

國立臺灣大學森林環境暨資源學研究所

碩士論文

指導教授：王亞男 博士

Advisor : Prof. Yan-Na Wang

日本女貞之微體繁殖

Micropropagation of Ligustrum japonicum Thunb.

研究生：林梓銘

By : Zi-Ming Lin

中華民國九十四年一月

JANUARY , 2005

謝誌

本論文得以順利完成，最先我要感謝我的恩師 王亞男教授悉心的指導與教誨，使我瞭解做學問的態度和方法，僅此對老師您致上我最崇高的感謝。

承蒙嘉義大學副校長 李明仁教授、大葉大學副校長 何偉真教授、嘉義大學 廖宇賡副教授與台灣大學 劉麗飛教授對本論文予以詳閱斧正，並賜予許多寶貴意見，在此由衷感謝。

在研究期間，感謝林志謀學長、吳宗賢學長、周宏祈學長與蔡國書同學於實驗及專業知識上的啟發及幫忙，特此感謝。

非常感謝怡君、王薇、沛霖、君逸、美祺、佳怡、佳穎、小藍、星輝、志威、凱楹、瓊裕、小朱、康康、小孟、淑瑩、坤池、誠偉、水鳥、阿錕、松真、凱薇、小三、小野、裕惠、家珍、基傑、或泓、立偉、侑恩、正馨、俊欽、阿哲、育全、達哥、嘉宏、宣崇、Chris、Aris、Amy、Kiki、Vicky、Vivi 等人，在我研究期間一直給我鼓勵與打氣，感謝你們。

特別感謝 Cheers Cheese music café shop 店長 Jaffy 與全體同仁、Dark Blue art café bar 店長 麗宇 與全體同仁、92°C music café shop 店長 Cheers 與全體同仁、咖啡布傢塘 個性化餐飲店長 Jimmy 與全體同仁、鹿角蕨 個性化餐廳 店長 美妹 與全體同仁，感謝你們在我求學的過程中一直陪伴著我，幫助我面對挫折與困難，感謝你們。

感謝麗宇的支持與鼓勵，謝謝妳一路陪著我面對人生中的低潮與挫折，讓我可以以正面和積極的態度去面對我的生活，感謝妳多年來的陪伴。

最後深深感謝的是一直默默支持我的爸媽以及我最親愛的家人，感謝你們在精神上和生活上的支持，可以讓我全心投入，使我在求學期間無後顧之憂，使我可以順利完成學業。在此，謹以本論文獻給我的爸媽以及我最親愛的家人和一直支持我朋友及同學們。

林梓銘 謹誌於
台灣大學森林環境暨資源研究所
中華民國九十四年一月

目錄

	頁
表目次	II
中文摘要	V
英文摘要	VI
縮寫字	VII
樹種學名對照	VIII
壹、前言	1.
一、樹種簡介	1.
二、研究動機	1.
(一) 植物復育	1.
(二) 生藥的應用	2.
貳、前人研究	2.
一、微體繁殖之定義	2.
二、微體繁殖之階段	3.
參、材料與方法	7.
一、材料	7.
二、方法	8.
(一) 培養基	8.
(二) 培養環境	8.
(三) 試驗項目	8.
(四) 統計分析	14.
(五) 型態觀察	15.
肆、結果與討論	15.
一、種子表面消毒	15.
二、無菌苗的培養	17.
三、癒合組織誘導	17.
四、根之誘導	26.
五、多芽體誘導	30.
六、芽體的抽長	31.
七、懸浮培養	33.
八、日本女貞對重金屬之忍受度---以銅為例	35.
伍、結論	36.
陸、參考文獻	37.
柒、附錄	41.
捌、照片	50.

表目次

	頁
表一、日本女貞種子以不同濃度之次氯酸鈉與雙氧水進行表面消毒之處 理。	5.
表二、日本女貞種子表面消毒不同濃度組合之處理	9.
表三、WPM 培養基添加不同種類與不同濃度之生長調節劑進行癒合組織誘導試驗	10.
表四、WPM 培養基添加不同濃度之 2, 4-D 進行不同培植體癒合組織誘導試驗	10.
表五、WPM 培養基添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗	11.
表六、WPM 培養基添加不同種類與不同濃度之生長調節劑進行多芽體誘導試 驗	12.
表七、WPM 培養基添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗 . .	13.
表八、WPM 培養基添加不同濃度之 2, 4-D 與不同濃度之 Sucrose 進行細胞懸浮培 養試驗	13.
表九、WPM 培養基添加不同濃度之 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 進行日本女貞頂芽對銅之忍受度試 驗	14.
表十、WPM 培養基添加不同濃度之 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 進行日本女貞細胞對銅之忍受度試 驗	14.
表十一、日本女貞種子以不同濃度之次氯酸鈉與雙氧水進行表面消毒處理之結 果。	16.
表十二、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果	19.
表十三、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與	

BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果．．．．．20.

表十四、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果．．．．．21.

表十五、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IAA 與 BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果．．．．．22.

表十六、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果．．．．．23.

表十七、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果．．．．．24.

表十八、WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 在光照環境中進行不同培植體癒合組織誘導試驗結果．．．．．25.

表十九、WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 在光照環境中進行不同培植體癒合組織誘導結果以 SAS 軟體進行 CRD 分析之結果．．．．．25.

表二十、WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 在黑暗環境中進行不同培植體癒合組織誘導試驗結果．．．．．26.

表二十一、WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 在黑暗環境中進行不同培植體癒合組織誘導結果，以 SAS 軟體進行 CRD 分析之結果．．．．．26.

表二十二、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重．．．．．27.

表二十三、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果．．．．．27.

表二十四、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果．．．．．28.

表二十五、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之

NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重 28.

表二十六、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果 29.

表二十七、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果 29.

表二十八、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數 29.

表二十九、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果 30.

表三十、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果 30.

表三十一、以先前所誘導出來之日本女貞多芽體為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗之結果 31.

表三十二、以先前所誘導出來之日本女貞多芽體為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗之結果，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果 32.

表三十三、試驗組間因為 A, B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LS Mean)進行比較之結果 32.

表三十四、以日本女貞頂芽莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之硫酸銅，在光照環境下日本女貞頂芽莖段對銅之忍受度試驗結果 35.

中文摘要

本試驗嘗試探討並建立日本女貞其組織培養之微體繁殖體系。初步結果如下：

本試驗以日本女貞之成熟種子為培植體進行培養。將成熟種子先以流水處理 24 小時，先以 1% 安其消毒液浸泡 20 分鐘做表面清潔，再以 70% 之酒精浸泡 5 分鐘，最後在 5% NaOCl 水溶液（含約 0.1% (v/v) Tween20 展著劑）中超音波震盪 30 分鐘，種子可達 100% 之無污染率。

在器官形成方面：種子與成熟胚植於 WPM、1/2MS、MS 三種基礎培養基中以 WPM 對於無菌苗之誘導效果最好。以胚軸為培植體，以 WPM 為基礎培養基在光照環境下，添加 0.5 ppm 之 2,4-D 培養，可獲得大量淡黃色、鬆軟之癒合組織。以無菌苗之頂芽為培植體，以 WPM 為基礎培養基在光照環境下，可順利發根。無菌苗之頂芽，在含有 0.01 ppm IBA 及 1 ppm BA 之 WPM 培養基中，光照環境下可誘導出多芽體。誘導出之多芽體以 WPM 空白培養基在光度 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 時，抽長效果較好。日本女貞細胞液態培養以 0.1 ppm 2,4-D 配合 10 g/l 蔗糖之 WPM 培養基最為適當。

Abstract

This study describes the development conditions and the propagation technique by in vitro culture for the *Ligustrum japonicum* Thunb. The primary results are as follow:

Results of mature seeds culture of *Ligustrum japonicum* were as follows: mature seeds were first treated with running water for 24 hours, soaked in 1% anticeptol solution (Benzel thyonium chloride U.S.P 10% (w/v), Allcyl arylpolyther alcohol 10% (w/v)) for 20 minutes, then soaked in 70 % ethanol solution for 5 minutes, then soaked in 5% NaOCl (supplemented with 0.1% (v/v) Tween 20) and treated with ultrasonic shaker for 30 minutes and the seeds could get the 100% non- contamination.

The medium of WPM get the best results to establish sterile plants. Light yellow and soft calli were induced after hypocotyls were cultured on WPM medium containing 0.5 ppm 2,4-D under light containing. Rooting was induced after terminal buds were cultured on WPM medium under light containing. Multiple shoots were induced after terminal buds were cultured on WPM medium containing 0.01 ppm IBA and 1 ppm BA under light containing. Multiple buds when transferred to WPM medium lacking plant growth regulators were promoted to elongate their length of internodes under light intensity of $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light environment. The optimal medium for suspension culture was WPM added with 0.1 ppm 2,4-D and 10g/l sucrose of WPM medium.

縮寫字

(Abbreviation)

ABA	abscisic acid
BA	6-benzylaminopurine
BAP	Benzylamino-purine
BN	Bourgin and Nitsch (1967)
2, 4-D	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
DKW	Driver and Kuniyuki walnut (1984)
DK	Driver and Kuniyuki (1984)
GA ₃	gibberellic acid
GSH	Reduced glutathione
H	Heller
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butyric acid
K	Knop (Keller et al., 1975)
MS	Murashige and Skoog (1962)
1/2MS	(Murashige and Skoog , Half conc.)
NAA	α -naphthaleneacetic acid
OM	Olive proliferation mmedium (Rugini, 1984)
OMc	Modified Olive mmedium
PGR	Plant Growth Regulator
2ip	2 isopentenly-adenine
QL	Quoirin and Lepoivre
TDZ	Thidiazuron-N-phenyl-N' -1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea
WPM	woody plant medium (Loyd and McCown , 1980)

樹種學名對照表

學名	中名
<i>Acer pseudoplatanus</i>	大槭樹
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	賓州白蠟樹
<i>Fraxinus american</i>	美國白蠟樹
<i>Fraxinus excelsior</i>	歐洲白蠟樹
<i>Olea europaea</i>	齊墩果

壹、前言

一、樹種簡介

日本女貞 (*Ligustrum japonicum* Thunb.) 為木犀科 (*Oleaceae*)，女貞屬 (*Ligustrum*)，又名女貞木、冬青木、毛女貞、石蠟葉女貞，嫩枝有細柔毛。葉對生，葉革質，光滑，闊卵狀至卵狀長橢圓形，光滑，長 2.5~6 公分，先端銳或鈍。圓錐花序頂生，長 6~15 公分；花小，白色；萼長 2.5~3 公釐；花冠筒長約 3.5 公釐，裂片長約花筒之半 (劉、呂和歐，1994)。果卵形至橢圓形，核果，徑 6~7 公釐，正儲型；佈韓國、日本、琉球、大陸及台灣中、北部，分布於本島 2,200 公尺以下 (呂和楊，1988)。開花期：5~8 月。結果期：8~10 月，種子可供藥用，代替咖啡。生長適性：性喜溫暖、潮濕和陽光充足或半陰環境。其耐鹽性佳、抗強風、耐旱性佳、耐寒性佳，耐陰性尚可 (呂等，1998)。生長速率：快。年平均基徑生長 0.8 公分以上。應用：綠籬、行道樹、庭園美化、藥用，藥用者可全年採葉曬乾加工 (邱和張，1992)。

二、研究動機

(一) 植物復育 (phytoremediation)

近年來，由於產業界的發展、工業污染、家庭廢棄物排放與個人的任意丟棄垃圾都是造成環境惡化的主要原因，而在拼經濟的情況之下工業污染成為扼殺自然環境的兇手，而其中重金屬污染則為兇手之一。工業污染如鎘、鉛、汞、砷、銅、鋅、鎳、鉍等重金屬已經逐漸成為世界環境的重大問題，其中又以銅、鋅、鉛、鎳、鎘為主要污染源 (葉，2004)。

在學者努力的研究之下已知植物可經由吸收累積之過程來移除土壤中之重金屬或者改變其毒性，利用植物復育 (phytoremediation) 來進行受金屬污染的土地的復育工作已被廣泛注意與研究，然而許多可耐高量重金屬之植物其生長皆相當緩慢，因此將解毒基因轉入速生植物，並提高其耐金屬及累積金屬的含量 (capacity) 來進行受重金屬污染土地之復育為一可行之方式。

由於日本女貞其耐鹽性佳、抗強風、耐旱性佳、耐寒性佳、生長快速，並且常綠少落葉，所以應當適合作為植物復育的植物，其極為適合種植在工業區中或者受到重金屬污染之土地，其某些重金屬 (如鎘) 容易被植物所吸附，而日本女貞抗性強且生長快速應當可以成功吸附這些重金屬。或者待將其無菌體系建立後，可以嘗試基因轉殖工程，利用基因轉殖導入金屬硫蛋白酵素或金屬螯合肽合成酵素 (例如 *r*-glutamylcysteine synthetase 及 glutathion synthetase)，經過上述兩個關鍵酵素後可合成 GSH (glutathion)，之後 GSH 經由 PC synthetase 之作用而形成金屬螯合素 (Phytochelatin, PC)，而植物有了金屬螯合素後就可以緊緊的把重金屬抓住，達到植物復育的目的。

(二) 生藥的應用

女貞屬 (*Ligustrum*) 為木犀科 (*Oleaceae*) 植物其中之一屬，全世界約有 40 種。台灣原生有 4 種 (呂和楊, 1988)，其較常被人利用在生藥上的為日本女貞。

日本女貞在生藥的藥理上其葉部醇的萃取物，能提高離體蛙心的伸縮幅度。貓做靜脈注射，也能使心臟收縮增強。樹脂狀物質的醇溶液或葉部醇萃取物能降低血壓。對於離體兔耳血管呈收縮作用。其葉曬乾後在中草藥上的效用有清熱、利尿、解毒、降血壓…等功效 (邱和張, 1992)。

中國大陸也有數種女貞在生藥上及中藥上頗為利用。例如：粗壯女貞 (*Ligustrum robustum*)，又名苦丁茶。其本植物具有降低血壓、治療心臟病、保肝…等功能。女貞木 (*Ligustrum lucidum*) 其種子則為中藥之女貞子。女貞子，含女貞苷、10-羥基女貞苷、橄欖苦苷、10-羥基橄欖苷、洋丁香酚苷、新女貞子苷、8-表金銀花苷、槲皮素、熊果酸、女貞子酸、女貞苷酸…等等 (Zhen *et al.*, 2001)。女貞子在藥理上研究被指出具有補血、保肝、降血糖、預防動脈硬化、增加免疫功能、消炎…等作用 (邱和張, 1992)。

基於日本女貞多方的利用，並且日本女貞並無組織培養相關研究，所以本試驗以日本女貞為試驗對象進行微體繁殖之試驗，試圖建立日本女貞之微體繁殖體系，希望能提供未來研究學者在生物復育及生藥應用上實際的效益。

貳、前人研究

木本植物組織培養，最早以闊葉樹材及針葉樹材之形成層組織培養成功 (Gautheret, 1934)；而第一篇誘導林木器官產生之報告，亦由 Gautheret (1940) 以歐洲榆 (*Ulmus campestris*) 之形成層組織誘導芽體發生。而第一個形成完整植株由顫楊 (*Populus tremuloides*) 誘導而來之癒合組織 (Winton, 1968)，後來，除了器官形成之外，唐松 (*Pinus lumbertiana*) (Gupta & Durzen, 1986) 等由產生體胚而生成植株，不僅縮短時間與人力，更加速大量繁殖之效果 (高, 1995)。

一、微體繁殖的定義

微體繁殖 (micropropagation) 是以組織培養技術，由試管中誘導培植體再生成植株，使其達到大量繁殖之目的。微體繁殖也可經由試管中進行微扦插 (microcutting)、微嫁接 (micrografting) 而達到在試管中繁殖苗木之目的。此途徑即利用無性繁殖的技術，以保存其遺傳的穩定性，且在木本植物，尤其是高大喬木的繁殖培育上，可使培植體返年輕化

(rejuvenalization)，達到試管繁殖優良品系的目的地。經由組織培養使植株再生之途徑有三(王，2003)：

- (一) 自培植體直接誘導芽與根等器官形成(organogenesis)。
- (二) 體胚形成(somatic-embryogenesis)。
- (三) 先誘導癒合組織形成經過增值後在誘導器官形成(organogenesis)。

二、微體繁殖一般可分為五個階段(Robert and Dennis, 2000)，分別討論如下：

(一) 第零階段：培植體的選擇與準備

組織培養的過程中，培植體的選擇可影響到器官之分化能力。雖然植物細胞具有分化全能性(totipotency)，可由不同之部位或分化過程長成一完整植株。如 *Nicotiana rustica* 可以利用根、莖、葉、種子來誘導癒合組織，其生長或生成 nicotine 的能力相似；但有時候只侷限於某些細胞，Murashige(1977)認為必須含有適當細胞之培植體，其結果才能令人滿意。所以選擇培植體時須考慮取材部位、培植體大小、不同之發育階段、培植體年齡及採集季節等因子。通常由植物之分生組織及生殖器官等細胞分裂旺盛之較幼嫩處取材。

(二) 第一階段：無菌體系之建立

此階段須考慮培植體，必須可存活或抽長，有時需對剛切除之組織添加抗氧化劑延遲褐化及劣化(deterioration)，或使用抗生素抑制微生物生長。

影響培植體再生之因素：

- 1. 生理年齡：組成細胞分化程度的差異。
- 2. 取得培植體之季節，特別是適應溫帶氣候之樹種。
- 3. 培養時培植體的大小會直接和存活率、發育速度有關。
- 4. 培養的組織進行之前處理及與母體的生理狀況有關。

(三) 第二階段：分化(增殖)

此階段首先必須先達到器官發生的階段，例如：不定芽、多芽體之發生，才能達到增殖之目的。事實上，培植體的任何器官及組織皆可誘導器官發生。

經由器官發生誘導植株再生之途徑有二：

- (1) 自培植體直接誘導芽與根等器官形成(organogenesis)，其遺傳性較為穩定：如帶節之莖段為常見之培植體，可誘導其側芽產生多芽體(Hakman *et al.*, 1985)；胚、胚軸、子葉亦可直接誘導不定芽之發生。
- (2) 由培植體先形成癒合組織，再誘導不定芽與不定根等器官體系形成。

由此種方式形成之植株有較多之限制，一般以胚、胚軸、子葉為培植體誘導癒合組織，但繼代培養產生器官時，DNA 含量可能有所改變，因此以種原保存及大量繁殖苗木而言，並不是一種理想繁殖方式(Patel *et al.*, 1982)。

(四) 第三階段：發根（前移植）

這個階段是為了使第二階段增殖之芽體可以成功的移植到土壤環境中生長所準備的，這些過程可能包括了：

1. 先前誘導出來之芽體的抽長及發根。
2. 個體之發根或者多芽體之發根。
3. 有時可能要低溫或者高溫的培養環境才能提高其存活率。

許多木本植物在此階段可以添加 Auxin 類之植物生長調節劑（例如：NAA 與 IBA），此類生長調節劑在適當的種類與濃度下有助於植物體之發根。而植物生長調節劑之最適當濃度則視植物之發根率、發根數與發根長度而定。其添加植物生長調節劑之原因則是欲使其根部健壯，生長勢旺盛，以減少移植時對於苗木所造成之傷害，以增加移植成功率。而低溫與或者高光之培養環境是為了能使植物先適應較嚴苛之環境，以達到植物健化之目的；健化後，生長勢較為強健，進而移植到溫室環境培育時，可增加存活率。

(五) 第四階段：移植至自然環境

組織培養苗出瓶後是否能生長成健康苗木，取決於其在溫室中健化之適當與否；剛自無菌環境（例如：試管）移出之組織培養苗生長必備的條件是維持一個高相對溼度之環境，在健化過程中，空氣中之微生物可能引起之感染則不是那麼的重要（Barker *et al.*, 1977）。成功之組織培養苗必須是可以在土壤中成長，而且是必須有較高之存活率，此涉及植株之健化，健化之步驟，植物必須能忍受水分逆境，對病蟲害之抵抗等，所以此階段必須掌握的十分恰當才算是成功之組織培養。而植物之健化主要目的在於使組織培養苗出瓶後能存活並生長成健康苗木，而組織培養苗在自然環境中必須面對的是低的相對濕度與高的光照，為了使苗木可以適應其環境，其在溫室中健化時，可使用間斷性之噴霧，來維持較高之相對濕度，而順應著苗木之生長情形，可以使噴霧之間斷延長，使苗木慢慢適應較低的相對濕度。

由於女貞屬植物之組織培養相關文獻十分稀少，故本章僅以木犀科植物之組織培養研究結果作為參考（表一）。

表一、木犀科植物之組織培養研究結果。

樹種	培植體	培養基	結果	參考文獻
<i>Fraxinus</i>				
<i>F. pennsylvanica</i>	Shoot tip	WPM+0.5, 1mg/l ⁻¹ BA	Callus, growth long	Heiman and Preece (1983)
		WPM+5, 10 mg/l ⁻¹ BA	Axillary shoot	
<i>F. americana</i>	Shoot tip	WPM+0.5, 1 mg/l ⁻¹ BA	Callus, growth long	
		WPM+5, 10 mg/l ⁻¹ BA	Axillary shoot	
<i>F. americana</i>	Cotyledon	DKW+1~10 μ M 2, 4-D	Callus	Preece <i>et al.</i> , (1989)
	Callus	MS+0.5 μ M BA+0.5 μ M NAA	embryogenesis	
<i>F. americana</i>	Somatic embryo	MS+1 μ M NAA+1 μ M BA in liquid	Secondary embryogenesis	Bates <i>et al.</i> (1993)
	Embryo	MS+1 μ M TDZ	Somatic embryo	
	Embryo	DKW+free PGRs	Cotyledon expansion	
<i>F. excelsior</i>	Cotyledonary nodes	WPM+22.2, 44.4 μ M BA	New axillary shoot and small leaves	Hammatt and Ridout (1992)
		DK+22.2, 44.4 μ M BA	Callus and shoots	
	Shoot tip	DK+22.2 μ M BA	axillary shoot proliferation	
	Nodal	DK+22.2 μ M BA	axillary shoot proliferation	
	Shoot	WPM+2.45, 4.9, 9.8 μ M IBA	Rooting	
<i>F. excelsior</i>	Shoot	DKW+22.2 μ M BA	Shoot proliferation	Hammatt, (1994)
	Shoot	MS+4.4 μ M TDZ	Shoot buds produced	
<i>F. excelsior</i>	Apical bud	WPM+3.0~4.0 mg/l ⁻¹ BA + 0.01~0.03 mg/l ⁻¹ IBA	Sprouts	Silveira and Cottignies

	Sprouted apical bud	WPM + free PGRs	Rooting	(1994)
<i>F. excelsior</i>	Embryo hypocotyls	DKW+5.0 mg/1 ⁻¹ 1 BAP	Adventitious Shoot	Tabrett and Hammatt(1992)
	Shoot	1/2 WPM+1.0 mg/1 ⁻¹ IBA	Rooting	
<i>F. angustifolia</i>	Shoot tip	DKW+4.4 μM BA+0.98 μM IBA	Shoot proliferation	Perez-Parron <i>et al.</i> , (1994)
		QL+8.9 μM BA+0.49 μM IBA		
	Nodal	DKW+4.4 μM BA+0.98 μM IBA	Shoot proliferation	
		QL+8.9 μM BA+0.49 μM IBA		
	Shoot	WPM+0.98~4.9 μM IBA	Rooting	
<i>F. angustifolia</i>	Embryo axes	1/2MS+4.4 μM BA+0.44 μM 2,4-D	Adventitious bud	Tonon <i>et al.</i> , (2001)
	Cotyledon	1/2MS+4.4~8.8 μM BA+0.44 μM 2,4-D		
	Adventitious bud	DKW+4.4 μM BA	Elongated shoot	
	Shoot	WPM+ free PGRs	Rooting	
<i>Olea</i>				
<i>O. europaea</i>	Embryo	OM+0.8 mg/1 ⁻¹ BAP+0.01 mg/1 ⁻¹ NAA	Germination	Canas <i>et al.</i> , (1987)
	Nodal	OM+4 mg/1 ⁻¹ Zeatin	Shoot	
		OM+4 mg/1 ⁻¹ 2ip	Shoot	
		OM+2 mg/1 ⁻¹ BAP	Shoot	
	Shoot	OM+1 mg/1 ⁻¹ IBA	Rooting	
<i>O. europaea</i>	Cotyledon	OMc+5 mg/1 ⁻¹ IBA+0.2~0.5 mg/1 ⁻¹ 2ip	Callus	Canas and Bendadis (1988)
		OMc+5 mg/1 ⁻¹ IBA+0.2~0.5 mg/1 ⁻¹ Zeatin	Callus	
	Callus	OMc+1 mg/1 ⁻¹ IBA	Rooting	
	Callus	OMc+4 mg/1 ⁻¹ 2ip	Shooting	
	Shoot	OMc+1 mg/1 ⁻¹ IBA	Adventitious root	
		OMc+1 mg/1 ⁻¹ NAA	Adventitious root	

<i>O. europaea</i>	Cotyledon	MS+12 μ M 2, 4-D+0.56 μ M BA	Callus	Rutter, <i>et al.</i> , (1997)
<i>O. europaea</i>	Shoot	MS+5 μ M NAA+100~200 mg/l ⁻¹ Brilliant Black BN-SIGMA	Rooting	Mencuccini, (2003)
<i>O. europaea</i>	Etiolated embryo	MS+ MS+12 μ M 2, 4-D+0.56 μ M BA+0.025% Activated charcoal	Callus	Williams <i>et al.</i> , (2000)
<i>O. europaea satival</i>	Shoot	1/2MS+1 mg/l ⁻¹ NAA+2% sucrose	Root	Ruggini(1984)
	Shoot	BN+1 mg/l ⁻¹ NAA+2% sucrose	Root	
	Shoot	K macro + H micro+1 mg/l ⁻¹ NAA+2% sucrose	Root	
<i>O. europaea</i> ssp. <i>maderensis</i>	Axillary bud	DKW+4.4 μ M BA+0.4 μ M IBA	Shoot elongation and propagation	Santos <i>et al.</i> , (2003)
	Axillary bud	OM+18.2 μ M Zeatin	Higher branching	
	Shoot	DKW+20.7 μ M IBA	Rooting	

參、材料與方法

一、材料

(一) 92 年 10 月份採自思源埡口之日本女貞成熟種子。

(二) 無菌苗之子葉、胚軸、頂芽莖段、帶節莖段、本葉、根。

(1) 子葉、下胚軸、根：

種子經表面消毒後，接種於不含植物生長調節劑之培養基中使其發芽（照片 1~3），取發芽後 10~15 天小苗之子葉、下胚軸、根（切成 0.5~1cm），進行培養（照片 4~6）。

(2) 頂芽莖段：

無菌苗之培養同（1）所述，待小苗長至 3~5cm 時，將其莖段切下（約 1.5cm），進行培養。

(3) 帶節莖段：

無菌苗之培養同（1）所述，待小苗長至 3~5cm 時，切成 1cm 長帶節莖段，進行培養（照片 7）。

(4) 葉子：

無菌苗之培養同(1)所述，待小苗長至3~5cm時，將其本葉切下，進行培養(照片8)。

二、方法

(一) 培養基

所進行之各項試驗採用以MS (Murashige and Skoog, 1962)、1/2MS (Murashige and Skoog, modified)、WPM (Loyd and McCown, 1980)三種培養基作為基礎培養基。培養基之配製為先於二次蒸餾水中加入各種基礎培養基所需之巨量、微量無機鹽類及有機物質與蔗糖，待完全溶解後加入所需之生長調節劑，然後定積，再以0.1N及1N NaOH或0.1N及1N HCl分別調整pH值至pH 5.7 (MS)、pH 5.7 (1/2MS)、pH 5.2 (WPM)；固態培養基則添加0.8%之Difco bacto agar作為支持物，用微波爐煮溶後分裝、封瓶。再送入高溫高壓滅菌釜中以121℃，1.2kg/cm²，滅菌15分鐘。

(二) 培養環境

培養室溫度為25±1℃恆溫，光度為50±5 μmol m⁻² s⁻¹，光週期為12小時，暗處理溫度為25±1℃恆溫。

(三) 試驗項目

(1) 種子表面消毒

日本女貞成熟種子先以流水處理24小時，再以1%安期消毒液浸泡20分鐘做表面清潔後，再以70%之酒精浸泡5分鐘，再置入不同濃度NaOCl水溶液(含約0.1% (v/v) Tween20展著劑)，並置入超音波震盪器中震盪，並且測試雙氧水溶液對種子表面消毒之差異，其試驗組合如表二、所示。

表二、日本女貞種子以不同濃度之次氯酸鈉與雙氧水進行表面消毒之處理。

消毒組合 代號	次氯酸鈉溶液		雙氧水溶液	
	濃度	消毒時間	濃度 (%)	消毒時間
A1	2% NaOCl	20 分鐘	—	—
A2	2% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘
A3	2% NaOCl	30 分鐘	—	—
A4	2% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘
A5	3% NaOCl	20 分鐘	—	—
A6	3% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘
A7	3% NaOCl	30 分鐘	—	—
A8	3% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘
A9	4% NaOCl	20 分鐘	—	—
A10	4% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘
A11	4% NaOCl	30 分鐘	—	—
A12	4% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘
A13	5% NaOCl	20 分鐘	—	—
A14	5% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘
A15	5% NaOCl	30 分鐘	—	—
A16	5% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘
A17	6% NaOCl	20 分鐘	—	—
A18	6% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘
A19	6% NaOCl	30 分鐘	—	—
A20	6% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘

(2) 培養基前試驗

種子經過表面消毒後，在無菌操作台內以無菌水沖洗三次以上，並植於試驗之培養基中進行培養。本試驗採用 MS、1/2MS、WPM 三種基礎培養基（附錄一），在無添加植物生長調節劑狀況下，進行無菌苗之培養試驗，以觀察無菌苗之生長情形。

(3) 癒合組織誘導

本試驗以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，以 WPM 作為基礎培養基，並且添加不同種類與不同濃度之生長調節劑，以代號 BW（BW1~BW75）之培養基作為前試驗，如表三、所示，觀察不同試驗組對癒合組織之誘導情形。得到最佳試驗組後，再利用無菌苗不同之部位（頂芽、下胚軸、子葉、葉子、根、帶節莖段）再以較佳之培養基進行代號 FW（FW1~FW12）癒合組織之誘導，

如表四、所示，並且將其癒合組織生長量量化，以得知最好的試驗組合。其所有之試驗分別置於光照與黑暗培養環境中進行誘導，觀察其光照與黑暗培養環境對於癒合組織誘導之差異。

表三、WPM 培養基添加不同種類與不同濃度之生長調節劑進行癒合組織誘導試驗。

WPM 培養基		BA (ppm)				
代號		0	0.1	0.5	1	2
NAA (ppm)	0	BW1	BW2	BW3	BW4	BW5
	0.1	BW6	BW7	BW8	BW9	BW10
	0.5	BW11	BW12	BW13	BW14	BW15
	1	BW16	BW17	BW18	BW19	BW20
	2	BW21	BW22	BW23	BW24	BW25
IBA (ppm)	0	BW26	BW27	BW28	BW29	BW30
	0.1	BW31	BW32	BW33	BW34	BW35
	0.5	BW36	BW37	BW38	BW39	BW40
	1	BW41	BW42	BW43	BW44	BW45
	2	BW46	BW47	BW48	BW49	BW50
2, 4-D (ppm)	0	BW51	BW52	BW53	BW54	BW55
	0.1	BW56	BW57	BW58	BW59	BW60
	0.5	BW61	BW62	BW63	BW64	BW65
	1	BW66	BW67	BW68	BW69	BW70
	2	BW71	BW72	BW73	BW74	BW75

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表四、WPM 培養基添加不同濃度之 2, 4-D 進行不同培植體癒合組織誘導試驗。

WPM 培養基		培植體					
代號		頂芽	子葉	下胚軸	帶節莖段	葉子	根
2, 4-D (ppm)	0.1	BW56	BW56	BW56	BW56	BW56	BW56
	0.5	BW61	BW61	BW61	BW61	BW61	BW61

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

（4）根之誘導

以日本女貞無菌苗之頂芽莖段為材料，並且將其頂芽莖段置入不同生長調節劑與不同濃度組合之 WPM 培養基中（照片 9），並且進行不同天數之暗處理（其處理代號 CW1~CW80），如表五、所示。並且觀察培植體發根狀態，且以發根數和根之重量將其量化，以找出最佳之誘根處理。

為了要避免內生賀爾蒙與光合作用對本試驗之影響而產生誤差，所以每一培植體均控制在 5~6 個葉片數，以避免葉片數較多者產生之內生賀爾蒙與光合作用產物較葉片數較少者多而產生誤差。

基於採用不同天數之暗處理對根之誘導進行試驗，是因為基於黃化處理 (etiolation) 而引導出來之觀念。原理是，枝葉經過黃化處理後使葉綠素消失、組織黃化、皮層增厚、薄壁細胞增多，有利於根原體的分化和生根。黃化處理可以減弱植物多酚的合成，在初期提高植物生長素之比例，可使黃化部位增加了內生植物賀爾蒙 IAA，並減少抑制生根作用之物質產生。同時黃化能促進生長素向基部聚集，協調激素之比例，進而促進生根。而過份的光照會造成生長素在頂端分佈，不利於向基部轉運，所以較難發根 (章，1963)。

一般之黃化處理時間須在進行扦插前 21 天進行，始可達到預期之成效。為了試驗日本女貞進行暗處理是否對於根之誘導有相關性，其本試驗設計了從 1 天~30 天不等之暗處理並且與對照組進行對照比較。

表五、WPM 培養基添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗。

處理		暗處理 (day)							
代號		0	1	5	10	15	20	25	30
NAA (ppm)	0	CW1	CW2	CW3	CW4	CW5	CW6	CW7	CW8
	0.1	CW9	CW10	CW11	CW12	CW13	CW14	CW15	CW16
	0.5	CW17	CW18	CW19	CW20	CW21	CW22	CW23	CW24
	1	CW25	CW26	CW27	CW28	CW29	CW30	CW31	CW32
	2	CW33	CW34	CW35	CW36	CW37	CW38	CW39	CW40
IBA (ppm)	0	CW41	CW42	CW43	CW44	CW45	CW46	CW47	CW48
	0.1	CW49	CW50	CW51	CW52	CW53	CW54	CW55	CW56
	0.5	CW57	CW58	CW59	CW60	CW61	CW62	CW63	CW64
	1	CW65	CW66	CW67	CW68	CW69	CW70	CW71	CW72
	2	CW73	CW74	CW75	CW76	CW77	CW78	CW79	CW80

※ (每組 1 個培植體，重複 10 次)

(5) 多芽體誘導

以日本女貞無菌苗帶節莖段為材料，並且以培養基代號 EW (EW1~EW72) 之 WPM 培養基進行多芽體之誘導，其培養基代號如表六、所示。

表六、WPM 培養基添加不同種類與不同濃度之生長調節劑進行多芽體誘導試驗。

WPM 培養基		BA (ppm)					
代號		0	0.01	0.1	0.5	1	2
NAA (ppm)	0	EW1	EW2	EW3	EW4	EW5	EW6
	0.01	EW7	EW8	EW9	EW10	EW11	EW12
	0.1	EW13	EW14	EW15	EW16	EW17	EW18
	0.5	EW19	EW20	EW21	EW22	EW23	EW24
	1	EW25	EW26	EW27	EW28	EW29	EW30
	2	EW31	EW32	EW33	EW34	EW35	EW36
IBA (ppm)	0	EW37	EW38	EW39	EW40	EW41	EW42
	0.01	EW43	EW44	EW45	EW46	EW47	EW48
	0.1	EW49	EW50	EW51	EW52	EW53	EW54
	0.5	EW55	EW56	EW57	EW58	EW59	EW60
	1	EW61	EW62	EW63	EW64	EW65	EW66
	2	EW67	EW68	EW69	EW70	EW71	EW72

※ (每一處理 5 個培植體，重複五次)

(6) 芽體的抽長

以日本女貞無菌苗連節帶莖段所誘導出來之多芽體為材料，並且以培養基代號 GW (GW1~GW3) 之 WPM 培養基分別放置在 $50 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 與 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (處理代號為 GW1' ~GW3') 光度之培養環境下進行芽體抽長之試驗，試驗代號如表七、所示，其將試驗材料置於 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光度之培養環境下進行試驗，是為了要測試培植體是否因為光度較弱而產生徒長，進而達到芽體抽長之效果。試驗後並觀察其生長狀況，並且以芽體抽長之長度將其量化，比較試驗組之間的差異。

表七、WPM 培養基添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗。

處理代號		光度 ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
		50±5	20±5
GA_3 濃度 (ppm)	0	GW1	GW1'
	0.5	GW2	GW2'
	1	GW3	GW3'

※ (每組 3 個培植體，重複 10 次)

(7) 懸浮培養

本試驗以日本女貞無菌苗下胚軸所誘導出來之癒合組織作為材料，並以添加 0.5ppm 2,4-D 之 WPM 培養基進行繼代，並將其置於黑暗培養環境中進行培養，待其 20 天後可得到淡黃色鬆軟之癒合組織。並且以培養基代號 HW (HW1~HW25) 之 WPM 培養基進行細胞懸浮培養，培養代號如表八、所示。待培養三週後，先觀察其有無褐化情形；選取其生長良好並且無褐化者，利用三層不同孔目之篩網進行過篩 (分別為 >100 孔目、60~100 孔目、30~60 孔目)，以便得到粗細均一之細胞，再接種回同種培養基代號之培養基。並且採用 Sedimented Cell Volume (SCV) 法進行懸浮細胞培養之測定，以求得細胞之生長曲線。

表八、WPM 培養基添加不同濃度之 2,4-D 與不同濃度之 Sucrose 進行細胞懸浮培養試驗。

WPM 培養基		Sucrose (g/l)				
代號		0	10	20	30	40
2,4-D (ppm)	0.	HW1	HW2	HW3	HW4	HW5
	0.1	HW6	HW7	HW8	HW9	HW10
	0.5	HW11	HW12	HW13	HW14	HW15
	1	HW16	HW17	HW18	HW19	HW20
	2	HW21	HW22	HW23	HW24	HW25

※ (每組 1 瓶，重複 3 次)

(8) 日本女貞對重金屬之忍受度---以銅為例

【1】日本女貞頂芽莖段對銅之忍受度

一般植物對重金屬銅之忍受度為 0.5~8.0 mg/l，但因為其為在一般天然環境所測出之數值，其本試驗是在無菌之人工環境下，其所受之逆境較小，所以特別將其銅濃度提高進行測試。

本試驗以日本女貞無菌苗之頂芽為材料，並且將其頂芽植於

不同銅濃度之 WPM 培養基中，試驗代號如表九、所示，並且觀察其頂芽對銅之忍受度，並記錄發根情形與其生長高度。

其中 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 之添加方法是以過濾消毒法進行，將 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在無菌操作台上加入經高溫高壓滅菌後但未凝固之培養基中，並充分搖動，使其均勻。

表九、WPM 培養基添加不同濃度之 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 進行日本女貞頂芽對銅之忍受度試驗。

銅濃度 (ppm)	0	5	10	50	100	150	200
WPM 空白培養基	IW1	IW2	IW3	IW4	IW5	IW6	IW7

※ (每組 3 個培植體，重複 5 次)

【2】 日本女貞細胞對銅之忍受度

本試驗以下胚軸所誘導出之癒合組織為材料，先以添加 0.1ppm 2,4-D 之 WPM 培養基進行細胞懸浮培養，培養二週後再利用三層不同孔目之篩網進行過濾，以便得到粗細均一之細胞，再接種回同種培養基代號之培養基。並在培養基中分別添加不同濃度之 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (表十)，再植入癒合組織，並且採用 Sedimented Cell Volume (SCV) 法進行懸浮細胞培養之測定，以求得細胞之生長曲線。並且觀察其對銅之忍受度。

表十、WPM 培養基添加不同濃度之 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 進行日本女貞細胞對銅之忍受度試驗。

銅濃度 (ppm)	0	5	10	15	20
WPM+0.1 ppm 2,4-D	JW1	JW2	JW3	JW4	JW5

※ (每組一瓶，重複 5 次)

(四) 統計分析

- (1) 以完全隨機設計，進行變異數分析。
- (2) 若處理間達到顯著水準 ($\alpha = 0.05$) 時，再使用鄧肯氏新多變域檢定法 (Duncan's new multiple range test) 比較。
- (3) 若複因子試驗交互達到顯著水準時，再以 Least Squares Means (LSMean) 進行比較，以求出較適合之試驗組合。

(五) 形態觀察

- (1) 以立體顯微鏡觀察外表型態並拍照記錄。
- (2) 塗抹片觀察法(張, 1998): 取不同試驗之癒合組織少許, 加入少許液態培養基稀釋後, 利用滴管吸取 1~2 滴置於載玻片上抹開, 於倒立顯微鏡下觀察、照相並記錄。

肆、結果與討論

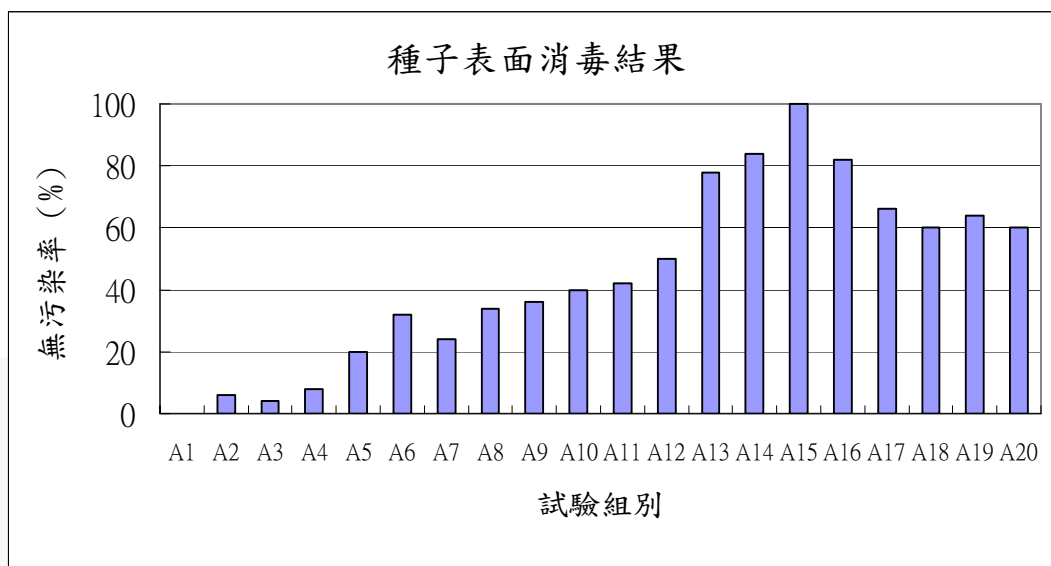
一、種子表面消毒

日本女貞種子表面消毒不同濃度之處理結果(表十一), 其先以流水處理 24 小時, 先以 1% 安期消毒液浸泡 20 分鐘做表面清潔, 再以 70% 之酒精浸泡 5 分鐘, 再置入 5% NaOCl 水溶液(含約 0.1%(v/v) Tween20 展著劑)之 A15 試驗組中, 並置入超音波震盪器中震盪 30 分鐘, 其種子可達零污染率(圖一)。其試驗中所測試之雙氧水添加, 並無法達到正面之消毒成效, 有時反而會因為種子結構導致過份消毒, 而影響了發芽率。

表十一、日本女貞種子以不同濃度之次氯酸鈉與雙氧水進行表面消毒之結果。

消毒組合 代號	次氯酸鈉溶液		雙氧水溶液		培植體 數目 (個)	無污染 數(個)	無污染 率 (%)
	濃度	消毒 時間	濃度 (%)	消毒 時間			
A1	2% NaOCl	20 分鐘	—	—	50	0	0
A2	2% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘	50	3	6
A3	2% NaOCl	30 分鐘	—	—	50	2	4
A4	2% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘	50	4	8
A5	3% NaOCl	20 分鐘	—	—	50	10	20
A6	3% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘	50	16	32
A7	3% NaOCl	30 分鐘	—	—	50	12	24
A8	3% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘	50	17	34
A9	4% NaOCl	20 分鐘	—	—	50	18	36
A10	4% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘	50	20	40
A11	4% NaOCl	30 分鐘	—	—	50	21	42
A12	4% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘	50	25	50
A13	5% NaOCl	20 分鐘	—	—	50	39	78
A14	5% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘	50	42	84
A15	5% NaOCl	30 分鐘	—	—	50	50	100 ^a
A16	5% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘	50	41	82
A17	6% NaOCl	20 分鐘	—	—	50	33	66
A18	6% NaOCl	20 分鐘	6%	5 分鐘	50	30	60
A19	6% NaOCl	30 分鐘	—	—	50	32	64
A20	6% NaOCl	30 分鐘	6%	5 分鐘	50	30	60

※ (每組 1 個培植體，重複 50 次)



圖一、日本女貞種子表面消毒不同試驗之處理結果。

二、培養基前試驗

本試驗採用 MS、1/2MS、WPM 三種基礎培養基（附錄一），在無添加植物生長調節劑狀況下，進行無菌苗之培養試驗。其結果在無菌苗發芽方面，其三種基礎培養基發芽狀況皆良好，但在無菌苗生長方面為 WPM 培養基較好，其無菌苗生長良好，莖部肥大、葉片茂盛（照片 10.）。而 MS、1/2MS 培養基其無菌苗生長狀況則較差，其葉片較小、顏色淡並且葉片容易扭曲，而莖部生長狀況也較細，且小苗較容易掉葉，如照片 11. 所示。且誘導出來之無菌苗頂芽為材料，將其植入 MS 培養基中也有掉葉之情形如照片 12. 所示。

一、癒合組織誘導

本試驗以 WPM 作為基礎培養基，並且添加不同種類與不同濃度之生長調節劑，以代號 BW（BW1~BW75）之培養基作為前試驗，其試驗結果以添加 0.1ppm 2, 4-D 之試驗組 BW56 與添加 0.5ppm 2, 4-D 之試驗組 BW61 為佳（表十六），BW56 試驗組以無菌苗之胚軸為培植體在光照之培養環境下 5 天則可明顯觀察出癒合組織之形成，而 10 天後則可得到淡黃色鬆軟之癒合組織；而 BW61 試驗組以無菌苗之胚軸為培植體在光照之培養環境下 5 天亦可明顯觀察到癒合組織之形成，而 10 天後則可得到淡黃色較為緊密之癒合組織，並且癒合組織不易褐化（照片 13~16）。其他試驗組合雖然有的癒合組織誘導率達到 100%（表十二~十五），但是大多誘導出較硬之癒合組織，不然則是非常容易褐化死亡，（照片 17~18）。而在光照與黑暗環境比較之下，其光照培養環境之誘導率則較高，且在同樣 BW56 與 BW61 培養基下，其在黑暗之培養環境下雖誘導得出癒

合組織（表十七），但是癒合組織則較容易褐化，不然則是誘導成功後停止不長；在其黑暗培養環境下，其原因則為培植體較容易褐化死亡（照片 19~24），而導致誘導失敗。

經過 BW 試驗組試驗後，其以 2,4-D 與 BA 之組合較為適合作為癒合組織之誘導，所以嘗試再以 MS 培養基做測試，觀察 WPM 培養基與 MS 培養基對於癒合組織誘導之差異；其結果在光照培養環境下，以在 MS 培養基中添加 0.5ppm 2,4-D 之試驗組、添加 0.5ppm 2,4-D 及 0.1ppm BA 之試驗組、添加 0.5ppm 2,4-D 及 0.5ppm BA 之試驗組，都有不錯之誘導率，在其三個試驗組中，其中所誘導出來之癒合組織則因為 BA 濃度之升高，而變的較緊密，並且也因為 BA 濃度之升高，其癒合組織也變的更綠（照片 25~26），雖然三個試驗組也可以成功的誘導出癒合組織來，但是往往在 20 天左右就已有褐化之情形產生，所以也不盡完美；而在黑暗之培養環境中，以在 MS 培養基中添加 0.1ppm 2,4-D 之試驗組、添加 0.1ppm 2,4-D 及 0.1ppm BA 之試驗組為較佳，二者在黑暗之培養環境下，雖誘導率不像在光照環境下誘導率來的高，但是其癒合組織之生長狀況卻不錯，往往在 20 天的培養下就可以滿瓶，雖然生長速度很快，但是較容易褐化，並且在繼代後將其放置光照環境下培養，也較容易褐化，需要常常繼代。

經過 WPM 與 MS 試驗組試驗後，選擇以添加 0.1ppm 2,4-D 與添加 0.5ppm 2,4-D 之 WPM 試驗組，再利用無菌苗不同之部位（頂芽、胚軸、子葉、葉子、根、帶節莖段），進行試驗。癒合組織誘導結果（表十八~二十一），在培養基方面，以 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D，在光照的環境下可以得到最高之誘導倍數，其可在短時間內成功的誘導出癒合組織（照片 27~31）；在其培植體方面其下胚軸在誘導 30 天後可得到 36.3~36.5 之最高生長倍數，其次為帶節莖段，其在誘導 30 天後可得到 34.8 之生長倍數。

而在細胞型態方面，其置於光照培養環境之癒合組織，其細胞較小，細胞較圓，較似胚原性癒合組織（照片 32~38）；其置於黑暗培養環境之癒和組織，其細胞較大，細胞較長，屬於長管狀細胞，較似非胚原性癒合組織（照片 39~41）。

表十二、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

NAA (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	0	0	-
	0.1	25	2	8	G+
	0.5	25	1	4	G+
	1	25	2	8	G+
	2	25	4	16	G+
0.1	0	25	11	44	G++
	0.1	25	7	28	G+
	0.5	25	8	32	G+
	1	25	15	60	G+
	2	25	10	40	G+
0.5	0	25	25	100	G+++
	0.1	25	19	76	G+++
	0.5	25	18	72	G+++
	1	25	21	84	G++
	2	25	20	80	G++
1	0	25	6	24	G+
	0.1	25	7	28	G+
	0.5	25	4	16	G+
	1	25	4	16	G+
	2	25	5	20	G+
2	0	25	6	24	G+
	0.1	25	2	8	G+
	0.5	25	5	20	G+
	1	25	8	32	G+
	2	25	2	8	G+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十三、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果。

NAA (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	0	0	-
	0.1	25	1	4	W+
	0.5	25	2	8	W+
	1	25	1	4	B+
	2	25	2	8	B+
0.1	0	25	5	20	W++
	0.1	25	4	16	W++
	0.5	25	4	16	B+
	1	25	8	32	B+
	2	25	9	36	B+
0.5	0	25	18	72	W++
	0.1	25	22	88	W++
	0.5	25	21	84	B++
	1	25	21	84	B+
	2	25	15	60	B+
1	0	25	16	64	B+
	0.1	25	12	48	B+
	0.5	25	21	84	B++
	1	25	11	44	B+
	2	25	16	64	B+
2	0	25	15	60	B+
	0.1	25	10	40	B+
	0.5	25	12	48	B+
	1	25	12	48	B+
	2	25	16	64	B+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十四、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

IBA (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	0	0	-
	0.1	25	1	4	G+
	0.5	25	4	16	G+
	1	25	3	12	G+
	2	25	4	16	G+
0.1	0	25	9	36	Y+
	0.1	25	11	44	Y++
	0.5	25	10	40	Y++
	1	25	20	80	B++
	2	25	14	56	B+
0.5	0	25	12	48	Y++
	0.1	25	14	56	Y++
	0.5	25	12	48	B+
	1	25	11	44	B+
	2	25	16	64	B++
1	0	25	13	52	B+
	0.1	25	14	56	B++
	0.5	25	14	56	B+
	1	25	22	88	B++
	2	25	16	64	B+
2	0	25	13	52	B+
	0.1	25	12	48	B+
	0.5	25	13	52	B+
	1	25	17	68	B+
	2	25	15	60	B+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十五、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IAA 與 BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果。

IBA (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	0	0	-
	0.1	25	1	4	W++
	0.5	25	2	8	W++
	1	25	4	16	B+
	2	25	2	8	B+
0.1	0	25	5	20	Y++
	0.1	25	5	20	Y++
	0.5	25	7	28	B+
	1	25	6	24	B+
	2	25	5	20	B+
0.5	0	25	4	16	Y++
	0.1	25	3	12	Y++
	0.5	25	6	24	B++
	1	25	5	20	B+
	2	25	4	16	B+
1	0	25	10	40	B+
	0.1	25	5	20	B+
	0.5	25	7	28	B+
	1	25	12	48	B+
	2	25	8	32	B+
2	0	25	13	52	B+
	0.1	25	6	24	B+
	0.5	25	7	28	B+
	1	25	5	20	B+
	2	25	6	24	B+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十六、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

2,4-D (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	0	0	-
	0.1	25	1	4	G++
	0.5	25	1	4	G++
	1	25	2	8	B++
	2	25	1	4	B++
0.1	0	25	22	88	G+++
	0.1	25	24	96	G++
	0.5	25	22	88	G++
	1	25	25	100	B+
	2	25	23	92	B+
0.5	0	25	25	100	G+++
	0.1	25	25	100	G++
	0.5	25	24	96	G++
	1	25	25	100	B+
	2	25	25	100	B+
1	0	25	20	80	G++
	0.1	25	22	88	G++
	0.5	25	21	84	G++
	1	25	23	92	B++
	2	25	22	88	B++
2	0	25	24	96	G++
	0.1	25	25	100	G++
	0.5	25	22	88	B+
	1	25	22	88	B+
	2	25	24	96	B+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十七、以日本女貞下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 BA，在黑暗環境中進行癒合組織誘導結果。

2,4-D (ppm)	BA (ppm)	培植體 個數	Callus 形成數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	25	1	4	-
	0.1	25	1	4	Y+
	0.5	25	3	12	B+
	1	25	2	8	B+
	2	25	1	4	B+
0.1	0	25	5	20	W+
	0.1	25	6	24	W++
	0.5	25	7	28	W++
	1	25	6	24	B+
	2	25	5	20	B+
0.5	0	25	5	20	W+
	0.1	25	3	12	W++
	0.5	25	6	24	W+
	1	25	5	20	B+
	2	25	5	20	B+
1	0	25	4	16	B+
	0.1	25	5	20	B+
	0.5	25	6	24	B+
	1	25	4	16	B+
	2	25	5	20	B+
2	0	25	4	16	B+
	0.1	25	6	24	B+
	0.5	25	6	24	B+
	1	25	5	20	B+
	2	25	5	20	B+

※G：綠色癒合組織

※B：褐色癒合組織

※Y：黃色癒合組織

※W：白色癒合組織

※+++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 5 個培植體，重複五次）

表十八、WPM 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 在光照環境中進行不同培植體癒合組織誘導試驗結果。

WPM 培養基	培植體	30 天後 鮮重 (g)	30 天後 生長倍數	30 天後 乾重 (g)
2,4-D— 0.1 ppm	頂芽	0.23	7.38	32.1
	子葉	0.12	4.00	33.3
	胚軸	0.19	6.90	36.3 ^b
	葉子	0.05	1.44	28.7
	帶節莖段	0.13	4.52	34.8 ^c
	根	0.15	4.89	32.6
	頂芽	0.23	7.48	32.5
	子葉	0.12	4.02	33.5
	胚軸	0.19	6.94	36.5 ^a
	葉子	0.05	1.49	29.8
0.5 ppm	帶節莖段	0.13	4.50	34.6
	根	0.15	4.91	32.7

※（每組 5 個培植體，重複 5 次）

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表十九、WPM 培養基添加不同濃度之 2,4-D 在光照環境中進行不同培植體癒合組織誘導結果以 SAS 軟體進行 CRD 分析之結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
2,4-D 濃度 (A)	1	1.3500000	0.06	0.8050 ^{N.S}
不同培植體 (B)	5	58.4066667	2.66	0.0333*
AxB	5	0.4800000	0.02	0.9998 ^{N.S}

※*代表顯著；N.S 代表不顯著

表二十、WPM 培養基中添加不同濃度之 2, 4-D 在黑暗環境中進行不同培植體癒合組織誘導試驗結果。

WPM 培養基	培植體	30 天後 鮮重 (g)	30 天後 生長倍數	30 天後 乾重 (g)
2, 4-D	頂芽	0.23	3.98	17.3
	子葉	0.12	2.14	17.8
	0.1 胚軸	0.19	3.44	18.1
	ppm 葉子	0.05	0.73	14.5
	帶節莖段	0.13	2.38	18.3 ^a
	根	0.15	2.61	17.4
	頂芽	0.23	4.03	17.5
	子葉	0.12	2.15	17.9 ^c
	0.5 胚軸	0.19	3.48	18.3 ^a
	ppm 葉	0.05	0.72	14.3
	帶節莖段	0.13	2.34	18.0 ^b
	根	0.15	2.64	17.6

※（每組 5 個培植體，重複 5 次）

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表二十一、WPM 培養基中添加不同濃度之 2, 4-D 在黑暗環境中進行不同培植體癒合組織誘導結果，以 SAS 軟體進行 CRD 分析之結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
2, 4-D 濃度 (A)	1	0.0166667	0.00	0.9663 ^{N.S}
不同培植體 (B)	5	20.5600000	2.22	0.0671 ^{N.S}
AxB	5	0.1266667	0.01	0.9999 ^{N.S}

※N.S 代表不顯著

二、根之誘導

本試驗以日本女貞無菌苗之頂芽莖段為材料，並且將其頂芽置入不同生長調節劑與不同濃度組合之 WPM 培養基中，並且進行不同天數之暗處理（其處理代號 CW1~CW80），其結果（表二十二~三十）以 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 NAA 與暗處理 20 天之 CW22 試驗組，可誘導出 14 條根為最高，但是在 WPM 培養基中不管添加多少濃度之 NAA，甚至與 IBA 配合時，其培植體與培養基接觸的地方都會長出癒合組織（照片 42），雖然看似並無影響其地上部之發育也無影響到根之誘導，但畢竟這並非所要之結果。

在本試驗結果則以 IBA 作為誘根之較佳選擇，其在根之誘導同時並

不會有明顯之癒合組織產生，而其中添加 IBA 1ppm 與暗處理 15 天之 CW69 試驗組為最佳，可誘導出 11 條根，其次為添加 2ppm 之 IBA 與暗處理 20 天之 CW78 試驗組，可誘導出 10 條根。

並且將其無菌苗本葉與帶節莖段置於含 IBA 之 WPM 培養基中，在光照之培養環境下，一樣可以誘導出不定根來（照片 43~45）。

但是基於節省時間與節省經費之前提之下，我們無法忽視了空白培養基，其本試驗中以空白培養基配合暗處理 10 天亦可誘導出 6 條之根來，其雖然並非最高之根誘導率，但是其也算有非常不錯之成效（照片 46~47）。

表二十二、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重。

誘導後		暗處理 (day)							
根之鮮重 (g)		0	1	5	10	15	20	25	30
NAA (ppm)	0	0.06	0.02	0.07	0.07	0.04	0.06	0.00	0.00
	0.1	0.15	0.58	0.61	0.59	0.06	0.56	0.58	0.43
	0.5	0.28	0.27	0.16	0.37	0.58	0.38	0.42	0.36
	1	0.06	0.74 ^b	0.46	0.43	0.46	0.49	0.43	0.41
	2	0.66 ^c	0.2	0.5	0.83 ^a	0.26	0.21	0.18	0.22
IBA (ppm)	0	0.06	0.02	0.07	0.07	0.04	0.06	0.00	0.00
	0.1	0.11	0.1	0.08	0.02	0.02	0.05	0.43 ^a	0.06
	0.5	0.18	0.01	0.10	0.02	0.06	0.02	0.43 ^a	0.05
	1	0.13	0.07	0.41 ^b	0.17	0.38	0.05	0.06	0.4 ^c
	2	0.13	0.06	0.13	0.17	0.29	0.33	0.35	0.3

※（每組 1 個培植體，重複 10 次）

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表二十三、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
NAA 濃度 (A)	4	1.13703800	4708.23	<0.0001**
天數 (B)	7	0.10427771	431.79	<0.0001**
AxB	28	0.17502771	724.75	<0.0001**

※**代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄二）。

表二十四、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
IBA 濃度 (A)	4	0.22737575	949.38	<0.0001**
天數 (B)	7	0.09411771	392098	<0.0001**
AxB	28	0.07210718	301.07	<0.0001**

※ **代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄三）。

表二十五、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重。

誘導後		暗處理 (day)							
根之乾重 (g)		0	1	5	10	15	20	25	30
NAA (ppm)	0	0.023	0.008	0.027	0.027	0.016	0.023	0.000	0.000
	0.1	0.043	0.167	0.176	0.170	0.017	0.161	0.167	0.124
	0.5	0.080	0.077	0.046	0.106	0.166	0.109	0.120	0.103
	1	0.017	0.211 ^b	0.131	0.123	0.131	0.140	0.123	0.117
	2	0.194 ^c	0.059	0.147	0.244 ^a	0.076	0.062	0.053	0.065
IBA (ppm)	0	0.023	0.008	0.027	0.027	0.016	0.023	0.000	0.000
	0.1	0.037	0.033	0.027	0.007	0.007	0.017	0.143 ^a	0.020
	0.5	0.058	0.003	0.032	0.006	0.019	0.006	0.139 ^b	0.016
	1	0.044	0.023	0.138 ^c	0.057	0.128	0.017	0.020	0.134
	2	0.042	0.020	0.042	0.056	0.095	0.108	0.114	0.098

※（每組 1 個培植體，重複 10 次）

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表二十六、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
NAA 濃度 (A)	4	0.08296118	350.64	<000.01**
天數 (B)	7	0.00929377	39.28	<0.0001**
AxB	28	0.01443731	61.02	<0.0001**

※ **代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交互作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄四）。

表二十七、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之根乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
IBA 濃度 (A)	4	0.02234926	101.64	<0.0001**
天數 (B)	7	0.00978467	44.50	<0.0001**
AxB	28	0.00779661	35.46	<0.0001**

※**代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交互作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄五）。

表二十八、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 IBA 配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數。

誘導後		暗處理 (day)							
發根數 (條)		0	1	5	10	15	20	25	30
NAA (ppm)	0	2	2	3	6	1.2	0	0	0
	0.1	3 ⁺⁺	6 ⁺⁺	6 ⁺⁺	4 ⁺⁺	4 ⁺⁺⁺	8 ⁺⁺	6 ⁺	4 ⁺
	0.5	6 ⁺⁺	3 ⁺⁺	5 ⁺⁺	5 ⁺⁺	7 ⁺⁺	14 ^{a++}	8 ⁺⁺	6 ⁺
	1	4 ⁺⁺	5 ⁺⁺⁺	4 ⁺⁺	4 ⁺⁺	5 ⁺⁺	8 ⁺⁺	7 ⁺	5 ⁺
	2	5 ⁺⁺	6 ⁺⁺	12 ^{b++}	7 ⁺⁺⁺	7 ⁺⁺	10 ^{c++}	10 ^{c++}	8 ⁺
IBA (ppm)	0	2	2	3	6	1.2	0	0	0
	0.1	3	3	3	3	2	3	2	1.2
	0.5	4	2	2	2	3	2	2	1.2
	1	3	2	3	5	11 ^a	7	1.2	1.2
	2	1.2	2	2	2	8 ^c	10 ^b	8 ^c	4

※（每組 1 個培植體，重複 10 次）

※若有上標者代表其培植體不止發根且也長癒合組織

※ $X^{+++} \sim X^{+}$ ，X：代表癒合組織極多量至極少量

※ $a > b > c$ ，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表二十九、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 NAA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
NAA 濃度 (A)	4	208.9375000	88.82	<0.0001**
天數 (B)	7	44.1457143	18.77	<0.0001**
AxB	28	19.7260714	8.39	<0.0001**

※**代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交互作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LS Mean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄六）。

表三十、以日本女貞無菌苗頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 IBA 與配合不同天數暗處理進行誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
IBA 濃度 (A)	4	56.1200000	35.13	<0.0001**
天數 (B)	7	33.9657143	21.26	<0.0001**
AxB	28	26.3800000	16.51	<0.0001**

※**代表極顯著

因為 A, B 兩因子具有交互作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LS Mean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（附錄七）。

三、多芽體誘導

本試驗以日本女貞無菌苗連節帶莖段為材料（照片 48），並且以培

養基代號 EW (EW1~EW72) 之 WPM 培養基進行多芽體之誘導，其誘導後以 WPM 培養基中添加 0.01ppm IBA 及 1ppm BA 的 EW47 試驗組為佳，其本試驗組可在一個月內誘發出 30 個左右之芽體（照片 49~50）。雖然 EW47 試驗組可在一個月內誘導出 30 個以上的芽體出來，但是約培養 30 天後其培植體與培養基接觸之處也會長出綠色且質地非常硬之癒合組織出來，且若不加以處理其有許多芽體則會遭癒合組織包覆而死亡，而其解決之方法則是將其癒合組織切除後，將其整個移到空白培養基中或者在培養基中添加 0.1% 之活性碳則可改善（照片 51~52）。而其添加 0.1ppm NAA 與 1ppm BA 組合之試驗組 EW17，雖然一開始也可以促使側芽發育（照片 53），並且使其每一腋芽生長抽長，但是並無法連續性的使其誘發出許多之腋芽，所以並無法達成誘導多芽體之目的。

四、芽體的抽長

本試驗以日本女貞無菌苗連節帶莖段所誘導出來之多芽體為材料，並且以培養基代號 GW(GW1~GW3) 之 WPM 培養基放置在 $50 \pm 5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之光度與 $20 \pm 5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (處理代號為 GW1' ~GW3') 進行芽體抽長試驗之結果(如表三十一~三十二、所示)，其 20 天後以 GA_3 濃度在 0.5 ppm 並配合在光度 $20 \pm 5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時，其芽體抽長之長度最長，可達 4.7cm（圖二）；其次為以 WPM 空白培養基在光度 $20 \pm 5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 時，其芽體之抽長長度可達 4.5cm（照片 54）。但是置於低光度培養環境中雖然可以達到非常好之抽長效果，但是若擺置過久植物體也比較瘦弱（照片 55），所以建議在達到抽長效果後，則將其移至正常之光照下。並且若此試驗與其發根共同進行，則更加方便與節省資源。

表三十一、以先前所誘導出來之日本女貞多芽體為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗之結果。

處理代號		光度 ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
		50±5	20±5
GA_3 濃度 (ppm)	0	1.7cm	4.5cm ^b
	0.5	3.5cm	4.7cm ^a
	1	3.2cm	4.2cm ^c

※（每組 3 個培植體，重複 10 次）

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

表三十二、以先前所誘導出來之日本女貞多芽體為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度進行芽體抽長試驗之結果，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果。

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	5.06666667	101.33	<0.0001**
B	1	20.83333333	833.33	<0.0001**
AxB	2	4.86666667	97.33	<0.0001**

※**代表極顯著

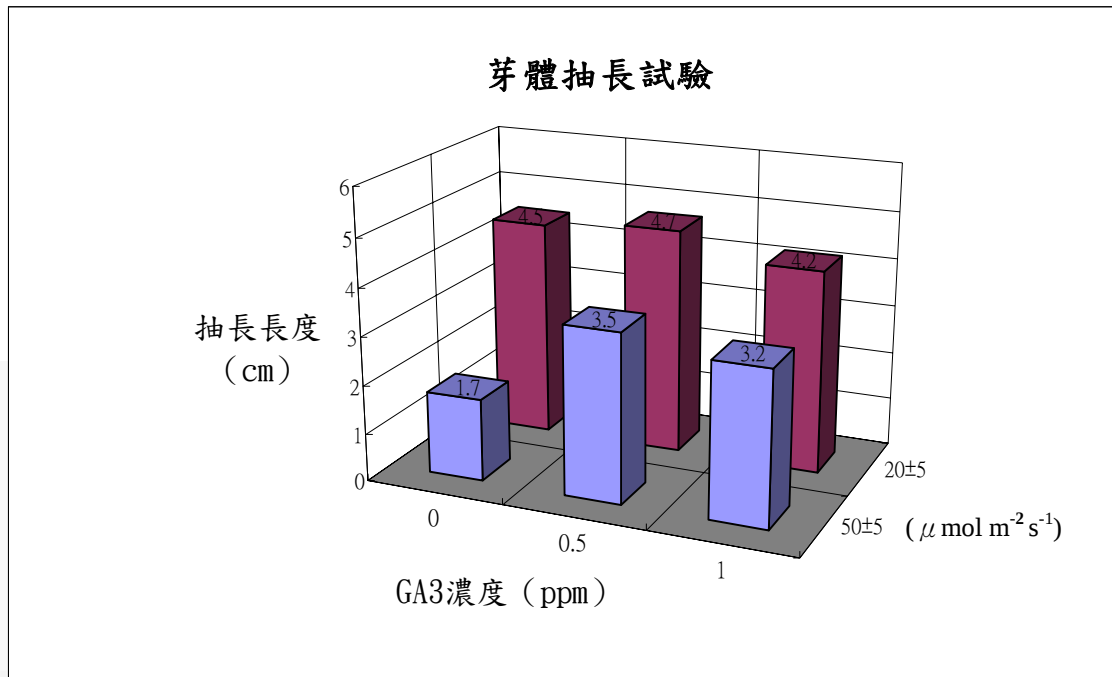
因為 A, B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較，以求出較適合之試驗組合（表三十二）。

表三十三、試驗組間因為 A, B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	1.700000	<0.0001	1
1	2	4.500000	<0.0001	2 ^b
2	1	3.500000	<0.0001	3
2	2	4.700000	<0.0001	4 ^a
3	1	3.200000	<0.0001	5
3	2	4.200000	<<0.0001	6 ^a

※a>b>c，值越大代表是越適合之處理方式，a, b, c 分別為前三適合之試驗組合。

※未標示者代表在 a, b, c 三者之後。

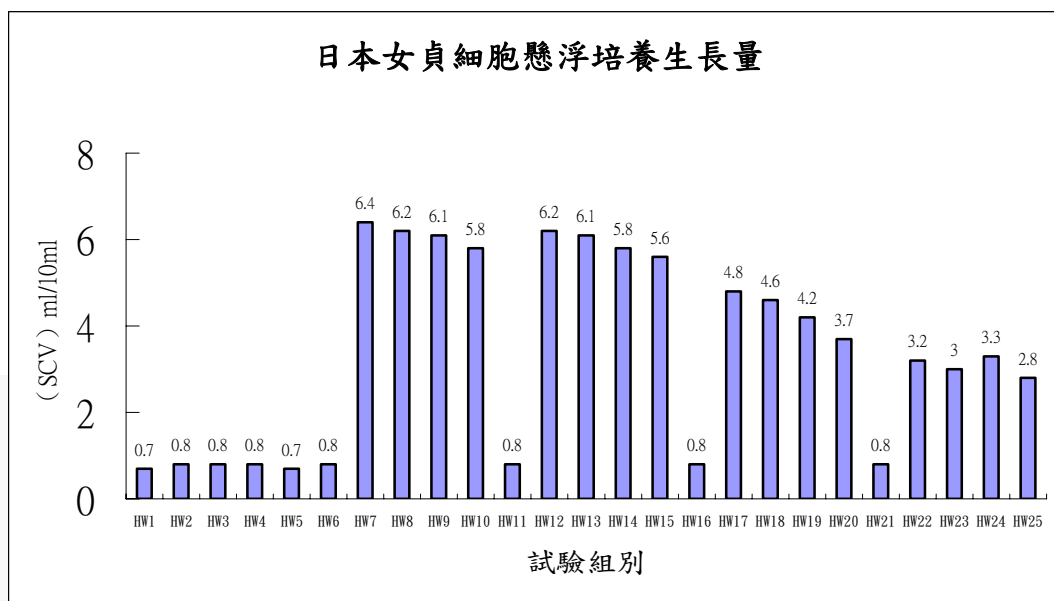


圖二、以先前所誘導出來之日本女貞多芽體為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之 GA_3 與配合不同光度環境下進行芽體抽長試驗之結果。

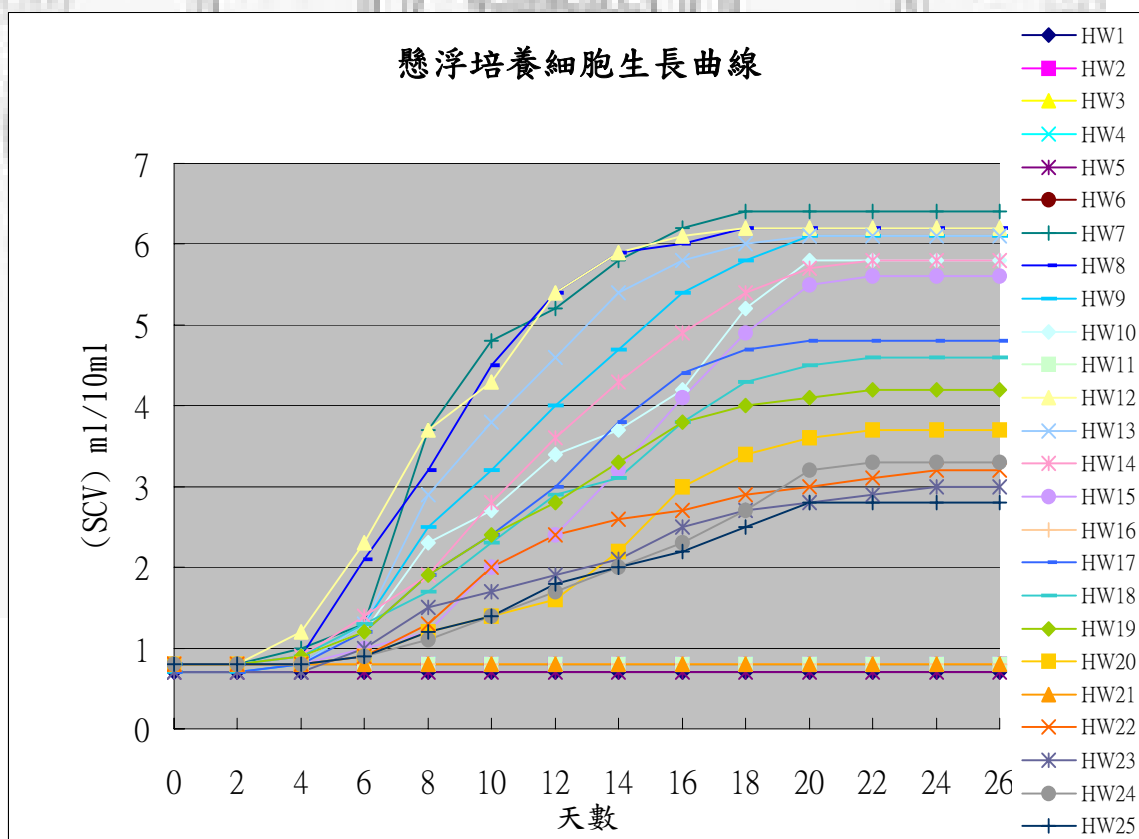
五、懸浮培養

本試驗以培養基代號 HW (HW1~HW25) 之 WPM 培養基進行細胞懸浮培養結果 (圖四)，以添加 0.1ppm 2, 4-D 配合 10g/l 蔗糖之 HW7 試驗組的成果最佳，其最後生長量可達 6.4 (SCV) ml/10ml，其 HW7 試驗組在懸浮培養 18 天後，其生長量可達原本接種量之八倍；其次為添加 0.5ppm 2, 4-D 配合 10g/l 蔗糖之 HW12 試驗組，其最後生長量可達 6.2 (SCV) ml/10ml (圖三)。

而在細胞型態方面，其蔗糖濃度並沒有改變其細胞之型態 (照片 56~60)，其所觀察到之細胞其細胞較小，細胞較圓，很少長管狀細胞。



圖三、以 WPM 基礎培養基中添加不同濃度之 2,4-D 並配合不同含量之蔗糖，進行懸浮培養試驗之結果-日本女貞細胞懸浮培養 26 天後懸浮細胞之生長量。



圖四、以 WPM 基礎培養基中添加不同濃度之 2,4-D 並配合不同含量之蔗糖，進行懸浮培養試驗之結果-日本女貞懸浮細胞生長曲線。

六、日本女貞對重金屬之忍受度---以銅為例

(一) 日本女貞頂芽莖段對銅之忍受度

以日本女貞無菌苗之頂芽莖段為培植體，對銅之忍受度試驗結果（表三十四），20 天後，頂芽莖段對銅之忍受度高達 200ppm 時，雖然培植體可以忍受不死亡，但是卻無法發根（照片 61），只有某些個體仍然會從節的地方長出根來（照片 62）；但在 10ppm 時其培植體生長依舊良好，依舊可以發根和生長（照片 63~64）。

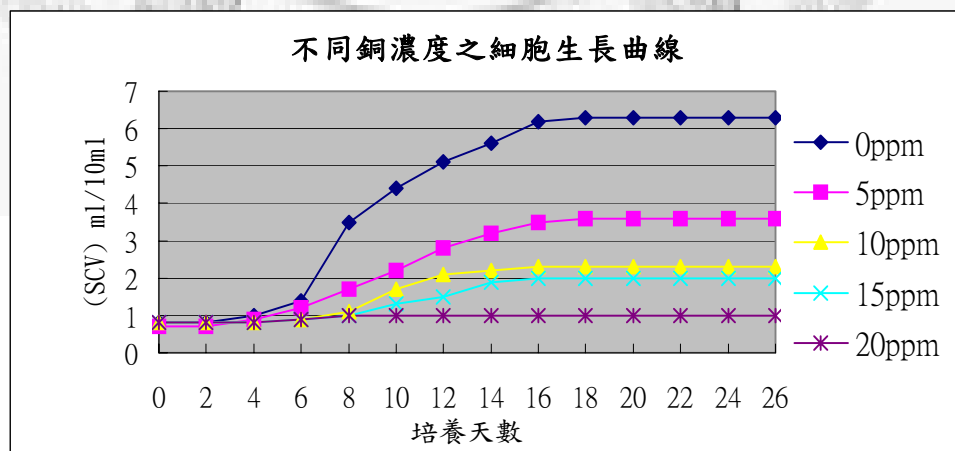
表三十四、以日本女貞頂芽莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加不同濃度之硫酸銅，在光照環境下日本女貞頂芽莖段對銅之忍受度試驗結果。

銅濃度 (ppm)	0	5	10	50	100	150	200
發根數	3.5	3.2	2.1	0	0	0	0
生長高度 (cm)	4.3	4.0	1.3	0.8	0.4	0.3	0

※（每組 3 個培植體，重複 5 次）

(二) 日本女貞懸浮細胞對銅之忍受度

日本女貞懸浮細胞對銅之忍受度試驗結果（圖五），在接種 20 天後以 TTC 做活力檢定，其在 5ppm 時細胞活力與對照組差不多，依舊存活，而在 15ppm 時細胞仍有 10% 存活，但是在 20ppm 時，細胞則全數死亡，因此表示日本女貞細胞對銅之忍受度並無法高於 20ppm，其結果與 Turner 和 Dickinson 在 1993 年利用 *Acer pseudoplatanus* 所發表 12.5~15ppm 差不多。



圖五、WPM 培養基中添加不同銅濃度之細胞生長曲線。

伍、結論

在日本女貞種子表面消毒方面，日本女貞成熟種子先以流水處理 24 小時，先以 1% 安其消毒液浸泡 20 分鐘做表面清潔，再以 70% 之酒精浸泡 5 分鐘，在置入 5% NaOCl 水溶液（含約 0.1% (v/v) Tween20 展著劑），並置入超音波震盪器中震盪 30 分鐘後，以無菌水沖洗 3 次可達零污染率。

在培養基前試驗方面，本試驗採用 MS、1/2MS、WPM 三種基礎培養基，在無添加植物生長調節劑狀況下，進行無菌苗之培養試驗。其結果在無菌苗發芽方面，其三種基礎培養基發芽狀況皆良好，而在無菌苗生長方面為 WPM 培養基較好，其無菌苗生長良好，莖部肥大、葉片茂盛。

在癒合組織誘導方面，癒合組織誘導結果以胚軸為培植體在添加 0.5ppm 2,4-D 之 WPM 培養基在光照培養環境下可達最高之生長倍數。

在根之誘導方面，誘導結果以 WPM 培養基中添加 1 ppm 之 IBA 與暗處理 15 天之試驗組為最佳，可誘導出 11 條根。但是基於節省時間與節省經費之前提之下，其中以空白培養基配合暗處理 10 天，其亦可誘導出 6 條之根來，其雖然並非最高之根誘導率，但是其也算有非常不錯之成效。

在多芽體誘導方面，誘導結果以 WPM 培養基中添加 0.01ppm IBA 及 1ppm BA 的試驗組為佳，其本試驗組可在一個月內誘發出 30 個左右之芽體。

在芽體的抽長方面，試驗之結果，其 20 天後以 GA_3 濃度在 0.5ppm 並配合在光度 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 時，其芽體之抽長長度最長，可達 4.7cm；其次為以 WPM 空白培養基在光度 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 時，其芽體之抽長長度可達 4.5cm。基於節省時間、節省能源與節省經費之前提之下採用以 WPM 空白培養基在光度 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ，使其芽體抽長可以達到較好之成效。並且若此試驗與其發根共同進行，則更加方便與節省資源。

在懸浮培養方面，結果以添加 0.1ppm 之 2,4-D 配合 10g/l 蔗糖之 HW7 試驗組的成果最佳，其最後生長量可達 6.4 (SCV) ml/10ml，其 HW7 試驗組在懸浮培養 18 天後，其生長量可達原本接種量之八倍；其次為添加 0.5 ppm 2,4-D 配合 10g/l 蔗糖之 HW12 試驗組，其最後生長量可達 6.2 (SCV) ml/10ml。其建議在 16~18 天繼代一次。

日本女貞頂芽對銅之忍受度試驗結果，頂芽對銅之忍受度高達 200ppm 時，其中之培植體雖然可以忍受不死亡，但是卻無法發根；但在 10ppm 時其培植體生長依舊良好，依舊可以發根和生長。日本女貞細胞對銅之忍受度試驗結果，其在 5ppm 時細胞活力與對照組差不多，依舊存活，而在 15ppm 時仍然有細胞存活，但是在 20ppm 時，細胞則全數死亡。

陸、參考文獻

- 王淑美 (2003) 植物細胞與組織培養學實驗。植物細胞與組織培養學實驗講義。P. 1~32。
- 呂勝由、楊遠波 (1988) 台灣女貞屬植物之系統分類。林業試驗所研究報告季刊 3 (2): 121~129。
- 呂勝由、何坤益、洪昆源、蔡達全、簡慶德、樓梅芳、陳沁源、鍾慧元 (1998) 台灣地區濱海型工業區綠化實用圖鑑。林業叢刊 95 號。
- 沈敏娟 (1992) 銀杏之組織培養。國立臺灣大學森林學研究所碩士論文。P. 1~45。
- 邱年永、張光雄 (1992) 原色台灣藥用植物圖鑑。南天書局有限公司。
- 苗迺蕙 (1999) 銀杏細胞大量培養與銀杏內酯含量之探討。中國文化大學生物科技研究所碩士論文。P. 8~74。
- 高毓瑩 (1995) 臺灣檉之組織培養。國立臺灣大學森林學研究所碩士論文。P. 1~39。
- 章君瑜 (1963) 花卉園藝學。台灣商務出版社。
- 葉顯銘、陳少燕、黃定鼎、黃浩仁 (2004) 清理重金屬污染的植物。科學發展。380: 44~49。
- 張肇麟 (1998) 台灣雲杉體胚之誘導。國立臺灣大學森林學研究所碩士論文。
- 劉業經、呂福原、歐辰雄 (1994) 臺灣樹木誌。國立中興大學農學院叢書。P. 608。
- Barker, P. K., R. A. de Fossard, and R. A. Bourne (1977) Progress toward clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 27: 546~556.
- Bates, S. A., J. E. Preece and J. H. Yopp, (1993) Secondary somatic embryogenesis and plantlet conversion of white ash. HortScience. 28:405.
- Canas, L. A., L. Carramolino and M. Vicente (1987) Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos. Plant Sci.

50:85~90.

Canas, L. A. and A. Bendadis (1988) Plant regeneration from cotyledon fragments of the olive (*Olea europaea* L.). Plant Sci. 54:65~67.

Canas, L. A. and A. Bendadis (1988) In vitro plant regeneration from cotyledon fragments of the olive (*Olea europaea* L.). Plant Sci. 54: 65~74.

Gautheret, R. J (1934) Culture du tissu cambial. C.R. Acad. Sci. (Paris) 198 : 2195~2196.

Gautheret, R. J (1940) Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d' *Ulmus campestris*, cultivate *in vitro*. C.R. Acad. Sci. (Paris)

Gupta, P. K. and D. H. Durzen. (1986) Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. BioTechnology 4 : 643~645.

Heiman, P. J. and J. E. Preece (1983) Aseptic micropropagation of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh and *Fraxinus Americana* L. utilizing shoot tip explants. HortScience 15:616.

Hammatt, N. and M. S. Ridout (1992) Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 31:67~74.

Hammatt, N. (1994) Shoot initiation in the leaflet axils of compound leaves of micropropagated shoots of juvenile and mature common ash (*Fraxinus excelsior* L.). J. Exp. Bot. 45:871~875.

Murashige, T and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473~497.

Murashige, T. (1977) Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev Plant Physiol 25 : 135~166.

Mencuccini M. (2003) Effect of medium darkening on in vitro rooting

capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Sci. Hort. 97:129~139.

Patel, K. R. and G. P. Berlyn. (1982) Genetic instability of multiple buds of *Pinus coulteri* regenerated from tissue culture. Can. J. For. Res. 12 : 93~101.

Preece, J. E., J. Zhao, and F. H. Kung (1989) Callus production and somatic embryogenesis of white ash (*Fraxinus Americana* L.). HortScience 24:377~380.

Perez-Parron, M. A., M. E. Gonzales-Bonito, and C. Perez (1994) Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 37:297~302.

Ruggini, E. (1984) In vitro propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Sci. Hort. 24:123~134.

Rutter, A. J., J. Sanchez and J. L. Harwood (1997) Glycerolipid synthesis by microsomal fractions from *Olea europaea* fruits and tissue cultures. phytochemistry. 46:265~272.

Robert, N. T. and J. G. Dennis. (2000) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. p. 79~85.

Silveira, C. A. and A. Cottignies (1994) Period of harvest, sprouting ability of cuttings, and in vitro plant regeneration in *Fraxinus excelsior*. Can. J. Bot. 72:261~267.

Santos, C. V., G. Birto and G. Pinto (2003) In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*. Sci. Hort. 97:83~87.

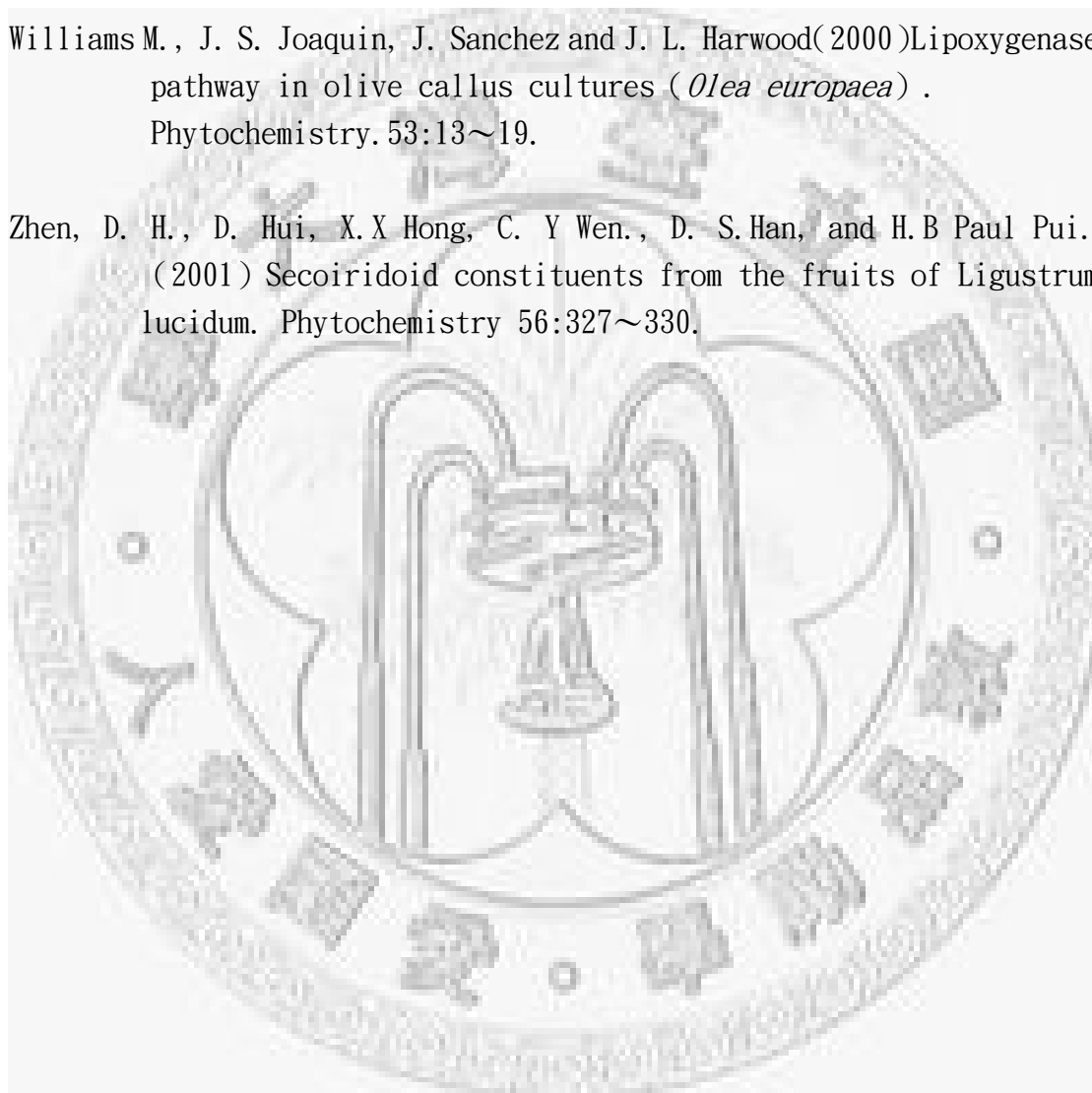
Tabrett, A. M. and N. Hammatt (1992) Regeneration of shoots from embryo hypocotyls of common ash (*Fraxinus excelsior*). Plant Cell Report. 11:514~518.

Turner, A. P. and N. M. Dickinson (1993) Copper tolerance of *Acer pseudoplatanus* L (sycamore) in tissue culture. 123:523~530.

Tanon, G., M Capuana, A Di Marco (2001) Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by in vitro shoot organogenesis. Sci. Hort. 87:291~301.

Williams M., J. S. Joaquin, J. Sanchez and J. L. Harwood (2000) Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). Phytochemistry. 53:13~19.

Zhen, D. H., D. Hui, X. X Hong, C. Y Wen., D. S. Han, and H. B Paul Pui. (2001) Secoiridoid constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum*. Phytochemistry 56:327~330.



柒、附錄

附錄一：基礎培養基成分一覽表

成分含量 (mg/l)	MS	1/2MS	WPM
Macro-nutrients			
	1, 900	950	–
KNO ₃	1, 650	825	400
NH ₄ NO ₃	170	85	170
KH ₂ PO ₄	440	220	96
CaCl ₂ ·2H ₂ O	370	185	370
MgSO ₄ ·7H ₂ O	–	–	556
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–	–	–
Micro-nutrients			
	22.3	22.3	16.9
MnSO ₄ ·H ₂ O	8.6	8.6	8.6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6.2	6.2	6.2
H ₃ BO ₃	0.83	0.83	–
KI	0.25	0.25	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.02	0.02	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02	0.02	–
CoCl ₂ ·6H ₂ O	–	–	–
Iron compounds			
	27.8	27.8	27.8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	37.3	37.3	37.3
Na ₂ -EDTA	–	–	–
<u>Organic substance</u>			
Myo-inositol	100	100	100
Sucrose (g/l)	30	30	20
<u>Vitamins</u>			
Thiamine·HCl	0.1	0.1	1
Pyridoxine·HCl	0.5	0.5	0.5
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Glycine	2	2	2
PH	5.7	5.7	5.2
Difco Bacto-agar (g/l)	8	8	8

附錄二、不同濃度之 NAA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

Least Squares Means				
A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.06000000	<.0001	1
1	2	0.02000000	0.0046	2
1	3	0.07000000	<.0001	3
1	4	0.07000000	<.0001	4
1	5	0.04000000	<.0001	5
1	6	0.06000000	<.0001	6
1	7	0.00600000	0.3892	7
1	8	0.00600000	0.3892	8
2	1	0.15000000	<.0001	9
2	2	0.58000000	<.0001	10
2	3	0.61000000	<.0001	11
2	4	0.59000000	<.0001	12
2	5	0.06000000	<.0001	13
2	6	0.56000000	<.0001	14
2	7	0.58000000	<.0001	15
2	8	0.53000000	<.0001	16
3	1	0.28000000	<.0001	17
3	2	0.27000000	<.0001	18
3	3	0.16000000	<.0001	19
3	4	0.37000000	<.0001	20
3	5	0.58000000	<.0001	21
3	6	0.38000000	<.0001	22
3	7	0.42000000	<.0001	23
3	8	0.36000000	<.0001	24
4	1	0.06000000	<.0001	25
4	2	0.74000000	<.0001	26 ^b
4	3	0.46000000	<.0001	27
4	4	0.43000000	<.0001	28
4	5	0.46000000	<.0001	29
4	6	0.49000000	<.0001	30
4	7	0.43000000	<.0001	31
4	8	0.41000000	<.0001	32

5	1	0.66000000	<.0001	33 ^c
5	2	0.20000000	<.0001	34
5	3	0.50000000	<.0001	35
5	4	0.83000000	<.0001	36 ^a
5	5	0.26000000	<.0001	37
5	6	0.21000000	<.0001	38
5	7	0.18000000	<.0001	39
5	8	0.22000000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

附錄三、不同濃度之 IBA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之鮮重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMEAN)進行比較之結果。

Least Squares Means				
A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.06000000	<.0001	1
1	2	0.02000000	0.0044	2
1	3	0.07000000	<.0001	3
1	4	0.07000000	<.0001	4
1	5	0.04000000	<.0001	5
1	6	0.06000000	<.0001	6
1	7	0.00600000	0.3873	7
1	8	0.00600000	0.3873	8
2	1	0.11000000	<.0001	9
2	2	0.10000000	<.0001	10
2	3	0.08000000	<.0001	11
2	4	0.02000000	0.0044	12
2	5	0.02000000	0.0044	13
2	6	0.05000000	<.0001	14
2	7	0.43000000	<.0001	15 ^a
2	8	0.06000000	<.0001	16
3	1	0.18000000	<.0001	17
3	2	0.01200000	0.0849	18
3	3	0.10000000	<.0001	19
3	4	0.02000000	0.0044	20

3	5	0.06000000	<.0001	21
3	6	0.02000000	0.0044	22
3	7	0.43000000	<.0001	23 ^a
3	8	0.05000000	<.0001	24
4	1	0.13000000	<.0001	25
4	2	0.07000000	<.0001	26
4	3	0.41000000	<.0001	27 ^b
4	4	0.17000000	<.0001	28
4	5	0.38000000	<.0001	29
4	6	0.05000000	<.0001	30
4	7	0.06000000	<.0001	31
4	8	0.40000000	<.0001	32 ^c
5	1	0.13000000	<.0001	33
5	2	0.06000000	<.0001	34
5	3	0.13000000	<.0001	35
5	4	0.17000000	<.0001	36
5	5	0.29000000	<.0001	37
5	6	0.33000000	<.0001	38
5	7	0.35000000	<.0001	39
5	8	0.30000000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

附錄四、不同濃度之 NAA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

Least Squares Means				
A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.02300000	0.0010	1
1	2	0.01080000	0.1184	2
1	3	0.02700000	0.0001	3
1	4	0.02700000	0.0001	4
1	5	0.01680000	0.0157	5
1	6	0.02300000	0.0010	6
1	7	0.00600000	0.3844	7
1	8	0.00600000	0.3844	8
2	1	0.04300000	<.0001	9

2	2	0.16700000	<.0001	10
2	3	0.17600000	<.0001	11
2	4	0.17000000	<.0001	12
2	5	0.01760000	0.0114	13
2	6	0.16100000	<.0001	14
2	7	0.16700000	<.0001	15
2	8	0.12400000	<.0001	16
3	1	0.08000000	<.0001	17
3	2	0.07700000	<.0001	18
3	3	0.04600000	<.0001	19
3	4	0.10600000	<.0001	20
3	5	0.16600000	<.0001	21
3	6	0.10900000	<.0001	22
3	7	0.12000000	<.0001	23
3	8	0.10300000	<.0001	24
4	1	0.01760000	0.0114	25
4	2	0.21100000	<.0001	26 ^b
4	3	0.13100000	<.0001	27
4	4	0.12300000	<.0001	28
4	5	0.13100000	<.0001	29
4	6	0.14000000	<.0001	30
4	7	0.12300000	<.0001	31
4	8	0.11700000	<.0001	32
5	1	0.19400000	<.0001	33 ^c
5	2	0.05900000	<.0001	34
5	3	0.14700000	<.0001	35
5	4	0.24400000	<.0001	36 ^a
5	5	0.07600000	<.0001	37
5	6	0.06200000	<.0001	38
5	7	0.05300000	<.0001	39
5	8	0.06500000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

附錄五、不同濃度之 IBA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.02300000	0.0007	1
1	2	0.01080000	0.1054	2
1	3	0.02700000	<.0001	3
1	4	0.02700000	<.0001	4
1	5	0.01680000	0.0123	5
1	6	0.02300000	0.0007	6
1	7	0.00600000	0.3669	7
1	8	0.00600000	0.3669	8
2	1	0.03700000	<.0001	9
2	2	0.03300000	<.0001	10
2	3	0.02700000	<.0001	11
2	4	0.01020000	0.1260	12
2	5	0.01020000	0.1260	13
2	6	0.01760000	0.0088	14
2	7	0.14300000	<.0001	15 ^a
2	8	0.02000000	0.0030	16
3	1	0.05800000	<.0001	17
3	2	0.00780000	0.2413	18
3	3	0.03200000	<.0001	19
3	4	0.00960000	0.1497	20
3	5	0.01920000	0.0043	21
3	6	0.00960000	0.1497	22
3	7	0.13900000	<.0001	23 ^b
3	8	0.01680000	0.0123	24
4	1	0.04400000	<.0001	25
4	2	0.02300000	0.0007	26
4	3	0.13800000	<.0001	27 ^c
4	4	0.05700000	<.0001	28
4	5	0.12800000	<.0001	29
4	6	0.01760000	0.0088	30
4	7	0.02000000	0.0030	31
4	8	0.13400000	<.0001	32
5	1	0.04200000	<.0001	33
5	2	0.02000000	0.0030	34
5	3	0.04200000	<.0001	35

5	4	0.05600000	<.0001	36
5	5	0.09500000	<.0001	37
5	6	0.10800000	<.0001	38
5	7	0.11400000	<.0001	39
5	8	0.09800000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

附錄六、不同濃度之 NAA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

Least Squares Means				
A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	2.0000000	0.0041	1
1	2	2.0000000	0.0041	2
1	3	3.0000000	<.0001	3
1	4	6.0000000	<.0001	4
1	5	1.2000000	0.0821	5
1	6	0.6000000	0.3830	6
1	7	0.6000000	0.3830	7
1	8	0.6000000	0.3830	8
2	1	3.0000000	<.0001	9
2	2	6.0000000	<.0001	10
2	3	6.0000000	<.0001	11
2	4	4.0000000	<.0001	12
2	5	4.0000000	<.0001	13
2	6	8.0000000	<.0001	14
2	7	6.0000000	<.0001	15
2	8	4.0000000	<.0001	16
3	1	6.0000000	<.0001	17
3	2	3.0000000	<.0001	18
3	3	5.0000000	<.0001	19
3	4	5.0000000	<.0001	20
3	5	7.0000000	<.0001	21
3	6	14.0000000	<.0001	22 ^a

3	7	8.0000000	<.0001	23
3	8	6.0000000	<.0001	24
4	1	4.0000000	<.0001	25
4	2	5.0000000	<.0001	26
4	3	4.0000000	<.0001	27
4	4	4.0000000	<.0001	28
4	5	5.0000000	<.0001	29
4	6	8.0000000	<.0001	30
4	7	7.0000000	<.0001	31
4	8	5.0000000	<.0001	32
5	1	5.0000000	<.0001	33
5	2	6.0000000	<.0001	34
5	3	12.0000000	<.0001	35 ^b
5	4	7.0000000	<.0001	36
5	5	7.0000000	<.0001	37
5	6	10.0000000	<.0001	38 ^c
5	7	10.0000000	<.0001	39 ^c
5	8	8.0000000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

附錄七、不同濃度之 IBA 配合不同天數暗處理誘根試驗結果之發根數，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果-試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且到達顯著水準，所以再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果。

Least Squares Means				
A	B	obs LSMEAN	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	1.6000000	0.0052	1
1	2	1.6000000	0.0052	2
1	3	2.6000000	<.0001	3
1	4	5.6000000	<.0001	4
1	5	0.8000000	0.1589	5
1	6	0.4000000	0.4802	6
1	7	0.4000000	0.4802	7
1	8	0.4000000	0.4802	8
2	1	2.6000000	<.0001	9

2	2	2.6000000	<.0001	10
2	3	2.6000000	<.0001	11
2	4	2.6000000	<.0001	12
2	5	1.6000000	0.0052	13
2	6	2.6000000	<.0001	14
2	7	1.6000000	0.0052	15
2	8	0.8000000	0.1589	16
3	1	3.6000000	<.0001	17
3	2	1.6000000	0.0052	18
3	3	1.6000000	0.0052	19
3	4	1.6000000	0.0052	20
3	5	2.6000000	<.0001	21
3	6	1.6000000	0.0052	22
3	7	1.6000000	0.0052	23
3	8	0.8000000	0.1589	24
4	1	2.6000000	<.0001	25
4	2	1.6000000	0.0052	26
4	3	2.6000000	<.0001	27
4	4	4.6000000	<.0001	28
4	5	10.6000000	<.0001	29 ^a
4	6	6.6000000	<.0001	30
4	7	0.8000000	0.1589	31
4	8	0.8000000	0.1589	32
5	1	0.8000000	0.1589	33
5	2	1.6000000	0.0052	34
5	3	1.6000000	0.0052	35
5	4	1.6000000	0.0052	36
5	5	7.6000000	<.0001	37 ^c
5	6	9.6000000	<.0001	38 ^b
5	7	7.6000000	<.0001	39 ^c
5	8	3.6000000	<.0001	40

A * B Factorial Design(CRD)

捌、照片

照片 1. 以日本女貞成熟種子為培植體經表面消毒後種植於基礎培養基上進行培養基前試驗之情形 (bar=1mm)。

照片 2. 以日本女貞成熟種子為培植體經表面消毒後種植於WPM培養基上 10 天後發芽之情形 (bar=1mm)。

照片 3. 以日本女貞成熟種子為培植體經表面消毒後種植於WPM培養基上發芽 7 天後之情形 (bar=1mm)。

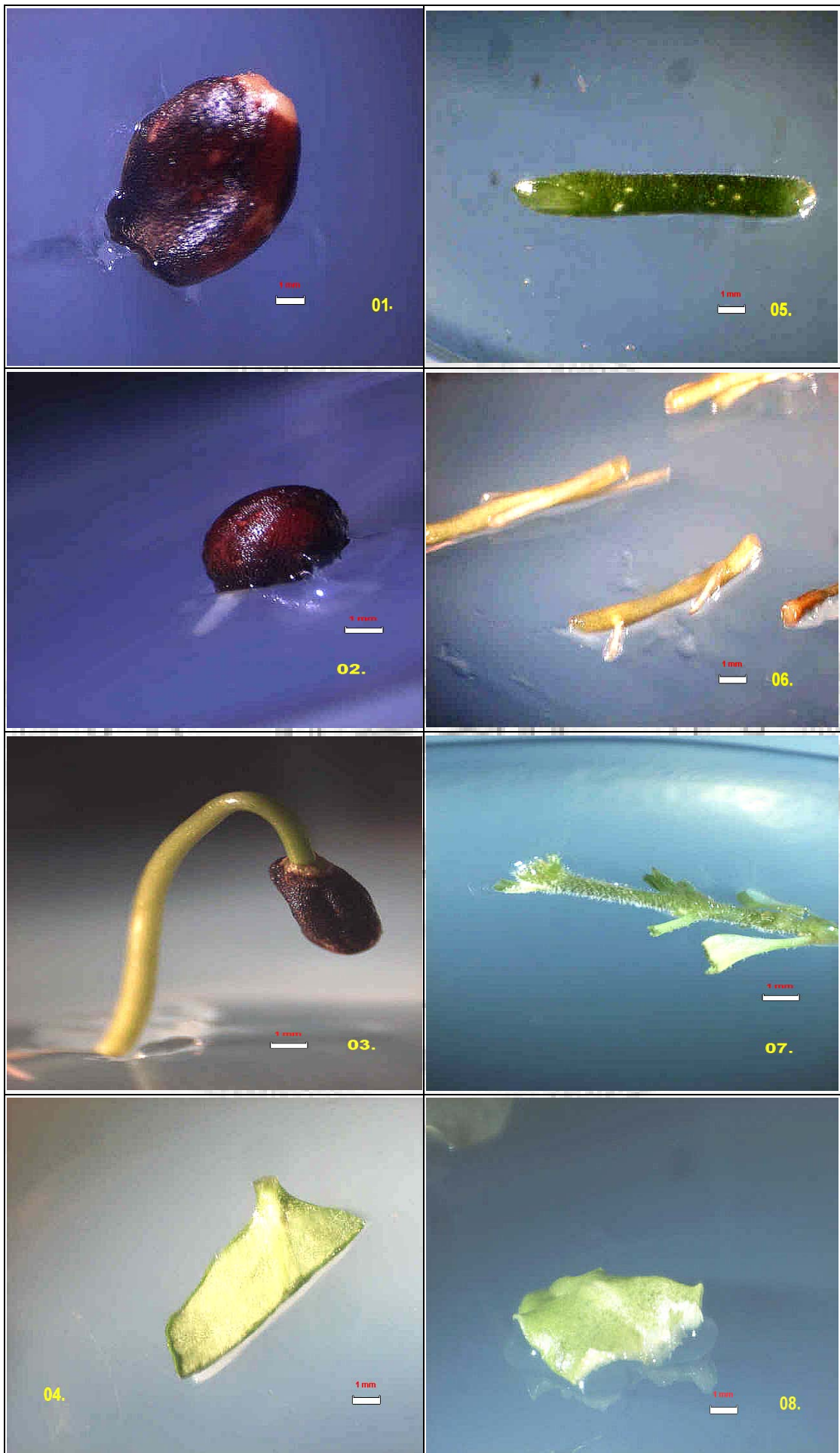
照片 4. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在光照環境下於WPM培養基上進行癒合組織誘導之情形 (bar=1mm)。

照片 5. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之下胚軸為培植體，在光照環境下於WPM培養基上進行癒合組織誘導之情形 (bar=1mm)。

照片 6. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之根為培植體，在光照環境下於WPM培養基上進行癒合組織誘導之情形 (bar=1mm)。

照片 7. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在光照環境下於WPM培養基上進行癒合組織誘導之情形 (bar=1mm)。

照片 8. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之葉子為培植體，在光照環境下於WPM培養基上進行癒合組織誘導之情形 (bar=1mm)。



照片 9. 以發芽後 20 天之日本女貞頂芽莖段為培植體置入 WPM 培養基中，並且進行不同天數之暗處裡，以進行誘根試驗 (bar=1mm)。

照片 10. 日本女貞無菌苗頂芽莖段植於空白 WPM 培養基上 14 天後之情形 (bar=1mm)。

照片 11. 無菌苗生長於 MS、1/2MS 培養基上 25 天後觀察之情形，其生長狀況較差，葉片較小、顏色淡，並且葉片容易扭曲，而莖部生長狀況也較細，且小苗較容易掉葉 (bar=1mm)。

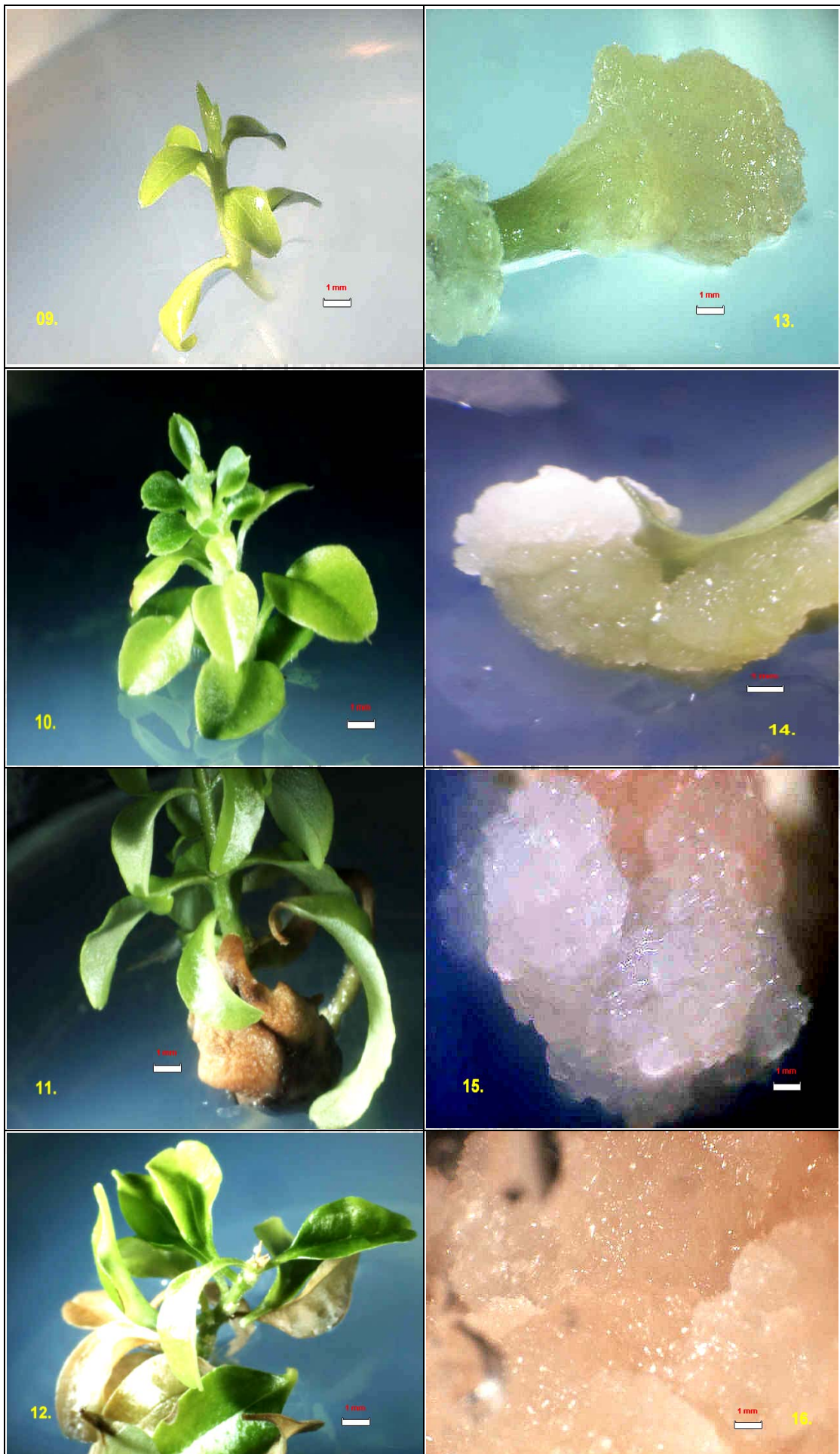
照片 12. 以誘導出來之無菌苗頂芽莖段為材料，將其植入空白 MS 培養基中 14 天後，也有掉葉之情形 (bar=1mm)。

照片 13. 以日本女貞無菌小苗之下胚軸為培植體，在光照環境下於 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 進行癒合組織誘導後 7 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 14. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在光照環境下於 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 進行癒合組織誘導後 10 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 15. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在光照環境下於 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 進行癒合組織誘導後 10 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 16. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在光照環境下於 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 進行癒合組織誘導後 10 天之生長情形 (bar=1mm)。



照片 17. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，植於不適當之培養基中在光照環境下進行癒合組織誘導後 15 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 18. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，植於不適當之培養基中在光照環境下進行癒合組織誘導後 15 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 19. 以日本女貞無菌小苗之頂芽莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 於黑暗培養環境下進行癒合組織誘導後 7 天之生長情形 (bar=1mm)。

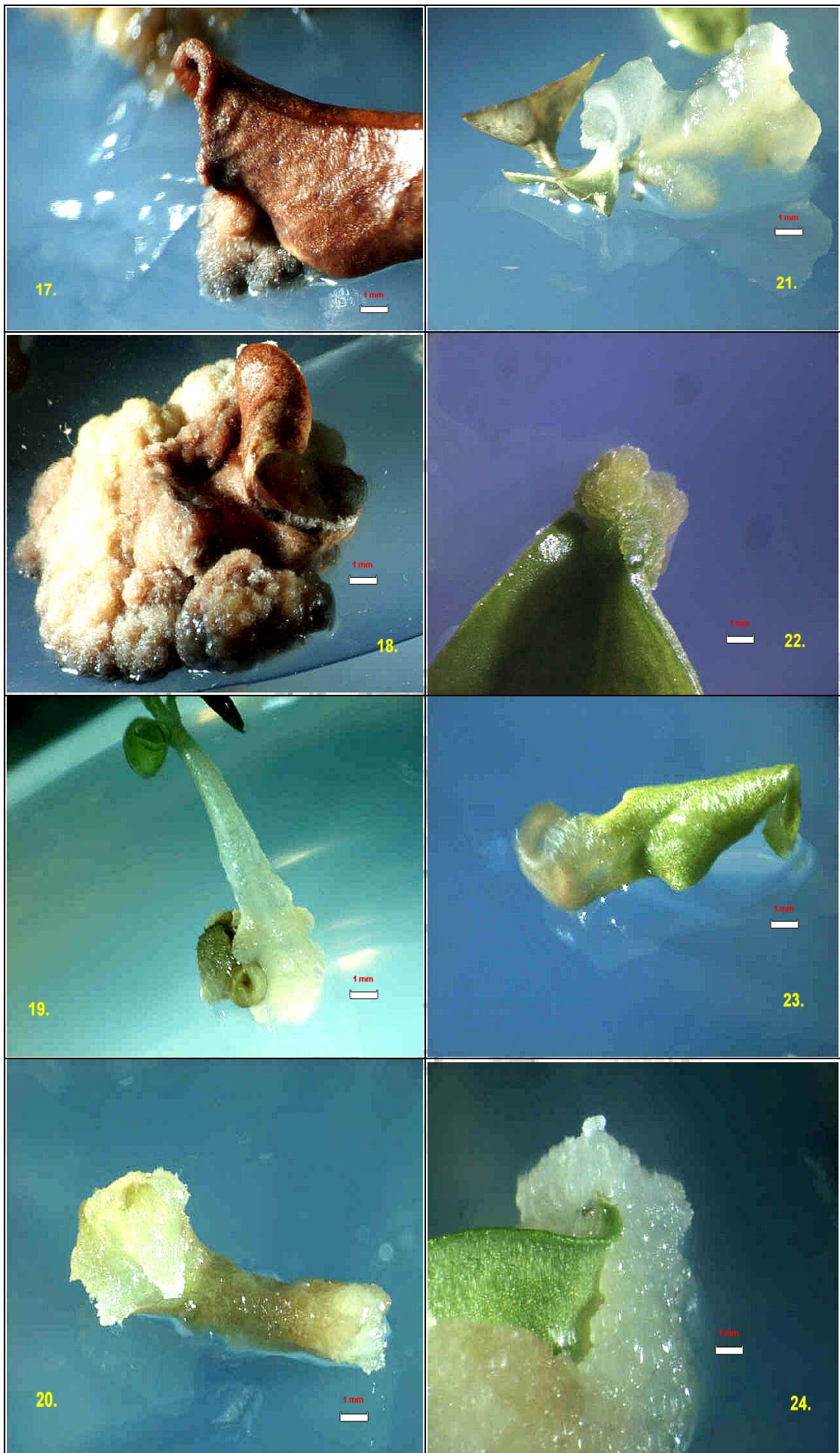
照片 20. 以日本女貞無菌小苗之根為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 於黑暗培養環境下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 21. 以日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 於黑暗培養環境下進行癒合組織誘導後 7 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 22. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形(bar=1mm)。

照片 23. 以日本女貞無菌小苗之葉子為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗培養環境下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 24. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗下進行癒合組織誘導後 10 天之生長情形 (bar=1mm)。



照片 25. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，於光照環境下之 MS 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 進行癒合組織誘導後 14 天後之生長情形 (bar=1mm)。

照片 26. 日本女貞無菌小苗之子葉之癒合組織，在 MS 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 與 0.5ppm 之 BA 培養結果，其隨著 BA 濃度升高，而變的較綠且較緊密 (bar=1mm)。

照片 27. 以日本女貞無菌小苗之下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

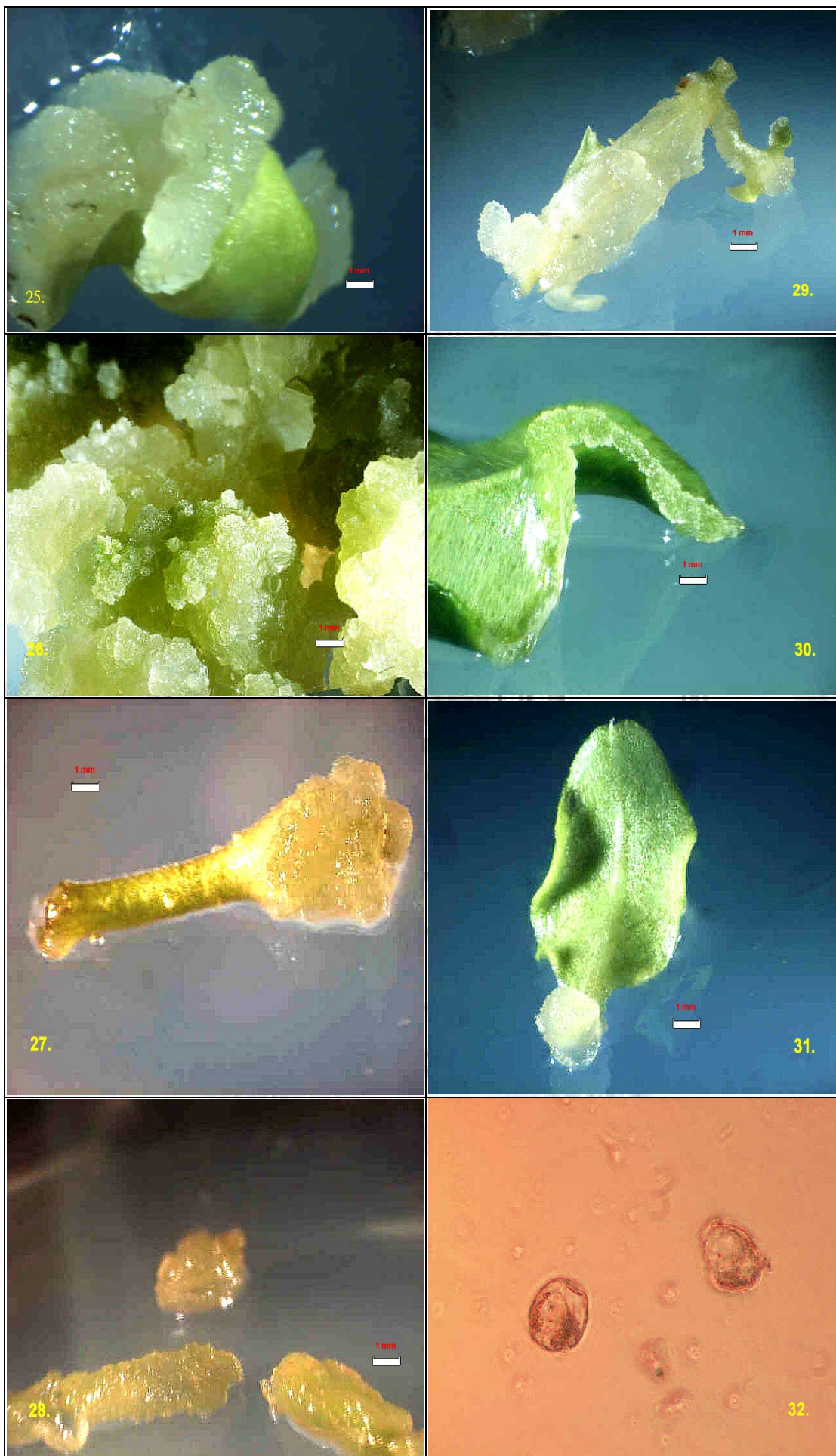
照片 28. 以日本女貞無菌小苗之根為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 29. 以日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 30. 以日本女貞無菌小苗之子葉為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 31. 以日本女貞無菌小苗之葉子為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行癒合組織誘導後 5 天之生長情形 (bar=1mm)。

照片 32. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2, 4-D 於光照下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形 (倍數=63X)。



照片 33. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=100X）。

照片 34. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=25X）。

照片 35. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=63X）。

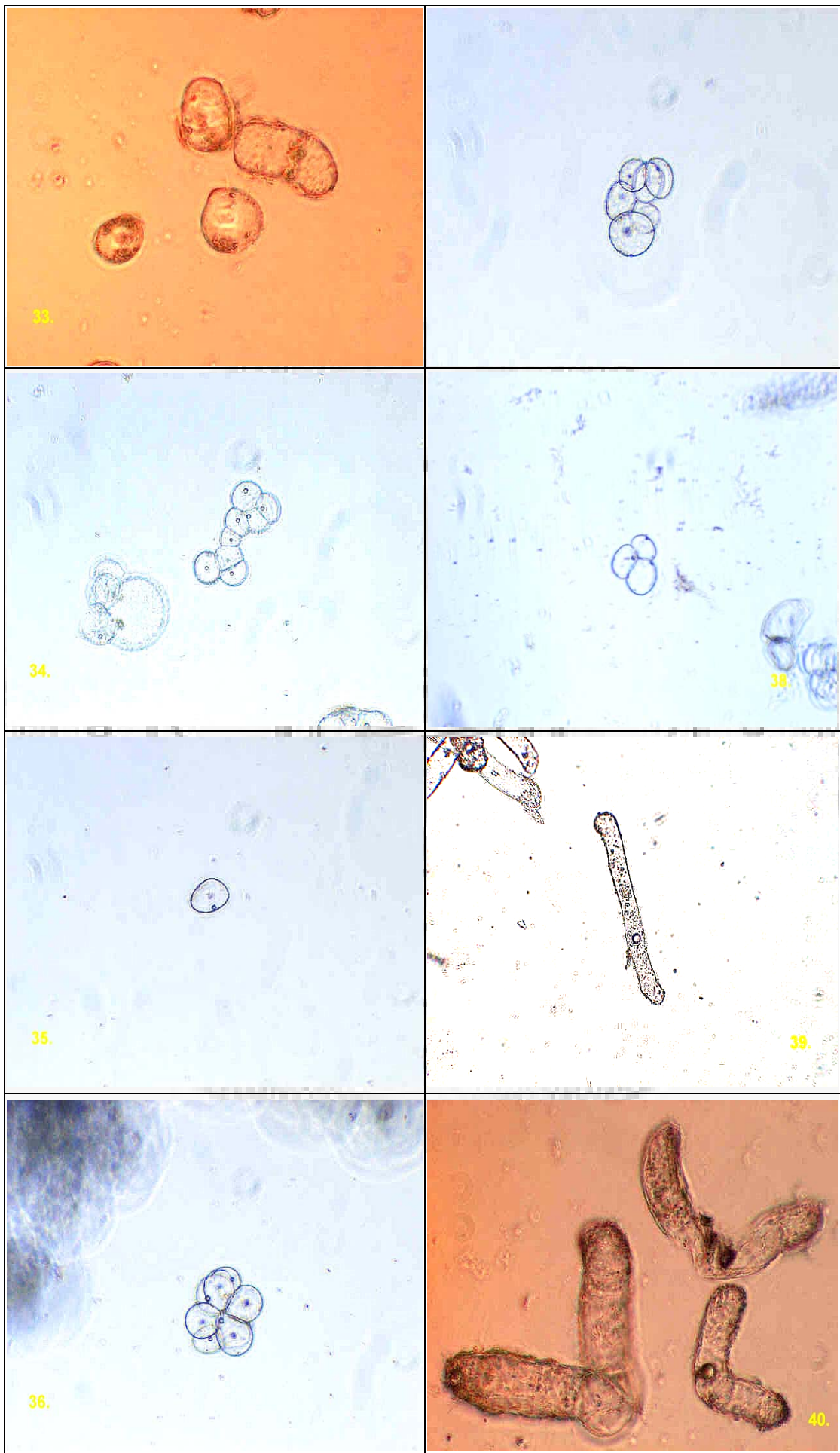
照片 36. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=63X）。

照片 37. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=63X）。

照片 38. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於光照環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=25X）。

照片 39. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=100X）。

照片 40. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=100X）。



照片 41. 取以日本女貞無菌苗下胚軸為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.5ppm 之 2,4-D 於黑暗環境下進行培養 20 天後之癒合組織以塗抹片觀察法，於倒立顯微鏡下觀察之情形（倍數=100X）。

照片 42. 以日本女貞無菌小苗之頂芽莖段為培植體，植於含高濃度 NAA 之 WPM 培養基中，置於光照環境下進行根誘導 10 天後之發根情形（bar=1mm）。

照片 43. 以日本女貞無菌小苗之葉子為培植體，植於含 1ppm IBA 之 WPM 培養基中，置於光照環境下其發根之情形（bar=1mm）。

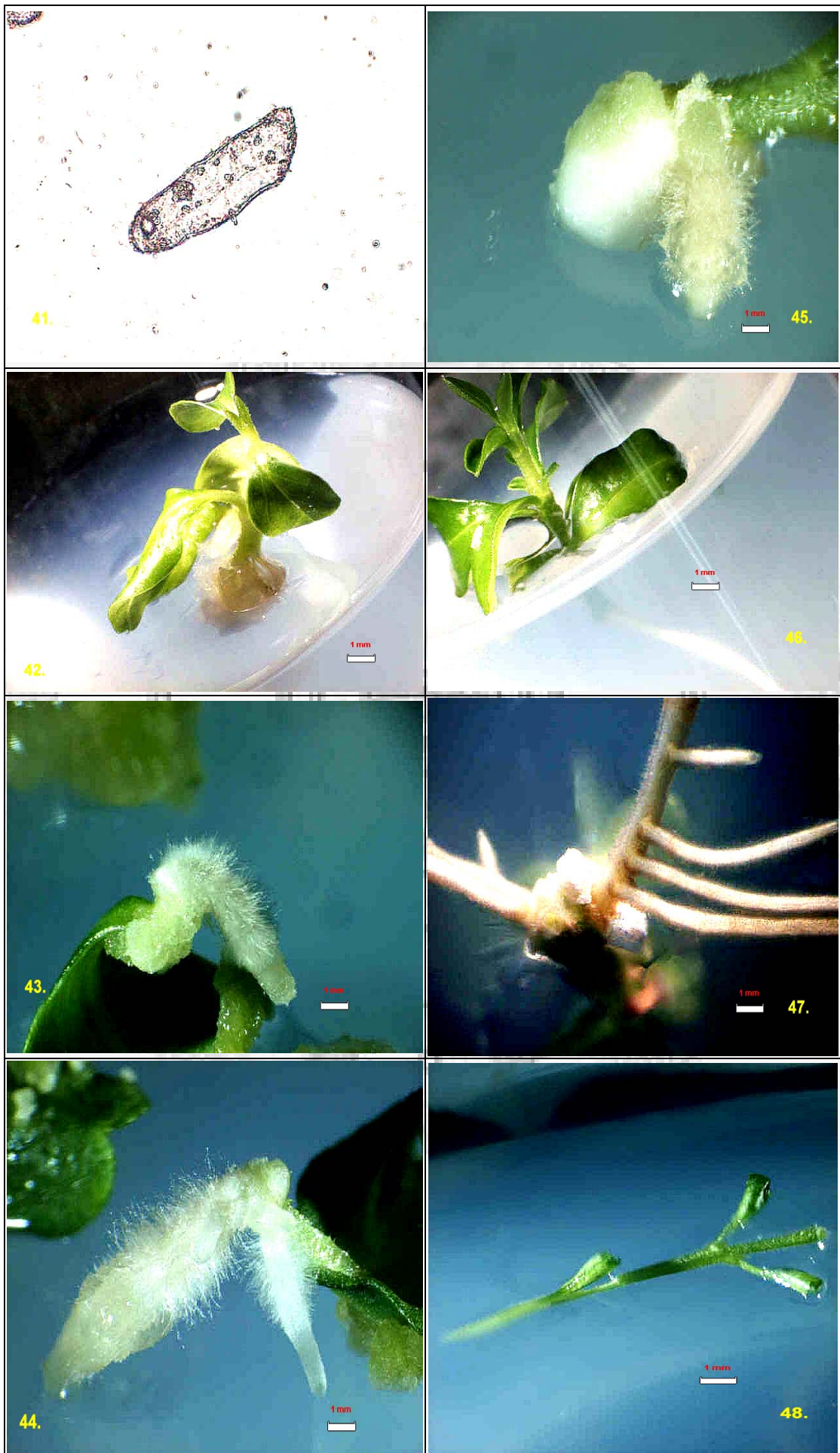
照片 44. 以日本女貞無菌小苗之葉子為培植體，植於含 1ppm IBA 之 WPM 培養基中，置於光照環境下其發根之情形（bar=1mm）。

照片 45. 以日本女貞無菌小苗之連節帶莖段為培植體，植於含 1ppm IBA 之 WPM 培養基中，置於光照環境下其發根之情形（bar=1mm）。

照片 46. 以日本女貞無菌小苗之頂芽莖段為培植體，植於 WPM 空白培養基中，置於光照下進行根誘導 14 天後之發根情形（bar=1mm）。

照片 47. 以日本女貞無菌小苗之頂芽為培植體，植於 WPM 空白培養基中，進行暗處理 10 天根誘導根誘導試驗，20 天後之發根情形（bar=1mm）。

照片 48. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.01ppm 之 IBA 與 0.1ppm 之 BA，置於光照環境下進行多芽體誘導之情形（bar=1mm）。



照片 49. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.01ppm 之 IBA 與 0.1ppm 之 BA，置於光照環境下進行多芽體誘導 25 天後之情形 (bar=1mm)。

照片 50. 取發芽後 10~15 天日本女貞無菌小苗之帶節莖段為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.01ppm 之 IBA 與 0.1ppm 之 BA，置於光照環境下進行多芽體誘導 25 天後之情形 (bar=1mm)。

照片 51. 日本女貞之帶節莖段所誘導出之多芽體，植於含活性炭之培養基中，置於光照環境中培養 15 天後之情形 (bar=1mm)。

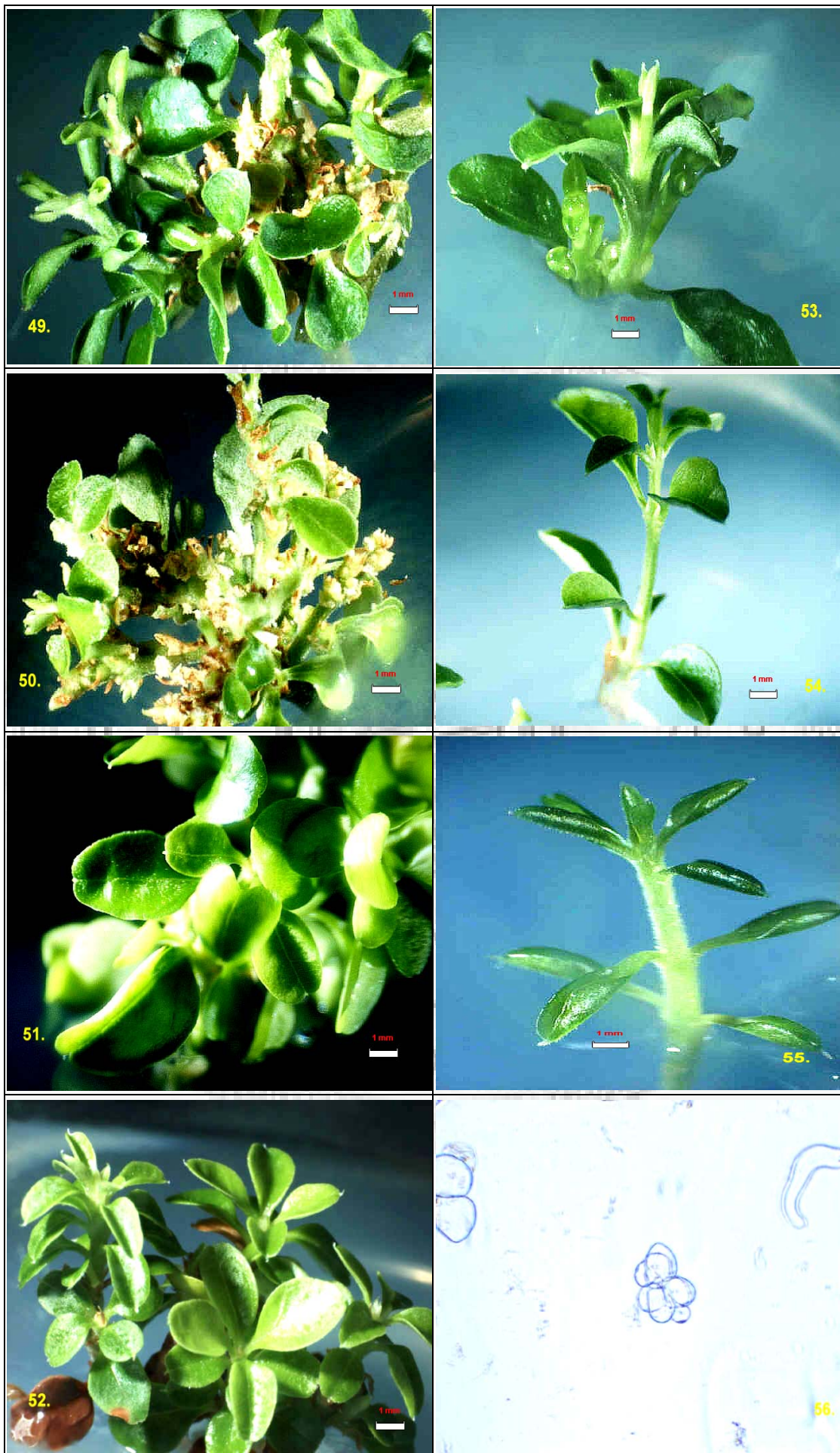
照片 52. 日本女貞之帶節莖段所誘導出之多芽體，植於空白之 WPM 培養基中，置於光照環境中培養 15 天後之情形 (bar=1mm)。

照片 53. 以日本女貞無菌小苗之頂芽為培植體，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 NAA 與 1ppm 之 BA，置於光照環境下進行多芽體誘導 14 天後頂芽遭抑制而腋芽開始生長之情形 (bar=1mm)。

照片 54. 以由日本女貞之帶節莖段所誘導出之多芽體為培植體，以 WPM 空白培養基並置於 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照環境下 14 天後芽體抽長之情形 (倍數=5X)。

照片 55. 以由日本女貞之帶節莖段所誘導出之多芽體為培植體，以 WPM 空白培養基並置於 $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照環境下 25 天後芽體抽長之情形 (bar=1mm, 倍數=5X)。

照片 56. 日本女貞細胞懸浮培養試驗中，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 並且配合 0 g/l^{-1} 蔗糖濃度，於光照環境下培養 20 天後之細胞型態 (倍數=63X)。



照片 57. 日本女貞細胞懸浮培養試驗中，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 並且配合 10 g/l⁻¹ 蔗糖濃度，於光照環境下培養 20 天後之細胞型態（倍數=63X）。

照片 58. 日本女貞細胞懸浮培養試驗中，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 並且配合 20 g/l⁻¹ 蔗糖濃度，於光照環境下培養 20 天後之細胞型態（倍數=100X）。

照片 59. 日本女貞細胞懸浮培養試驗中，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 並且配合 30 g/l⁻¹ 蔗糖濃度，於光照環境下培養 20 天後之細胞型態（倍數=63X）。

照片 60. 日本女貞細胞懸浮培養試驗中，在 WPM 培養基中添加 0.1ppm 之 2,4-D 並且配合 40 g/l⁻¹ 蔗糖濃度，於光照環境下培養 20 天後之細胞型態（倍數=100X）。

照片 61. 日本女貞頂芽莖段對硫酸銅之忍受度高達 200ppm 時，20 天後培植體雖然可以忍受不死亡，但是卻無法發根（bar=1mm）。

照片 62. 日本女貞頂芽莖段對硫酸銅之忍受度高達 200ppm 時，20 天後其中少數之培植體從培養基上方長出根來之情形（bar=1mm）。

照片 63. 日本女貞頂芽莖段在含有 10ppm 硫酸銅之 WPM 培養基中，20 天後其培植體生長依舊良好，依舊可以發根和生長（bar=1mm）。

照片 64. 日本女貞頂芽莖段在含有 10ppm 硫酸銅之 WPM 培養基中，20 天後其培植體生長依舊良好，依舊可以發根和生長（bar=1mm）。

