophyte)，在餐廳裡常有用「松子」入菜的機會，松子就是松樹種子的雌配子體。其外觀顏色以及在種子中的解剖位置有點像是單子葉植物如稻、麥的胚乳，因此有人會誤稱其為胚乳。但是胚乳是精、卵細胞在有性生殖作用下產生的三倍體組織，兼有雌雄親本的染色體。針葉樹種子的雌配子體卻是源自於雌親本的生殖細胞，而且是由經過減數分裂之後的單套染色體細胞分化而來，因此它只具有雌親本的單套染色體。奇妙的事情就發生在落葉松這個樹種，當

研究學者依樣操作將未成熟的落葉松種子剝殼後放到體胚誘導培養基之後，非但種子中所包含的未成熟胚組織（具雙套染色體）會形成體胚，其雌配子體細胞也會接受誘導刺激而形成體胚，透過染色體檢查及印證，這個體胚後來萌芽所生長的小植物竟然是一個單倍體 (monoploid) 植物。在育種學上，單倍體植物可以利用藥物刺激讓它的染色體加

倍而變成雙倍體，在這個過程中，原來的單倍體中若含有一個優良的基因，染色體加倍之後所形成的雙倍體植物就會是這個優良基因的純系，用簡單的孟德爾遺傳學符號來說明，就是將單倍體中的 A 基因變成 AA 雙倍體。這種 AA 的基因組成如果要經過傳統的育種學以有性生殖方式產生，通常要利用近親交配或自交 6 - 7 世代才有機會形成。先不論落葉松自交是否能成功，單單要落葉松完成 6 - 7 個世代就要數十年之久。因此在落葉松這個例子，如果我們在單倍體體胚中仔細尋找有優良性狀的個體，在一夕之間就能讓它形成該性狀的雙倍體純

系，省去了數十年的育種時間，這是體胚發生相關研究在落葉松上創造的時光節約奇蹟。

最後還值得一提的，在針葉樹進行體胚發生的研究，除了可以大量繁殖性狀優良、遺傳組成均一的個體之外，近代新興而起的生物技術學科——以基因



一個完全分化的台灣雲杉成熟體胚

累積無限競爭利基

最後還值得一提的，在針葉樹進行體胚發生的研究，除了可以大量繁殖性狀優良、遺傳組成均一的個體之外，近代新興而起的生物技術學科——以基因

轉殖為基礎的物種改良也要用到這個培養系統，因為我們在操作體胚發生時，會有一個階段是將細胞誘導回復到極原始狀態的胚狀組織，然後才從那個階段將組織的量增殖放大並且使其中發育的體胚成熟，基因轉殖的研究人員就是利用這個難得的階段，將各種有特殊功能的基因以不同的方法移轉到細胞中，如此操作的理由是將基因修改的時間點放在植物個體發育的源頭，一旦基因移轉成功，後續分裂而來的所有體細胞（整個植物體）才全部都會攜帶有這個基因，如此轉殖的工作才算是完成，這也是發展體胚繁殖這個技術的另一項應用成果。

雖然我們在針葉樹體胚發生的研究領域已經累積了 20 餘年的經驗，成果

也算斐然。但是目前研究室中還有一些困難需要突破，例如不是每一種針葉樹利用相同的處理就都能誘導發生體胚，樹種之間的差異還有待科學家逐一探究其原因。其次同一批種子接受相同處理，有些會形成體胚增殖效率極高的組織，有些則形成在型態學上有變異且一個體胚也無法形成的組織，這一點也是目前各研究室正在找尋原因的待解問題。最後當大量的體胚培養出來之後，發展利用低溫（液態氮）保存的技術也需要提升。依照目前國外林業發達國家對造林樹苗需求孔急的情形推算，將來在提升木材生產質與量的前提之下，由體胚繁殖而來的無性營養系苗木一定會占有一席之地，為木材的經濟生產創造莫大利基。 

三冠牌 農業用遮光網

掛耳式遮光網 (專利產品)
網身織有補強帶，固定間隔有掛耳，適活動式搭設。電動、手動皆宜

防蟲網
木瓜專用防蟲網、蔬菜防蟲網、果蠅網等

能源節省布
縮小溫控空間，節省能源。可遮光、防霧、防滴水

懸掛式遮光網
讓人如處在森林般清爽，通風性佳，不怕強風

穴植網 (專利產品)
預留作物穴植區並抑制雜草滋生，透氣性、透水性佳

雜草抑制蓆
有效防止雜草滋生，溫室、園地作業方便

其他農業用設施資材

- ◆ 活動網室零組件、溫室零件
- ◆ 聚酯鋼線
- ◆ 貯水蓆
- ◆ 固定帶
- ◆ 速束帶
- ◆ 粘扣帶
- ◆ 土木工程用布
- ◆ 水泥加勁纖維絲
- ◆ 網類製品依客戶需要縫合加工



煥坤企業股份有限公司

彰化縣福興鄉西勢村員鹿路二段155號
TEL : (04) 7773878 FAX : (04) 7789778