

# 利用試管內(*in vitro*)篩選方法 輔助育種之探討

農試所生技組 夏奇鋌 陳威臣 曹進義

## 一、前言

成功的育種取決於豐富的遺傳多樣性及有效的篩選方法，傳統育種一般透過雜交來產生新的組合，達到創造變異的目的，但許多作物在人類長期選種下，遺傳多樣性已大量流失；加之植物原生地的快速消失，多樣性種原的取得也愈來愈困難，如何持續創造新的變異，成為育種過程中首要面對的問題。此外，面對全球暖化與極端氣候的頻繁出現，以適應氣溫變化、乾旱、病蟲害為目標之育種，與過去以提高產量或品質為目標之育種相較，前者在營造篩選環境上必須付出較高的成本，如何將各種新科技納入傳統的育種過程中，用以提高育種的效率、縮短育種的時程，以便因應日趨嚴峻的農業環境，是育種者必須嚴肅思考的挑戰。

## 二、組織培養在育種上之應用

組織培養技術在農業上的應用比較為人所熟知的是利用於種苗的大量繁殖，許多重要的經濟花卉如蝴蝶蘭、文心蘭皆以組織培養大量生產整齊畫一的分生苗奠定產業的生產基礎；對於許多無性繁殖的作物而言，利用組織培養技術生產不帶特定病原的健康種苗用以提高種苗品質，其重要性亦逐漸增加。除此之外，組織培養技術的應用可以提供傳統育種者另外一條蹊徑，例如為克服遠緣雜交不親和性之障礙，以胚培養拯救退化之幼胚，提高種間或屬間雜交的成功率；利用花藥培養或小孢子培養獲得單倍體植株，用於隱性基因的選拔；或更進一步利用染色體倍加技術獲得同質雙單元體（doubled haploid），快速育成純系親本，有效縮短生產 $F_1$ 種子所需之時程等。其實隨著生物技術的快速發展，對於育種者而言，善於運用組織培養技術可以創造變異、縮短育種年限及提高選拔效率，這也說明不同專業領域間橫向合作的重要性。組織培養應用於輔助育種的面相很多，本篇討論的是利用組織培養系統中所產生的體細胞變異

作者：夏奇鋌研究員  
連絡電話：04-23317327

(somaclonal variation)配合試管內篩選技術在育種上的運用，亦即將組織培養系統當作一個誘變系統及篩選進行的場所，階段性的以試管內培養及試管內篩選代替傳統育種中的雜交與選拔的過程，達到創造變異、有效篩選的目標。試管內篩選所得之植物材料，雖然最後仍須回歸育種流程以田間種植加以驗證，但過程中大量的土地、人力及時間成本得以節省。綜合來看，利用試管內篩選的優點包括可以排除環境因素變化的干擾、可以在很小的培養容器中篩選為數極大的族群、可以創造變異及針對不同目標同時或分開選拔，這些要素讓育種工作不再受自然環境的限制與影響，得以在培養系統內專注於特定目標的篩選，自然能夠顯著地提升篩選效率。

### 三、體細胞變異介紹

組織培養系統中產生的變異被稱為體細胞變異，是1981年由Larkin & Scowcroft 第一個提出的，指的是經由組織培養過程中導致植物體所產生的各種改變。這個發現緣起於無性繁殖作物在利用組培大量繁殖種苗的過程中，理論上應該得到完全一致的分生苗(clone)，但事實上在相同或不同的培養條件下，常可以觀察到一些與原來植株相異的特性，持續將這些變異分離培養後，可以得到具有新特性的變異株。這些因試管內培養而導致改變的特性在植株出瓶種植後，有些可以遺傳給下一代；有些則在持續種植或下一代時恢復正常，即所謂的表觀遺傳(epigenetic)的改變，在遺傳

上較不具利用的價值。組織培養系統中的體細胞變異從何而來有很多的看法，一般認為組織培養本身可能具有扮演誘變系統的功能，因為培植體從繼代的切割受傷、培養基中的營養成分、生長調節劑、糖濃度、培養基的滲透壓、培養容器內的空氣組成以及濕度等各種因子，皆有可能在培養的過程中對培植體造成不同程度之逆境，這些逆境影響了正在進行分裂、分化、再生的培植體細胞，導致大如細胞染色體數目的改變，小至於細胞基因分子層面的改變，如轉位子(transposable element)活化、DNA序列的變化以及DNA甲基化等，最終造成植物在外觀上、生長速度或習性上的改變而被人們所覺察。

### 四、試管內培養配合誘變處理提高變異的創造

誘變是創造變異的一個有效手段，過去不管是利用物理方法或化學方法誘變在育種上的成效有目共睹(Predieri 2001)，但其實無論是物理或化學誘變處理的先決條件皆需要一個適當的生物系統來配合，例如使用體積小且生長勢強的種子來進行誘變處理，可以提高誘變效率；但對於許多以無性繁殖為主的園藝作物而言，種子可能不是一個好選項，必須尋找更適當的替代方案。組織培養系統在配合誘變處理方面就是一個很好的生物系統，因為只要建立組織培養系統，如生長點、芽體、根段、小孢子、癒合組織或是懸浮細胞的培養，以及建立此一培養系統的再生條件後，即

可利用試管內培養的芽體、花粉或細胞等施以物理或化學誘變處理，相較施用於植物體的誘變處理，試管內系統不僅節省大量的空間，且施用條件可以嚴格控制，因此對於提高誘變效率、增加變異的產生，可以說是事半功倍。圖一

中顯示的是利用葉色深綠的蔓綠絨‘紅公主’組培苗在經過伽瑪射線處理後，在培養過程中持續將葉色改變的芽體加以分離培養，選到的不同葉色之試管苗；圖二為利用相同之培養、誘變及選拔方法，得到在生長期間葉色具有變化



圖一、左邊為正常的蔓綠絨‘紅公主’組培苗，中間及右邊為經過放射線處理及篩選分離後之葉色變異瓶苗。



圖二、由伽瑪射線照射後之蔓綠絨組培苗莖段篩選所得之變異株‘三色王子’，植株之葉色在生長期間有不同之變化。

之變異株‘三色王子’。利用組織培養配合誘變處理，選拔得到遺傳穩定新品種的最佳例子是食用香蕉(*Musa acuminata* Colla)，傳統育種因為三倍體香蕉不易產生種子的障礙，育種成效一直難有突破，反而是以香蕉體胚培養配合誘變處理成功的選到矮性、耐香蕉黃葉病或具有大果等不同特性的突變株。

## 五、試管內篩選

解決了創造變異的問題後，緊接著面臨的是如何針對育種目標有效的將標的物選出，這考驗著篩選系統效率的優劣。試管內篩選的進行除了要瞭解組織培養系統中培植體的生物特性外，篩選劑(selection agent)的選定非常重要，篩選劑與篩選目標間的連動特性，對於篩選能否成功具有決定性的意義。其實篩選劑的選擇需要以植物生理知識作為基礎，接下來才是使用劑量的調整以及正確評估標準的建立。過去試管內篩選常見的目標包括抗病、耐鹽、耐金屬離子如鋁或鐵、耐酸、耐乾旱以及耐殺草劑等，具有相當多元的特性，其中抗耐病性的篩選因為牽涉對病原菌與植物互動的瞭解較為複雜，將另撰文介紹。整體來看，試管內篩選的流程可以分為(1)建立組織培養系統，(2)選擇適當之篩選劑，(3)測試篩選劑之施用濃度，建立試管內培植體與篩選劑間互動的模式，(4)持續試管內篩選直到確認篩選之有效性，(5)植株再生，(6)評估再生植株於試管內及田間之表現，(7)追蹤篩選所得植株之遺傳模式。

## 六、結語

育種者對於育種工具的充份瞭解與掌握，將有助其制訂出較高效率的育種策略。試管內篩選技術雖然有助於提高育種效率，但並不能獨立於育種程序之外，試管內篩選過程中除了需要組織培養領域專家的參與，更重要的是育種者對作物生理機制的瞭解以及對於試管內篩選材料的有效利用，方能達成目標。展望未來，試管內篩選技術將會隨著組織培養技術的不斷進步而更加精進，但如何利用此一技術於提高育種的效率，還需要組織培養工作者與育種者不斷的努力與充分合作方能開花結果。

## 七、參考文獻

- 陳威臣、蕭翌柱、蔡新聲。1999。珈瑪射線照射蔓綠絨組培苗莖段之誘變研究。中華農業研究 48 : 32-41。
- Jain S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153-166.
- Jain S. M. 2010. In vitro mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. *Acta Hort.* 879:605-614.
- Larkin P. J., and W. R. Scowcroft 1981. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Predieri S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64:185-210.