

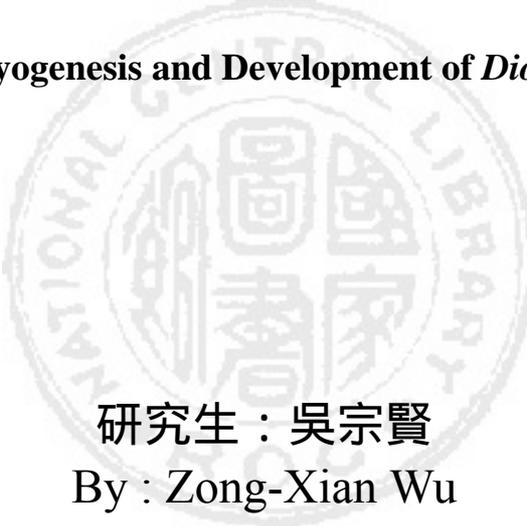
國立臺灣大學森林學研究所碩士論文

A Thesis Present to the Faculty of the Graduate Institute of Forestry
National Taiwan University in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Master of Science

指導教授：王亞男 教授 教授
Advisor : Prof. Ya-Nan Wang

毛柿之體胚發生及發育

Somatic Embryogenesis and Development of *Diospyros discolor*



研究生：吳宗賢
By : Zong-Xian Wu

中華民國 92 年 6 月
June , 2003

目 錄

中文摘要

英文摘要

縮寫字

Index of Species

、 前言	1
、 前人研究	2
、 材料與方法	8
、 結果	13
討論	27
結論	34
、 引用文獻	35
、 附表	44
、 照片之說明	45
照片	47

誌 謝

本論文承蒙王亞男教授的指導與勉勵，王老師稟持自由研究之態度，培育獨立研究之精神，使我受益良多；文稿初成，復蒙許圳塗教授、王淑美教授、廖宇廣教授及林敏宜教授詳于審閱斧正，惠賜寶貴意見，僅致上最崇高之謝意。

感謝許明道學長對試驗數據化觀念之導入，林志謀學長在組織培養理論及文獻查閱之幫助，402 實驗室學弟周宏祺及蔡國書在組織培養技術上之互相切磋，論文得順利完成，謹至此致上誠摯之謝意。

感謝始終關心我的所有人，及在背後默默支持我，並給于鼓勵與安慰的家人，僅以此文獻給我最親愛的家人，爸爸、媽媽、姊姊及哥哥。

摘 要

毛柿成熟胚培養於 MS 培養基可促使胚發芽，外加生長節劑則會抑制發芽作用。成熟胚培養於添加 0.1 及 0.5 ppm 2,4-D 之 MS 培養基，胚軸具膨脹反應，將膨脹之胚軸繼代培養於添加 0.3% (w/v) 活性炭之 MS 培養基，可誘導直接體胚與間接體胚發生。

毛柿成熟胚之胚軸培養於添加 0.1 ppm 2,4-D 及 0.2% (w/v) PVP 之 MS 培養基可誘導直接體胚發生，培養於添加活性炭之 MS 培養基則無反應。0.1 ppm TDZ 與 0.1 ppm 2,4-D 之組合較單獨使用 2,4-D 可獲得較高之體胚發生率，BA 與 2,4-D 之組合較單獨使用 2,4-D 並無顯著效果。

毛柿體胚發生需培養於光照環境，黑暗環境雖亦有體胚發生現象，但效果較培養於光照環境差。誘導體胚發生所需之蔗糖濃度為 3% (w/v) 或 4% (w/v)，蔗糖濃度過低或過高皆不利毛柿體胚發生。

毛柿成熟胚之胚軸培養於修飾過之 MS 培養基，以 KNO_3 濃度為 28.2 mM 及 NH_4NO_3 濃度為 10.3 mM， $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比值為 3.7，可得最佳體胚誘發效果，將發展至球形階段之體胚培養於分化用之空白培養基，MS 培養基氮濃度減半具促進體胚發芽之作用，維持原氮濃度，體胚可發芽、發根及胚軸伸長，提高氮濃度至原 MS 培養基之 3/2 倍，可促進體胚胚軸伸長。

Abstract

Mature embryos of *Diospyros discolor* could germinate on hormone-free MS medium. Germination of mature embryos inhibited by exogenous plant growth regulators. While mature embryos cultured on MS medium supplemented with 0.1 and 0.5 ppm 2,4-D, hypocotyls began to swell. Swelled hypocotyls subcultured on MS medium supplemented with 0.3% (w/v) activated charcoal, direct and indirect somatic embryogenesis occurred.

Hypocotyls of matured embryos of *Diospyros discolor* cultured on MS medium supplemented with 0.1 ppm 2,4-D and 0.2% (w/v) PVP could obtain direct somatic embryogenesis. Explants had no response while hypocotyls cultured on MS medium supplemented with 0.1 ppm and activated charcoal. In order to obtain high frequency of somatic embryogenesis, we culture hypocotyls of mature embryo of *Diospyros discolor* on MS medium supplemented with 0.1 ppm 2,4-D and 0.1 ppm TDZ. The result of somatic embryogenesis of medium supplemented with 2,4-D and BA was the same as medium only supplemented with 2,4-D.

Although somatic embryogenesis of *Diospyros discolor* could occurred in the dark culture, the frequency of somatic embryogenesis was lower than culture in the 16 hr light photoperiod. The optimal concentration of sucrose used to somatic embryogenesis of *Diospyros discolor* was 3 and 4 % (w/v) .It didn't suited somatic embryogenesis while concentration of sucrose was too low or too high.

In order to understand nutrient necessary of somatic embryos development, hypocotyls of mature embryos of *Diospyros Discolor* cultured on modify MS medium. High frequency somatic embryogenesis could obtain while explants cultured on modify MS medium with 28.2 mM KNO₃ and 10.3 mM NH₄NO₃ , 3.7 NO₃⁻/NH₄⁺.

Globular embryos subcultured on hormone-free modify MS medium for development. In 1/2 nitrogen strength MS medium, germination of somatic embryos occurred. Germination, rooting and elongation of somatic embryos were gained in normal nitrogen strength MS medium. In 3/2 nitrogen strength MS medium, somatic embryos could elongate.

縮寫字

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
4-CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
ABA	±cis-trans abscisic acid
BA	6-benzylaminopurine
GA	Gibberellic acid
KIN	Kinetin, (N ⁶ -furfurylaminopurine)
IAA	Indole-3-acetic acid
MS	Murashige & Skoog
NAA	-naphthaleneacetic acid
PEG	Polyethyleneglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidone
TDZ	Thidiazuron, (N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)

Index of Species

中文名稱	學名	附註	索引
花生	<i>Arachis hypogaea</i> L.		P4、 35
沙打旺	<i>Astragalus adsurgens</i> Pall.	綠肥植物。	P5、 39
燕麥	<i>Avena sativa</i> L.		P5、 30、 31、 41
緋合歡	<i>Calliandra tweedii</i>		P4、 30、 39
檸檬	<i>Citrus lemon</i>		P5
甜橙	<i>Citrus sinensis</i>		P5
青剛櫟	<i>Cyclobalanopsis glauca</i>		P5、 30、 35
柔毛地黃	<i>Digitalis lanata</i>		P31、 41
毛柿	<i>Diospyros discolor</i>		P1
象牙樹	<i>Diospyros ferrea</i>		P27、 39
柿	<i>Diospyros kaki</i>		P2
黃心柿	<i>Diospyros maritima</i>		P27、 39
山柿樹	<i>Diospyros montana</i>		P27、 41
無梗五加	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	藥用植物。	P4、 28、 37
桉樹	<i>Eucalyptus globulus</i>		P4
費翹	<i>Feijoa sellowiana</i>	別名：鳳梨番石榴。	P5、 31、 42
琴葉榕	<i>Ficus pandurata</i> Warb.		P4、 35
白臘樹	<i>Fraxinus Americana</i> L.		P5、 30、 36
武靴葉	<i>Gymnema sylvestre</i>	藥用植物，別名：滅糖葉。	P5、 30、 35
大麥	<i>Hordeum vulgare</i> L.		P5、 31、 41

高麗蔘	<i>Korean ginseng</i>		P7、32、36
美國鵝掌楸	<i>Liriodendron tulipifera</i>		P4、30、40
忍冬	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.		P4
苜蓿	<i>Medicago sativa</i>		P31、42
人參	<i>Panax ginseng</i>		P31
白雲杉	<i>Picea glauca</i>		P31、36
蛇椒	<i>Piper colubrinum</i>	胡椒科，產於美國南部，對根腐病免疫。	P4、5、43
西班牙栓皮櫟	<i>Quercus suber</i> L.		P28、41
白檀木	<i>Santalum album</i> L.		P2、3、30、42
田菁	<i>Sesbania sesban</i> var. <i>bicolor</i>		P4、42
高粱	<i>Sorghum bicolor</i>		P5、37
葡萄	<i>Vitis vinifera</i> L.		P30、39

、 前言

毛柿 (*Diospyros discolor*) 屬柿樹科 (Ebenaceae) 柿樹屬, 又名臺灣黑檀 (Taiwan Ebony), 為常綠大喬木; 樹皮黑色。小枝、葉柄、葉背、花及果皆披黃褐色毛, 葉屬披針型, 長約 15~30 cm, 花雌雄異株, 黃白色, 花期 3~5 月, 果實密生褐毛, 成熟時呈紅色, 可食, 果期為 9 月 (呂等, 2000)。

毛柿為陽性樹種, 深根性, 幹形通直, 生長緩慢, 喜生於珊瑚礁土壤或肥沃之石灰質土壤, 屬標準的熱帶樹種, 種子發芽率高, 約 70~80%, 但保存期甚短, 種子採收後經 20 天發芽率為 68%, 30 天為 45%, 40 天為 11%, 50 天為 5%, 60 天為 0%, 故種子採後需即播。毛柿葉厚質柔軟, 具耐旱、耐鹽及耐風特性, 適用於防風樹種及水源涵養林, 且由於枝葉茂密, 樹型通直優美, 乃上乘之造園樹種。毛柿為世界之貴重材, 日本稱唐木, 材質極致密, 心材塗附洋漆後, 至為美麗, 為臺灣重要之高貴裝飾材樹種, 其幼年未成熟材, 抗壓、抗曲力均強, 可做柱材, 亦可製刀柄及船具。日據時代為保護此稀有樹種, 曾將恆春鵝鑾鼻海岸林及恆春龜子角(墾丁)之毛柿天然原生林指定為天然紀念物予以保存(郭, 1998)。

毛柿為台灣固有種, 屬於邊際分佈, 分佈地為恆春半島、蘭嶼、綠島 (呂、林, 1996)。現今毛柿之保護等級為「瀕臨滅絕」種, 屬於小而持續下降之族群 (呂、林, 1996; 賴, 1991), 實有加強復育之必要。

本研究之目的在以毛柿之成熟胚為材料, 探討誘導體胚發生及發育所需之條件, 建立毛柿體胚繁殖體系, 以期對毛柿之推廣及復育能有所助益。

、前人研究

() 柿樹科植物之微體繁殖

有關柿樹科之微體繁殖研究不多，Ryutaro *et al.* (1988) 曾以柿 (*Diospyros kaki*) 之葉原體 (Leaf primordia) 為材料，培養於將 NH_4NO_3 濃度減半之 MS 培養基，並添加 $10 \mu\text{M}$ IAA 與 $10 \mu\text{M}$ Zeatin 之組合，於黑暗環境下，培養 10 天，成功誘導出癒合組織，培養 40 天後癒合組織量可完全覆蓋培殖體。Ryutaro 和 Akira (1992) 亦以柿之葉原體為培殖體，但以 KNO_3 及 NH_4NO_3 濃度減半之 MS 為基礎培養基，顯示以 $1 \mu\text{M}$ IAA 與 $10 \mu\text{M}$ Zeatin 之組合或單以 $1 \mu\text{M}$ 4-CPPU 較適合誘導癒合組織發生，培養於 12 小時光照週期下，培養 10 天即可誘導出癒合組織，再持續培養 30 天可由癒合組織誘導出不定芽。柿樹科之體胚誘導方面則尚無研究發表。

() 體胚之定義

胚 (embryo) 可定義為一個生物個體尚未發育成組織或構造前之最初型態。在高等植物中稱胚為經由有性生殖作用使雌雄配子結合所產生之合子胚或種子 (Nagmani *et al.*, 1995)。然而許多植物組織培養中顯示，在未經有性生殖情況下，植物組織仍可出現一些類似胚之構造，並具有雙極性形態分化之能力，這些類胚體被稱為體胚 (Somatic embryo) 或擬胚 (Embryoids)；其形成及發育過程則稱為體胚發生 (Somatic embryogenesis)。體胚之研究最早為 Steward *et al.* (1958) 利用胡蘿蔔的次生韌皮部為材料誘導出體胚，Reinert (1959) 更指出胡蘿蔔體胚具有雙極分化之能力，進一步證明具有細胞全能性 (Totipotency)。在木本之被子植物中，最早由 Rao (1965) 誘導出之白檀木 (Sandalwood) 體胚。事實上至今為止已有許多植物被指出具有形成體胚之能力，故體胚發生已被認為是高等植物普遍能力 (Gray, 2000)。

Sharp *et al.* (1980) 將體胚發生分為直接體胚與間接體胚。直接體胚發生是指體胚直接由培植體發生，此現象是經由培植體之已具胚性的單細胞或細胞團，發育而成，故只要在適當的培養條件下即可發育成體胚，如白檀木之成熟合子胚即具有直接體胚發生能力 (Rai and McComb, 2002)。間接體胚發生則是培植體先經逆分化產生癒合組織或稱前胚性細胞團 (Pre-embryogenic mass, PEMs) 再分化成體胚，胚性細胞的基本特性為體積小、細胞質濃、核大、液泡小及含澱粉體，並具有旺盛的 RNA 合成及代謝活性。

植物經由體胚發生進行增殖為一種極有效率之方式 (Chalupa, 1990)。在植物育種方面，以體胚發生進行微體繁殖通常比器官發生具較多優點，體胚由單一細胞分化而成，器官則由許多細胞分化而成，因此經體胚形成之植物其基因型傾向於一致性，經器官發生形成之植物則可能有鑲嵌體現象 (Tomar and Gupta, 1988)。Hogberg *et al.* (2001) 認為體胚發生比其他微體繁殖技術較好之因素有三，即：較高的增殖效率、具低花費自動化生產潛力及適當方式保存可避免成熟化。此外假如適當包裹後可導致體胚進入休眠狀態，則體胚可用於人工種子製造 (Redenbaugh *et al.*, 1986)。

() 影響體胚發生之因子

1、培植體種類

一般而言愈年輕的培植體愈容易誘導體胚發生，如未成熟胚或成熟胚 (Gray, 2000)。Williams and Maheshwaran (1986) 認為幼嫩胚中的許多細胞已決定往胚發生之潛力，當胚成熟或發芽，胚中可發育成胚之細胞減少，結果使體胚發生之能力及頻率下降。但使用未成熟胚為培植體進行繁殖有一些缺點，未成熟胚無法長期保存，因此材料取得容易受季節性影響；未成熟胚通常較小，所以很難進行剝胚及切取，因此在其他較成熟的組織無反應時，才考慮使用未成熟胚 (Bonga and Aderkas, 1993)。

被子植物之體胚發生所使用的培植體多為成熟胚或更成熟之植物組織，如花生 (Baker *et al.*, 1995)、Sandalwood (Rai and McComb, 2002)、*Eucalyptus globulus* (Nugent *et al.*, 2001) 及 *Lonicera japonica* Thunb. (Kim *et al.*, 2003) 使用成熟胚為培植體誘導體胚發生；琴葉榕(黃馬, 1985)、*Piper colubrinum* (Yusuf *et al.*, 2001) 之體胚發生以葉為培植體；*Calliandra tweedii* (Kumar *et al.*, 2002) 則利用莖與葉柄誘導體胚發生。但在部分例子中體胚發生之培植體需要使用未成熟胚才有反應，如 *Liriodendron tulipifera* 需以未成熟胚為培植體才可誘導出胚性癒合組織，使用成熟胚為培植體則無體胚發生現象 (Merkle and Sommer, 1986)。

2、植物生長調節素

植物生長素 (Auxin) 對體胚之誘導扮演重要的角色，其中最常使用的如 2,4-D、IAA 及 NAA 等。Zimmerman (1993) 認為植物生長素為開啟體胚發生程序之關鍵，植物生長素會促使某些基因表現並合成體胚發生所需之物質 (mRNAs 及 Proteins)。在種子中之內植物生長素的濃度在魚雷型胚階段之早期達到最大濃度，之後即逐漸減少 (Etienne *et al.*, 1993)。植物生長素對植物體胚發生之作用可分為兩類，一為先以較高濃度之植物生長素處理培植體一段時間後，再將培植體繼代至較低濃植物生長素或空白之培養基，培植體需使用兩種處理誘導體胚發生，此種體胚發生類型如胡蘿蔔 (Ibaraki *et al.*, 2000) 及 *Eleutherococcus sessiliflorus* (Choi *et al.*, 2002) 等，前培養所需之時間因培植體種類與植物種而異，以胡蘿蔔為例，培植體為葉柄、胚軸及單細胞所需前培養之時間分別為 1、2 及 7 天 (Zimmerman, 1993)，而以胚軸為培植體的 *Eleutherococcus sessiliflorus* 之前培養則需 14 天；另有些植物只需一種處理，即持續有植物生長素存在才可誘導體胚發生，如 *Sesbania sesban* var. *bicolor* (Shahana and Gupta, 2002)。

除了 Auxin 外，許多雙子葉植物之體胚誘導亦常使用細胞分裂素 (Cytokinin)，最常使用的細胞分裂素如 BA、Kin 及 TDZ 等。細胞分裂素的含

量在種子發育過程中具明顯改變之現象，種子組織增殖過程中細胞分裂素含量增加，之後隨種子成熟而減少 (Banowitz *et al.*, 1999)。細胞分裂素通常和植物生長素組合誘導體胚發生，如 *Gymnema sylvestre* (Ashok-Kumar *et al.*, 2002) 及 *Astragalus adsurgens* Pall. (Luo *et al.*, 1999) 以 2,4-D 與 BA 之組合誘導體胚發生，*Fraxinus Americana* L. (Bates *et al.*, 1992) 以 TDZ 及 2,4-D 之組合誘導體胚發生，但有些植物單獨以細胞分裂素處理即可誘導體胚發生，如青剛櫟以 TDZ 或 BA 處理即可誘導體胚發生 (王、章, 2001), *Piper colubrinum* (Yusuf *et al.*, 2001) 則以 BA 及 Kin 組合誘導體胚發生，*Citrus lemon* 之柱頭及花柱單以 4-CPPU 處理即可誘導體胚發生，而 4-CPPU 與 2,4-D 之組合反而無法誘導體胚發生 (Fiore *et al.*, 2002)。

3、培養基之氮源

培養基是否適於植物生長及發育之關鍵在於培養基離子強度、氮含量、鉍態氮與硝酸態氮之比例、鈣離子是否缺乏及植物組織對氯離子之敏感度等 (McCown and Sellmer, 1987)。氮為影響植物型態發育之重要因子 (Halperin, 1995)，氮為合成蛋白質之主要元素，許多儲存在細胞內的蛋白質，則是誘導體胚發生或使體胚發育正常化之關鍵 (Sreedhar and Bewley, 1998)。

培養基內鉍態氮與硝酸態氮之比例與含量為影響植物體胚發生之重要因素，Vesco and Guerra (2001) 對 *Feijoa sellowiana* 體胚發生之研究顯示，無論是單以鉍態氮或硝酸態氮為氮源之培養基，誘導體胚發生率皆很低，當鉍態氮比硝酸態氮為 15 : 34，可提高體胚發生率。類似之情形也出現在 Halperin 和 Wetherell (1965) 對野生胡蘿蔔 Elkonin 和 Pakhomova (2000) 對 *Sorghum bicolor* Nuutila *et al.* (2002) 對 *Avena sativa* L. 及 Nuutila *et al.* (2000) 對 *Hordeum vulgare* L. 之體胚發生研究中，不同的是各物種有其特定之最適比例。培養基之氮含量亦可影響體胚發生。Niedz (1994) 在誘導 *Citrus sinensis* 胚性癒合組織之研究中顯示，當培養基有添加 BA 時，硝酸態氮與鉍態氮相同比例下，以培養基氮含量較

高者可獲得較高之胚性癒合組織鮮重。

4、其他因子

其他可影響植物體胚發生之因子，如蔗糖濃度 (Lou and Kako, 1995) 培養基滲透壓 (May and Trigiano, 1991) 及光 (Castillo and Smith, 1997) 等。

體胚誘導亦受到鉀之影響。Brown *et al.* (1976) 研究鉀與野生胡蘿蔔體胚發生之關係，鉀為胡蘿蔔體胚發生之必要元素，且培養基鉀之含量，適合體胚發生之濃度高於維持正常生理作用之濃度。

() 體胚發育

雙子葉植物合子胚與體胚在發育上通常都會經歷 3 個階段，即球型胚、心臟型胚、魚雷型胚，之後再發育成完整植株。然而合子胚與體胚在構造及發育過程中有 2 個決定性的不同，分別是合子胚外層具有胚乳及種皮包覆，而體胚則成裸露狀態，以及合子胚在發芽形成完整植株前會現經歷脫水及休眠作用，但體胚則直接越過此兩作用而發育成植株 (Zimmerman, 1993)。

體胚發育成完整植株之過程相當艱難，其機率在 0%~50%之間 (Gray , 2000) 研究如何使體胚發育正常往往著眼於體胚與合子胚發育之相異處，Arnold *et al* (2002) 認為促使體胚正常發育之重點在於使體胚呈乾燥狀態及提供正常發育所需之養分。

ABA 與滲透壓為調整植物儲藏性 Polypeptide 合成之兩個重要因子 (Skriver and Mundy, 1990)，如 LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins，LEA proteins 指在胚胎發育後期所出現之一群蛋白質而言，表現出此蛋白質之基因則稱為 LEA 基因 (Galau *et al.*, 1986)，LEA proteins 為極親水性蛋白，在植物之合子胚發育時大量出現，從其在胚發育過程出現之時機及可由 ABA 誘導基因表現推測 LEA proteins 之功能可能與保護胚不致受胚發育後期之脫水危害有關 (Dure *et al.*, 1989)。

ABA 在種子發育時會抑制種子吸水作用，而滲透壓則可增加內生 ABA 之濃度，兩者之關係密切 (Skriver and Mundy, 1990)。ABA 於種子發育過程中所扮演之角色包括，維持休眠及、抑制過早發芽、影響胚之型態發生及增加缺水忍受性 (Misra, 1995)。

除 ABA 與滲透壓外，體胚發育亦受培養基中之硝酸態氮與銨態氮影響。Nuutila *et al.* (2000) 認為體胚發育之每階段對氮需求皆不同。Choi *et al.* (1998) 對 *Korean ginseng* 體胚分化之研究中指出，銨態氮會抑制體胚之根分化，銨態氮與硝酸態氮同時存在下可促進體胚發芽。

、材料與方法

() 材料

毛柿成熟果實於民國 90 及 91 年 8 月採自屏東縣林邊鄉崎峰國小校校園內約 30 年生母樹 (Fig. 1), 果實以手剝開, 將成熟種子取出, 並以菜瓜布刷除種皮表面之黏膜, 貯藏於 4 以備使用。

() 方法

1、種子表面消毒

種子進行流水處理 24 小時。先以稀釋 1/400 安期-A 消毒液 (中國化學製藥公司) 浸泡 5 分鐘, 70% 酒精處理 5 分鐘, 再以 3% (v/v) NaOCl (100ml 加一滴 Tween20) 殺菌 30 分鐘進行種子表面消毒, 所有過程均以超音波震盪器震盪。種子表面消毒後於無菌操作台中以無菌水沖洗 3 次。

2、培養基

試驗用之培養基為 MS (Murashige and Skoog, 1962) 及修飾過之 MS, 即 KNO_3 3 種濃度 (分別為 MS 全量時之 0.5、1、1.5 倍) 以及 NH_4NO_3 4 種濃度 (分別為 MS 全量之 0、0.5、1、1.5 倍) 之互相組合, 故共有 12 種不同濃度組合處理 (M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、M10、M11、M12), 詳見表 1 及表 2。

培養基之製備: 各種基礎培養基之有機、無機鹽類及蔗糖加入二次蒸餾水後, 再添加各種植物生長調節劑, 如需添加活性炭或 PVP 【Polyvinylpyrrolidone 40,000 wt, K value (intrinsic viscosity): 26-35】, 待蔗糖溶解後加入培養基, 至全部溶解完畢, 再以二次蒸餾水定體積, 以 0.1N NaOH 或 0.1N HCl 調整 pH 值至

5.7 5.8。液態培養基至此即可分瓶，固態培養基則再加入 7 g/l Agar (Pronadisa)，以微波爐將 Agar 煮溶後分瓶，封瓶後以 121 °C、1.05 kg/cm² 之高溫高壓滅菌鍋中滅菌 15 分鐘，靜置冷卻，加活性炭者需於凝固前搖晃，使均勻。

表 1 毛柿體胚發生試驗之培養基設計

代號	KNO ₃ 濃度 (mM)	NH ₄ NO ₃ 濃度 (mM)	原 MS KNO ₃ 濃度之倍數	原 MS NH ₄ NO ₃ 濃度之倍數
M1	9.4	0	1/2	0
M2	9.4	10.3	1/2	1/2
M3	9.4	20.6	1/2	1
M4	9.4	30.9	1/2	3/2
M5	18.8	0	1	0
M6	18.8	10.3	1	1/2
M7 (MS)	18.8	20.6	1	1
M8	18.8	30.9	1	3/2
M9	28.2	0	3/2	0
M10	28.2	10.3	3/2	1/2
M11	28.2	20.6	3/2	1
M12	28.2	30.9	3/2	3/2

表 2 毛柿體胚發育試驗之培養基設計

代號	KNO ₃ (mM)	NH ₄ NO ₃ (mM)	原 MS KNO ₃ 濃度之倍數	原 MS NH ₄ NO ₃ 濃度之倍數
M2	9.4	10.3	1/2	1/2
M7 (MS)	18.8	20.6	1	1
M12	28.2	30.9	3/2	3/2

3、培養環境

培養室溫度為 25 ± 1 °C，光照強度約 27 μE/m² s，光週期為 16 小時。暗培養則於同一環境下，另以暗箱為之。液態培養者亦在同一環境下，以水平迴轉式振盪器 (HOTTECH, orbital shaker model : 722) 轉速 90 rpm 培養。

4、試驗項目

(1) 胚培養

成熟胚從毛柿種子取出後，水平培養於添加 3% (w/v) 蔗糖之 MS 基礎培養基，試驗 0 3 ppm 2,4-D、0 3 ppm NAA 及 0 3 ppm IAA 對胚生長之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶 (Kimax) 進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 4 個培植體，光照，培養 20 天，每處理重複 5 次。

(2) 體胚誘導

a、前培養與 2,4-D 濃度對體胚誘導之影響

將胚培養試驗 (0.1、0.5 ppm 2,4-D) 呈膨大狀態之胚取出，切取膨大之胚軸，大小約 0.5 0.8 cm 為培植體，繼代培養於 MS 培養基、3% (w/v) 蔗糖、0.3% (w/v) 活性炭，試驗 0 1 ppm 2,4-D 對體胚誘導之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 5 個培植體，光照，培養 50 天，每處理重複 3 次。

b、活性炭與 PVP 對體胚誘導之影響

成熟胚由毛柿種子取出，切取胚軸部分約 0.5 0.8 cm 為培植體，培養於添加 0.1 ppm 2,4-D、3% 蔗糖之 MS 培養基。試驗 0.3% 1.0% (w/v) 活性炭及 0.1% 0.6% (w/v) PVP 對體胚誘導之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 5 個培植體，光照，培養 50 天，每處理重複 4 次。

c、不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 或 TDZ 之組合對體胚誘導之影響

成熟胚由毛柿種子取出，切取胚軸部分約 0.5 - 0.8 cm 為培植體，培養於 3 % (w/v) 蔗糖、0.2% (w/v) PVP 之 MS 培養基。試驗 0 - 1 ppm 2,4-D 與 0 - 3 ppm BA 之組合，0 - 0.5 ppm 2,4-D 與 0 - 1 ppm TDZ 之組合對體胚誘導之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 5 個培植體，光照，培養 50 天，每處理重複 3 次。

d、光照及黑暗培養對體胚誘導之影響

成熟胚由毛柿種子取出，切取胚軸部分約 0.5 - 0.8 cm 為培植體，培養於 3 % (w/v) 蔗糖、0.2% (w/v) PVP、0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之 MS 培養基。試驗光照及黑暗對體胚誘導之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 5 個培植體，培養 50 天，每處理重複 4 次。

e、蔗糖濃度對體胚誘導之影響

成熟胚由毛柿種子取出，切取胚軸部分約 0.5 - 0.8 cm 為培植體，培養於 0.2% (w/v) PVP、0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之 MS 培養基。試驗 10% - 60 % (w/v) 蔗糖對體胚誘導之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 5 個培植體，光照，培養 50 天，每處理重複 4 次。

f、KNO₃ 及 NH₄NO₃ 濃度對體胚誘導之影響

種子於無菌操作環境下將胚取出，切取胚軸部分 0.5-0.8 cm 為培植體，水平放置於培養基上，測試之培養基為修飾過之 MS 培養基，KNO₃ 3 種濃度（分別為 MS 全量時之 0.5、1、1.5 倍）以及 NH₄NO₃ 4 種濃度（分別為 MS 全量之 0、0.5、1、1.5 倍）之互相組合，共有 12 種不同濃度組合處理（詳見表 1），添加 0.1 ppm 2,4-D、0.1 ppm TDZ、3%(w/v) sucrose、0.2%(w/v) PVP，試驗於 125ml 三角錐型瓶進行，每瓶倒入約 50 ml 培養基，接種 4 個培植體，培養 50 天，每處理重複 5 次。

(3) 體胚發育

將發育至球型階段之體胚團(Fig. 2)由原培養基取出,以鑷子分成數小團,每團約 4-10 個球型體胚,接種於體胚發育用之培養基,測試之培養基為修飾過之 MS 培養基,分別為原 MS 氮源濃度 KNO_3 之 0.5 倍及 NH_4NO_3 之 0.5 倍、原 MS 氮源濃度全量及原 MS 氮源濃度 KNO_3 之 1.5 倍及 NH_4NO_3 之 1.5 倍(詳見表 2),培養基添加 0.5%(w/v)活性炭、3%(w/v) sucrose,不添加植物生長調節劑,試驗培養基氮濃度對體胚發育及成熟之影響。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行,每瓶倒入約 50 ml 培養基,接種 6 個培植體,光照,培養 40 天,每處理重複 3 次。

(4) 二次體胚誘導

將發育至魚雷型之體胚,大小約 1 cm 為培植體,繼代培養於 3%(w/v)蔗糖、0.2% PVP、0.1 ppm 2,4-D、0.1 ppm TDZ 之 MS 液態培養基。試驗於 125ml 三角錐型瓶進行,每瓶倒入約 40 ml 培養基,接種 10 個培植體,光照,培養 40 天。

5、統計分析

所有試驗均為完全隨機試驗設計,以錐型瓶為重複單位,結果之數據以 SAS 統計軟體之 PROC GLM 分析,各項誘導率均為百分比,故先以反正弦函數變換角度,再進行 F 檢定。如處理間之效應達顯著水準則使用鄧肯式新多變域法 (Duncan New Multiple Range Test) 檢定。複因子試驗若兩因子間有交感效應存在,以最小平方均值法 (Least squares mean) 求出最佳處理組合。

6、形態觀察

以立體顯微鏡做外表形態觀察,並照相記錄。

、 結 果

() 胚培養

毛柿種子成熟胚以三種植物生長素處理之變方分析表詳如表 4 9, 其結果之彙整詳如表 3。以 2,4-D 處理之結果顯示 0.1、0.5、1 ppm 2,4-D 處理, 成熟胚出現膨大現象, 以 0.5 及 0.1 ppm 2,4-D 之處理, 胚膨大效果較顯著。添加 2,4-D 之試驗胚發芽率皆不佳, 雖 0.1 ppm 2,4-D 處理有胚發芽現象, 但效果不顯著; 空白培養基之胚發芽效果較好, 3 ppm 2,4-D 處理, 胚無膨大效果亦無胚發芽現象。

IAA 處理之試驗顯示, 1 及 3 ppm IAA 處理胚有膨大現象, 但效果不顯著, 其他濃度處理則無胚膨大現象; 在胚發芽方面, 發芽現象出現於 0、0.1、0.5 及 1 ppm IAA 之處理, 以 IAA 濃度為 0、0.1 及 0.5 ppm 效果較好, 1 ppm IAA 處理效果較差, 3 ppm IAA 處理無發芽現象。

毛柿成熟胚於添加 NAA 之培養基培養, 當 NAA 濃度為 0.5 及 1 ppm, 胚具膨大現象, 但效果不顯著, 0.1 及 3 ppm NAA 則無膨大反應; 0 及 0.1 ppm NAA 之處理, 胚可發芽, 發芽之情況以空白培養基較佳, 0.5、1、3 ppm 無發芽現象。

在胚培養時顯示, 培植體會分泌紫黑色分泌物, 影響培植體生長, 培植體膨大之部位為胚軸, 子葉多呈捲曲狀。發芽現象為根部先發芽且主根優勢明顯, 少側根發生, 根發芽後子葉才開展。

IAA 濃度 1 ppm 之處理有癒合組織發生現象, 但機率很低, 在 20 個培植體中只有 1 個誘導出癒合組織, 癒合組織呈白色堅硬狀 (Fig. 3), 至培養終了沒有明顯增殖及分化現象。

表 3 不同濃度 2,4-D、IAA 及 NAA 對毛柿成熟胚培養之影響

2,4-D ppm	培植體數 (個)	培植體發生膨大數(個)	培植體發芽數 (個)	發芽率角度轉換值 (均值)	膨大率角度轉換值(均值)
0	20	0	14	60 ±8.2 ^a	0 ±0 ^c
0.1	20	14	1	6 ±6 ^b	60 ±8.2 ^a
0.5	20	18	0	0 ±0 ^b	78 ±7.3 ^a
1	20	4	0	0 ±0 ^b	21 ±9 ^b
3	20	0	0	0 ±0 ^b	0 ±0 ^c
IAA	培植體數 (個)	培植體發生膨大數(個)	培植體發芽數 (個)	發芽率角度轉換值 (均值)	膨大率角度轉換值(均值)
0	20	0	10	45 ±4.7 ^a	0 ±0
0.1	20	0	9	42 ±5.6 ^a	0 ±0
0.5	20	0	11	51 ±10.1 ^a	0 ±0
1	20	1	3	18 ±7.3 ^b	6 ±6
3	20	1	0	0 ±0 ^b	6 ±6
NAA	培植體數 (個)	培植體發生膨大數(個)	培植體發芽數 (個)	發芽率角度轉換值 (均值)	膨大率角度轉換值(均值)
0	20	0	13	54 ±3.7 ^a	0 ±0
0.1	20	0	4	24 ±6 ^b	0 ±0
0.5	20	2	0	0 ±0 ^c	6 ±6
1	20	1	0	0 ±0 ^c	12 ±7.3
3	20	0	0	0 ±0 ^c	0 ±0

註 1. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

2. 均值 ± 標準誤差

表 4 2,4-D 處理影響毛柿成熟胚發芽結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
2,4-D 濃度	4	3456	33.39	<0.0001
機差	20	103.5		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

表 5 2,4-D 處理影響毛柿成熟胚膨大結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
2,4-D 濃度	4	6336	31.29	<0.0001
機差	20	202.5		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

表 6 IAA 處理影響毛柿成熟胚發芽結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
IAA 濃度	4	2308.5	10.91	<0.0001
機差	20	211.5		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

表 7 IAA 處理影響毛柿成熟胚膨大結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
IAA 濃度	4	54	0.75	0.5696
機差	20	72		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

表 8 NAA 處理影響毛柿成熟胚發芽結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
NAA 濃度	4	2844	57.45	<0.0001
機差	20	49.5		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

表 9 NAA 處理影響毛柿成熟胚膨大結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
NAA 濃度	4	144	1.6	0.2132
機差	20	90		
總計	24			

註 $\alpha=0.05$

() 體胚誘導

1、前培養與 2,4-D 濃度對體胚誘導之影響

以胚培養之 0.1 及 0.5 ppm 2,4-D 處理視為前培養，呈膨大之胚軸為培植體，繼代培養於 0、0.1、0.5、1 ppm 2,4-D 處理之培養基，其變方分析（詳如表 11、表 12）及結果之彙整（詳如表 10）。試驗顯示誘導出之體胚有兩種型式，一為直接體胚發生（Fig. 4），另一為間接體胚發生，試驗中顯示誘導出之胚性癒合組織（Fig. 5、Fig. 6）並無明顯增殖現象，而是朝分化成體胚方向發育（Fig. 7），將間接體胚發生之體胚團分開，可發現體胚之間有懸柄相接，有些體胚可發育至魚雷型胚，體胚發育呈不一致現象（Fig. 8）。由變方分析表顯示無論是直接體胚發生或間接體胚發生，前培養、繼代培養及前培養與繼代培養之交感反應，均未達到 5% 顯著差異，故無法以鄧肯氏新多變域法比較各處理間之差異。若以平均發生率比較各處理之效果，直接體胚發生以前培養為 0.5 ppm 2,4-D，繼代培養為 1 ppm 2,4-D 之處理組合效果較好，直接體胚之平均發生率可達 44%；間接體胚則以前培養 2,4-D 濃度為 0.5 ppm，繼代培養為 0 及 0.5 ppm 之效果較佳，間接體胚之平均發生率可達 32%。

表 10 前培養與繼代培養在不同濃度 2,4-D 誘導體胚發生之結果

前處理濃度 (ppm)	2,4-D							
	0.1				0.5			
繼代濃度 (ppm)	0	0.1	0.5	1	0	0.1	0.5	1
培植體數 (個)	25	25	25	25	25	25	25	25
直接體胚發生 (培植體數)	9	8	7	6	9	10	10	11
平均發生率 (%)	36	32	28	24	36	40	40	44
間接體胚發生 (培植體數)	5	6	6	7	8	6	8	6
平均發生率 (%)	20	24	24	28	32	24	32	24

表 11 直接體胚發生之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
前培養	1	699.2	3.4	0.0745
繼代培養	3	41.9	0.2	0.8929
前培養*繼代培養	3	120.0	0.58	0.63
機差	32	205.6		
總計	39			

註 =0.05

表 12 間接體胚發生之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
前培養	1	93.6	0.3	0.59
繼代培養	3	22.7	0.07	0.9746
前培養*繼代培養	3	77.8	0.25	0.8632
機差	32	315.8		
總計	39			

註 =0.05

2、活性炭與 PVP 對體胚誘導之影響

毛柿成熟胚之胚軸培養於添加 PVP 及活性炭之培養基，培養 50 天之體胚發生結果，添加活性炭之處理，不論活性炭之濃度為何，均無體胚發生之現象；添加 PVP 之處理，變方分析顯示 PVP 濃度間具極顯著差異（表 14）。體胚發生以 PVP 濃度為 0.2% (w/v) 及 0.1% (w/v) 效果較佳，0.4% (w/v) 及 0.6% (w/v) 體胚發生效果較差（表 13）。體胚發生類型全為直接體胚發生（Fig. 9），培養 30 天後陸續出現，50 天培養後可發現體胚多發育至球型胚階段，有些體胚可發育至魚雷型體胚（Fig. 10），體胚發育呈不一致性。有些魚雷型胚有黑色表皮分化現象（Fig. 11）。

表 13 不同濃度 PVP 及活性炭對毛柿體胚發生之影響

PVP (w/v)	培植體數 (個)	體胚發生 (培植體數)	體胚發生率 (%)	體胚發生率角度轉換值 (均值)
0.1	20	7	35	36.7 ±3.2 ^a
0.2	20	9	45	42.1 ±2.9 ^a
0.4	20	2	10	13.3 ±7.7 ^b
0.6	20	0	0	0 ±0 ^b
活性炭 (w/v)	培植體數 (個)	體胚發生 (培植體數)	平均體胚發生率 (%)	體胚發生率角度轉換值 (均值)
0.3	20	0	0	0
0.5	20	0	0	0
0.8	20	0	0	0
1.0	20	0	0	0

. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

. 均值 ± 標準誤差

表 14 PVP 濃度之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
PVP 濃度	3	1545.9	20.04	<0.0001
機差	12	77.1		
總計	15			

註 =0.05

3、不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 及 TDZ 之組合對體胚誘導之影響

(1) 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 之組合

不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 之組合對毛柿成熟胚軸體胚發生結果之變方分析表詳如表 16，由表 15 可知，2,4-D 與 BA 有交感效應存在，以最小平方均值法求各處理間之差異結果詳如表 15，較佳之誘導體胚發生組合為 0.1 ppm 2,4-D 和 0 或 0.5 ppm BA 之組合及 0.5 ppm 2,4-D 和 0 或 0.5 ppm BA 之組合；其體胚發生率最高可達 40%，BA 單獨使用無誘導體胚發生作用，由圖 12 顯示，高濃度 BA 之處理（BA 濃度為 1 及 3 ppm）皆不若低濃度 BA 之處理（BA 濃度為 0 及 0.5 ppm）所得體胚誘導效果佳。體胚發生屬直接體胚，培養 35 天後可發現體胚發生，培養終了體胚多發育至球型胚階段（Fig. 13）。

表 15 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 之組合對毛柿體胚發生之影響

2,4-D (ppm)	BA (ppm)	培植體數 (個)	體胚個數 (培植體個數)	體胚發生率 (%)	體胚發生率角度 轉換值(均值)	Lsm
0	0	15	0	0	0 ±0	C
	0.5	15	0	0	0 ±0	C
	1	15	0	0	0 ±0	C
	3	15	0	0	0 ±0	C
0.1	0	15	5	33.3	35 ±4.2	A
	0.5	15	6	40	38.9 ±7	A
	1	15	2	13.3	17.7 ±8.8	B
	3	15	0	0	0 ±0	C
0.5	0	15	5	33.3	35 ±4.2	A
	0.5	15	5	33.3	35 ±4.2	A
	1	15	1	6.7	8.9 ±8.9	B
	3	15	0	0	0 ±0	C

- . 採最小平方均值法比較各處理組合之差異，優劣順序為：A>B>C，字母相同表示差異未達 5 %顯著
- . 均值 ± 標準誤差
- . Lsm 表最小平方均值法

表 16 2,4-D 與 BA 不同濃度間之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
2,4-D	2	1779.8	24.17	<0.0001
BA	3	1183.6	14.58	<0.0001
2,4-D*BA	6	313.8	4.04	0.0023
機差	24	64.7		
總計	35			

註 =0.05

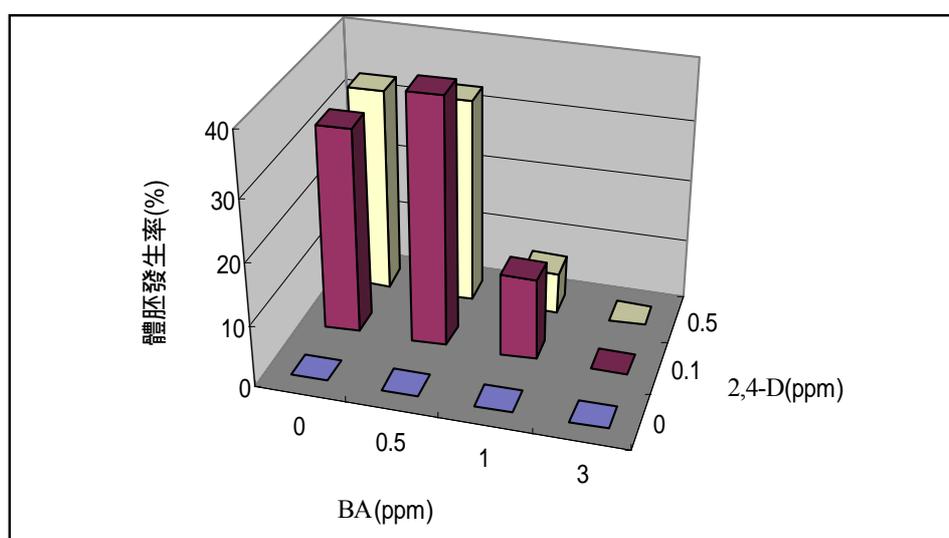


圖 12 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 BA 之組合對毛柿體胚發生之影響

(2) 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 TDZ 之組合

毛柿體胚發生之結果以變方分析法分析，結果顯示 2,4-D 與 TDZ 具有交感效應(表 18)，在所有組合中以 0.1 ppm 2,4-D 與 0.1 ppm TDZ 之組合對體胚誘導效果最好，平均誘導率可達 60%，其次為 0.1 ppm 2,4-D 與 0 ppm TDZ 之組合及 0.5 ppm 2,4-D 與 0 或 0.1 ppm TDZ 之組合，TDZ 單獨存在下並無體胚發生(表 17)。體胚發生之類型為直接體胚發生，於培養 33 天後培植體開始有體胚發生現象，至培養終了，體胚可發育至球型胚及魚雷型胚，體胚發育不一致 (Fig. 14)。TDZ 低濃度 (0 及 0.1 ppm) 較高濃度 (0.5 及 1 ppm) 適合誘導體胚 (圖 15)

表 17 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 TDZ 之組合對毛柿體胚發生之影響

2,4-D (ppm)	TDZ (ppm)	培植體數 (個)	體胚發數 (培植體個數)	體胚發生率 (%)	體胚發生率角度 轉換值(均值)	Lsm
0	0	15	0	0	0 ± 0	C
	0.1	15	0	0	0 ± 0	C
	0.5	15	0	0	0 ± 0	C
	1	15	0	0	0 ± 0	C
0.1	0	15	4	26.7	30.8 ± 4.2	B
	0.1	15	9	60	50.8 ± 0	A
	0.5	15	1	6.7	8.9 ± 8.9	C
	1	15	0	0	0 ± 0	C
0.5	0	15	4	26.7	30.8 ± 4.2	B
	0.1	15	5	33.3	35.0 ± 4.2	B
	0.5	15	0	0	0 ± 0	C
	1	15	0	0	0 ± 0	C

. 採最小平方均值法比較各處理組合之差異，優劣順序為：A>B>C，字母相同表示差異未達 5 %顯著

. 均值 ± 標準誤差

. Lsm 表最小平方均值法

表 18 2,4-D 與 TDZ 不同濃度間之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
2,4-D	2	1638.5	49.69	<0.0001
TDZ	3	1709.0	51.83	<0.0001
2,4-D*TDZ	6	471.1	14.29	<0.0001
機差	24	33.0		
總計	35			

=0.05

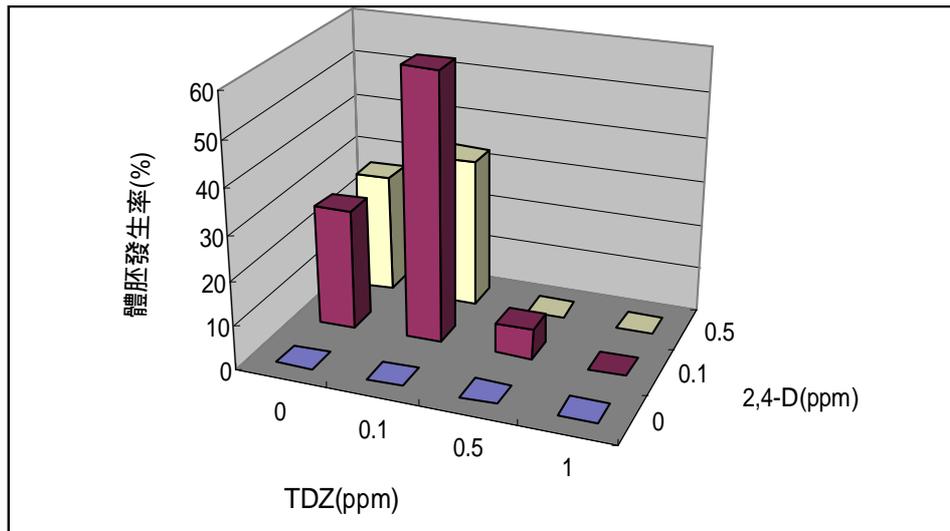


圖 15 不同濃度 2,4-D 與不同濃度 TDZ 之組合對毛柿體胚發生之影響

4、光照及黑暗培養對體胚誘導之影響

以光照及黑暗處理，探討毛柿成熟胚軸體胚發生與培養環境之關係，其結果之變方分析表（表 20）顯示培養環境具顯著差異。光照或黑暗環境都可誘導體胚發生，利用鄧肯氏新多變域法檢定，光照環境較黑暗環境適合誘導體胚發生，其體胚發生率可達 55%（表 19）。體胚發生屬直接體胚，光照環境下培養之體胚發生數目（Fig 16）多較黑暗環境下培養（Fig 17）多，。

表 19 光照與黑暗對毛柿體胚發生之影響

培養環境	培植體數 (個)	體胚發生數 (培植體數)	體胚發生率 (%)	體胚發生率角度轉換 值(均值)
Light	20	11	55	48.2 ± 3.2 ^a
Dark	20	5	25	29.7 ± 5.8 ^b

· 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

· 均值 ± 標準誤差

表 20 培養環境影響毛柿體胚發生結果之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
培養環境	1	680.1	7.84	0.0311
機差	6	86.7		
總計	7			

註 =0.05

5、蔗糖濃度對體胚誘導之影響

毛柿成熟胚軸培養於 4 種不同濃度蔗糖之試驗，結果顯示蔗糖濃度間具顯著差異（表 22），其中以蔗糖濃度為 3%（w/v）及 4%（w/v）之結果較佳，體胚發生率最高可達 55%，其次為 6%（w/v）蔗糖，蔗糖濃度為 1%（w/v）則無體胚發生現象（表 21）。體胚發生為直接體胚，體胚發育亦呈不一致狀，同培植體具多種型態體胚（Fig. 18）。

表 21 不同蔗糖濃度對體胚發生之影響

蔗糖濃度	培植體數 (個)	體胚發生數 (培植體數)	體胚發生率 (%)	體胚發生率角度轉 換值(均值)
1%	20	0	0	0 ± 0 ^b
3%	20	11	55	47.9 ± 2.9 ^a
4%	20	10	50	45 ± 3.3 ^a
6%	20	1	5	6.6 ± 6.6 ^b

· 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

· 均值 ± 標準誤差

表 22 蔗糖濃度之變方分析表

變異來源	自由度	均方	F 值	Pr>F
蔗糖濃度	3	2514.3	39.59	<0.0001
機差	12	63.5		
總計	15			

註 =0.05

6、KNO₃ 及 NH₄NO₃ 濃度對體胚誘導之影響

12 種氮源濃度不同之組合，體胚誘導效果以 M10 最佳，M9、M1 及 M5 最差，試驗結果顯示無 NH₄⁺ 存在之培養基 (M9、M1、M5)，體胚發生率皆很低。單以 NO₃⁻/NH₄⁺ 比例觀之，NO₃⁻/NH₄⁺ 比例在 3.7 較適合體胚誘導，高比例之 NO₃⁻/NH₄⁺ (M10、M11、M6) 明顯較低比例【M7 (MS)、M2、M12、M8、M3、M4】適合誘導體胚發生。M7、M2 及 M12 之 NO₃⁻/NH₄⁺ 比例相同，皆為 1.9，故可以之比較培養基鉀離子強度對體胚發生之影響，提高鉀離子濃度對體胚發生具顯著促進效果 (表 23)。

體胚發生之類型以直接體胚發生為主 (Fig. 19)，雖在 M7 (MS) 有黃色、類似胚性癒合組織發生 (Fig. 20)，但機率很低，20 個培植體只有 1 個發生，且至培養終了癒合組織無明顯分化現象。培養終了發現體胚多發育至球型胚階段，未接觸培養基之體胚即不再發育，且有部分體胚呈褐化現象 (Fig. 21)。

表 23 不同濃度 KNO₃ 與 NH₄NO₃ 組合對毛柿體胚發生之影響

培養基代號	KNO ₃ (mM)	NH ₄ NO ₃ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	K ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	誘發率 (角度轉換值)
M10	28.2	10.3	38.5	10.3	28.2	3.7	72 ±7.3 ^a
M11	28.2	20.6	48.8	20.6	28.2	2.4	57 ±3.0 ^b
M6	18.8	10.3	29.1	10.3	18.8	2.8	54 ±3.7 ^c
M12	28.2	30.9	59.1	30.9	28.2	1.9	48 ±5.6 ^d
M7 (MS)	18.8	20.6	39.4	20.6	18.8	1.9	42 ±5.6 ^e
M2	9.4	10.3	19.7	10.3	9.4	1.9	33 ±3.0 ^f
M8	18.8	30.9	49.7	30.9	18.8	1.6	27 ±7.3 ^g
M3	9.4	20.6	30	20.6	9.4	1.5	24 ±6.0 ^h
M4	9.4	30.9	40.3	30.9	9.4	1.3	15 ±9.5 ⁱ
M9	28.2	0	28.2	0	28.2	--	6 ±6 ^j
M1	9.4	0	9.4	0	9.4	--	0 ±0 ^j
M5	18.8	0	18.8	0	18.8	--	0 ±0 ^j

. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

. 均值 ± 標準誤差

() 體胚發育

三種不同 KNO_3 與 NH_4NO_3 組合之培養基對毛柿體胚分化之影響具明顯差異 (表 24), 降低 MS 氮源濃度至 1/2 倍對體胚發芽具促進效果, 但多屬過早發芽 (Precocious germination) (Fig. 22) 現象, 體胚無發根, 分化出之子葉數目多不正常, 如單一子葉、多子葉、或成輪狀, 少為雙子葉。體胚抽長現象發生機率很低, 在 31 個體胚中只有一個抽長, 且抽長胚軸成彎曲狀 (Fig. 23)。

以原 MS 氮源濃度培養, 體胚發芽、發根及抽長現象皆發生 (Fig. 24), 體胚發芽雖無過早發芽現象, 但子葉之大小明顯較小, 子葉數目則多屬正常, 但少變成綠色; 在發根方面發現主根優勢明顯, 不見側根發生, 故胚軸和胚根很難判斷, 不過胚根末端有明顯分化根尖現象; 體胚抽長亦呈彎曲狀, 抽長胚軸多細長, 無明顯肥大現象。

提高原氮源濃度至 3/2 倍, 體胚無發芽且發根現象減少, 但抽長現象增加, 抽長之胚軸肥大現象明顯, 但胚軸彎曲現象則減少 (Fig. 25)。降低培養基氮源濃度可促進體胚發芽, 提高氮源濃度可增加體胚抽長現象, 就促進發根而言以原氮源濃度較佳 (圖 26)。

三種處理之體胚分化後多具玻璃質化現象, 胚軸呈黑色 (Fig. 27), 在 M7 (MS) 及 M12 培養基中少部分植物體具二次體胚發生現象 (Fig. 28)。

表 24 培養基不同氮濃度對毛柿體胚轉換之影響

培養基代號	KNO_3 (mM)	NH_4NO_3 (mM)	Germination (角度轉換值)	Rooting (角度轉換值)	Elongation (角度轉換值)
M2	9.4	10.3	52.7 ±8.5 ^a	0.0 ±0.0 ^b	3.7 ±3.7 ^b
M7 (MS)	18.8	20.6	27.9 ±2.8 ^b	29.8 ±9.6 ^a	38.7 ±8.5 ^a
M12	28.2	30.9	0.0 ±0.0 ^c	8.9 ±1.4 ^b	57.0 ±2.5 ^a

. 採用鄧肯氏新多變域檢驗法, 字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

. 均值 ± 標準誤差

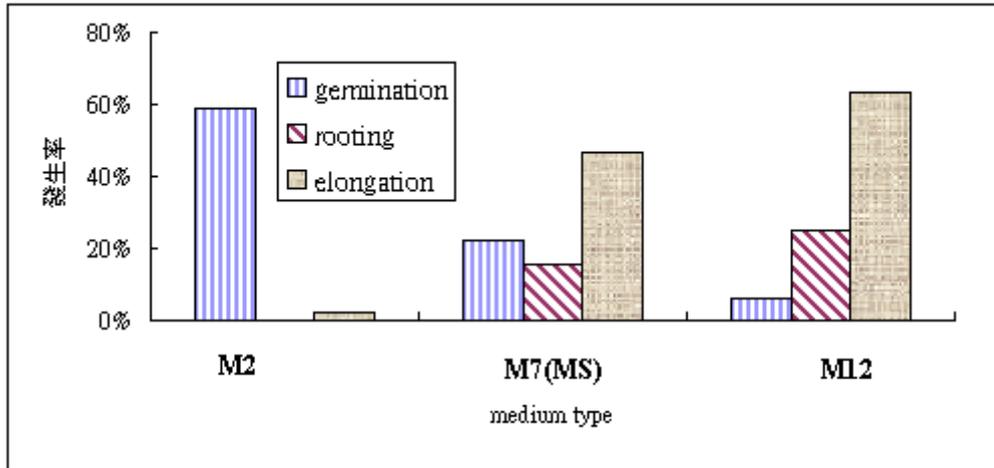


圖 26 三種不同濃度之培養基氮原對毛柿體胚發展之影響

() 二次體胚誘導

魚雷型體胚培養於液態培養基 40 天後發現，原培植體呈膨大脆裂狀，培植體表面具體胚發生現象，體胚顏色呈淡褐色，且體胚無進一步發育現象(Fig 29)

、 討 論

() 胚培養

毛柿成熟胚培養於不添加生植物生長調節劑之 MS 培養基即可發芽，添加 2,4-D 與 NAA 對發芽有抑制作用，可見毛柿成熟胚有足夠之內生 Auxin，外加 Auxin 反不利發芽。IAA 濃度為 0、0.1 及 0.5 ppm 對發芽之效果相同，造成此結果之原因可能為 IAA 受熱及光分解所致，根據 Nissen 及 Sutter (1988) 研究，經 20 分鐘高溫高壓滅菌後，約有 40% IAA 被分解。培養基添加 IAA 儲存在 16 小時光週期環境下，10 天後，約有 97% IAA 被分解 (Nissen and Sutter, 1990)。1 及 3 ppm IAA 處理之胚發芽效果差，表示雖有部分 IAA 受熱及光分解，但存留下之 IAA 濃度仍過高，不利胚發芽。

胚軸膨大方面，三種 Auxin 處理以 2,4-D 效果最佳，膨大之胚軸繼代後可誘導體胚發生，表示 2,4-D 適合毛柿體胚發生之誘導，NAA 及 IAA 與 2,4-D 之差別在於 NAA 及 IAA 為 Non-phenoxy Auxin, 2,4-D 為 Phenoxy Auxin (Beauchensne, 1995)，雖同為 Auxin，但對影響植物之生理作用則不相同。

胚培養試驗顯示毛柿成熟胚會分泌紫黑色物質，導致培植體褐化。毛柿分泌物之成分無相關研究報告，參考其同屬植物，如黃心柿 (Kuo *et al.*, 1997^a)、*Diospyros montana* (Ravishankara *et al.*, 2000) 及同科之象牙樹 (Kuo *et al.*, 1997^b)，抽出物成分中皆含有一種奈昆 (naphthoquinone), Isodiospyrin，為一種細胞毒性物質，具抗癌效果 (Chakrabarty *et al.*, 2002)，深具研究價值。

() 體胚誘導

1、前培養與 2,4-D 濃度對體胚誘導之影響

以兩步驟 (two-steps) 法誘導毛柿體胚發生，可誘導出兩種不同之體胚發生型式，即直接與間接體胚發生。根據 Williams and Maheswaran (1986) 對直接體

胚與間接體胚之區分，直接體胚為由培殖體之 Pre-embryogenic determined cells 形成，間接體胚則由呈非器官化(unorganized)之癒合組織團內之 Embryogenically determined cells 形成，Pre-embryogenic determined cells 在培養前已決定往胚形成發育，因此只需適當的生長調節劑或培養環境即可體胚發生；間接體胚發生則需使癒合組織增殖並重新決定細胞分化之方向，使往形成胚方向發育。毛柿胚軸可誘導出兩種型式體胚，可能在毛柿胚軸內同時具有兩種型式之細胞，一為已決定往胚發生發育之細胞，即 Pre-embryogenic determined cells，另一為雖未決定朝胚形成發育，但有潛力形成胚之細胞，即 Embryogenically determined cells，使用兩步驟培養方式可能在兩種細胞往胚發育之條件範圍內，所以才會同時出現兩種型式之體胚發生。相同培養條件下，培殖體同時可誘導直接體胚發生與胚性癒合組織之情形者如 Choi *et al.*(2002)對 *Eleutherococcus sessiliflorus* 之體胚誘導研究。

Puigderrajols *et al.* (1996) 對 *Quercus suber* L. 體胚發生之研究亦皆同時具有直接與間接體胚發生現象，但 Puigderrajols *et al.* (1996) 認為所誘導出之胚性細胞團並非真正的胚性癒合組織，原因為此種胚性細胞團並無明顯增殖現象以及迅速地發育成體胚。毛柿胚軸所誘導出之胚性細胞團亦呈無明顯增殖以及迅速地發育成體胚之現象，因此是否為間接體胚發生仍有待研究。缺少需經癒合組織增殖之過程對植物微體繁殖過程可避免許多風險，因可避免體細胞變異發生 (Chen and Ahuja, 1993)。

試驗結果顯示前培養與繼代培養各處理間均無顯著性差異，表示前培養之關鍵在於培殖體是否能成膨大狀態，因繼代培養時所選用的培殖體，皆為胚培養時呈膨大之胚軸。0.1 及 0.5 ppm 2,4-D 在胚培養試驗時胚軸膨大數最多，故為最適前培養所需之生長調節劑種類及濃度。在胚培養試驗顯示除 2,4-D 外，IAA 及 NAA 之處理有少數胚亦具膨大現象，雖其量過少以致無法提供後續完整之試驗，但並不表示以 IAA 及 NAA 處理之膨大狀胚不具體胚發生能力。繼代培養之 4 種 2,4-D 濃度間無顯著差異之原因應和培養基添加活性炭所致，試驗中無添加 2,4-D 之處理和有添加 2,4-D 之處理其結果無顯著差異即可得證，活性炭對 2,4-D

吸收之情形將在下述中探討。

2、活性炭與 PVP 對體胚誘導之影響

活性炭與 PVP 對體胚發生之影響呈現截然不同的結果，添加活性炭之所有處理皆無體胚發生，添加 0.1% (w/v)、0.2% (w/v) 及 0.3% (w/v) PVP 之處理可誘導體胚發生，造成此現象之原因在於 PVP 與活性炭之差異。培養基添加 PVP 或活性炭之主要目的為吸附培植體分泌之有毒二次代謝物或培養基經高溫高壓滅菌後可能產生之有毒物質，這些作用皆有助於防止培植體褐化 (Eymar *et al.*, 2000 ; Dhar and Upreti, 1999)。不同的是活性炭會吸附植物生長調節素，如 2,4-D (Ebert and Taylor, 1990)、BA (Ebert *et al.*, 1993)、IAA 及 IBA (Nissen and Sutter, 1990) 等。根據 Ebert and Taylor (1990) 研究， 10^{-6} M (約 0.22 ppm) 之 2,4-D 與 2.5 g/l 活性炭高溫高壓滅菌後，未被吸附之 2,4-D 只剩原來之 0.2%，吸附之程度隨活性炭濃度增加及培養基存放天數提高，至最後未被吸附之 2,4-D 都將趨近於 0。本試驗所使用之 2,4-D 濃度為 0.1 ppm，且測試之活性炭都高於 2.5 g/l，因此可被培植體利用之 2,4-D 可謂為 0，故無體胚發生現象。在上述兩步驟方式之培養，可誘導體胚發生，是因為在 30 天之前培養時，培養基內之 2,4-D 已開啟體胚發生之條件或已促使培植體合成體胚發生所需之物質，故繼代培養之培養基雖有添加活性炭仍有體胚發生現象。

研究中顯示 PVP 濃度為 0.6% (w/v) 無體胚發生，表示 PVP 濃度在 0.6% (w/v) 以上以不適合毛柿體胚發生，推測原因可能為培養基添加 PVP 後使黏度增加，導致培養基滲透壓提高，造成培植體無反應發生。

3、Auxin 與 Cytokinins 之組合對體胚誘導之影響

Auxin 與 Cytokinins 組合誘導胚之結果，不同濃度間 BA 與 TDZ 之變方分析顯示都具顯著差異，但觀察其體胚誘導率可發現，BA 與 TDZ 對體胚誘導之效果截然不同，BA 濃度 0 或 0.5 ppm 組合 0.1 或 0.5 ppm 之 2,4-D，經最小平方均值

法比較之結果皆顯示，0 及 0.5 ppm BA 對體胚誘導之效果相同，顯示培養基是否添加 BA 對體胚誘導並無促進之效用，且 BA 濃度在 1 ppm 以上反有抑制體胚發生之作用，雖 BA 為最常和 Auxin 組合以誘導體胚發生之 Cytokinin，如 *Quercus robur* L. (Chalupa, 1990) *Liriodendron tulipifera* (Merkle *et al.*, 1990) 及 *Gymnema sylvestre* (Ashok Kumar *et al.*, 2002) 等，但 Matsuta 及 Hirabayashi (1989) 對 *Vitis vinifera* L. 之體胚發生研究指出，2,4-D 與 BA 之組合無促進體胚發生作用，但以 TDZ 取代 BA 可提高體胚發生率。

比較 0 或 0.1 ppm TDZ 與 0.1 或 0.5 ppm 2,4-D 之組合，顯示 0.1 ppm TDZ 與 2,4-D 之組合皆較 2,4-D 單獨使用可得較高之體胚發生率，表示 0.1 ppm TDZ 對毛柿體胚發生具促進效果。TDZ 用於植物體胚發生之研究報告較少，可能為 TDZ 在對不定芽之形成較體胚發生更具效果 (Huetteman and Preece, 1993)。以 TDZ 與 Auxin 組合誘導體胚發生之研究，如 *Fraxinus americana* L. (Bates *et al.*, 1992) 及青剛櫟 (王、章, 2001)。

當 2,4-D 濃度為 0 ppm 時，試驗之 BA 與 TDZ 所有濃度皆無體胚發生現象，因此 Auxin 為影響毛柿體胚發生之主要因子，Cytokinins 則可視為體胚發生之輔助因子。

4、光照及黑暗培養對體胚誘導之影響

光對毛柿體胚發生為一重要因子，試驗顯示黑暗環境雖有體胚發生現象，但其效果不若光照環境下培養。以間接體胚而言，較多之體胚誘導例子，如 *Avena sativa* L. (Nuutila *et al.*, 2002)，胚性癒合組織先在黑暗環境中誘導及增殖，再繼代培養於光照環境使體胚發育，但直接體胚發生並不需經逆分化誘導癒合組織，故通常在光環境下培養，如 *Calliandra tweedii* (Kumar *et al.*, 2002) 及 *Santalum album* L. (Rai and McComb, 2002)。毛柿屬直接體胚發生類型。

5、蔗糖濃度對體胚誘導之影響

蔗糖除提供培植體碳源外亦為一種滲透壓調節劑，提高培養基滲透壓可能處使體胚發生率提高 (May and Trigiano, 1991)。在毛柿體胚發生試驗，蔗糖濃度在 3% 及 4% (w/v) 最適合體胚發生，1% (w/v) 蔗糖無體胚發生，可能為培養基滲透壓太低或培養基蔗糖含量過少，無法維持培植體正常生理活動，6% (w/v) 蔗糖雖有體胚發生，但效果不顯著，可能為培養基滲透壓過高，以致不利培植體正常生理代謝。蔗糖濃度對毛柿體胚發生之影響仍須研究。

6、KNO₃ 及 NH₄NO₃ 濃度對體胚誘導之影響

試驗顯示培養基缺少 NH₄⁺ 體胚發生率為 0 或很低，表示 NH₄⁺ 存在與否為毛柿體胚發生之必要因子。Wetherell and Dougall (1975) 對胡蘿蔔體胚誘導試驗中指出，在完全以 KNO₃ 為氮源之培養基，體胚發生率極低，但當培養基加入 0.1mM NH₄Cl，可提高體胚發生率。許多植物體胚發生之研究，如 *Feijoa sellowiana* (Vesco and Guerra, 2001)、*Picea glauca* (Barrett et al., 1997)、*Panax ginseng* (Choi et al., 2003) 及 *Digitalis lanata* (Reinbothe et al., 1990)，NH₄⁺ 存在可促進體胚發生已被証實。

NO₃⁻/NH₄⁺ 比例對體胚發生之影響因植物種類不同而有差異，如 *Hordeum vulgare* L. 培養基 NO₃⁻/NH₄⁺ 之比值為 4 最適合體胚發生 (Nuutila et al., 2000)、*Avena sativa* L. 最適之 NO₃⁻/NH₄⁺ 為 6 及 5/3 (Nuutila et al., 2002) 及 *Medicago sativa* 體胚發生，當 NO₃⁻/NH₄⁺ 為 4 最佳 (Meijer and Brown, 1987)。在本研究中毛柿體胚發生之最佳 NO₃⁻/NH₄⁺ 為 3.7。

研究顯示高 K⁺ 濃度較低 K⁺ 濃度可獲得較高之體胚誘發率，Brown et al. (1976) 研究 K⁺ 對胡蘿蔔體胚發生之影響，指出培養基 K⁺ 濃度需高於 20 mM 方可獲得最大體胚發生率。K⁺ 為培養基之巨量元素之一，含量多寡可影響培養基之滲透壓強度 (Clarkson and Hanson, 1980)，培養基之滲透壓為影響植物體胚發生之重要因子 (Lou and Kako, 1995; May and Trigiano, 1991)。

培養終了時顯示部分體胚有褐化現象，表示體胚誘導之培養時間過長。體胚多發育至球型胚階段即停止，但將體胚移至不含生長調節素及添加活性炭之培養基後，體胚開始即進行發育，造成此現象之可能原因有二：

- (1) 可能為誘導體胚發生培養基內之 2,4-D 影響所致，2,4-D 被為最常被使用來誘導體胚發生之 Auxin (Bonga and Aderkas, 1993)，但對體胚後續之發育則有抑制作用 (Zimmerman, 1993)，故將體胚移至無 auxin 及添加活性炭之培養基，使活性炭吸收殘餘在培殖體之 2,4-D (Ebert and Taylor, 1990)，促進體胚發育。
- (2) 可能為養分供應不足或相互競爭所致，由於同一培殖體上誘導出之體胚個數很多，且有些體胚發生於培殖體表面未接觸培養基部分，體胚與培殖體屬獨立之個體，並無維管束相連，因此未接觸培養基部分之體胚由於養分供應不理想，故呈褐化現象。在體胚發育試驗中，將體胚團分成數小團，使降低競爭作用且增加體胚接觸培養基之機會，則體胚少褐化發生。

() 體胚發育

降低培養基氮濃度對毛柿體胚發芽具促進作用，提高 MS 氮濃度有利體胚之胚軸伸長，維持原 MS 氮濃度則提高根分化效率，可見毛柿體胚發育之每階段所需之氮濃度皆不盡相同。Choi *et al.* (1998) 在研究 *Korean ginseng* 之體胚發育中指出 NO_3^- 與 NH_4^+ 濃度變化會影響體胚莖及根生長，Nuutila *et al.* (2000) 認為此種不同發育階段需不同濃度或形式氮源的現象，可能和型態發生時植物體內部不同胺基酸代謝有關。

子葉融合（呈輪狀）、多子葉、重複頂芽及其他不正常構造為體胚發育失敗之常見現象 (Merkle *et al.*, 1990)，畸型胚不易發育成正常植物，促使體胚發育正常化為植物體胚培養之重要關鍵。在本研究中，毛柿體胚雖有發育現象但其形

態多屬不正常，此現象可能和培養基之滲透壓與 ABA 有關，且 ABA 具有抑制過早發芽之作用 (Roberts *et al.*, 1990)，故培養基添加 ABA 或提高滲透壓，如提高培養基蔗糖濃度或使用 PEG 應可促使毛柿體胚發育正常。

() 二次體胚誘導

二次體胚發生之試驗由於培殖體經懸浮培養後膨大且脆裂成數小塊，無法計算體胚誘導率，無具體結果數據，故在此不予討論。

、 結論

以兩步驟培養方式雖誘導出之結果不全為胚性癒合組織，但較其他方式誘導之結果所得胚性癒合組織之頻率為高，植物是否可以誘導出胚性癒合組織為其是否能大量增殖之關鍵，因可利用懸浮培養或生物反應器培養，故如何誘使毛柿胚性癒合組織發生實有必要做更詳細之研究。

毛柿成熟胚之胚軸培養於添加 0.1 ppm 2,4-D、0.1 ppm TDZ 及 0.2% (w/v) PVP 之 MS 培養基可誘導體胚發生，將 MS 培養基 KNO_3 濃度修改為原 3/2 倍及 NH_4NO_3 濃度修改為原 1/2 倍可提高胚發生效率，體胚發生率和培養基之 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比例相關，後續之研究可以培養基之 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 比為主題，做更詳細之探討。

毛柿體胚發展隨培養基氮源濃度不同呈顯著之不同型態發展，但試驗結果多屬不正常體胚發展現象，因此除培養基養分改變外，應可嘗試使用處使體胚發展正常化之方法，如 ABA、GA 及乾燥處理等。

試驗過程發現毛柿培植體會分泌大量之二次代謝物，雖不知其成分，但比較其同屬或同科植物之抽出物，可能含有抗癌物質，值得深入研究。

、引用文獻

- 王亞男、章友萱(2001) 青剛櫟之組織培養-體胚之誘導。中華林學季刊 34(2): 147-159。
- 呂勝由、林明志(1996) 臺灣稀有及瀕危植物之分級彩色圖鑑() 行政院農業委員會。71-72 頁。
- 呂福原、歐辰雄、呂金誠(2000) 臺灣樹木解說(四) 行政院農業委員會。172 頁。
- 郭寶章(1998) 育林學各論。國立編譯館。220-226 頁。
- 黃怡菁(1986) 琴葉榕之組織培養繁殖及體胚發生。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。21-23 頁。
- 賴明洲(1991) 臺灣地區植物紅皮書-稀有及瀕危植物種類之認定與保護等級之評定。34 頁。
- Arnold, S. V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 69 : 233-249.
- Ashok-Kumar, H. G., H. N. Murthy and K. Y. Paek (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema Sylvestre*. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 71 : 85-88.
- Baker, C. M., R. E. Durham, J. A. Burns, W. A. Parrott and H. Y. Wetzstein (1995) High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. *Plant Cell Rep.* 15 : 38-42.
- Banowitz, G. M., K. Ammar and D. D. Chen (1999) Postanthesis temperatures influence cytokinin accumulation and wheat kernel weight. *Plant, Cell and Enviro.* 22 : 309-316.
- Barrett, J. D., Y. S. Park, and J. M. Bonga (1997) The effectiveness of various

- nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 16 : 411-415.
- Bates, D. J., E. Preece, N. E. Navarrete, J. W. Van Sambeek and G. R. Gaffney(1992) Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L.) . *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 31 : 21-29.
- Beauchesne, G. (1995) The history and basic of *in vitro* culture. In : Vidalie H. (ed) *In Vitro Culture and Its Application in Horticulture*. Science Publishers, Inc. 9-10 pp.
- Bonga, J. M. and P. V. Aderkas (1993) *In Vitro Culture of Tree*, Kluwer Academic Publishers, London. 36, 89-96 pp.
- Brown, S., D. F. Wetherell and D. K. Dougall (1976) The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 37 : 73-79.
- Castillo, B. and M. A. L. Smith (1997) Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16 : 385-388.
- Chakrabarty, S., M. Roy, B. Hazra and R. K. Bhattacharya (2002) Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid, and its synthetic derivatives. *Cancer Lett.* 188 : 85-93.
- Chalupa, V. (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of Oak(*Quercus robur* L.) and Linden(*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep.* 9 : 398-401.
- Chen, Z. and M. R. Ahuja (1993) Regeneration and genetic variation in plant tissue culture. In : Ahuja, M. R. and W. J. Libby (eds) *Clonal forestry , genetic and biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 92-100 pp.
- Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, and K. T. Choi (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of *Korean*

- ginseng* on hormone-free medium. Plant Cell Rep. 17 : 544-551.
- Choi, Y. E., S. K. Ko, K. S. Lee and E. S. Yoon (2002) Production of plantlets of *Eleutherococcus sessiliflorus* via somatic embryogenesis and successful transfer to soil. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 69 : 201-204.
- Choi, Y. E., J. H. Jeong and C. K. Shin (2003) Hormone-independent embryogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentrations of NH_4NO_3 and progress towards bioreactor production. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 72 : 229-235.
- Clarkson, D. T. and J. B. Hanson (1980) The mineral nutrition of high plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 31 : 239-298.
- Dhar, U. and J. Upreti (1999) *In vitro* regeneration of mature leguminous liana (*Bauhinia vahilii* Wight & Arnott) . Plant Cell Rep. 18 : 664-669.
- Dure, L., M. Crouch, J. Harada, T.-H. D. Ho, J. Mundy, R. Quatrano, T. Thomas and Z. R. Sung (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. 12 : 475-486.
- Ebert, A. and H. F. Taylo (1990) Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture medium in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 20 : 165-172.
- Ebert, A., F. Taylor and J. Blake (1993) Change of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophnoxyacetic acid concentration in plant tissue culture medium in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 33 : 157-162.
- Elkonin, L. A. and N. V. Pakhomova (2000) Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 61 : 115-123.
- Etienne, H., B. Sotta, P. Montoro, E. Miginiac and M. P. Carron(1993) Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea*

- Brasiliensis* (Müll. Arg.) during ontogenesis. Plant Sci. 92 : 111-119.
- Eymar, E., J. Alegre, M. Toribio and D. López-Vela (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 63 : 57-65.
- Fiore, S., F. D. Pasquale, F. Carimi and M. Sajevo(2002)Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 68 : 57-63.
- Galau, G. A., D. W. Hughes and L. Dure (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. Plant Mol. Biol. 7 : 155-170.
- Gray, D. J. (2000) Nonzygotic embryogenesis. In : Trigiano, R. N. and D. J. Gray (eds) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises, second edition, CRC Press LLC, Boca Raton. 175-203 pp.
- Halperin, W. and D. F. Wetherell (1965) Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. Nature 205 : 519-520.
- Halperin, W. (1995) *In vitro* embryogenesis : Some historical issues and unresolved problems. In : Thorpe, T. A. (ed) *In Vitro* Embryogenesis in Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1-16 pp.
- Hogberg, K.-A., P. V. Bozhkov, R. Gronroos and S. V. Arnold (2001) Critical factors affecting ex vitro performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. Scand. J. For. Res. 16 : 295-304.
- Huetteman, C. A. and J. E. Preece (1993) Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 33 : 105-119.
- Ibaraki, Y., R. Mastsushima and K. Kurata(2000)Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 61 : 9-14.

- Kim, S. W., S. C. Oh, D. S. In and J. R. Liu (2003) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of Japanese honeysuckle. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 72 : 277-280.
- Kumar, S., V. Agrawal and S. C. Gupta (2002) Somatic embryogenesis in woody legume *Calliandra tweedii*. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 71 : 77-80.
- Kuo, Y.-H., C.-I. Chang, S.-Y. Li, C.-J. Chou, C.-F. Chen, Y.-H. Kuo and K.-H. Lee (1997a) Cytotoxic constituents from the stems of *Diospyros maritima*. *Plant Med.* 63 : 363-365.
- Kuo, Y.-H., S.-Y. Li, C.-C. Shen, L.-M. Yang, H.-C. Huang, W.-B. Liao, C.-I. Chang and Y.-H. Kuo (1997b) Cytotoxic constituents from the fruit of *diospyros ferrea*. *The Chinese Pharam. J.* 49 : 207-216.
- Lou, H. and S. Kako (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci. Hortic.* 64 : 11-20.
- Luo, J.-P., J.-F. Jia, Y.-U. Gu and J. Liu (1999) High Frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Sci.* 143 : 93-99.
- Matsuta, N. and T. Hirabayashi (1989) Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.) . *Plant Cell Rep* 7 : 684-687.
- May, R. A. and R. N. Trigiano (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116 : 366-371.
- McCown, B. H. and J. C. Sellmer (1987) General media and vessels suitable for woody plant culture. In : Bong, J. M. and D. J. Durzan (eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1, General Principles and Biotechnology*, Martinus Nijhoff Publishers. 4-16 pp.
- Meijer, E. G. M. and D. C. W. Brown (1987) Role of exogenous reduced nitrogen and

- sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*.
Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 10 : 11-19.
- Merkle, S. A. and H. E. Sommer (1986) Somatic embryogenesis in tissue cultures of
Liriodendron tulipifera. Can. J. For. Res. 16 : 420-422.
- Merkle, S. A., A. T. Wiecko, R. J. Sotak, and H. E. Sommer (1990) Maturation and
conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.*
26 : 1086-1093.
- Misra, S.(1995)Molecular analysis of zygotic and somatic conifer embryos. In : Jain,
S. M., P. K. Gupta and R. J. Newton (eds) Somatic Embryogenesis in Woody
Plants (vol. 1) , History, Molecular and Biochemical Aspects and Applications.
Kluwer Academic Publishers, London. 131-133 pp.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and assays
with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Nagmani, R., A. M. Diner, S. Garton and A. E. Zipf (1995) Anatomical comparison
of somatic and zygotic embryogeny in conifers. In :Jani, S. M., P. K. Gupta and R.
J. Newton (eds) Somatic Embryogenesis in Woody Plants (vol. 1) ,History,
Molecular and Biochemical Aspects and Applications. Kluwer Academic
publishers, London. 23-24 pp.
- Niedz, R. P. (1994) Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in
the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tis. and Org. Cult.* 39 : 1-5.
- Nissen, S. J. and E. G. Sutter (1988) Stability of IAA and IBA in nutrient medium
after autoclaving and after storage under various environmental conditions.
HortSci. 23 : 758.
- Nissen, S. J. and E. G. Sutter (1990) Stability of IAA and IBA in nutrient medium to
several tissue culture procedures. *HortSci.* 25 : 800-802.
- Nugent, G., S. F. Chandler, P. Whiteman and T. W. Stevenson (2001) Somatic

- embryogenesis in *Ecalyptus globules*. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 67 : 85-88.
- Nuutila, A. M., J. Hamalainen and L. Mannone (2000) Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley(*Hordeum vulgare* L.). Plant Sci. 151 : 85-92.
- Nuutila, A. M., C. Villiger and K.-M. Oksman-Caldentey (2002) Embryogenesis and regeneration of green plantlets from oat (*Avena sativa* L.) leaf-base segments : influence of nitrogen balance, sugar and auxin. Plant Cell Rep. 20 : 1156-1161.
- Puigderrajols, P., B. F. Guijarro, M. Toribio and M. Molinas (1996) Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. Int. J. Plant Sci. 157 (6): 674-684.
- Rai, V. R. and J. McComb (2002) Direct somatic embryogenesis from mature embryos of sandalwood. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 69 : 65-70.
- Ravishankara, M. N., N. Shrivastava, M. G. Jayathirtha, H. Padh and M. Rajani (2000) Sensitive high-performance thin-layer chromatographic method for the estimation of diospyrin, a tumour inhibitory agent from the stem bark of *Diospyros montana* Roxb. J. of Chromatog. B 74 : 257-262.
- Redenbaugh, K., B. D. Passch, J. W. Nichol, M. E. Kossler, P. R. Wise and K. A. Walker (1986) Somatic seeds : Encapsulation of asexual plant embryos. Bio/Technology 4 : 797-801.
- Reinborthe, C., B. Diettrich and M. L. Luckner (1990) Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. J. Plant Physiol. 137 : 224-228.
- Reinert, J. (1959) Ueber die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventive-embryonen an Gewebekulturen aus Karotten. Planta 53 : 318-333.
- Roberts, D. R., B. S. Flinn, D. T. Webb, F. B. Webster and B. C. S. Sutton (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. Physiol.

- Plant. 78 : 355-360.
- Rao, P. S. (1965) *In vitro* induction of embryonal proliferation in *Santalum album* (L.) . Phytomorphology 15 : 175-179.
- Ryutaro, T., H. Murayama, K. Moriguchi and A. Sugiura (1988) Plant Regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortSci. 23 : 1055-1056.
- Ryutaro, T. and A. Sugiura(1992) Adventitious bud formation from callus cultures of Japanese persimmon. HortSci. 27 : 259-261.
- Shahana, S. and S. C. Gupta (2002) Somatic embryogenesis in *Sesbania sesban* var. *bicolor* : A multipurpose fabaceous woody species. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 69 : 289-292.
- Sharp, W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas and S. B. Maraffa (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2 : 268-310.
- Skriver, K. and J. Mundy (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell 2 : 503-512.
- Sreedhar, L. and J. D. Bewley (1998) Nitrogen- and sulfur-containing compounds enhance the synthesis of storage reserves in developing somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.) . Plant Sci. 134 : 31-44.
- Steward, F. C., M. O. Mapes, and K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells. . Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45 : 705-708.
- Tomar, U. K. and S. C. Gupta (1988) Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume-*Albizia richardiana* King. Plant Cell Reps. 7 : 70-73.
- Vesco, L. D. and M. P. Guerra (2001) The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 64 : 19-25.

- Wetherell, D. F. and D. K. Dougall (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37 : 97-103.
- Williams, E. G. and G. Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis : factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57 : 443-462.
- Yusuf, A., R. K. Tyagi and S. K. Malik (2001) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 65 : 255-258.
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis : A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5 : 1411-1423.

附表 1 MS 培養基之組成分

Murashige and Skoog (MS) Medium	
Compounds	
Macronutrients in mg/L	
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrients in mg/L	
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.85
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
Organics in mg/L	
My-inositol	100
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1

照片之說明

Fig. 1	30 年生毛柿母樹之樹姿。
Fig. 2	毛柿體胚發育試驗所使用之培植體-球型體胚團 (約 9 個球型體胚)。
Fig. 3	毛柿成熟胚以 1 ppm IAA 處理誘導出白色堅硬狀之癒合組織 (箭頭所指處)。
Fig. 4	兩步驟培養法, 前培養以 0.5 ppm 2,4-D 處理, 繼代培養以 0.1 ppm 2,4-D 並添加 0.3% (w/v) 活性炭, 誘導出之毛柿直接體胚發生 (箭頭所指處)。
Fig. 5	兩步驟培養法, 前培養以 0.5 ppm 2,4-D 處理, 繼代培養以 0.5 ppm 2,4-D 並添加 0.3% (w/v) 活性炭, 誘導出之毛柿胚性癒合組織 (箭頭所指處)。
Fig. 6	毛柿胚性癒合組織 (箭頭所指處) 之顯微觀察。
Fig. 7	毛柿胚性癒合組織培養於添加活性炭之培養基, 0.5 ppm 2,4-D 並添加 0.3% (w/v) 活性炭, 可發育成球型胚 (箭頭所指處)。
Fig. 8	毛柿體胚間具明顯懸柄相接 (箭頭所指處)。
Fig. 9	培養基添加 0.1 ppm 2,4-D 及 0.2% (w/v) PVP 之處理誘導出毛柿直接體胚發生 (箭頭所指處)。
Fig. 10	培養基添加 0.1 ppm 2,4-D 及 0.2% (w/v) PVP 之處理, 培養 50 天後, 體胚發育成球型 (白色箭頭) 及魚雷型體胚 (綠色箭頭)。
Fig. 11	毛柿魚雷型胚分化黑色表皮之現象 (箭頭所指處)。
Fig. 13	0.1 ppm 2,4-D 及 0.5 ppm BA 之組合誘導出毛柿之直接體胚發生 (箭頭所指處)。
Fig. 14	0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之組合毛柿體胚發育不一致 (綠色箭頭: 球型體胚; 白色箭頭: 心型體胚; 紅色箭頭: 魚雷型體胚)。
Fig. 16	0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之組合於光照環境下培養誘導出毛柿體胚發生之情形。
Fig. 17	0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之組合於黑暗環境下培養誘導出毛柿體胚發生之情形。
Fig. 18	0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之組合並添加 4% (w/v) 蔗糖培養毛柿體胚, 同培植體可發育成具三種型態之體胚 (綠色箭頭: 心型體胚; 白色箭頭: 球型體胚; 紅色箭頭: 魚雷型體胚)。
Fig. 19	修飾過之 MS 培養基 (KNO_3 為原 MS 含量之 1.5 倍; NH_4NO_3 為原 MS 含量之 0.5 倍), 並添加 0.1 ppm 2,4-D 及 0.1 ppm TDZ 之組合, 誘導出毛柿直接體胚發生之情形 (箭頭所指處)。
Fig. 20	黃色、類似胚性癒合組織發生之情形 (箭頭所指處)。
Fig. 21	未接觸培養基之體胚發育成球型胚後即不再發育, 且有褐化現象 (箭頭所指處)。
Fig. 22	以修飾氮源濃度之 MS 培養基 (KNO_3 為原濃度 0.5 倍; NH_4NO_3 為原濃度之 0.5 倍) 培養毛柿體胚, 體胚過早發芽之現象 (箭頭所指處)。

Fig. 23	以修飾氮源濃度之 MS 培養基 (KNO_3 為原濃度 0.5 倍 ; NH_4NO_3 為原濃度之 0.5 倍) 培養毛柿體胚 , 部分發芽體胚具 3 子葉 (箭頭所指處) 之體胚不正常發育現象
Fig. 24	以 MS 培養基培養毛柿體胚 , 體胚發芽且胚軸抽長。
Fig. 25	以修飾氮源濃度之 MS 培養基 (KNO_3 為原濃度 1.5 倍 ; NH_4NO_3 為原濃度之 1.5 倍) 培養毛柿體胚 , 體胚胚軸抽長但不發芽。
Fig. 27	不同濃度之 KNO_3 與 NH_4NO_3 影響毛柿體胚發育之現象。
Fig. 28	毛柿二次體胚發生之現象 (箭頭所指處) 。
Fig. 29	0.2% (w/v) PVP、 0.1 ppm 2,4-D、 0.1 ppm TDZ 之 MS 液態培養基誘導毛柿二次體胚發生 (箭頭所指處) 之情形。

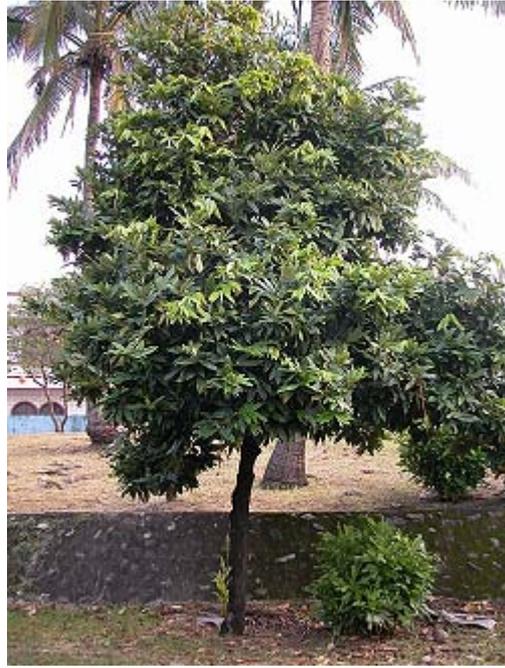


Fig. 1

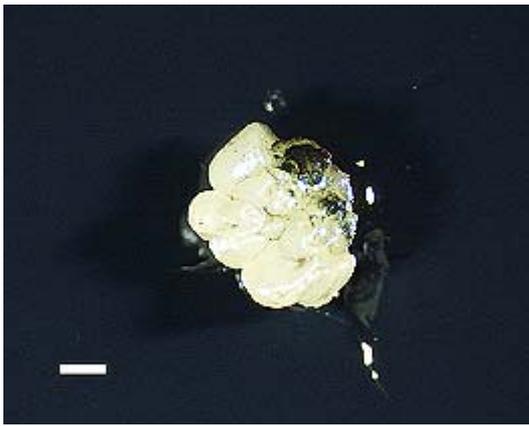


Fig. 2

Bar = 1 mm



Fig. 3

Bar = 1 mm

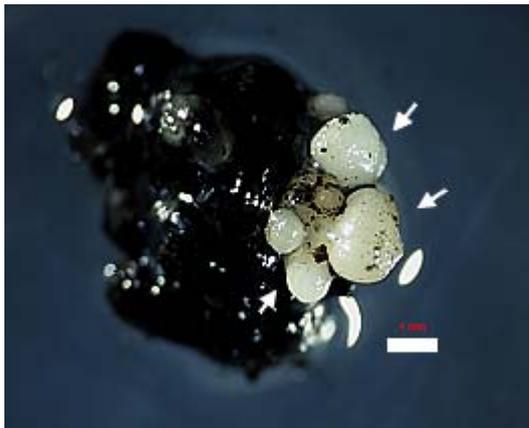


Fig. 4

Bar = 1 mm

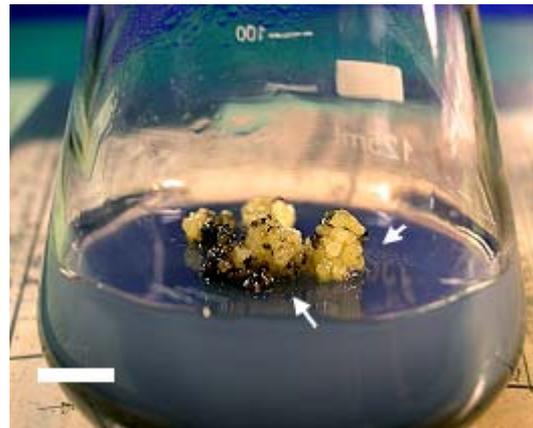


Fig. 5

Bar = 1 cm



Fig. 6 Bar = 1 mm



Fig. 7 Bar = 1 mm

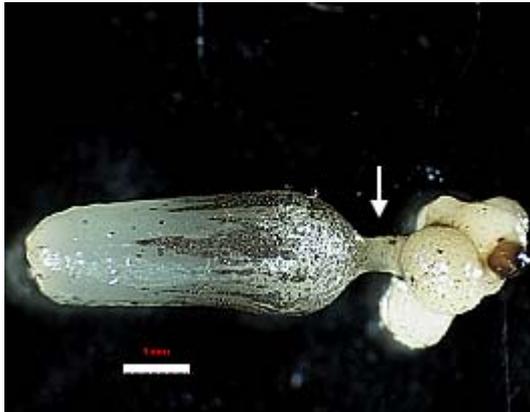


Fig. 8 Bar = 1 mm



Fig. 9 Bar = 1 mm

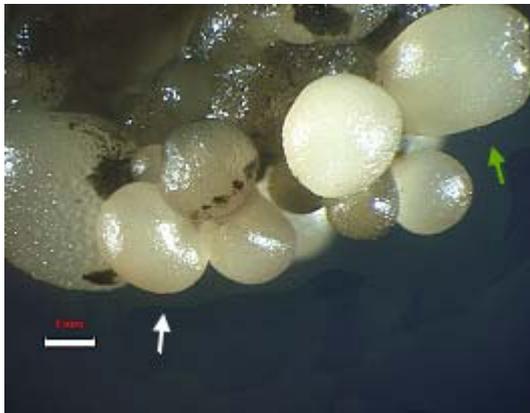


Fig. 10 Bar = 1 mm



Fig. 11 Bar = 1 mm



Fig. 13 Bar = 1 mm



Fig. 14 Bar = 1 mm



Fig. 16 Bar = 1 mm



Fig. 17 Bar = 1 mm

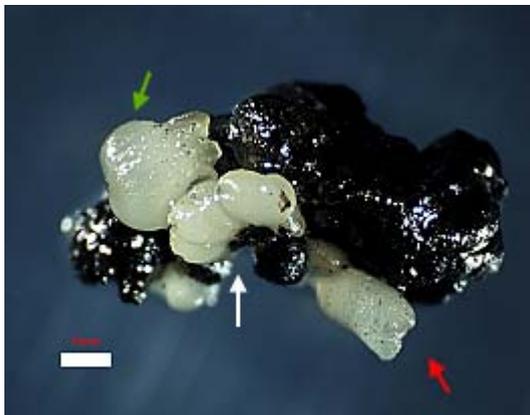


Fig. 18 Bar = 1 mm



Fig. 19 Bar = 1 mm



Fig. 20 Bar = 1 mm



Fig. 21 Bar = 1 mm

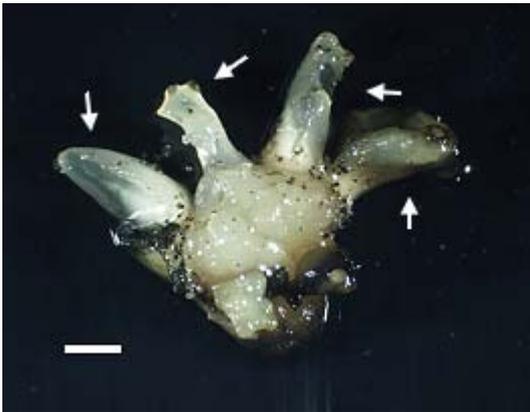


Fig. 22 Bar = 1 mm

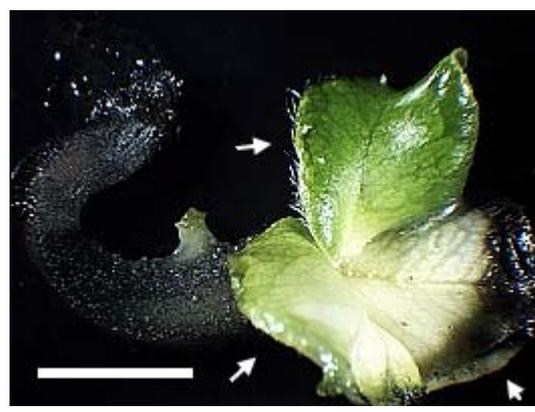


Fig. 23 Bar = 1 cm

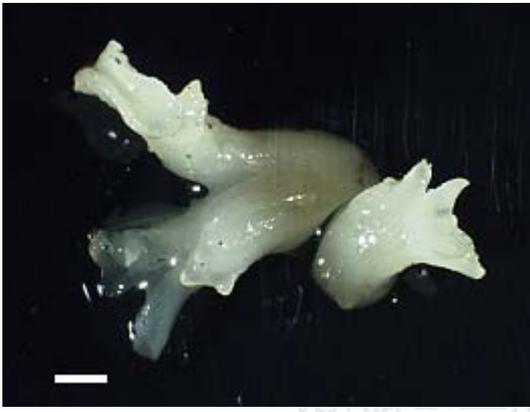


Fig. 24 Bar = 1 mm



Fig. 25 Bar = 1 mm

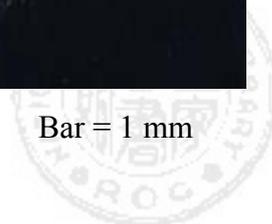




Fig. 27 Bar = 1 cm

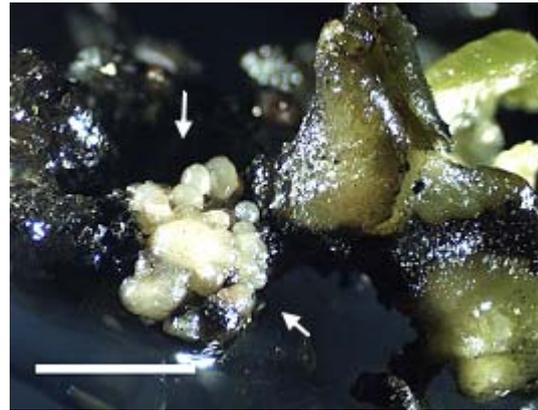


Fig. 28 Bar = 0.5 cm



Fig. 29 Bar = 0.5 cm