

## 培養容器內之空氣成分 對柑橘側芽培養之影響

許聰耀 馬溯軒

臺灣大學園藝學系

### 一、前 言

一般組織培養必須保持在無菌狀態下進行，因而培植體之生存空間侷限於幾近封閉之培養容器內。容器內之空氣與外界大氣之交換有限，培植體本身在培養過程中因呼吸及其它生理作用又會不斷產生及消耗某些氣體，故容器內之空氣成分會隨著培養容器大小，培養基成分及培植體之生理狀況而變化。如葡萄(1)和蘋果(2)之芽體培養，草莓芽體之發根(3)，以及菸草之花藥培養(6)等，都因培養容器大小不同而有不同之結果；菸草癒合組織在培養時隨著處理和培植體年齡不同會有不等量之乙烯產生，而影響癒合組織之生長(7)(9)。

成年之柑橘側芽在培養時，很容易從離層部位發生癒合組織(4)(5)，而抑制側芽之正常生長與發育。另外，即使側芽萌生出枝芽，也常會在培養一段時期後發生葉片及枝芽脫落，或是逆分化等問題。這些現象可能是培植體產生之乙烯累積於培養容器內而發生之影響(8)(11)。本試驗乃針對培養容器內之空氣成分，特別是乙烯，做一初步之探討，以尋求改善培養結果之方法。

### 二、材 料 與 方 法

柳橙(*Citrus sinensis* L. cv. Liucheng) 之成年株抽梢後約兩個月之枝條，採下後剪去細梢及基部側芽發育不良數節，僅留下中間生長發育一致之側芽做為培養之材料。

柑橘枝條消毒不易完全，一般污染率極高，故消毒處理略為複雜。先將葉片自翼葉上端剪除，枝條用清潔劑洗淨，再用試管刷沾 1%次氯酸鈉(NaOCl)仔細地刷洗，特別是葉腋部位，完成後放置十分鐘再用清水沖淨，再剪成6至8公分長，放入含0.1%次氯酸鈉及 0.1% Tween 20展著劑之稀薄消毒液中，在抽氣減壓(約60mmHg)狀態下維持20分鐘，恢復常壓後再放置30分鐘才又移入含0.1% Tween 20之清水中，通氣使水保持攪動下過夜。前面處理完成後，用1%次氯酸鈉加0.1% Tween 20消毒25分鐘，再用無菌水清洗三回，切成2公分長左右，每段帶一個腋芽之培植體。為控制培植內部潛伏之細菌性污染原，又在將培植體插入培養基之前，先用現配之500mg/l Rifampicin (添加 500 mg/l L-ascorbic acid，並經 millipore過濾消毒)滴上7-8滴於欲插入之位置，然後將培植體經過藥液插入培養基中，插入深度約為0.5cm。

基本培養基使用MS無機鹽類，添加100 mg/l Myo-inositol, 2mg/l Glycine, 1mg/l Thiamine.HCl, 0.5mg/l Nicotinic acid及 Pyridoxine.HCl, 蔗糖5%, 洋菜0.9% (Sigma)。為促進萌芽添加GA 5mg/l, BA 1mg/l, pH在殺菌前調整為5.70±0.02。

試驗處理有不同大小之培養瓶(40ml平底試管與170ml之廣口瓶)，乙烯吸收劑(高錳酸鉀蛭石，依蔣(1970)之方法配製)，乙烯生合成抑制劑(用AOA, aminoxyacetic acid)及通空氣，通2% CO<sub>2</sub>等。乙烯吸收劑在使用時將之裝入小玻璃瓶(36×18mm)中，用包覆鋁箔之軟木塞塞住瓶口，高溫高壓滅菌後，再在無菌操作下，拿掉軟木塞，置入殺過菌而尚未凝結之廣口瓶培養基中，此時乙烯吸收劑仍應維持在乾燥狀態，安置乙烯吸收劑之培養基皆在三天內使用，以避免效力減弱等影響。

AOA與rifampicin混合使用會破壞rifampicin之活性，故在培養第二天才處理，使用濃度為150mg/l，以millipore過濾消毒後滴7-8滴於培植體基部周圍。

無菌微量之通氣系統裝置如圖1，其中空氣幫浦在本試驗中固定為 3.5psi 之出氣壓力，150ml三角瓶中之通氣速率控制在 5±1ml/min，以肥皂泡氣體流速計測定排氣量做為調節流量之依據。控制鋼瓶中純二氧化碳在一定流量下與空氣幫浦打出之空氣混合，此混合空氣之二氧化碳濃度相當穩定，依此先以GC



測出混合空氣為2% CO<sub>2</sub>時二氧化碳鋼瓶之流出量，其後即此為調整之依據。

試驗於28±1°C之控溫培養室進行，每日光照16小時，光度2200-3000lux，測定培養容器內培植體之乙烯產生量時，五個重覆之培植體樣品培養於80×25mm平底試管中，以血清瓶塞（serum cap）封口，每24小時自培養瓶中抽取1ml之氣體樣品注入GC(FID)，測定其乙烯濃度，再換算為產生量。每回氣體樣品抽取後，在無菌操作檯中打開瓶塞15-20分鐘，使瓶內氣體完全更新後再蓋回瓶塞，收集下一次之氣體樣品。

試驗處理組之氣體分析在抽取樣品時，除兩組通氣處理組以血清瓶塞封口可以直接自培養瓶中抽取樣品外，其它各處理組以鋁箔封口，則必須先在鋁箔蓋上貼上兩層膠紙，再行抽取樣品，以免鋁箔破口太大，導致污染。取完樣再貼上一層膠紙封住針孔即可。

### 三、結果與討論

柑桔側芽在培養初期會有大量之乙烯產生，隨後乙烯產生量急遽下降，第3-7天之產生量，維持在1.4至2.4  $\text{nl g}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 之間（培養瓶中之乙烯濃度為0.2-0.3ppm）（圖2），而培養24小時後，以GC(FID)分析其空氣成份時發現除了乙烯外，所有之樣品皆同時存在兩種不明氣體（ $u_1$ ， $u_2$ ，圖3），但是繼續調查的結果， $u_2$ 只在以血清瓶塞封口之瓶中之第一次樣品中存在，第二次取樣或是通氣及用鋁箔封口之培養瓶中則未再發現，故 $u_2$ 很可能只是切割培植體時，表面之油胞破裂溢出之揮發性物質，而非代謝產物。經觀察， $u_2$ 對柑橘側芽之生長並無可見之影響。 $u_1$ 氣體則在培養後數天繼續產生，且與側芽之生長可能有關，將於後述中討論之。

進一步在不同大小的培養容器，乙烯抑制劑 AOA，乙烯吸收劑高錳酸鉀蛭石，以及連續通空氣或2% CO<sub>2</sub>等處理下培養側芽，其結果分析如表1。在不同大小之培養容器中培養兩週後，柑橘側芽之生長表現，在生長量方面（枝芽長度、鮮重及乾物量）雖無明顯差異，但是較小容器（CK<sub>1</sub>）內之乙烯及CO<sub>2</sub>皆維持較高濃度，其萌出之枝芽色澤較黃，脫落率高。可見在同一培養基配方之培養，培養容器大小不同，仍會因改變了培養容器內之空氣成分，而影響其生長



表現。更明顯的結果是，當培養瓶中用高錳酸鉀來吸收培植體所產生之乙烯，或是用連續通空氣方式不斷地供應新鮮空氣之情況，對側芽之正常生長較為有利，不但萌芽較早而整齊，長出之枝芽無論在長度、鮮重及乾物量都顯著增加，其葉之生長也較對照組及 AOA處理組茂盛，落芽情形也極少或不發生。而在連續以2% CO<sub>2</sub>通氣處理下，發出之枝芽色澤深綠，乾物量大為增加，幾達對照組 (ck<sub>2</sub>) 的三倍，AOA處理組表現之結果則不理想，就枝芽生長量與其它處理比較，有極顯著之生長抑制現象。

各處理組培養三天後，以 GC(FID)分析其容器內之氣體如圖 4。乙烯吸收劑高錳酸鉀蛭石能將乙烯完全氧化；除此外，其它處理組則仍皆有乙烯之存在，惟在 2% CO<sub>2</sub>連續通氣下，乙烯量又顯著比只通一般空氣處理要低得多 (表 1)。另一值得注意之處為不明氣體 u<sub>1</sub> 在通氣處理之兩組中皆未偵測到，而非通氣之其它各處理組則皆可發現。

生長發育較佳之三個處理為乙烯吸收劑、連續通空氣及通2% CO<sub>2</sub>，前者只出現 u<sub>1</sub> 氣體，後二者卻只出現乙烯，而生長較差之三組 ck<sub>1</sub>、ck<sub>2</sub> 及 AOA處理等則兩種氣體皆同時存在。再從另一方面來看，從培養於相同於 ck<sub>2</sub> 處理中六週之樣品，挑出其中沒發生落芽或逆分化現象者，和培養於不含生長素培養基中兩週，其中枝條生長良好者，分別抽取其容器內氣體分析 (圖 5)，可以看出，縱使在培養六週後，仍有相當量之乙烯繼續產生，但生長比其同處理好之此二個例，其容器內亦偵測不到 u<sub>1</sub> 氣體，兩個例間乙烯濃度相差 30 倍以上，生長表現卻又相差不多，故單純認為柑桔側芽培養時落芽、逆分化或枝芽發育不良等現象是由乙烯造成，仍有待商榷。而本次試驗的結果，又顯示在同一培養基培養下，不同之空氣成分確能顯著影響柑桔側芽之生長與發育。通氣處理，尤其是通2% CO<sub>2</sub> 其生長量更幾達對照組三倍。是故，u<sub>1</sub> 不明氣體是否扮演一關鍵之角色，或是否和乙烯作用有關聯或因果關係，應值得進一步探討。另外，提高 CO<sub>2</sub> 濃度除了可降低乙烯產生量外，對於側芽之生長量也有很好的促進效果，其利用性也值得注意。

#### 四、參考文獻

1. 蔣明南. 1970. 香蕉密封包裝用乙烯吸收劑之研究. 中國園藝16(5):14-22.

2. Abbott, A. J. and A. Belcher. 1979. Analysis of gases in culture flask. Rep. Long Ashton Res. Stn. p.73-74.
3. Adams, A. N. 1972. An improved medium for strawberry meristem culture. J. Hort. Sci. 47:263-264.
4. Altman, A. and R. Goren. 1971. Promotion of callus formation by abscisic acid in citrus bud cultures. Plant Physiol. 47:844-846.
5. Altman, A. and R. Goren. 1974. Interrelationship of abscisic acid and gibberellic acid in the promotion of callus formation in the abscission zone of citrus bud cultures. Physiol. Plant. 32:55-61.
6. Dunwell, J. M. 1979. Anther culture in *Nicotiana tabacum*: The role of the culture vessel atmosphere in pollen embryo induction and growth. J. Exp. Bot. 30:419-428.
7. Garica, F. C. and J. W. Einset. 1983. Ethylene and ethane production in 2,4-D treated and salt treated tobacco tissue cultures. Ann. Bot. 51:287-295.
8. Goren, R., A. Altman and I. Giladi. 1979. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in citrus bud cultures. Plant Physiol. 63:280-282.
9. Huxter, T. J., D. M. Reid and T. A. Thorpe. 1979. Ethylene production by tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus. Physiol. Plant. 46:374-380.
10. Monette, P. L. 1983. Influence of size of vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. Plant Cell Tissue Organ Culture. 2:327-332.
11. Sagee, O., R. Goren, and J. Riov. 1980. Abscission of citrus leaf explants. Plant Physiol. 66:750-753.

## 討 論

問：（蔡平里）

試驗設備中對於經由幫浦出來空氣量之調節外，宜注意空氣質之純化處理，易言之，從幫浦所發生油質之分解產物須在到達培養容器過程中，設法以化學藥品除去，以免影響試驗吸收分離。

答：（許聰耀）

我直接用魚箱幫浦。我覺得您的意見很寶貴，以後要朝這方面改進。



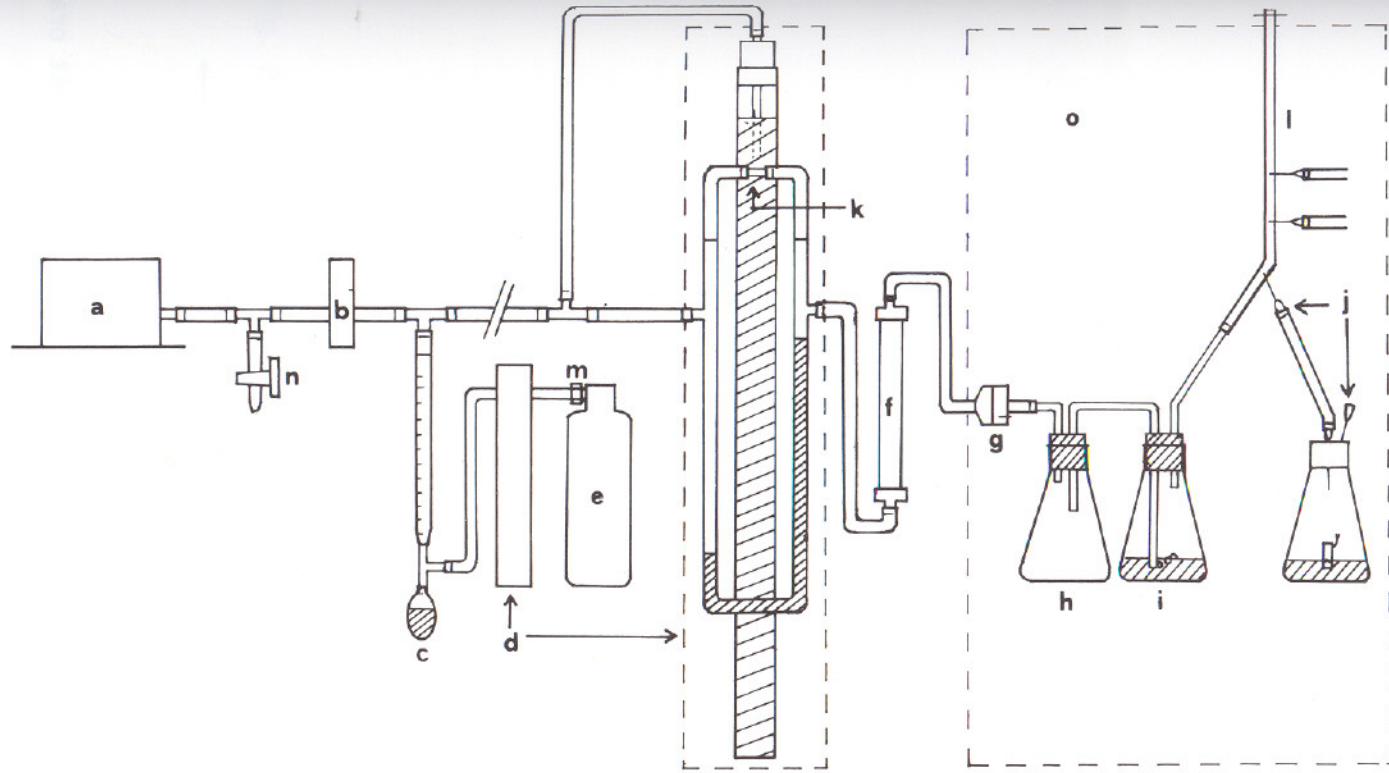


Fig. 1. Air flow system in citrus bud cultures. (a) air pump, (b) pressure gauge, (c) flowmeter, (d) flow control, (e) CO<sub>2</sub> gas. (f) air drying tube, (g) millipore filter, (h) safety flask, (i) sterilized distilled water, (j) 23# hypodermic needles, (k) capillary, (l) thick-wall rubber tubing (5x9mm), (m) needle valve, (n) pressure controller, (o) under sterile condition.

圖 1。柑桔側芽培養使用之微量通氣系統模式圖。

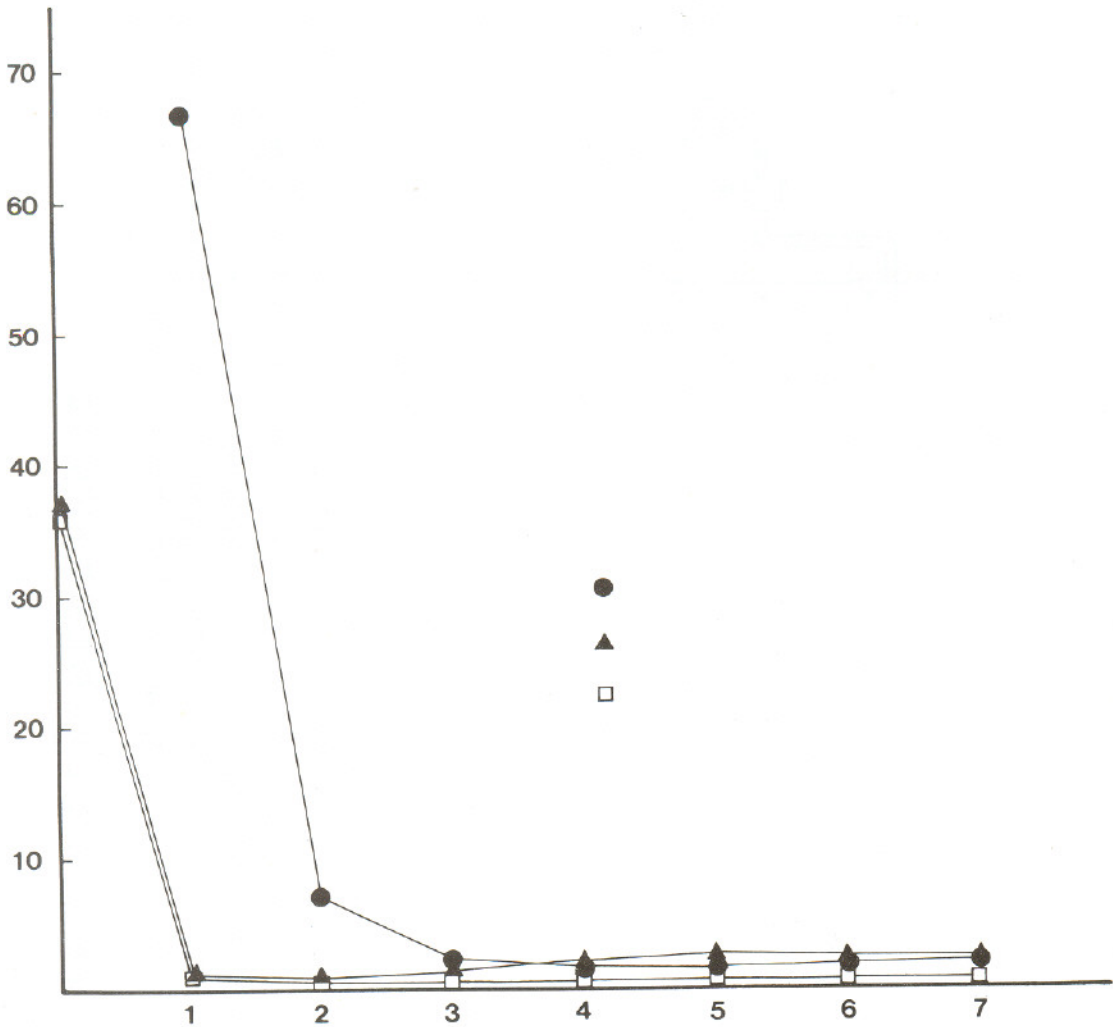


Fig. 2. Ethylene evolution in bud cultures of 'Liu-Cheng' sweet orange in different seasons and age.

圖 2 . 季節與年齡對側芽培植體乙烯產生之影響。

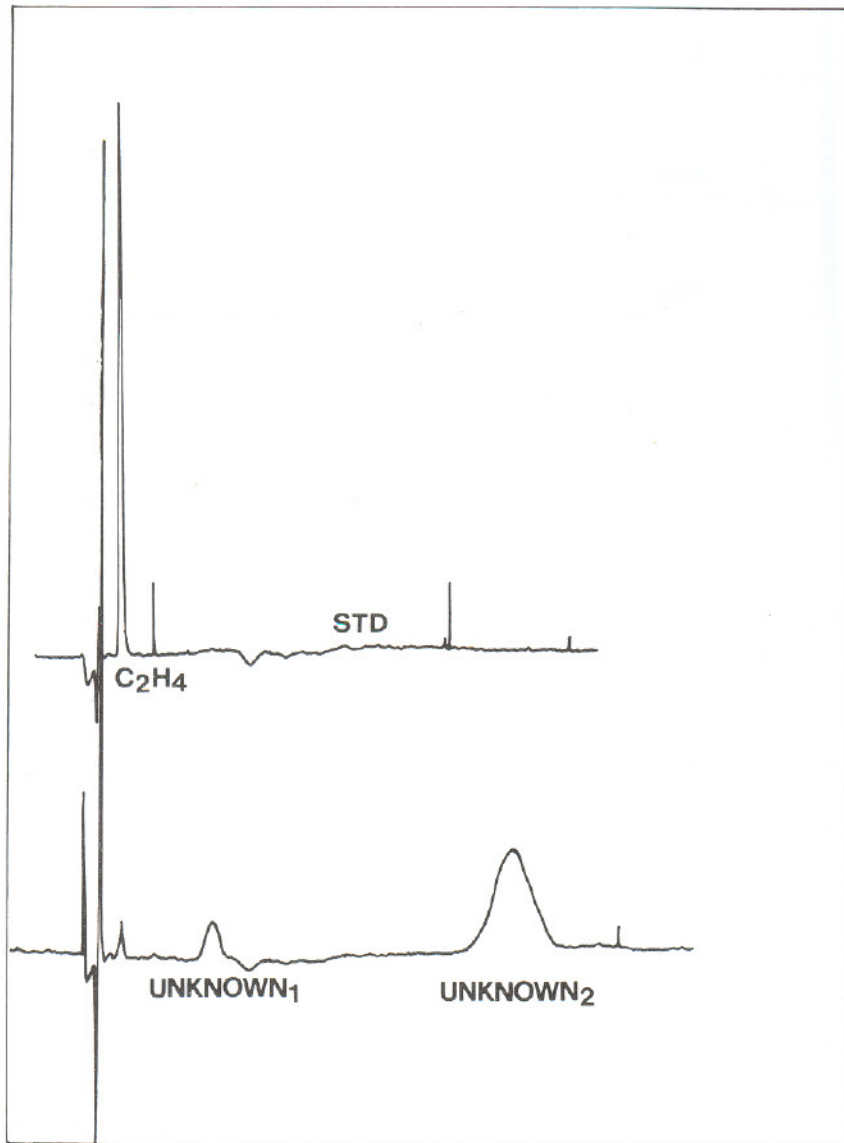


Fig. 3. GC analysis of gases in culture vessels (80x25 mm test tube with a serum cap) in bud culture of 'Liu-Cheng' sweet orange after 24 hours incubation. The bud explant were excised from summer flush about 2 months old, and culture medium contain 5 mg/l GA and 1 mg/l BA. Both the unknown<sub>1</sub> and unknown<sub>2</sub> gases of higher molecular weight were detectable in all the culture vessels of this treatment. STD: ethylene standard = 0.8143 ppm.

圖 3. 柳橙側芽培養容器內之氣體分析。



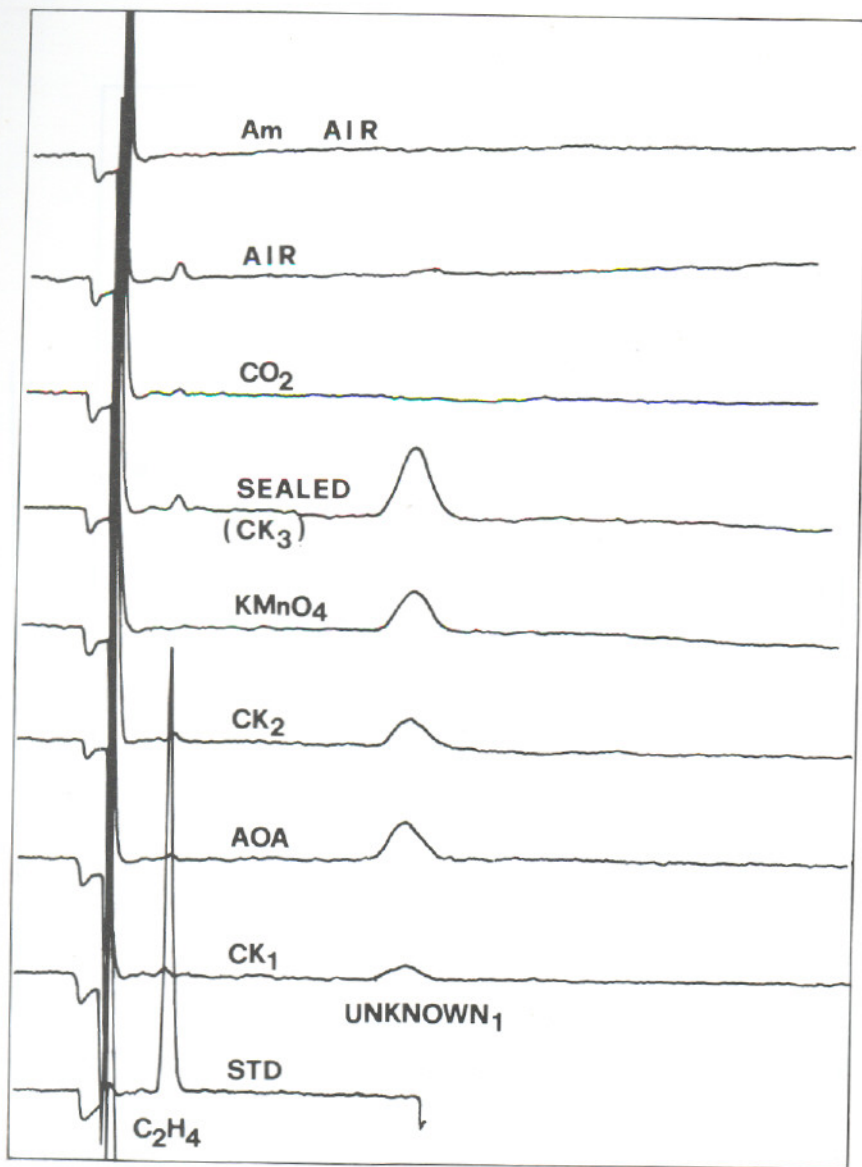


Fig. 4. Analysis of gases in vessels for citrus bud cultures. STD: ethylene standard (1.1779 ppm); CK<sub>1</sub>: test tube (80x25 mm) with alluminum foil cover; CK<sub>2</sub>: wide mouth bottle (170 ml) with alluminum foil cover; SEALED(CK<sub>3</sub>): flask (150ml) sealed with a serum cap; AOA: 7-8 drops AOA (100 mg/l) around the base of each explant; KMnO<sub>4</sub>: 2.8% KMnO<sub>4</sub> is absorbed on vermiculite, each wide mouth bottle contained 500-600 mg this absorbent; AIR: air flow through the flask (5 ml/min); CO<sub>2</sub>: 2% CO<sub>2</sub> flow through the flask (5 ml/min); Am. AIR: ambient air. The bud explants of 'Liu-Cheng' sweet orange were excised from spring flushes about 2 months old, and data were recorded after 3 days incubation.

圖 4. 不同大小培養容器、A O A、高錳酸鉀蛭石及通氣處理，其培養容器內氣體成分之分析。

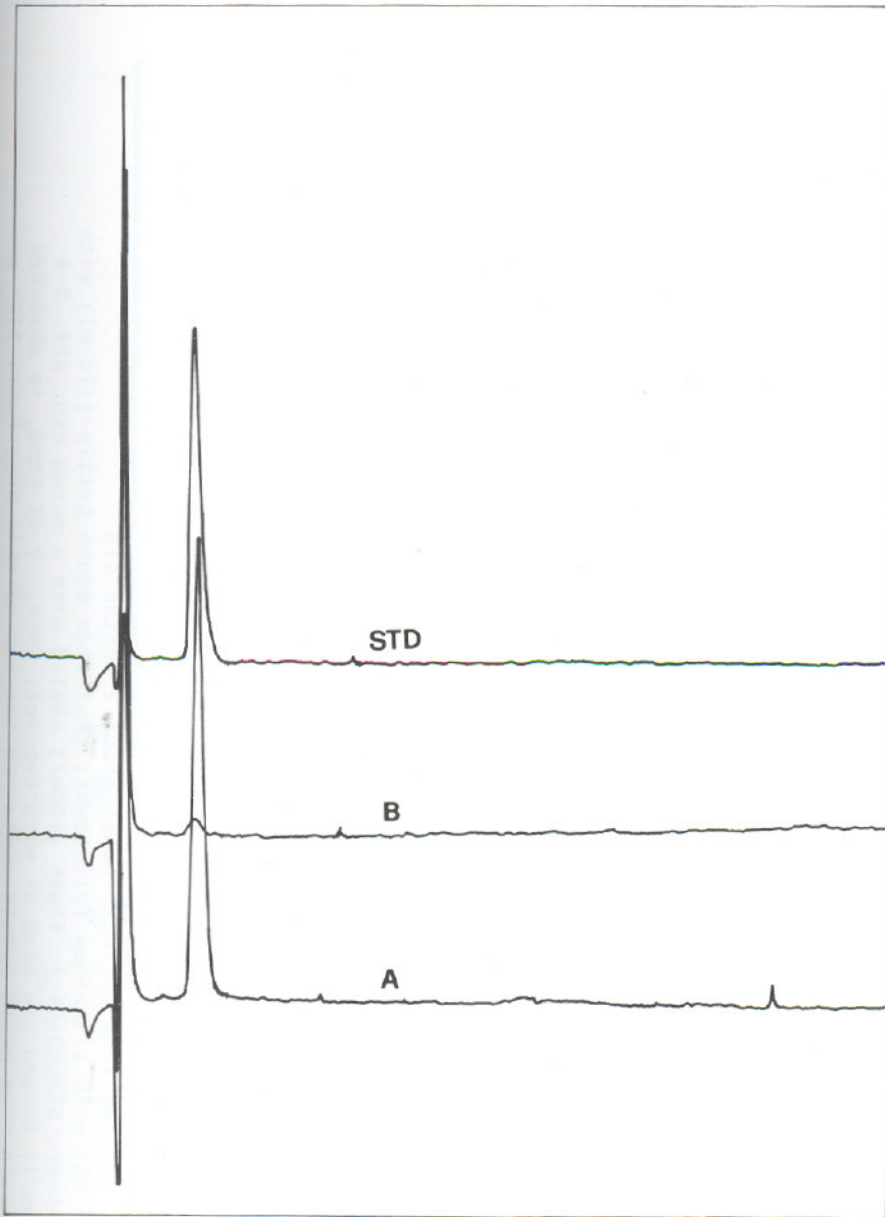


Fig. 5. GC analysis of gases in culture vessels for bud cultures of 'Liu-Cheng' sweet orange. A: 6 weeks in culture on a medium contained 5 mg/l GA and 1 mg/l BA. B: 2 weeks in culture on a hormone-free medium. STD: ethylene standard = 0.6995 ppm. Both A and B were without the unknown<sub>1</sub> gas.

圖 5. 培養狀況不同之側芽培植體，沒有乙烯作用之現象，也沒有  $u_1$  不明氣體出現。



表 1. 柑桔側芽培養容器內之空氣成分對側芽生長之影響

Table. 1. Influences of gas phase of culture vessels on bud cultures\* of 'Liu-Cheng' sweet orange; data recorded after 14 days in culture.

Treatment **	Average days to sprouting	Average no. of shoots formed per bud explant	Shoot length distribution				Total growth of shoots per bud explant			Rate of abscised shoots (%)	Rate of callusing explants			Color of shoots ****	Analysis of gases in vessels		
			No. of nodes	(mm)			(mm)	FW	DW		+++	++	+		(nl/l)	(%)	Unknown
			1-4	5-9	10-14	>15	length								C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	
CK <sub>1</sub>	8.3 <sup>a</sup>	1.93 <sup>a</sup>	0.13 5	0.93 8	0.47 8	0.40 11	20.3 <sup>b</sup>	15.5	2.1	27.6	1/15	2/15	1/15	YG	42.5	0.18	+
CK <sub>2</sub>	7.1 <sup>ab</sup>	1.57 <sup>a</sup>	0.43 5	0.43 8	0.43 8	0.29 9	19.5 <sup>b</sup>	12.6	2.0	13.6	2/14	1/14	0/14	G	32.4	0.13	+
AOA	8.7 <sup>a</sup>	1.14 <sup>a</sup>	0.36 6	0.43 8	0.29 10	0.07 10	11.3 <sup>c</sup>	6.1	1.2	12.5	6/14	1/14	0/14	G	22.3	0.11	+
KMnO <sub>4</sub>	6.3 <sup>b</sup>	2.14 <sup>a</sup>	0.36 5	0.43 7	0.50 9	0.86 9	28.5 <sup>ab</sup>	33.3	4.8	6.7	0/14	0/14	0/14	G	0.0	0.12	+
AIR	6.7 <sup>b</sup>	1.79 <sup>a</sup>	0.21 7	0.36 7	0.29 8	0.93 10	31.5 <sup>a</sup>	29.9	4.4	0.0	0/14	0/14	0/14	G	20.2	---	-
CO <sub>2</sub>	6.7 <sup>b</sup>	2.07 <sup>a</sup>	0.29 6	0.50 8	0.50 11	0.79 12	27.1 <sup>ab</sup>	35.6	5.7	0.0	0/14	0/14	0/14	DG	8.1	---	-

\* The bud explants were excised from spring flushes about 2 months old.

\*\* CK<sub>1</sub>: test tube (80x25 mm) with alluminum foil cover; CK<sub>2</sub>: wide mouth bottle (170 ml) with alluminum foil cover; SEALED(CK<sub>3</sub>): flask (150ml) sealed with a serum cap; AOA: 7-8 drops AOA (100 mg/l) around the base of each explant; KMnO<sub>4</sub>: 2.8% KMnO<sub>4</sub> is absorbed on vermiculite, each wide mouth bottle contained 500-600 mg this absorbent; AIR: air flow through the flask (5 ml/min); CO<sub>2</sub>: 2% CO<sub>2</sub> flow through the flask (5 ml/min).

\*\*\* +++: Callus covered all the bud severely inhibiting the growth of bud; +: Callusing slightly.

\*\*\*\* YG: yellow-green; G: green; DG: dark green.