

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

組織培養苗生產系統環境控制(II)

Environmental control on the production of
tissue culture plantlets *in vitro*

計畫編號：NSC 87-2313-B-002-070

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：方煒教授 單位名稱：台灣大學農業機械工程學系

一、中文摘要

本研究旨在建立一適用於組織培養瓶苗栽培的 CO₂ 補充，溫、濕度與 CO₂ 濃度即時監測與控制的系統。探討二氧化碳施肥對本土的珍貴藥材—台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 組培苗自營生長 (photoautotrophic growth) 之影響為本研究的第二目的。試驗結果顯示監控系統之運作合乎需求，並且在 60 天的栽培中，對照組 (傳統栽培方式) 的相對生長速率為 1.78%/日，控制組 (CO₂ 施肥組) 則為 3.73%/日，增加倍數達 2.1 倍。證實在光期對透氣性良好且培養基中不加糖的金線連組培瓶補充二氧化碳確可達到提高瓶內組培苗生長速率之目的，且台灣金線連組培苗採自營方式栽培亦證實為可行。

關鍵詞：二氧化碳施肥，金線連，自營生長，即時監控，組織培養

Abstract

The first purpose of this study was to develop a real time CO₂ supplying, temperature, relative humidity and CO₂ concentration monitoring and control system for the growth of tissue culture plantlets *in vitro*. The second purpose was to examine the effects of CO₂ enrichment on the photoautotrophic growth of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a traditional Taiwanese galenical plants, plantlets *in vitro*. The results show

that after the 60 days of growth, the relative growth rate of the group using the traditional method is 1.78% per day and is 3.73% per day for the CO₂ enriched group. The growth rate was improved by 2.1 times. The results of the experiment proved that the CO₂ enrichment is useful in increasing the growth rate of *Anoectochilus formosanus* Hayata plantlets *in vitro* and to culture the plantlets of interests *in vitro* photoautotrophically is possible. The monitoring and control system developed in this study worked well and functioned properly throughout the entire experiment.

Keywords: CO₂ enrichment, *Anoectochilus formosanus* Hayata, photoautotrophic growth, real time monitoring and control, tissue culture

二、緣由與目的

傳統的組織培養需在培養基中加入蔗糖或葡萄糖做為培養初期唯一之碳源，此種栽培方式稱為異營 (或稱從屬營養) 生長 (heterotrophic growth)；當植株產生葉綠素，開始吸收二氧化碳行光合作用後，由於同時存在兩種碳源，此時稱為混營 (或稱混合營養) 生長 (photomixotrophic growth)；若一開始在培養基中即不加入蔗糖或葡萄糖，植物體本身的光合作用為唯一之碳源，此種栽培方式稱為自營 (或稱光獨立營養) 生長 (photoautotrophic growth)。

自營性組培苗之生產首先需要使

用透氣性高的瓶口包封材料，其次則須提供足夠的光量與在光期中補充足量的 CO_2 來做為光合作用的碳源。本研究旨在建立一適用於組織培養瓶苗栽培的 CO_2 補充，溫、濕度與 CO_2 濃度即時監測與控制系統。系統建立完成後以台灣金線連組培苗為測試材料，探討二氧化碳施肥對組培苗栽培之影響同時探討台灣金線連以自營生長方式栽培之可行性。

三、材料與方法

(一)、參試材料與實驗方法

選取重量約為 200mg 之含莖頂台灣金線連二節，扦插於培養基中。培養基分為兩種，二者之差別在有無添加蔗糖。以 500 ml 蘭花瓶為培養容器，蘭花瓶中裝填 100ml 的培養液及 12g 的 3 號蛭石，每瓶移植 5 株。

由培養基配方及封口的差異構成四種處理(SAL、NAL、SPL、NPL)，每個處理重複 9 瓶。代號中第一個字母代表培養基中加糖(S)或不加糖(N)；第二個字母代表封口材質為鋁箔(A)或秤藥紙(P)；第三個字母 L 代表光期與暗期分別為 16hr 與 8hr。

以鋁箔當封口的苗瓶(SAL 與 NAL 處理)雖置於高 CO_2 濃度的培養箱中，但由於鋁箔封口的透氣率低(0.128 次/hr)，進入瓶內的 CO_2 量很少，所以可視為傳統的金線連組培苗栽培方式。本試驗以此為對照組。以秤藥紙當封口的苗瓶(SPL 與 NPL 處理)透氣率高(4.5 次/hr)，培養箱的高濃度 CO_2 可穿透封口進入瓶內達到 CO_2 施肥的效果，本試驗以此為控制組。試驗時間為 60 天，試驗結束後量取瓶苗的植株鮮重、根鮮重、總鮮重及乾重。

以秤藥紙當封口的苗瓶內水份容易逸出，試驗期間為防止失水，每

三個星期需將苗瓶由培養箱內取出，添加 15ml 的無菌水(約為失重的 1.2 倍)，再於更換新秤藥紙後放回培養箱內。有關透氣率之量測與封口材質、容器種類與瓶封方式等對透氣率之影響請參見吳(1997)之論文。有關如何於栽培過程中自動添加無菌水之部份當為後續研究之重點。

(二)、監控系統軟硬體

本試驗使用培養箱的尺寸為長、寬、高分別為 100cm，50cm 與 27cm，由壓克力製成。組織培養苗瓶放於培養箱內。培養箱上方架設有二支 40W 的飛利浦 TLD 83 燈管。光期時之光量為 $65 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ 。光期之明暗時間長度分別為 16 小時與 8 小時。系統配置如圖 1 所示。

培養箱內 CO_2 的供應主要透過 CO_2 鋼瓶來補充， CO_2 氣體透過調壓閥、流速計、電磁閥與加濕瓶等裝置進入培養箱；培養箱內氣體則透過導管引入內具抽氣泵的 CO_2 分析儀(理研，R1-411A)，量測箱內 CO_2 濃度。相對濕度由相對濕度感測器、除濕器、加濕瓶、電磁閥及 21X 程式所控制。

環控室內的溫度控制在 24~25 $^{\circ}\text{C}$ ，培養箱內相對濕度則設定在 85~90%。溫度與相對濕度均透過溫、濕度感測器(神榮，THT-B110)， CO_2 濃度則透過 CO_2 分析儀的輸出埠將訊號送至 21X 記錄。相對濕度、溫度與 CO_2 濃度之感測訊號分別接上 21X 之輸入埠。

監控系統使用三個輸出埠，分別用來控制 CO_2 、燈光與除濕器之開閉動作。21X 的輸出訊號必須經過放大電路才能驅動所要控制的負載。

試驗期間溫度、濕度及二氧化碳濃度等之變化情形，由 21X 以每 5

秒鐘掃描一次並顯示當時數值, 每 15 分鐘做一次平均並儲存, 可供日後查詢試驗期間溫、濕度及二氧化碳濃度變化情形。

培養箱置於環控室內, 培養箱內溫度不作控制, 培養箱外(環控室內)的溫度則透過另一套電腦監控系統來控制。試驗期間培養箱內溫度與濕度透過溫、濕度感測器(神榮, THT-B110)及 21X 予以記錄。

光期/暗期為 16hr/8hr, 燈光開啟與關閉時間由儲存於 21X 內的程式所控制, 初始設定值為上午 8 時關燈, 下午 4 時開燈。培養箱內的日夜與外界顛倒之目的在避免白天高溫時段開燈, 如此可避免增加環控室降溫系統的負擔。培養箱內氣體若濕度過高則會開啟通往除濕器的電磁閥 3 並關閉電磁閥 4; 若濕度在設定的範圍內則電磁閥 3 關閉並開啟電磁閥 4。將培養箱內光期時 CO₂ 濃度控制在 800~900ppm, 暗期時 CO₂ 濃度不控制。CO₂ 濃度過高, 控制程式會輸出訊號關閉電磁閥 1 與 2, 反之則開啟。

四、結果與討論

(一)、監控系統

培養箱置於台大農機系之環控室內, 培養箱外(環控室內)的溫度與溼度由電腦監控並透過冷凍空調系統進行調節。試驗期間培養箱內溫度維持在 25°C 左右, 光期時之培養箱內溫度比暗期時平均約高出 2°C。相對濕度維持在 80~90%。

光期時瓶苗行光合作用吸收二氧化碳, 當二氧化碳濃度低到 800ppm 時, CO₂ 分析儀偵測得此訊號, 並送至 21X 經監控程式判斷後啟動電磁閥 1 與 2, 補充 CO₂。當濃度超過設定上限(900ppm)便停止。培養箱內光期時

之 CO₂ 濃度大多維持在 800 ~ 1000ppm, 偶爾亦有高達 1100ppm 或以上的情形發生, 比設定之上限 900ppm 高出許多; 此為控制系統的缺失, 主要原因有二: 其一是鋼瓶內使用的為純二氧化碳, 若改用事先配好的較低濃度的 CO₂ 應可改善此現象。其二則是受限於使用的控制主機 21X 的功能, 所有的控制動作僅能以 on-off 進行, 若能改以電腦進行控制當可加入進一級的控制策略如比例、積分、微分(PID)控制、模糊(fuzzy)控制或其它, 如此對 CO₂ 濃度之控制當可更精確。暗期時 CO₂ 不作控制, 由於培養箱並非完全氣密, 所以在暗期時箱內的 CO₂ 濃度會由高轉低。

(二)、瓶苗栽培試驗

如表 1 所示, 瓶苗經 60 天培養後其地上部鮮重、根鮮重與總鮮重以不加蔗糖, 使用秤藥紙封口的處理(NPL), 顯著地比其他處理佳。就乾重而言, 則以添加蔗糖, 秤藥紙封口的處理(SPL)為最好, 此顯示在 60 天的培養期中對乾重的增加以加糖且補充 CO₂ 的栽培為最佳。比較總鮮重可知使用透氣性佳的封口, 對瓶苗補充 CO₂ 將能促進瓶苗的生長。

由相對生長速率(Relative growth rate)的比較亦可得到相同的結論。相對生長速率以下式計算:

$$\text{相對生長速率} = \frac{(W_2 - W_1) / W_1}{(t_2 - t_1)} * 100\%$$

其中, W₁ 為初重, W₂ 為 60 天後的重量, t₁ 與 t₂ 以天數計算, t₂-t₁ 為 60 天, W₁ 與 W₂ 則以 mg 計算; 相對生長速率的單位為%/日。

如圖 2 所示為四種處理之總鮮重的相對生長速率, 依序分別為 1.78、1.81、2.8、與 3.73%/日。以秤藥紙

封口的兩組處理(SPL、NPL)明顯的比鋁箔封口的兩組(SAL、NAL)為佳，顯示對透氣性良好的組培瓶苗補充 CO₂ 確可提高相對生長速率。

以秤藥紙當封口的苗瓶(SPL 與 NPL 處理)透氣率高，允許高濃度 CO₂ 進入瓶內達到 CO₂ 施肥的效果，但瓶內的水份亦容易逸出。試驗期間每三個星期補充無菌水的作業耗費不少人工，應可在培養箱中保持高濕來減少瓶內蒸散出去的水份，亦可設計自動定時給水的裝置。需注意的是高濕容易造成高污染，所以只適合不加糖的培養。本次試驗中 SPL 組之苗瓶污染比例為 40%，其他各組則無污染。再另一次試驗中將相對溼度控制在不超過 70%則全部無污染。

五、結論

本研究建立一套針對組培苗栽培的 CO₂ 供應與濃度即時監測與控制系統，監測項目除 CO₂ 濃度之外亦包括溫度與相對濕度。為節省 CO₂ 氣體的使用，目前發展之監控系統的控制範圍以培養箱內為主；相同監控軟硬體亦可應用於整間環控室。將此套系統應用於金線連組培苗的栽培，初步試驗結果顯示在 60 天的栽培中，相對生長速率可以由 1.78%/日增加到 3.73%/日，增加倍數達 2.1 倍。證實在光期對透氣性良好的金線連組培瓶補充 CO₂ 確可達到提高生長速率之目的，亦證實台灣金線連之組培苗可採自營方式栽培。

七、計畫成果自評

本研究應已達成預期之目標，亦適合在學術期刊發表，主要發現正如結論中所言『在 60 天的栽培中，相對生長速率可增加達 2.1 倍。證實在

光期對透氣性良好的金線連組培瓶補充 CO₂ 確可達到提高生長速率之目的，亦證實台灣金線連之組培苗可採自營方式栽培。』。

本研究已發表於農業機械學刊第七卷第二期。論文題目及參與研究之人員請參見參考文獻的第一篇。

八、參考文獻

1. 方煒、張祖亮、吳瑞宏。 1998。即時監控系統應用於二氧化碳施肥對金線連組織培養苗生長之研究。農業機械學刊。7(2)29：38。
2. 吳瑞宏。 1997。應用環控技術於金線連組培苗之生產。碩士論文。台北：台灣大學園藝學研究所。
3. 劉新裕、蔡新聲、徐原田、劉柏煙。 1987。金線連之繁殖與栽培技術。科學農業 35：125-129。
4. Cournac, L., B. Dimon, P. Carrier, A. Lohou and P. Chagvardieff. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment. Plant Physiol. 97：112-117.
5. Deng, R and D. J. Donnelly. 1993. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. Hortscience 28(10)：1048-1051
6. Desjardins, Y., F. Laforge, C. Lussier and A. Gosselin. 1988. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. Acta Horticulturae 230：45-53.
7. Figueira, A., A. Whipkey and J. Janick. 1991. Increased CO₂ and light promote *in vitro* shoot growth and development of *Theobroma cacao*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116：585-589.

8. Fujiwara, K., T. Kozai and I. Watanabe. 1987. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. (3) Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *J. Agr. Meteorol.* 43 : 21-31.
9. Ikeda, A., S. Nakayama, Y. Kitaya and K. Yabuki. 1988. Effect of photoperiod, CO₂ concentration, and light intensity on growth and net photosynthetic rates of lettuce and turnip. *Acta Horticulturae* 229 : 273-282.
10. Jeong, B.R., K. Fujiwara and T. Kozai, 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation of quality plantlets. *Hortic. Review* 17 : 123-170.
11. Jeong, B.R., C.S. Yang and J.C. Park. 1996. Growth of *Gerbera hybrida* *in vitro* as affected by CO₂ concentration and air exchange rate of the vessel. *Acta Horticulturae* 440 : 510-514.
12. Kirdmanee, C., Y. Kitaya . and T. Kozai, 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 31 : 144-149.
13. Kozai, T., H. Oki and K. Fujiwara. 1987. Effect of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlet during the preparation stage. In "Proc. of Symp. Florizel on Plant Micropropagation in Hort." 135-141. Arlon, Belgium.
14. Kozai, T., M. Hayashi, Y. Hirose, T. Kodama and I. Watanabe. 1987. Development of the acclimatization unit for accelerating plantlet growth and the test cultivations. *J. Agr. Meteorol.* 42 : 349-358.
15. Kozai, T. and K. Sekimoto. 1988. Effect of the number of air exchanges per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets *in vitro*. *Environ. Control Biol.* 26 : 21-29.
16. Kozai, T. and Y. Iwanami. 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 57 : 279-288.
17. Kozai, T. 1989. Autotrophic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction of production costs. *Chron. Hort.* 29(2) : 19-20.
18. Kozai, T. 1991. Environmental control in plant tissue culture and its application for micropropagation. In "Mathematical and Control Application in Agriculture and Horticulture - Proc. International Federation of Automatic Control", eds. Y. Hashimoto and W. Day, 99-103. San Diego : Academic Press, Inc.
19. Porter, M. A. and B. Grodzinski. 1985. CO₂ enrichment and protected crops. *Hort. Review* 7 : 345-398.
20. Predieri, S., R. Infante, F. Fasolo and B. Righetti. 1991. CO₂ enrichment effect on *in vitro* grown apple and kiwifruit. *Acta Horticulturae* 300 : 107-110.
21. Roche, T.D. and A.C. Cassells. 1996. Gaseous and media-related factors influencing *in vitro* morphogenesis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) 'Nahodka' node cultures. *Acta Horticulturae* 440 : 588-593.
22. Roche, T.D., R.D. Long, A.J. Sayegh and M.J. Hennerty. 1996. Commercial-scale photoautotrophic micropropagation applications in Irish agriculture, horticulture and forestry. *Acta Horticulturae* 440 : 515-520.

表 1. 光期添加 900 ppm CO₂, 培養 60 天之瓶苗生長情形

Table 1. The growth of *A. formosanus* Hayata plantlets *in vitro* in 60 days supplied with 900 ppm CO₂ during the light period.

處理 ¹ treatment	地上部鮮重 top fresh weight, mg	根鮮重 root fresh weight, mg	總鮮重 total fresh weight, mg	乾重 dry weight, mg
SAL	383.1b	30.6c	413.7c	52.5b
NAL	362.2b	55.0b	417.2c	34.9c
SPL	508.3a	27.9c	536.2b	80.7a
NPL	530.7a	116.7a	647.4a	57.3b

* Means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by Duncan's Multiple Range Test

1. S 代表加糖 (S means with sugar), N 代表不加糖 (N means sugar free), A 代表鋁箔封口 (A means aluminum foil), P 代表秤藥紙封口 (P means medicine paper), L 代表光週期為 16/8 小時 (L means 16/8 hours light/dark period)

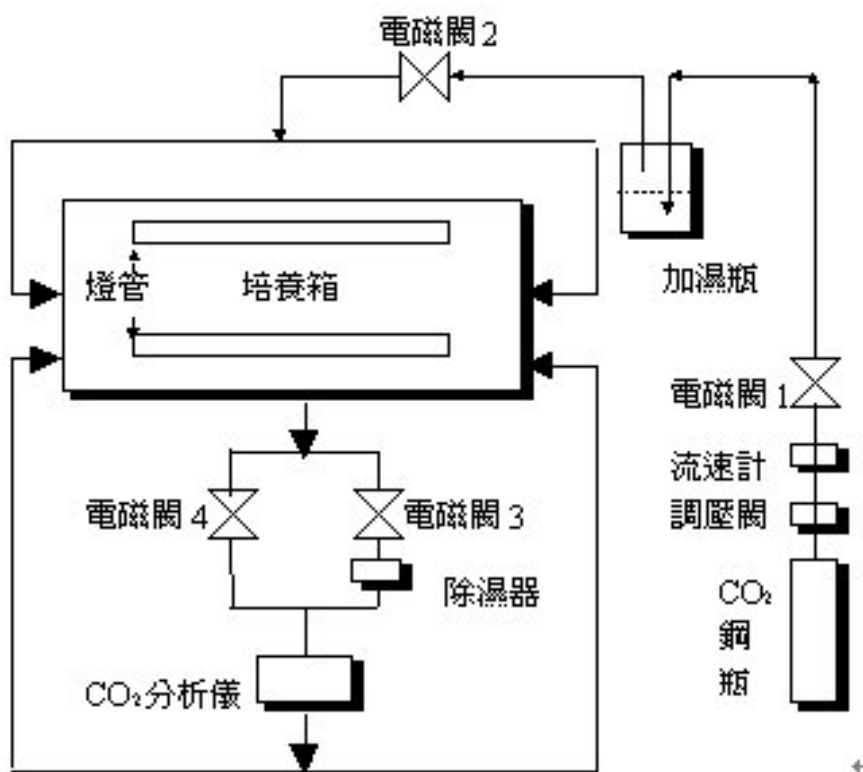


圖 1. 瓶苗添加 CO₂ 試驗之硬體架構示意圖

Fig.1. The schematic diagram of the system layout and controls for the CO₂ enrichment experiments.

錯誤! 連結無效。

處理別 / treatments

SAL : 加糖, 鋁箔紙封口 /with sugar, aluminum foil

圖 2. 光期添加 900 ppm CO₂ 金線連瓶在培養 60 天之鮮重相對生長速率

Fig.2. Relative growth rates of *A. formosanus* Hayata plantlets *in vitro* in 60 days supplied with 900 ppm CO₂ during the light period.

SPL : 加糖, 秤藥紙封口 /with sugar, medicine paper

NPL : 不加糖, 秤藥紙封口 /sugar free, medicine paper