

國立臺灣大學森林環境暨資源研究所

碩士論文

指導教授：王亞男 博士

臺灣扁柏與大葉桉組織培養與玻璃質化法超低溫保存
之研究

Studies on Cryopreservation and Tissue Culture of
Chamaecyparis obtusa var. *formosana* and *Eucalyptus robusta* by
Vitrification Technique.

研究生：蔡國書

中華民國九十四年一月

誌謝

本論文的完成承王亞男博士於學業上的指導，並給予學習的機會，稿成復蒙嘉義大學副校長 李明仁博士、大葉大學副校長 何偉真博士、嘉義大學 廖宇賡博士與台灣大學 劉麗飛博士對本論文予以詳閱斧正，並賜予許多寶貴意見，謹誌最崇高之謝意。

在論文實驗期間，感謝林志謀學長傳授組織培養方面的技術，李衛宗學長、成寧學姊、張藝齡學姊、吳宗賢學長、周宏祈學長與林梓銘同學於實驗及專業知識上的啟發及幫忙，特此感謝。

非常感謝陳瑩達同學、藍佩芬同學、劉俊毅同學、游智偉同學、張照群同學等人，在我研究期間一直給我鼓勵與打氣，感謝你們。

特別感謝邱怡禎學妹、陳映嵐學妹、郭宇文學妹、王婉柔學妹、蕭慧敏學妹、吳元鼎學弟、張恒顥學弟、林彥良學妹、賴彥達學弟、林立人學妹等人，感謝你們在我實驗過程中的協助，使實驗能順利進行。

最後感謝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。

蔡國書 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
中文摘要	IV
英文摘要	V
縮寫字	VII
一、前言	1.
二、前人研究	2.
(一) 桉樹微體繁殖系統	2.
(二) 台灣扁柏微體繁殖系統	4.
(三) 超低溫保存系統	5.
(四) 玻璃質化法超低溫保存之流程	5.
(五) 影響玻璃質化法之因子	9.
(六) 玻璃質化法植物生理反應及細胞改變	13.
三、材料與方法	15.
(一) 材料	15.
(二) 方法	15.
1、大葉桉組織培養	15.
2、台灣扁柏組織培養	19.
3、超低溫保存試驗	21.
四、結果與討論	24.
(一)、大葉桉組織培養	24.
(二)、台灣扁柏組織培養	31.
(三)、超低溫保存試驗	35.
五、結論	44.
六、參考文獻	46.
七、附錄	52.
八、照片	53.

表目次

	頁
表一、MS 培養基添加 BA 與 2, 4-D 不同濃度之組合表。	17.
表二、WPM 培養基添加 BA 與不同濃度 NAA 及 2, 4-D 之組合表。	20.
表三、大葉桉萌藥培植體表面消毒試驗結果及誘導率。	24.
表四、大葉桉萌藥莖段不同濃度 BA 處理之芽體增殖結果。	25.
表五、大葉桉萌藥莖段不同濃度 BA 處理之芽體增殖變方分析。	26.
表六、大葉桉萌藥莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖結果。	26.
表七、大葉桉萌藥莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖變方分析。	27.
表八、大葉桉萌藥莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖比較。	27.
表九、以 MS 為基礎培養基添加不同濃度 BA、2, 4-D 誘導大葉桉癒合組織生長試驗觀察結果。	28.
表十、以 MS 為基礎培養基添加不同濃度 BA、2, 4-D 誘導大葉桉癒合組織試驗結果變方分析。	29.
表十一、台灣扁柏消毒試驗結果。	31.
表十二、不同濃度的 BA 與 NAA 或 2, 4-D 生長調節劑之組合進行台灣扁柏成熟胚培養。	32.
表十三、大葉桉懸浮細胞經過不同濃度 PVS2 與處理時間之 TTC 活力檢定情形。	35.
表十四、台灣扁柏懸浮細胞經過不同濃度 PVS2 與處理時間之 TTC 活力檢定情形。	36.

表十五、大葉桉懸浮細胞先經過 LS 溶液處理 20 分鐘後，經由不同 PVS2 處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 37.

表十六、台灣扁柏懸浮細胞先經過 LS 溶液處理 20 分鐘後，經由不同 PVS2 處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 38.

表十七、比較抗凍劑濃度與處理時間對桉樹懸浮細胞，經冷凍保存後試驗結果。．．．．． 39.

表十八、大葉桉懸浮細胞，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 39.

表十九、比較抗凍劑濃度與處理時間對大葉桉多芽體，經冷凍保存後試驗結果。．．．．． 40.

表二十、大葉桉多芽體，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 40.

表二十一、台灣扁柏懸浮細胞，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 41.

表二十二、台灣扁柏多芽體，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。．．．．． 42.

中文摘要

本試驗以台灣扁柏 *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* 與大葉桉 *Eucalyptus robusta* 的芽體與懸浮培養細胞為材料，利用玻璃質化法進行超低溫保存之研究，並檢測 PVS2 的毒性、LS(loading solution)試驗及不同濃度的 PVS2 處理，以找出最佳的配方與處理方式，提高冰凍後細胞之活力。

大葉桉以 MS 培養基添加 0.5ppm BA 與 1ppm NAA 誘導多芽體，單一芽體平均產生 10 個芽，並以 5ppm 2,4-D 誘導癒合組織得到最佳結果；台灣扁柏以 WPM 培養基添加 0.5-1 ppm BA 時多芽體誘導率最高，以 NAA 5ppm 誘導癒合組織得到最佳結果。

將大葉桉懸浮細胞浸置 PVS2 溶液 15 分鐘以上會使活性降低至 35% 以下，但台灣扁柏懸浮細胞浸置 30 分鐘以上卻依然有 60% 以上的細胞活力；LN(loading solution)試驗則可降低 PVS2 對其懸浮細胞的毒性，使細胞活性經 PVS2 處理 15 分鐘後仍維持將近 60% 的活性。

先以 50%PVS2 處理大葉桉懸浮細胞 5 分鐘，再以 100%PVS2 處理 10 分鐘，細胞活力可以高達 68%，並能誘導出癒合組織生長，而芽體經 50%PVS2 處理 60 分鐘再以 100%PVS2 處理 60 分鐘，可使細胞活力高達 82%。而台灣扁柏多芽體先以 50%PVS2 處理，再以 100%PVS2 處理 60 分鐘，細胞活力可以高達 76%，並有 33% 的芽體能誘導出癒合組織。

Abstract

This study try to use cryopreservation by vitrification technique to experiment on *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* and *Eucalyptus robusta* buds and suspension cell culture. Then we test PVS2 toxicity、LS(loading solution) test and different concentration of PVS2 to find out the best formula to enhance of the cell viability after freezed.

The best result to induce buds of *Eucalyptus robusta* in MS medium with 0.5 ppm BA was to use 1 ppm NAA. The results showed that single bud could most effectly induce 10 buds and to induce callus with 5 ppm 2,4-D. And the best results to induce buds of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* in WPM medium with 0.5-1 ppm BA. And callus induction were to use 5 ppm NAA.

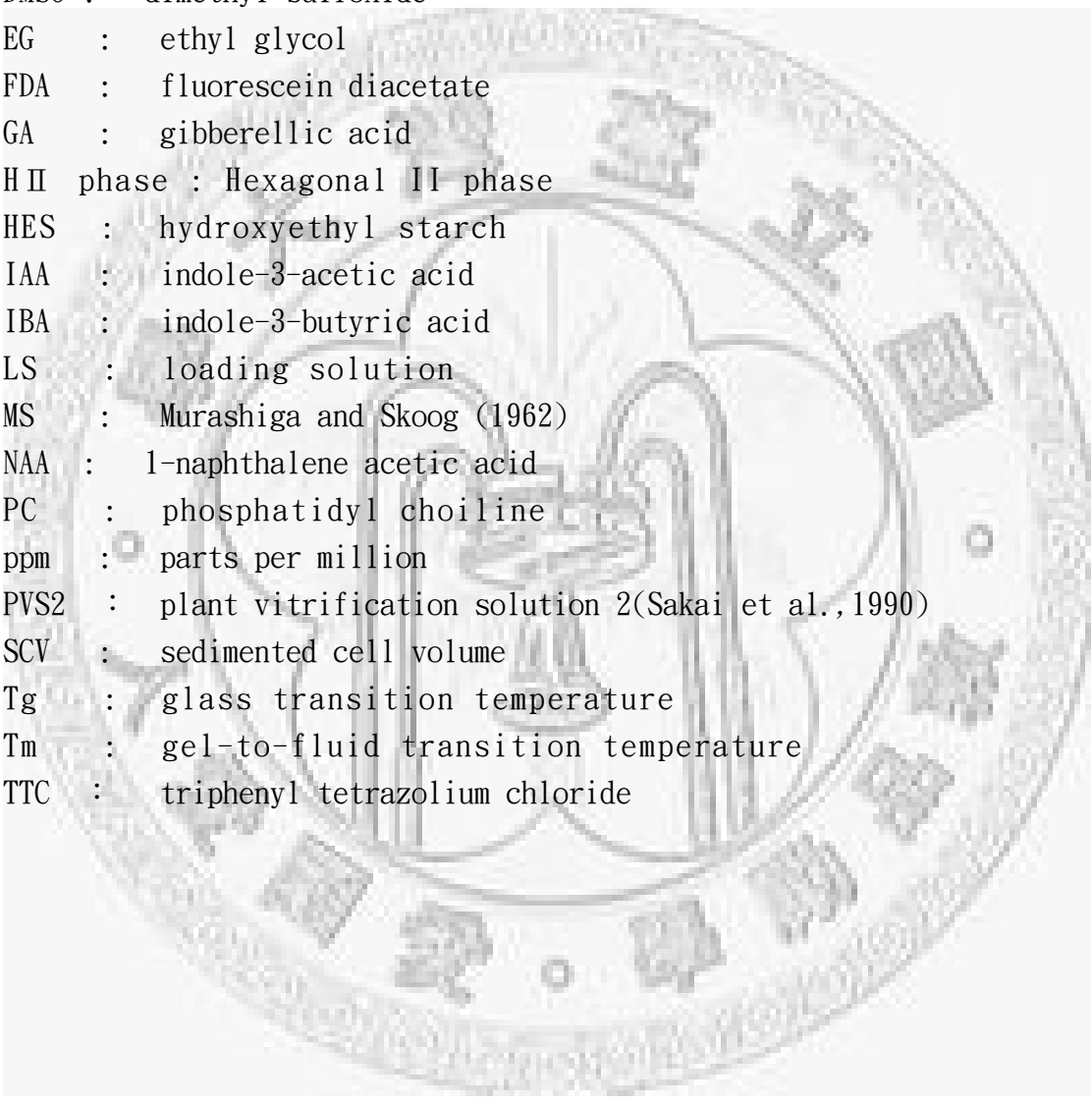
The *Eucalyptus robusta* suspension culture cell load in PVS2 solution over 15 minutes will decrease cell viability below 35%, but the *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* suspension culture cell load in PVS2 solution

will still preserve cell viability over 60% after 30 minutes. The *Eucalyptus robusta* suspension culture cell can preserve about 60% viability of cell by LS (loading solution) test and to decrease PVS2 toxicity by soaking in PVS2 solution after 15 minutes.

Take *Eucalyptus robusta* suspension culture cell with 50%PVS2 solution after 5 minutes and then with 100%PVS2 after 10 minutes will preserve the viability of cell over 68% and to induce the growth of callus. Take *Eucalyptus robusta* buds with 50%PVS2 solution after 60 minutes and then with 100% PVS2 after 60 minutes will preserve the viability of cell over 82%. Take *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* buds with 50%PVS2 solution after 60 minutes and then with 100% PVS2 after 60 minutes will preserve the viability of cell over 76% and make 33% buds induce callus.

縮寫字

(Abbreviation)



2,4-D	:	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
ABA	:	abscisic acid
BA	:	6-benzylaminopurine
DMSO	:	dimethyl sulfoxide
EG	:	ethyl glycol
FDA	:	fluorescein diacetate
GA	:	gibberellic acid
H II phase	:	Hexagonal II phase
HES	:	hydroxyethyl starch
IAA	:	indole-3-acetic acid
IBA	:	indole-3-butyric acid
LS	:	loading solution
MS	:	Murashiga and Skoog (1962)
NAA	:	1-naphthalene acetic acid
PC	:	phosphatidyl choline
ppm	:	parts per million
PVS2	:	plant vitrification solution 2(Sakai et al.,1990)
SCV	:	sedimented cell volume
Tg	:	glass transition temperature
Tm	:	gel-to-fluid transition temperature
TTC	:	triphenyl tetrazolium chloride

一、前言

臺灣扁柏(*Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*)為柏科(Cupressaceae)扁柏屬，台灣特有種，樹型高大，樹高可達35m，胸徑可達1m，分布在臺灣海拔1,300~2,900m山地，具有高度經濟價值，根據IUCN表(The World Conservation Union)評估為易受害(Vulnerable)需進行保護，而且台灣扁柏經初步抗癌活性測試，呈現陽性反應，具有甚高經濟價值；大葉桉(*Eucalyptus robusta*)則屬於桃金娘科(Myrtaceae)之桉樹屬，原產於澳洲、馬來群島等地，生長快速且適應力強，葉揉開具特殊氣味，適作行道樹、園景樹。桉樹之樹葉、嫩芽、果實或木材中，含有多種精油成分，醫藥用途甚廣，是以各國相繼引種推廣，栽植極為普遍，然而多以種子為繁殖材料，種子為有性繁殖之產物，遺傳性質較易發生變化，因此維持優良的遺傳種質甚為重要，需借助組織培養與種質保存技術。

植物種質保存方法依據保存之種原、目的及族群狀態不同，可分為下列幾種方式：

1. 現場保存法(*in site* conservation):種原保存於原生育地。
2. 離場保存法(*ex site* conservation):如種子基因庫(seed genebank)、花粉基因庫(pollen genebank)、營養系種質庫(clonal germplasm repository)。
3. 體外保存法(*in vitro* conservation):以組織培養技術，將小植株、器官、組織、細胞等，無菌保存於試管內。
4. 超低溫冷凍保存法(cryopreservation):將植物的部分器官或組織，經前處理及冷凍保護處理後，移入液態氮(-196℃)中保存。

然而超低溫保存法能最長期保存植物種質，且較為節省空間及人力，能維持細胞活力與再生能力、降低繼代培養次數及人為疏失所造成之污染機會、減少體細胞變異及供遺傳育種存利用。

論文研究主要以台灣扁柏與大葉桉為材料，進行組織培養試驗，利用培養出來的多芽體和懸浮細胞，進行玻璃質化法超低溫保存，探討不同處理及過程和條件，對超低溫保存後細胞或組織再生能力的影響，以期能找出適合的超低溫保存條件，有效的保存植物種質，並可以利用微體繁殖技術進行優良品系的大量培養，以及使用超低溫保存技術將之長期保存，並維持其遺傳穩定性，將可使台灣扁柏及大葉桉利用性大增，對未來研究有所助益。

二、 前人研究

(一) 桉樹微體繁殖系統

培養桉樹之組織培養始於 60 年代，初期多致力於小苗之癒合組織培養以及自癒合組織誘導器官再生，而後才漸轉移至芽體之大量增殖(Mc-Comb and Bennett 1986)、體胚誘導及原生質體之分離與培養等，等到建立了組織培養系，往往會因不斷繼代培養，種質可能產生變異(Panis, 1995)，因此需要超低溫保存技術，保存優良植物種質，下面將建立桉樹組織培養，所需分別敘述：

1、幼年期培植體(juvenile explant):

如：胚、子葉、胚軸或小苗之各部分器官，此等材料取得容易、乾淨、易消毒、分化能力較強，然胚或小苗皆自種子而來，乃有性繁殖之產物，故遺傳性狀較不易確保。

經由器官發生誘導植株再生之途徑有二，一為自培植體上直接誘導芽或根形成，二則經由癒合組織產生不定芽或不定根，帶節之莖段(nodal stem segment)為途徑一最常用之培植體，可誘導其側芽產生多芽體；胚、子葉與胚軸亦可直接誘導不定芽發生，Kitahara and Caldas(1975)發表之報告指出，白桉之小苗培養於添加椰子水及 1 ppm IAA 之 White 培養基中，可自胚軸處發生癒合組織，而後形成不定根，繼代培養兩個月後自根生芽而成完整植株，然該芽乃自小苗之側芽或分生組織而來，欲藉途徑二再生植株者，培植體有較多的限制，以胚、子葉、胚軸為培植體誘導的癒合組織一般具有較高的分化能力，若由成年植株培植體誘導的癒合組織通常分化能力受限制。

誘導器官發生之基礎培養基無特殊需求，最初認為椰子胚乳汁(coconut milk)為培養基中不可或缺之成分(Durand-Cresswell et al., 1982)，其後試驗發現，添加水解酪蛋白(casein hydrolysate)的培養基，或甚至只利用不同濃度的植物生長調節劑處理，亦可培養成功，Cytokinin 可誘導側芽大量發生，Auxin 則對芽之誘導無助益，然 Mehra-Palta(1982)以帶節莖段為培植體誘導器官時發現，Auxin 可促進芽的生長，但若濃度過高則不論芽體誘導率或芽體增值率皆會明顯下降。

癒合組織之誘導一般需藉 Auxin 處理，但如果 Auxin 處理時間過長或濃度過高，常會抑制形態發生的能力，故如進一步分化，需移至不含任何植物生長調節劑或僅含微量 Cytokinin 的培養基中，誘導不定芽發生(Sita 1979)，Mehra-Palta (1982)認為癒合組織誘導時添加微量 Cytokinin，有助於形成緊密、表面呈瘤狀突起且具分化能力的癒合組織。

在誘導芽體抽長為枝條方面，活性碳、鹽類濃度、植物生長調節劑及培養方式等四項為最常被測試及討論的因子：

(a)活性碳:Fantini and Graca (1985)與Wiecheteck 等人(1989)證實活性碳有助於芽體抽長，然 Graca and Mendes (1989)的試驗中卻發現添加活性碳會導致葉褐化及生長下降。

(b)鹽類濃度:Graca and Mendes(1989)發現，添加 GA3、活性碳、植物生長調節劑、氮源，或使用不同的鹽類成分，皆比將鹽類濃度減半(1/2MS)的效果為差，Mehra-Palta(1982)之試驗亦發現在鹽類濃度減半的培養基下，芽體抽長最佳。

(c)植物生長調節劑：GA 對芽體抽長的影響眾說紛云，隨樹種及試驗方法而異，正、負面的報告皆有，無一定論。Fantini and Graca (1989)、Rao and Venkateswara (1985)及 Sita and Rani (1985)等的試驗結果顯示 GA3 可顯著促進芽體抽長，然而 Graca and Mendes(1989) 與 Wiecheteck 等人(1989)認為 GA 對芽體生長有不利影響。Gupta et al.(1983)指出，將誘得之芽體移至含低濃度 Cytokinin 的培養基中，可以誘導芽體抽長 Sita (1979)則發現，將多芽體繼代培養至含微量 Cytokinin 與 Auxin 的培養基，芽之生長活力較佳，Mehra-Palta(1982)則認為不含 Cytokinin 的培養基較利於芽體的抽長，而添加 0.01ppm IBA 可使生長更佳，此外亦有不使用任何植物生長調節劑即達到抽長目地，如 Graca and Mendes(1989)的試驗。

(d)培養方式:Gupta 等人(1983)發現，由赤桉誘得之芽體在固態培養基上皆無法抽長，經嘗試改以懸浮培養，芽體在 30 天可長至 40-45mm，故對一些抽長不易的桉樹而言，懸浮培養為可行方式，此外在此階段莖及葉上常有癒合組織伴隨發生，3-4 週後芽的生長優勢會抑制癒合組織之生長(Rao and Venkateswara,1985)，有些則需將蔗糖濃度降至 0.25%才可克服(Mehra-Palta 1982)。

2、成年植株培植體(mature explant):

自成熟木取材培養，為組織培養上極為重要的方式，此確保優良性狀遺傳至後代的唯一途徑然由於材料來自野外，消毒不易，且成熟木之分化能力較差，故培養上困難重重。早期之試驗乃利用節(nodes)進行試管中之微體扦插(microcutting)，可得到較傳統插條法為高之發根率(McComb and Bennett 1986)，近年則多利用溫室培養的返幼年化苗為材料，一則降低污染率，一則提高分化能力。

一般而言，節為常用之培植體，然欲自培植體直接誘導側芽大量發生並不容易 Gupta 等人(1981)曾嘗試取二十年生檸檬桉之頂芽與側芽進行培養，利用低溫弱光(15℃, 500lux)預處理 72 小時後，移至

25°C, 500lux, 16hr 光照培養約三星期，芽稍伸展後，再置於液態培養基中震盪培養(120rpm, 500lux)，兩星期內約有 30% 的培植體可以誘得 5-8 個芽體，將這些芽體切離做為二次培植體(secondary explant)，可以大量誘導多芽體發生此乃污染率高、分化差之成熟木大量培養可行方式，Gupta 等人(1983)依此方法成功地建立了 11 年生赤桉成熟木的微體繁殖系統。而雪梨藍桉(蔡，1991)從野外採回的萌蘗以 BA 及 NAA 處理後，50% 可誘導出芽體。

(二)台灣扁柏微體繁殖系統

台灣扁柏的微體繁殖經蔡(1990)、黃(1991)的研究，已建立完整微體繁殖系統，將其研究結果分別摘錄如下：

1. 芽體誘導與分化

台灣扁柏成熟胚直接分化成芽體的適合培養條件：以 WPM 或 1/4MS 為基礎培養基添加 0.15~0.45 ppmBA，培植體可分化成不定芽。

2. 癒合組織之誘導及細胞懸浮培養

臺灣扁柏成熟胚放入培養基中一個月，即可形成不同的癒合組織，以 WPM 培養的癒合組織較緻密且易產生根，在 B5 及 1/2MS 培養者較鬆軟、不易生根。但是基礎培養基的種類對台灣扁柏癒合組織疏鬆度分化生根的能力及增生速度的影響不大，其主要的關鍵在於添加的種類及濃度，當 IBA 濃度提高到 8ppm、10ppm 時，雖能產生鬆軟的癒合組織但很快的分化出根來；2,4-D 及 NAA 在 2-4ppm 所誘導的癒合組織也極易分化出根，當 NAA 提高到 6ppm 時根即銳減，若為 10ppm 則無根發生，但其癒合組織卻變的緻密，而在 2,4-D 6ppm 時亦無根發生。因此以台灣扁柏成熟胚為培植體，適合以 6-8ppm 2,4-D、8ppm NAA 左右及 IBA 高於 10ppm 以上誘導產生大量癒合組織，組織的細胞團粒疏鬆、細胞質濃，以之建立懸浮培養，在 WPM 或 B5 添加 6、8ppm 2,4-D 的培養基中分泌物較多，約三週左右細胞結成大而緻密的團粒並開始褐化；培養在 WPM 或 B5 添加 8、10ppm NAA 的懸浮培養細胞則分裂快速、團粒疏鬆並維持乳白色。

(三)超低溫保存系統

超低溫保存的方式主要可分為兩種(薛,1994、吳,1997):

1、傳統超低溫保存法(Conventional cryopreservation)

其特色為兩段式的降溫過程，培植體經過處理後，以一定的降溫速率至零下溫度，多在 $-30\sim-50^{\circ}\text{C}$ 之間(Kartha,1985)，在此溫度下放置一段時間後，再放入液態氮中儲存，其原理是利用程式冷凍器來進行兩段式降溫，目的是控制細胞適度的脫水，使水自細胞內釋出，所以速率不可以太快，以免細胞失水太多，但是速率如果太過緩慢，在降溫過程中反而會使細胞內形成冰晶，所以降溫速率的控制，為本法保存的關鍵。

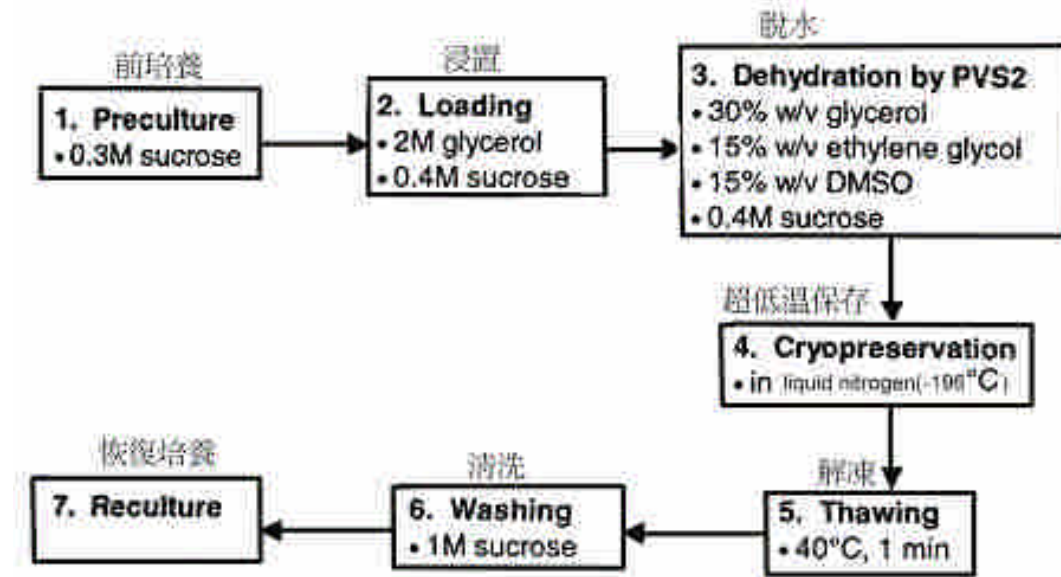
2、玻璃質化法(Vitrification)

其特點是加入高濃度的冷凍保護劑，取代傳統超低溫保存法，以降溫速率的控制來進行脫水反應，其滲透性的冷凍保護劑可進入細胞內，使細胞內的溶液在超低溫下固化成玻璃狀態不會產生冰晶(Fahy et al.,1984)。這樣的情況在熱力學上為不平衡的狀態，但是只要在 -140°C 之下相當穩定。此法在操作上方便很多，所以玻璃質化法比起傳統保存法更有如下的優點(Steponkus,1992)

- a. 可以保存組織較複雜的器官，其內含有各種形態的細胞，所以對脫水上有不同的要求，而玻璃質化法較傳統法提供了保存上更大的潛力。
- b. 因操作較不複雜，所以在施用過程中可變化的能力就更寬廣，即使是不同形式的細胞，只需小幅度的調整就好。
- c. 因降溫速率快，可施用低溫敏感的作物。
- d. 不需要額外的降溫設備(Steponkas,1992)但是所使用的抗凍劑濃度較高，容易對培植體造成損害(Fahy et al.,1984)。

(四)玻璃質化法超低溫保存之流程

植物細胞超低溫冷凍玻璃質化法的具體的操作流程，包括取材和預處理、凍存、化凍、活性檢測和恢復生長(圖一)。



圖一、玻璃化法進行超低温保存的步驟(Yoshimatsu et al., 2000)

1、取材：

植物的種類、品種、培植體的形式，會因抗凍能力不同而影響保存方式、保存後的活力，即使是同一種植物，因品種不同其遺傳組成不同，而抗凍能力也有所差別(Kartha, 1985)。例如 油椰子的體胚，不同品種含水量不同，所以保存後的存活力會有差異(Dument et al., 1993)。

組織培養用來保存的培植體其種類很多，保存的過程各不相同，以體胚而言，不同時期的體胚其含水量、大小就不一樣，所以體胚的成熟度也會影響保存能力，通常以球形胚和心臟期胚較易保存，而完全分化好的胚其保存力較差(Kartha, 1985)，不過也因物種而會有差異，如胡蘿蔔體胚以十五天的胚最能忍受乾燥處理(Iida et al., 1992)。

2、預處理：

在培植體冰凍前給予一些前處理以增進保存能力，常用的方式有三種：

a. 脫水法

釋出組織內的自由水，以免進行保存時形成具有傷害性的冰晶，在脫水時要注意避免失水過度，造成組織生理上的損害(Dument et al., 1993)，使組織脫水的方式很多，不同的培植體其適合的脫水方式也不一樣，以有性胚而言，較能忍受快速的脫水型式，如枸橘(Poncirus trifoliata)的胚軸(Radhamani and Chandel, 1992)在無菌操作臺(laminar flow)下風乾 4 小時後的抗凍能力最好。體胚的

脫水方法則是在培養基中加入 ABA (Edward et al., 1993)、抗凍劑 (Kartha et al., 1982)、滲透調節劑 (Gnanapragasam and Vasil, 1990) 或是提高蔗糖濃度，以減少細胞內自由水的含量，添加合適濃度的糖醇類物質，以水稻胚性懸浮細胞為例 (王和黃, 1997)，添加山梨醇的預培養能降低細胞自由水含量，提高束縛水比例，自由水含量的減少，可以降低胞內冰晶形成的數目和形成速度，束縛水含量的提高，可以防止細胞過度脫水，保護蛋白質的結構和功能凍存，或是外施乾燥劑 (Nag and Street, 1975)，如矽膠 (silica gel) 類等以緩慢脫水的方式，可使水自組織內部釋出，達到均衡脫水的目的。

b. 冷馴化

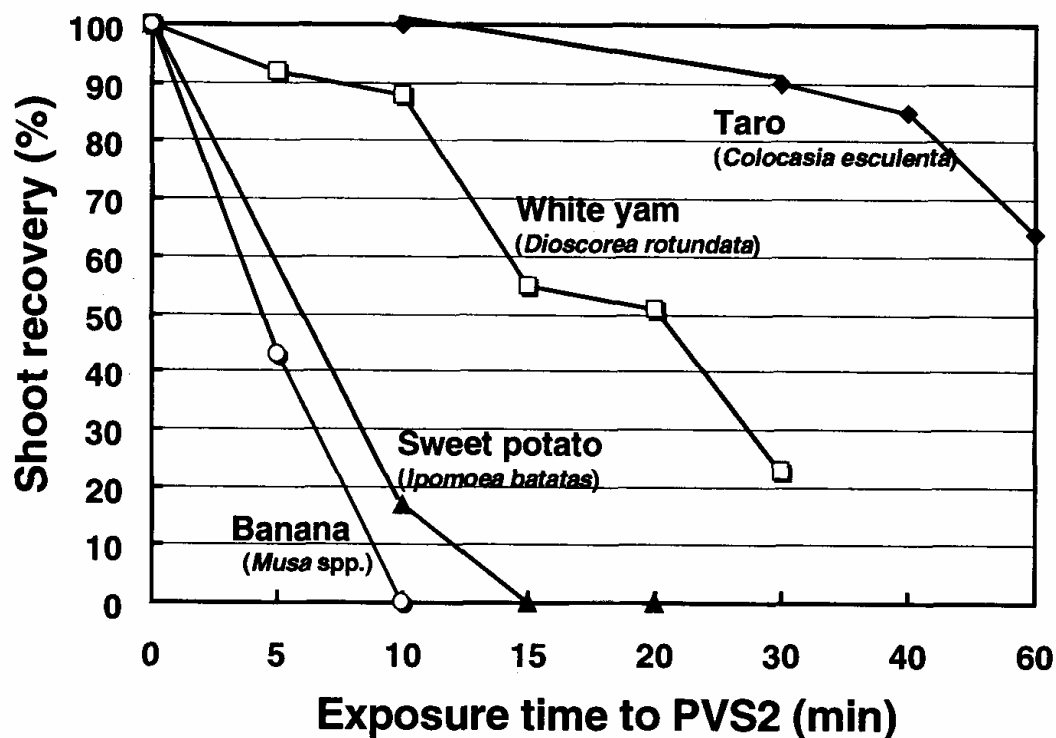
先給予低溫冷馴化處理，有助於存活力的提升，Reed 取梨的頂端分生組織放在 -1°C 下處理一星期後再保存，存活率確有增高的現象 (Reed, 1990)。

c. 冷凍保護劑

在 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的低溫下會使細胞代謝失常， 0°C 以下就會使細胞結構發生損害 (Kartha, 1985)。所以，欲避免細胞在保存過程中受到低溫的傷害，就需要加入冷凍保護劑來保護細胞 (Kartha, 1985)。冷凍保護劑依其滲透能力，可以分為兩種：通常分子量低，中性，可以滲透到細胞內部的，為可滲透性藥劑 (penetrating cryoprotectant)，如 DMSO (dimethyl sulfoxide)、menthanol、glycerol acetamide。而化合物如 glycerol、sucrose 無法滲入細胞內部，為不可滲透性藥劑 (non penetrating cryoprotectant) 兩者的抗凍機制是不同的，可滲透性藥劑防止細胞過多的水份釋出，造成細胞質濃度提高而導致細胞萎縮，使組織仍保有膜的完整性，同時抑制細胞內冰晶生長，不可滲透性藥劑可使細胞脫水，並減少細胞外冰晶的發生 (Kartha, 1985)。不同的植物、培植體所適用的冷凍保護劑種類、濃度、及加入保護劑的溫度、時間長短也會有差別，如 Chen et al., (1985) 以小麥的細胞和癒合組織分別使用不同濃度的 DMSO、蔗糖、清涼茶醇 (sorbitol) 之組合。

通常冷凍保護劑具有毒性，所以要注意施用的條件，如果處理時間太長，對培植體會有毒害的效果，如若放置的時間不足，則冷凍保護劑沒有防護效果 (Kartha, 1985)，使用多種保護劑比單用一種效果要好，可以減緩毒性，並兼具多種保護劑的功能 (Chen et al., 1985, Uemura and Sakai, 1980) 如日日春的細胞以清涼茶醇 (sorbitol) 和 DMSO 混合使用要比個別使用清涼茶醇 (sorbitol) 或 DMSO 的效果要好。由圖二可看出，不同植物、不同培植體對冷凍保護劑毒性抵抗力

不同，所以要選擇最適當的冷凍保護劑，才能有效的保存植物，如果選擇不適當的抗凍劑處理培植體或處理時間超出植物體所能承受的範圍，將直接毒死植物而沒有任何保存的效果。



圖二、冷凍保護劑對一些熱帶作物莖頂接觸時間與恢復率的關係。(Takagi, 2000)

3、凍存

樣品用高濃度的複合冰凍保護劑(玻璃化保護劑)處理後，快速投入液態氮儲存此時冷凍速度達 $10000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ，由於使用高濃度冰凍保護劑進行某一程度脫水，故即使在細胞內引起結晶也不會太大(上野洋一郎等, 2000)。目前較為常使用的冰凍保護劑組成，大部分都以 DMSO 和 glycerol 為主要成分，並增加蔗糖濃度用於脫水，通常還會添加適當培養基基本鹽類，再調整 pH 值。

4、化凍：

解凍回溫的速率要快，以便快速通過冰晶帶，避免再度產生冰晶，造成對細胞的二度傷害，通常解凍回溫的溫度多在 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 之間，多採水浴的方式，如果有使用冰凍保護劑，在解凍回溫後要快速洗滌，通常以含 1.2M 蔗糖培養基於 25°C 下洗滌 10~20 分鐘(Kohmura et al., 1994)。

5、活性檢測

測試細胞活力的染劑種類，因植物的不同、細胞種類、細胞時期或毒害方式(例如冷凍方式)，所使用之染劑種類也不同(Widholm, 1972)，一般常用的方式有 FDA(fluorescein diacetate) 螢光染色法檢定法和 TTC(2, 3, 5-triphenyltertrazolium)檢定法，FDA 染色後活性強的細胞呈較深的螢光，反之螢光較淺的細胞活力較弱，TTC 染色法原理為，具活力之組織或細胞會不斷地進行呼吸作用，而使 TTC 進入植物體內，被活植物體內脫氫酵素(dehydrogenase)所還原，形成不能溶解之紅色沈澱物 formazan，在死亡的細胞中則不發生反應仍維持無色，於光學顯微鏡下觀察活的細胞呈紅色。超低溫保存後，化學染劑可快速檢定細胞的活性，但只是細胞活性程度的表示，不一定能肯定細胞是否有再生能力，需以生長試驗來證明(Reinhoud et al., 1995)。

6、恢復生長

解凍後恢復培養環境是很重要的，為了恢復細胞活力，改善保存後細胞之再生長情形，有時會在恢復生長培養基中添加一些物質，如 1 g/L 的活性碳或降低培養基中生長調節劑，有助於恢復原生質體及懸浮細胞的活力(Dussert et al., 1992)。

(五)影響玻璃質化法之因子

影響玻璃質化超低溫保存法之因子有許多，將分別於下面數項討論：

1、材料性質與細胞培養狀況

保存體(preservant)種類有原生質體、懸浮細胞、癒合組織、莖頂、生長點、體胚等，根據植物材料性質不同，實際的超低溫保存程序上有所差異。同一作物，品種不同，其遺傳組成不同，故細胞的組成分也不同，因而抗凍能力亦有所差別。即使是同一種植物，不同的組織型態，保存所需的條件也會不一樣，因為本身細胞的生理狀況會有差異(Kartha, 1985)。

植株的株齡亦是影響冷凍保存存活率的重要因子，但對於植株年齡大小的選擇，至今仍有不同的說法。Engelman(1991)提出需使用年輕植株之莖頂作為超低溫冷凍保存的材料，其原因在於年輕植株之莖頂具有體積小、液泡少、細胞質之密度高，細胞核比例大等優點，又由於液泡少，故細胞內水分也較少。由於上述特點，年輕植株之莖頂在超低溫冷凍保存進行時，有較高的耐凍性，且較不易形成冰晶。但 Takagi 等人(1997)則提出需使用成熟植株之莖頂作為超低溫冷凍保存材料的說法，其在芋頭之超低溫冷凍保存的實驗中發現，使用株齡 1 星期與 1 個月的莖頂，其存活率約為 45%，使用株齡於 2 個月

的莖頂，其存活率約為 63%，使用株齡 3 個月的莖頂，則存活率增加為 75%。認為成熟植株具有碳水化合物累積量充足、器官生長於活躍階段等優點，而較具有對抗逆境之能力。並認為年輕植株之莖頂太小、太過於幼嫩，而不適合用來進行超低溫冷凍保存實驗。

2、預培養

高濃度蔗糖前處理可使細胞質濃縮，減少細胞含水量，進而提升材料忍受脫水之能力與降低超低溫冷凍之下產生冰晶之機會，減少細胞傷害。Kuranuki 與 Sakai(1995)以茶樹莖頂為材料進行不同濃度之高濃度蔗糖培養基進行預培養，發現以 0.2M 蔗糖培養基健化茶樹莖頂之超低溫冷凍保存存活率明顯高於其他蔗糖濃度培養之材料。Pennycooke 與 Towill(2000)以甘藷莖頂為材料，配合 0.3-1.0M 蔗糖液體培養基預培養後進行 PVS2 玻璃質化法冷凍保存，得到結果為：經 0.3M 蔗糖培養基預培養之莖頂冷凍保存後回復生長率最高，並提出 0.3M 濃度之蔗糖預培養可以廣泛應用在玻璃質化冷凍保護流程，增加材料對冷凍保護劑之耐性。

3、LS(loading solution)處理

很多研究顯示，若將不耐脫水之細胞與莖頂，直接處理抗凍劑，會造成劇烈的滲透逆境與化學傷害。Towill 與 Jarret(1992)將甘藷莖頂直接處理 PVS2，造成莖頂全數死亡，但若先處理低濃度的抗凍劑，則能減輕其傷害。目前已有許多熱帶作物利用低濃度抗凍劑 LS 配合 PVS2 處理，達到其超低溫冷凍保存之目的。

Matsumoto 等人(1998)發現當劇烈脫水時，累積於原生質周圍空間的 LS，可減緩細胞所受到的機械逆境。根據此理論，在 Pennycooke 與 Towill(2000)的甘藷超低溫冷凍保存實驗中，LS 處理 20 分鐘，PVS2 處理 10 分鐘，存活率可達到 50%，LS 處理 60 分鐘，PVS2 處理 16 分鐘後，可得 66%之存活率，顯示 LS 與 PVS2 的處理時間應作良好搭配，才能達到最佳存活率。

LS 如何降低 PVS2 毒性的效用？Pennycooke 與 Towill(2000)以 LS(2M glycerol+0.4M sucrose in MS medium)處理甘藷莖頂後，使得冷凍保存存活率大大的提升，並證實了甘藷莖頂即使以 LS 於 25℃ 下處理至 3 小時，仍未產生任何傷害。Langis 與 Steponkus(1990)為最早建立 Loading solution 應用於超低溫冷凍保存之學者，他們以高濃度 EG(ethyl glycol)水溶液對裸麥原生質體(protoplast)進行處理，使 EG 與材料間產生平衡以增加材料對冷凍保護劑滲透逆境的忍受能力，並稱此一過程為"loading"，使得後人衍生出以相似配方之高濃度溶液進行處理，發展至今最為廣泛使用的配方即為甘油加上蔗糖後之 LS，而甘油與蔗糖的比例可依材料的需要而有所不同。

4、冰凍保護劑處理

Fahy(1986)歸納出冷凍保護劑毒性與低溫傷害之間的關係：(1)低溫會造成膜通透性增加，提昇溶質進入細胞的效率，此現象稱為"solute loading"，與冷凍保護劑具有強滲透力現象相同。(2)低溫下膜系極性(polarity)會發生改變，造成膜系傷害，而冷凍保護劑也會改變細胞環境(cellular environment)，亦造成膜系極性改變。(3)在某些情況下，冷凍保護劑可能會促使膜系之間產生膜融合(fusion)現象，與低溫下膜系因脫水而融合的現象相同。Jitsuyama 等人(1997)以 glucose 處理甘藍葉肉組織後，發現葉肉細胞膜系因質離作用而減少膜系緊密並列現象(close apposition)的發生頻率，指出細胞質離現象對於液態氮保存後之植物材料具有減緩因回溫後細胞壁解體產生之機械性傷害的功能。Matsumoto 等人(1998)指出：材料進行 PVS2 冷凍保護處理前，先以高濃度溶質於常溫下處理，避免材料突然接觸高濃度冷凍保護劑急劇脫水產生滲透逆境，來提升材料對 PVS2 之忍受能力，進而提高冷凍保存後之存活率，此觀念正與 LS 處理目的相同。Matsumoto 等人(1998)以芥末(wasabi)莖頂為材料，將莖頂以 LS 處理後利用 PVS2 脫水進行超低溫冷凍保存得到高達 95% 之存活率，並指出 LS 之主要功能在於(1)提升膜穩定性(2)調整嚴重脫水下細胞結構。Thinh 等人(1999)指出香蕉莖頂對 PVS2 極為敏感，但在冰浴(0℃)下處理 PVS2 可使冷凍保護效果提昇，顯示暫時性低溫處理材料可促進對 PVS2 毒性之忍受能力，其作用原理為依照 van't Hoff's law，低溫下 PVS2 的滲透壓下降而降低其毒性，使得 PVS2 的有效脫水時間延長、達到冷凍保護的目的。

5、可溶性醣類累積

Vandenbussche 等人(1999)提出細胞內含糖量增加將有助於細胞忍受脫水逆境、促進超低溫冷凍狀態下玻璃質化的產生，其原因為：醣類具有穩定細胞膜系磷脂質與蛋白質的功能，細胞原生質膜系磷脂質(phospholipid)主要組成份為 PC(phosphatidylcholine)，由於磷脂質能夠自由流動，使得原生質膜具有半透性，得以維持生物基本生理代謝，但進行超低溫冷凍保護過程(如：LS 處理、PVS2 脫水)或材料置入液態氮時，會造成細胞水分大量流失，導致膜系磷脂質之親水性端(hydrophilic polar)相互靠近擠壓，此時當溫度下降至膜轉換溫度(gel-to-fluid transition temperature, T_m)將使原本具有半透性之流動態(liquid phase)原生質膜呈現失去半透性之膠狀態(gel phase)(Wolfe and Bryant, 1999)，更甚者，在嚴重脫水下磷脂質親水端被僅存之極少量水分子牽引而解體並重新排列，形成疏水端(hydrophobic polar)外露之不具通透性的 HII phase(Hexagonal II phase)，使得膜系在恢復給水後再度發生磷脂質排列而造成膜嚴

重破裂與滲漏。Koster 等人(2000)以人工合成之 PC 製作成小囊泡，添加 glucose、sucrose、trehalose、raffinose 等醣類成為懸浮液，經脫水後進行低溫冷凍、回溫後發現醣類可以減低小囊泡在低溫下產生 HII phase 的機率，其原因為(1)可溶性糖分子在常溫下可存在於膜系表面，當脫水現象產生時糖分子仍可藉由氫鍵 (hydrogen bond) 的力量存在於膜系之間，並因為脫水而使得糖溶液濃度增加，隨溫度快速降低而產生非結晶性之玻璃質化現象，使 T_m 下降達到維持膜系流動態的效果(2)糖分子包圍磷脂質親水端，取代了脫水狀態下水分子的位置，防止磷脂質相互擠壓與重新排列，有效抑止 HII phase 發生。但並非所有醣類皆可形成有效的玻璃化物質保護膜系，Oliver 等人(1998)經實驗證明大分子醣類，如:HES(hydroxyethyl starch)便無法有效保護脫水下的液泡，而小分子醣類如:glucose 雖然可以輕易的存在於膜系之間，但由於 glucose 分子量過小，玻璃質轉換溫度(glass transition temperature, T_g)過低(Koster et al., 2000)，無法在膜系嚴重脫水產生融合現象之前進行玻璃質化作用，對於脫水、低溫下膜系不具有有效的保護作用，結果以 sucrose、trehalose 最能夠符合玻璃質化過程所需，不過 trehalose 使用成本過高，且保護效果相較於蔗糖並無明顯差異，因此，以蔗糖進行預培養促進可溶性醣類累積，及外加蔗糖進行冷凍保護對於超低溫冷凍保存來說是較為經濟實用。

6、可溶性蛋白質累積

Shibli 等人(2001)將紫花苜蓿(alfalfa)懸浮培養細胞以藻膠包埋法後，進行 0.75M 高濃度蔗糖預培養，發現細胞之蛋白質有累積的情形。

Kurkela 與 Franck(1990)以阿拉伯芥為材料觀察其滲透逆境下產生之蛋白質累積現象，發現該蛋白質與低溫逆境及 ABA 誘導產生之蛋白質類似，並且和魚類抗凍蛋白(antifreeze proteins; AFPs)相類似，將含有此蛋白質之懸浮溶液以階段性降溫系統配合顯微鏡觀察，發現含有此蛋白質之懸浮液其低溫下冰晶形成受到抑制，AFPs 作用原理為低溫下水分子聚集形成冰晶初期，抗凍蛋白附著於初期冰晶之上，隨溫度降低，抗凍蛋白修飾冰晶形成外型，成為雙六角錐狀且阻止冰晶繼續增長，相反的在一般不含抗凍蛋白之水溶液中隨著溫度的降低，冰晶朝水平方向擴大，形成圓板狀的巨大結晶，且有繼續增長的趨勢(Wang, 2000)

但目前為止與滲透逆境下產生抗凍蛋白的相關研究極為缺乏，絕大部分研究均傾向於低溫冷馴化誘導方式促進材料產生 AFPs，但對於低溫敏感性作物，需透過冷馴化以外的方式來誘導抗凍蛋白累積，以獲得超低溫冷凍保存之成功。

根據目前研究結果發現，分析滲透潛勢、可溶性醣類與可溶性蛋白質含量三者變化趨勢後發現，滲透潛勢的改變趨勢可能主要受到蔗糖含量之影響，而可溶性蛋白質的增加雖對於滲透潛勢之改變趨勢有些微的影響，但非主要之影響因子，滲透逆境下所誘導產生的蛋白質，可能為抗凍蛋白 (Wang, 2000)或 ABA 反應蛋白(abscisic acid-responsive protein;RABP)(Luo and Reed,1997)，其功能角色應是在冷凍保護上，而非滲透調節上。

(六)玻璃質化法植物生理反應及細胞改變

1、生理反應

在超低溫冷凍保存的過程中，植物遭受到嚴厲的低溫逆境以及低溫所誘導產生的脫水逆境，因此，植物是否具備耐凍性與耐旱性，為冷凍保存成功與否的重要關鍵。溫帶植物利用冷馴化過程提高植物的耐凍性與耐旱性，以利進行超低溫冷凍保存的進行，但大部分的熱帶植物由於其不耐低溫的生理特性，而無法利用冷馴化過程提高植物的耐凍性與耐旱性，為了完成熱帶植物的超低溫冷凍保存，利用高濃度的滲透物質作為冷凍保存前的處理，藉由其所造成的滲透逆境來誘導植物產生耐凍性與耐旱性(Gropitetsch et al.,1999)

很多植物在面臨環境逆境時，組織內會大量累積 sucrose，包括缺水逆境、鹽分逆境與低溫逆境。Wang (2000)發現，甘藷懸浮細胞在 0.6M sorbitol 滲透逆境下，會產生大量 sucrose，且 sucrose phosphate synthase(SPS)的活性也會明顯地增加，SPS 為合成 sucrose 的主要酵素，在 sucrose phosphate phosphatase(SPP)共同作用下，會不可逆的累積 sucrose，故認為在滲透逆境下，由於 SPS 的活性增加，而導致 sucrose 的大量累積。在滲透逆境下，sucrose 扮演著滲透調節、穩定膜系與蛋白質、冷凍保護的角色，在滲透調節上，sucrose 可維持細胞質、液泡與培養基之間滲透物質的平衡(Swan et al.,1999)，在穩定膜系上，sucrose 可與生物膜的磷脂質極性端產生氫鍵鍵結，取代水的位置，另一方面，sucrose 濃度增加可降低膜系形成 HII phase 的溫度，而避免 HII phase 產生，在穩定蛋白質上，sucrose 可取代蛋白質結構上與水鍵結的住置，防止蛋白質變性(Crowe et al.,1990)。在冷凍保護上，sucrose 濃度增加可降低同質成核結晶作用之溫度，提高玻璃化轉換溫度，進而避免冰晶形成並促進玻璃化產生(Wowk et al.,2000)。

Hitmi 等人 (1999)以高濃度蔗糖處理除蟲菊(*Chrysanthemum cinerariaefolium* L.)懸浮細胞，發現除了造成雙醣(sucrose)含量增加外，單醣(glucose 與 fructose)的含量亦增加。Olive 等人(1998)

發現，當膜系脫水時，加入雙醣可提高 Tg(玻璃化轉換溫度)值，並降低 Tm(膜相轉換溫度)值至 Tg 值以下，可使膜相在尚未轉換成膠態時，即達到玻璃化的狀態，可避免膜系因脫水而造成的傷害，而加入單醣亦可提高 Tg 值，降低 Tm 值，但其改變程度皆不及雙醣，故其保護膜系的能力則較差。在滲透逆境下，除了有醣類的累積外，尚有其它變化，包括細胞體積縮小，細胞內水分減少，非冷凍水(unfrozen water)的增加，出現質壁分離的現象，ABA 與 proline 的產生，以及新的蛋白質合成等變化(Hitmi et al., 1999)，而這些改變並非是絕對的，需視植物滲透調節的能力而定。

不同濃度蔗糖之滲透逆境誘導植物耐凍性與耐旱性的程度，將進一步導致冷凍保存後有不同之存活結果，過高的蔗糖濃度會導致水分大量移出細胞，造成細胞質濃縮，導致 pH 值改變，電解質增加，以及大分子間產生交互作用，此外也會造成蛋白質變性與膜系改變，反而導致植物死亡(Swan et al., 1999)。過低的蔗糖濃度，雖亦會累積 Sucrose、ABA 或 proline，但其累積量卻不足以保護植物對抗更劇烈的逆境，此外過低的蔗糖濃度會造成脫水不足與非冷凍水不足，導致冷凍保存進行時形成冰晶。

2、玻璃質化法後細胞改變

植物細胞經過高濃度蔗糖培養基預培養後、可使細胞質濃縮、減少細胞含水量，進而提升材料忍受脫水之能力，提高玻璃質化法超低溫保存存活率，因此瞭解高濃度蔗糖預培養後細胞改變，有助於提高玻璃質化法成功機會。

經玻璃質化劑處理過後，植物細胞將能於液態氮嚴重逆境環境下存活，玻璃質化劑使細胞構造的改變，將左右超低溫保存存活率，在 Helliot 等人(2002)的試驗中，將香蕉莖頂分生組織(highly proliferation)，以 0.4M sucrose in MS medium 預培養兩週後，經 0°C PVS2 處理 2 小時，產生了質壁分離現象，嚴重的質壁分離將導致細胞內聯繫斷裂。植物細胞經玻璃質化法超低溫保存後，細胞內部構造改變，經細胞染色後，顯微鏡觀察，可以判別細胞的存活，回復後的細胞較小，且存活的細胞有一定數量的胞器比例，有較旺盛的代謝能力，在細胞冰凍與解凍回復後，electron-dense granules 將累積於液泡中，這可能表示具毒性的多酚類物質累積於液泡中，香蕉組織中大部分的多酚類會隨細胞在大量分化的狀況下，將多酚類物質快速氧化，受嚴重傷害喪失分化能力的細胞，細胞組成構造將被分解。

三、材料與方法

(一)材料

(1) 大葉桉

2001、2002 年春季間採自台灣大學校總區大葉桉之萌蘖。

(2) 台灣扁柏

2000 年採自棲蘭山之成熟毬果，經脫粒後種子儲存在 -70°C 冰箱。

(二)方法

1、大葉桉組織培養

(1)培植體表面消毒

選取健康無病蟲害之萌蘖，以安期消毒液【Anticeptol solution 成分：Benzelthyonium chloride U.S.P 10 % (w/v)、Alkyl arylpolyther alcohol 10%(w/v)】稀釋五百倍清洗，然後再將萌蘖切成 2-4cm 之小段，於 70%酒精浸泡 30 秒，而後以次氯酸鈉(NaOCl)消毒，並置於超音波震盪器震盪，最後以無菌水沖洗 4 次。

比較次氯酸鈉溶液(含 0.1%(v/v) tween20)不同濃度與處理時間：

- a. 2% NaOCl 20 和 30 分鐘
- b. 3% NaOCl 20 和 30 分鐘
- c. 4% NaOCl 20 和 30 分鐘

消毒後材料在無菌操作台中切成 1-2cm 長接種於誘導培養基。

(2)培養基

以 MS (Murashiga and Skoog 1962) 為基礎培養基，所有培養基皆以 0.1N NaOH 與 0.1N HCl 調整 pH 值至 5.7，固體培養基則添加 0.7% Bacteriological agar 做為支撐物，培養基分裝後於 121°C、 1.2 kg/cm^2 高溫高壓下滅菌 15 鐘。

培養基中植物生長調節劑之處理依培養目的的不同進行各項試驗如下：

a. 誘導萌蘖之莖段發生培養基

以 MS 為基礎培養基添加 Auxin 與 Cytokinin: 1ppm NAA(1-naphthalene acetic acid) 與 0.5ppm BA(6-benzylaminopurine)，以 50ml 三角瓶分裝，每瓶 30ml。

b. 多芽體之增殖培養基

以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度的 Auxin(BA):0、0.5、1、5ppm，進行試驗，另外再加入 0.5ppm BA 與不同濃度 NAA:0.5、1、5 ppm 之組合，以直徑 9cm 塑膠培養皿分裝，每個 20 ml。

c. 癒合組織誘導與生長培養基

以 MS 為基礎培養基，添加 NAA、2, 4-D 與 BA 不同濃度之組合如下表(表一)，以直徑 9cm 塑膠培養皿分裝，每個 20 ml。

表一、MS 培養基添加 BA 與 2, 4-D 不同濃度之組合表。

培養基代號		2, 4-D(ppm)		
		0.1	1	5
BA (ppm)	0	BD1	BD2	BD3
	0.1	BD4	BD5	BD5
	1	BD7	BD8	BD9
	5	BD10	BD11	BD12

d. 懸浮細胞培養基

以 MS 為基礎液態培養基，添加不同濃度 2, 4-D:1ppm、3ppm、5ppm，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 50ml。

(3)培養環境

培養室條件為 25℃ 恆溫，光照強度約為 25 μ E/m²/s，光週期 16 小時。液態培養者亦為同一溫度，弱光下，以水平迴旋式震盪器震盪培養，轉速維持 120 rpm。

(4)試驗方法

a. 多芽體之誘導與增殖

將萌蘖之莖段誘導出的芽體為培植體，放入多芽體之增殖培養基中，每個培養皿放入四個培植體，二十天後，用實體顯微鏡計算其芽體數量，並觀察紀錄之。

b. 癒合組織誘導與生長

將誘導出的芽體或癒合組織的萌蘖莖段為培植體，切取適當大小，放入癒合組織誘導與生長培養基中，每個培養皿放入六個培植體，觀察其生長，十五天後計算其誘導率。

c. 細胞懸浮培養

取約 4g 之癒合組織切碎，置於 50ml 的液態懸浮細胞培養基中，培養十天後過濾去除大顆粒細胞團，過篩 30-60 目(mesh)(0.56X0.42mm)，再進行繼代培養，並以 SCV(sedimented cell volume)法測量細胞生長曲線。

(5)統計分析

本試驗以完全逢機設計，進行多變異數分析，如處理間達顯著水準($\alpha=0.05$)，在使用鄧肯氏新多變域檢定法(Duncan's new multiple range test)比較。

2、台灣扁柏組織培養

(1)表面消毒

處理步驟如下

a. 將台灣扁柏成熟種子進行流水處理兩天

b. 以 70%酒精浸泡 30 秒

c. 再以 2%次氯酸鈉水溶液(含 2%NaOCl +0.1%(v/v) tween20)
消毒 30 分鐘，同時以超音波震盪器震盪

d. 最後以無菌水沖洗 4 次

c. 於無菌操作台下，進行剝胚。

(2)基礎培養基

以 WPM (Loyd and McCown 1980)為基礎培養基，所有培養基皆以 0.1N NaOH 與 0.1N HCl 調整 pH 值至 5.2(WPM)，固體培養基則添加 0.7% Bacteriological agar 做為支撐物，培養基分裝後於 121℃、1.2 kg/cm² 高溫高壓下滅菌 15 鐘。

(3)試驗項目

培養基中植物生長調節劑之處理依培養目的的不同進行各項試驗如下：

a. 胚培養

將消毒過後的種子，經過剝胚後置入 WPM 不同濃度的生長調節劑中，觀察其生長，其種類及濃度如下表(表二)，以直徑 9cm 塑膠培養皿分裝，每個 20 ml，每個培養皿放入四個胚，每種處理六個培養皿。

表二、WPM 培養基添加 BA 與不同濃度 NAA 及 2,4-D 之組合表。

培養基代號		NAA(ppm)			
		0	0.5	1	5
BA (ppm)	0	BN1	BN2	BN3	BN4
	0.5	BN5	BN6	BN7	BN8
	1	BN9	BN10	BN11	BN12
	2,4-D(ppm)				
	0	—	BD2	BD3	BD4
	0.5	—	BD6	BD7	BD8
	1	—	BD10	BD11	BD12

b. 懸浮細胞培養

以 WPM 為基礎液態培養基，添加不同濃度 NAA:1ppm、5ppm，取約 4g 之癒合組織切碎，置於 50ml 的液態懸浮細胞培養基中，培養十天後，過篩 30-60 目(mesh)(0.56X0.42mm)去除大顆粒細胞團，進行繼代培養，並以 SCV(sedimented cell volume)法測量細胞生長曲線。

(4)培養環境

培養室條件為 25°C 恆溫，光照強度約為 25 μ E/m²/s，光週期 16 小時。液態培養者亦為同一溫度，弱光下，以水平迴旋式震盪器震盪培養，轉速維持 120 rpm。

3、超低溫保存試驗

(1) 浸置不同濃度 PVS2 試驗

選取生長良好的懸浮細胞，先去除細胞培養基，再加入不同濃度 20 %、50 %、80 %、100 % 之 PVS2 溶液(培養基本鹽類+30 % (w/v)glycerol 30 % (w/v)+ 15 % (w/v)DMSO +15 % (w/v) ethyl glycol + 0.4M sucrose)，20-80%PVS2 以 0.4M sucrose 溶液稀釋 100%PVS2 而成，各別處理 5、10、30 分鐘(冰浴)，再以 1.2M sucrose 溶液震盪清洗 20 分鐘，進行活力檢定(FDA and TTC 活性鑑定)，並加入液體培養液進行培養，以 SCV(sedimented cell volume)測其生長量。

(2) LS(loading solution)試驗

選取生長良好的懸浮細胞，先去除細胞培養基，浸置於 LN(2M glycerol+0.4M sucrose in MS or WPM medium)溶液中 20 分鐘後，去除 LN 溶液，放入抗凍瓶(cryo-vial)後，加入以 PVS2 溶液，各別處理 5、10、30 分鐘(冰浴)，投入液態氮中，一天後，取出，以 40 °C 水浴快速解凍回溫，再以高濃度恢復液(培養基+1.2Msucrose)震盪清洗 20 分鐘，進行活性檢定(FDA and TTC 活性鑑定)，並加入液體培養液進行培養，以 SCV(sedimented cell volume)測其生長量。

(3)超低溫冷凍保存試驗

選取生長良好的多芽體及生長旺盛的懸浮細胞團，將多芽體切成 0.2-0.5cm 含 2-5 個小芽之小片斷，放入抗凍瓶後，添加 PVS2 冰凍保護劑 [培養基本鹽類+30%(w/v)glycerol 30%(w/v)+ 15%(w/v)DMSO +15%(w/v) ethyl glycol + 0.4M sucrose - 玻璃質化法]，使之完全浸入抗凍劑中，處理一定時間後，投入液態氮中，保持超低溫-196℃，一天後，取出，以 40℃水浴快速解凍回溫，再以高濃度恢復液(培養基+1.2M sucrose)清洗培植體，以去除抗凍劑，再放入恢復生長之培養基，恢復生長，觀察其生長情形。

比較抗凍劑濃度與處理時間進行各項試驗如下：

A、懸浮細胞部分

- a. 100%PVS2 分別處理 5、10、30 分鐘。
- b. 50%PVS2 處理 5 分鐘後，再以 100%PVS2 分別處理 5、10、30 分鐘。
- c. 50%PVS2 處理 10 分鐘後，再以 100%PVS2 分別處理 5、10、30 分鐘。

B、芽體部分

- a. 100%PVS2 分別處理 30、60、120 分鐘。
- b. 50%PVS2 處理 30 分鐘後，再以 100%PVS2 分別處理 30、60、120

分鐘。

c. 50%PVS2 處理 60 分鐘後，再以 100%PVS2 分別處理 30、60、120 分鐘。

(4)細胞活力檢定

(a)FDA 法(Dixon, 1985)

以丙酮配製 0.5%(w/v) FDA，存放 4°C 下，以 0.98mL 之細胞培養液加入 0.02mL 0.5%(w/v) FDA，5 分鐘後置於螢光顯微鏡下觀察。

(b)TTC 法

以 0.05M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液配置 0.6%(w/v)之 TTC 溶液成 pH 5.2，再加入 0.05(w/v)之 Tween80 製成 TTC 試劑。將溼重 0.1g 左右之細胞置於試管中，加入 4mL TTC 試劑，在減壓抽器裝置中放置 20 分鐘後，置於 30°C 黑暗中反應 6 小時。去除試劑後(離心 bench centrifuge 2000 X g 1min)，加入 7mL 95% 酒精以 60°C 水浴 10 分鐘，靜置待涼，離心 5000 X g 1min，取上清液測 485nm 波長下之吸光，以此吸光值表示細胞活性(Benson, 1994)。

四、結果與討論

(一)、大葉桉組織培養

1、培植體消毒

(1)自野外採回之萌蘗，部分葉子或莖具有蟲害的痕跡，去除後方進行表面消毒。

(2)野外採回之萌蘗，一小時後葉與芽呈現枯萎，插於水中能延長其時間，並維持其活力，但時間過久將會影響其活力，故材料最好當天採回使用。

(3)培植體消毒後十天內，會因消毒不完全而發生霉變，發霉高峰在消毒後第五、六天，十天後發霉可能是因封瓶不夠緊密所造成，故污染率計算應以第十天計算，誘導率以培植體放入培養基後五十天計算，培植體大約在放入後三十天開始誘導出癒合組織及多芽體(圖九-A)。

(4)自野外採回之材料，經表面消毒後污染率仍高，提高 NaOCl 濃度比不上延長處理時間效果好，試驗結果以 2%NaOCl 消毒 30 分鐘污染率最低，可控制在 50%以下，然而卻大大減低誘導率，以 2%NaOCl 消毒 20 分鐘所造成的污染率最高，高達 91%，然而誘導出多芽體的機會非常高，並且能縮短誘導的時間，產生出多芽體與癒合組織比例較其他消毒方法高，試驗結果以表三顯示。

表三：大葉桉萌蘗培植體表面消毒試驗結果及誘導率。

NaOCl 濃度 與處理時間	培植體 數目	未污染 數	污染率(%)	培植體 誘導數	誘導率 (%)	總誘導率 (%)
2%NaOCl 20 分鐘	132	12	91	11	92	8
2%NaOCl 30 分鐘	300	215	28	91	42	30
3%NaOCl 20 分鐘	160	44	73	30	68	19
3%NaOCl 30 分鐘	160	76	53	54	71	34
4%NaOCl 20 分鐘	120	68	43	23	34	19
4%NaOCl 30 分鐘	120	85	29	4	5	3

*以 MS +0.5ppm BA、1ppm NAA 為培養基，培養 30 天後之結果。

**誘導率為培植體誘導數除以未污染數。

總誘導率為培植體誘導除以培植體數目。

2、多芽體之誘導與增殖

(1)、芽體之增殖

將萌蘖之莖段誘導出的芽體為培植體，放入增殖多芽體之培養基中，約二十天後，芽體增殖(圖九-B)，再經過約三十天後生長良好培植體可產生高達10~18個側芽(圖九-C)，其中以單一含BA的培養基中，0.5 ppm BA 效果最佳，平均可誘導10個芽體(表四、表五)，另外以0.5ppm BA 再加入0~5 ppm NAA 進行試驗，得到芽體誘導結果(表六、表七)，以0.5ppm BA、1ppm NAA 時芽體誘導結果最佳，最多可以得到18個側芽(表八)，此後芽體間彼此競爭養分(圖九-D)，個體增大，部分生長弱勢的芽體開始褐化，芽體數量減少，而且培植體開始生根，養分大量消耗下，養分、空間競爭劇烈，部分芽體開始失去活力，分泌出褐色物質，使整個培養基褐化，大約八十天後，絕大部分芽體褐化死亡，僅有數個細長、略黃、生長不佳的小苗生成。

如果要大量增殖芽體，應該在芽體放入培養基增殖後60~70天為最佳的繼代時期，此時芽體較大，且彼此間競爭尚未影響其正常生長，同時也是最好的誘導芽體抽長時期。

表四、大葉桉萌蘖莖段不同濃度BA處理之芽體增殖結果。

植物生長調節劑(ppm)****	培植體數目	芽體總數	平均單一培植體產芽數	標準差	Duncan Grouping *
0ppm BA	18	28	1.56	0.85	D
0.5ppm BA	18	186	10.33	2.94	A
1ppm BA	18	120	6.67	1.53	B
5ppm BA	18	56	3.11	1.63	C

* Duncan's Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha=0.05$ 時，相同字母同級，A最好、以下類推。

**每種處理6個培植體，重複三次。

***平均單一培植體產芽數=芽體總數÷培植體數目。

****以MS為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表五、大葉桉萌蘗莖段不同濃度 BA 處理之芽體增殖變方分析。

變源來源	平方和	自由度	均方	F 值
處理	827.28	3	275.76	158.613*
重複	188.22	68	1.74	
總和	945.5	71		

*具極顯著之差異($\alpha=0.01$ 、 $P<0.01$)

**每種處理 6 個培植體，重複三次。

***以 MS 為基礎培養基，四種處理為 0、0.5、1、5ppm BA，利用表四結果進行變方分析。

表六、大葉桉萌蘗莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖結果。

植物生長調節劑(ppm)****	培植體數目	芽體總數	平均單一培植體產芽數	標準差	Duncan Grouping*
BA0 NAA0	18	28	1.56	0.85	F
BA0.5 NAA0	18	186	10.33	2.94	B
BA1 NAA0	18	120	6.67	1.53	C
BA5 NAA0	18	56	3.11	1.63	E
BA0.5 NAA0.5	18	111	6.17	1.21	C
BA0.5 NAA1	18	278	15.44	2.38	A
BA0.5 NAA5	18	90	5	1.18	D

* Duncan's Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha=0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理 6 個培植體，重複三次。

***平均單一培植體產芽數=芽體總數÷培植體數目。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表七、大葉桉萌蘗莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖變方分析。

變源來源	平方和	自由度	均方	F 值
處理	2374.49	6	395.75	236.46*
重複	199.17	119	1.67	
總和	2573.66	125		

*具極顯著之差異($\alpha=0.01$ 、 $P<0.01$)

**每種處理 6 個培植體，重複三次。

***以 MS 為基礎培養基，利用表六結果進行變方分析。

表八、大葉桉萌蘗莖段不同濃度 BA 與 NAA 處理之芽體增殖比較。

MS medium		BA(ppm)			
		0	0.5	1	5
NAA (ppm)	0	1.56 ± 0.85	10.33 ± 2.94	6.67 ± 1.53	3.11 ± 1.63
	0.5	—	6.17 ± 1.21	—	—
	1	—	15.44 ± 2.38***	—	—
	5	—	5 ± 1.8	—	—

*每種處理 6 個培植體，重複三次。

**此表為表四、表六整理之結果。

***為平均單一培植體產芽量最高的培養基，最高為 18 個芽體。

(2)、芽體之抽長

將適當大小芽體 2-4 個為一個培植體，將放入誘導芽體抽長培養基內誘導生長，以 1/2MS 培養基添加 0.5ppm NAA 時其抽長效果最好，約一個月一個培植體至少有一個芽體能生長到 3-4cm(圖九-E)，然而，同一培植體很少能芽體同時抽長至兩公分以上，可能與生長空間限制有關。

觀察中發現，芽體能否抽長受限於其他芽體，如果將較先抽長到一定高度的芽體，切離進行發根後(圖九-F)，常能誘導同一培植體之其他芽體迅速抽長，此可能與養分的利用或生長優勢的取代有關。

芽體抽長後的小苗放入誘導癒合組織的培養基中，可以誘導出大量的癒合組織(圖八-F)，為誘導癒合組織另一途徑。

3、癒合組織誘導與生長

將從萌蘗莖段誘導出之癒合組織切除，放入誘導與生長培養基中，十五天後觀察其生長情形，得到表九之結果。

試驗中以生長調節劑 0.1ppm BA、5ppm 2,4-D 得到最佳的生長結果(表九、表十)，添加少量的 BA 配合 2,4-D 使用，確實可以增進癒合組織之生長(圖八-A)，不過當 BA 濃度過高時，反而抑制癒合組織生長，甚至停頓(圖三)。

在含有 BA 的培養基中，約 40 天後，癒合組織開始大量形成葉綠素，使癒合組織呈現鮮綠色(圖八-C)，在經過約 20 天後，癒合組織開始向下生成不定根(圖八-E)以及分化成不定芽，在此時可以將不定芽切除放入芽體誘導之培養基下大量增殖，而原先的培養基，如果再放置 10 天，癒合組織將開始大量褐化，可能是培養基內養分將盡所造成。

如果單獨使用 5 ppm 2,4-D 時，約 50 天後，癒合組織開始大量形成葉綠素，使癒合組織呈現鮮綠色，再經過 30 天，始終沒有發根現象，也不會形成芽體，但開始褐化(圖八-D)，以此推論，過高濃度的 2-4 D 會抑制癒合組織的分化與器官的形成。

表九、以 MS 為基礎培養基添加不同濃度 BA、2,4-D 誘導大葉桉癒合組織生長試驗觀察結果。

BA(ppm)	2,4-D(ppm)	培植體數	callus 形成數	callus 誘導率(%)	callus 生長情形*
0	0.1	18	9	50	++
	1	18	15	83	++
	5	18	18	100	+++
0.1	0.1	18	7	38	+
	1	18	12	67	++
	5	18	17	95	++
1	0.1	18	3	17	-
	1	18	4	22	+
	5	18	6	33	+
5	0.1	18	0	0	-
	1	18	1	5	-
	5	18	4	22	-

*+表示生長量，越多表示生長量越多；-表示不生長或微量到難以觀察出其生長。

**每種處理 6 個培植體，重複三次

表十、以 MS 為基礎培養基添加不同濃度 BA、2,4-D 誘導大葉桉癒合組織試驗結果變方分析。

MS 培養基+生長調節劑(ppm)	配方組成數	誘導率總和	平均 callus 誘導率(%)	標準差
2,4-D0.1	4	1.05	26	0.05
2,4-D1	4	1.77	44	0.14
2,4-D5	4	2.5	62	0.17
BA0	3	2.33	78	0.06
BA0.1	3	2	67	0.08
BA1	3	0.72	24	0.01
BA5	3	0.27	9	0.01

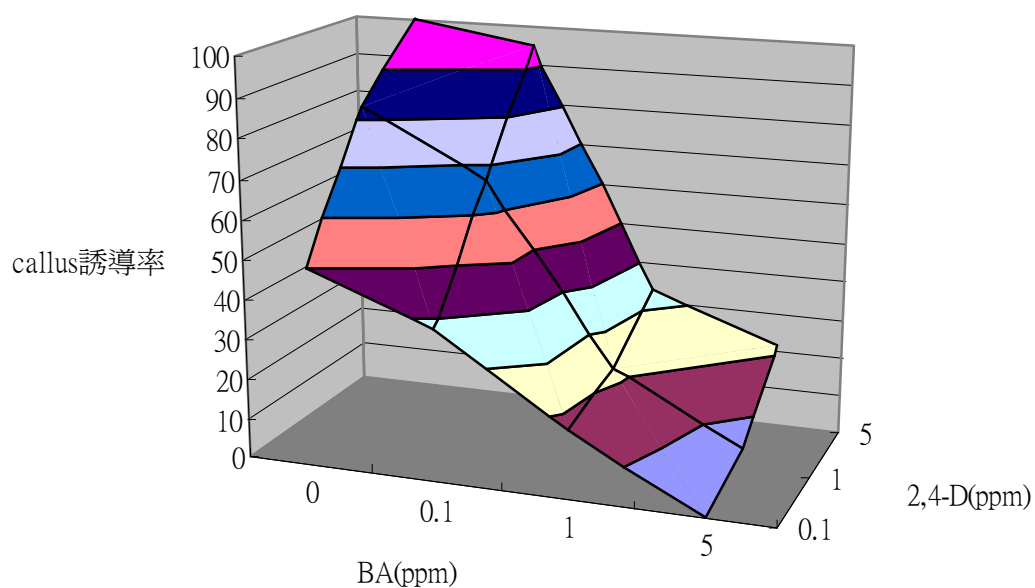
ANOVA

變源來源	平方和	自由度	均方	F 值	P-值
2,4-D 濃度	0.26	2	0.13	11.44**	0.008966
BA 濃度	0.98	3	0.32	28.48**	0.000602
機誤	0.07	6	0.01		
總和	1.3	11			

*每種處理 6 個培植體，重複三次。

**具極顯著之差異($\alpha=0.01$ 、 $P<0.01$)

不同濃度BA與2,4-D誘導癒合組織之結果

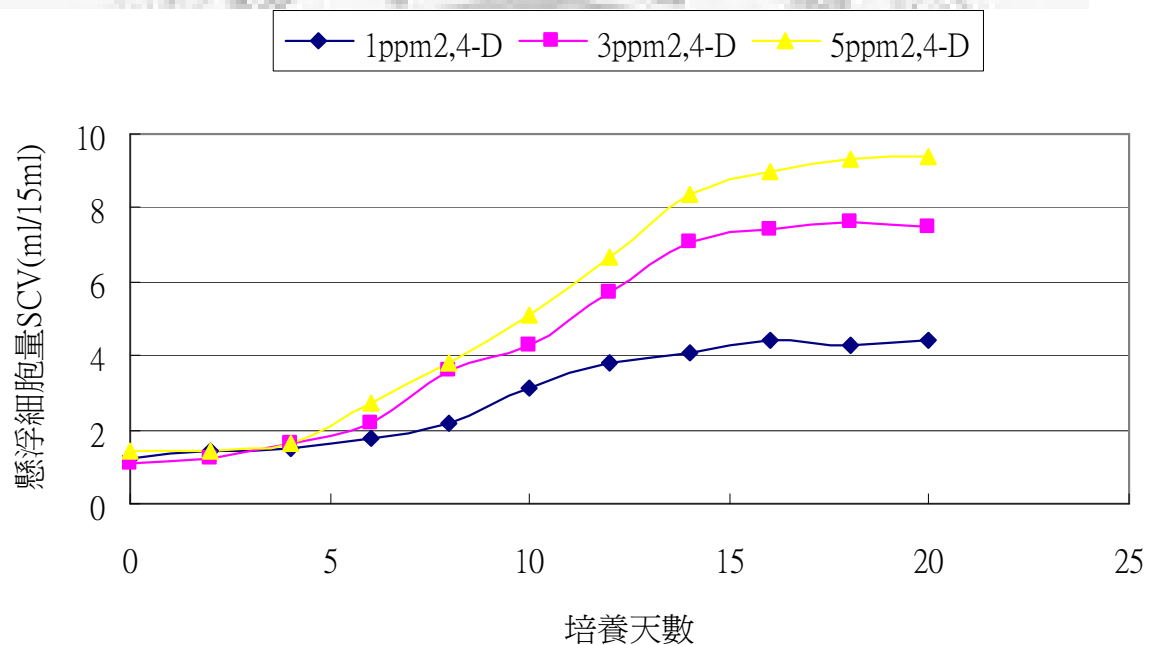


圖三、不同濃度 BA 與 2,4-D 對大葉桉癒合組織誘導試驗結果曲線圖。

4、細胞懸浮培養

將癒合組織再增殖之癒合組織，置入含有 2,4-D 之 MS 液態培養基中進行懸浮細胞培養，採 SCV(sedimented cell volume)法測量細胞生長曲線，得到圖四之懸浮細胞生長曲線，圖中顯示培養 14 天後細胞生長開始減緩，因此繼代培養以 14 天為一次，並以培養 12-14 天的懸浮細胞團為超低溫保存的材料。

在懸浮細胞培養 16 天後，細胞團開始大量快速褐化，導致細胞大量死亡，而且培養液呈現灰色，推測可能是桉樹懸浮細胞培養過久而導致少部分細胞停滯生長而分泌精油或二次代謝物進入培養液，而毒害其餘活細胞，加快細胞死亡，其成分還需進一步的分析。



圖四、在 MS 液體培養基中，含有不同 2,4-D 濃度下大葉桉懸浮培養生長曲線。
*SCV(ml/15ml)；每兩天測一次，每次靜置十分鐘，重複三次。

(二)、台灣扁柏組織培養

1、表面消毒

臺灣扁柏種子經過表面消毒後，於無菌操作台上剝胚，置於培養基中，7 天後，80%以上為無菌，少量胚有細菌產生，其消毒效果良好(表十一)。

表十一、台灣扁柏消毒試驗結果。

	胚數量	發霉數	污染率
臺灣扁柏	310	37	12%

*消毒方法：70%酒精浸泡 30 秒=>2%NaOCl 30 分鐘

2、胚培養

以 WPM 為培養基，加入不同濃度的 BA 與 NAA 或 2,4-D 生長調節劑之組合進行成熟胚培養，一個月後得到表十二之結果，在 NAA 濃度 0~5ppm 之間，callus 誘導率與 NAA 濃度成正比(圖五)，生長情形愈好，然而 BA 會抑制 callus 的誘導與生長，當 BA 濃度大於 0.5ppm 時會嚴重影響 callus 的誘導與生長，容易造成癒合組織褐化(圖十-E)。

成熟胚進行芽體誘導時，在不同濃度的 BA 與 NAA 或 2,4-D 生長調節劑之組合，含有 BA 可以獲得較高的芽體誘導率(表十二、圖六)，BA 0.5~1ppm 時可以得到較高的芽體誘導率(圖十一-A, B)，NAA、2,4-D 皆會抑制芽體的生成，然而 2,4-D 的效果較為嚴重。

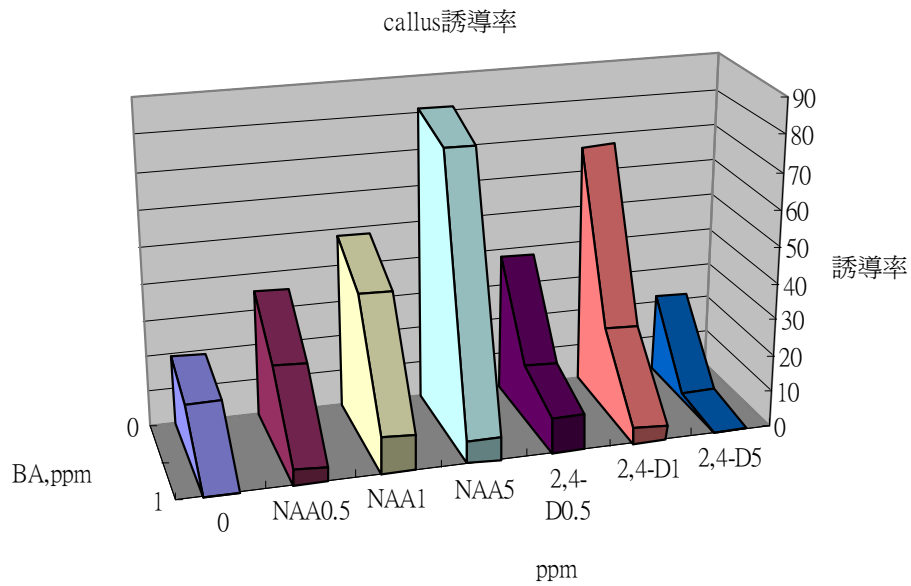
表十二、不同濃度的 BA 與 NAA 或 2,4-D 生長調節劑之組合進行台灣扁柏成熟胚培養。

BA (ppm)	NAA (ppm)	培植體數	callus 形成數	callus 誘導率	callus 生長情形	產芽率
0	0	48	9	19	+	0
	0.5	48	17	35	+	0
	1	48	23	48	++	0
	5	48	39	81	++	0
0.5	0	48	7	15	-	88
	0.5	48	11	23	+	67
	1	48	19	40	++	40
	5	48	37	77	++	0
1	0	48	0	0	-	98
	0.5	48	2	4	-	35
	1	48	5	10	-	30
	5	48	3	6	-	15
	2,4-D (ppm)					
0	0.5	48	18	38	+	0
	1	48	32	67	++	0
	5	48	11	22	+	0
0.5	0.5	48	7	15	+	48
	1	48	11	23	+	23
	5	48	1	2	-	8
1	0.5	48	5	10	+	58
	1	48	2	4	-	17
	5	48	0	0	-	0

*+表示生長量，越多表示生長量越多；-表示不生長或微量到難以觀察出其生長。

**每種處理 16 個培植體，重複三次。

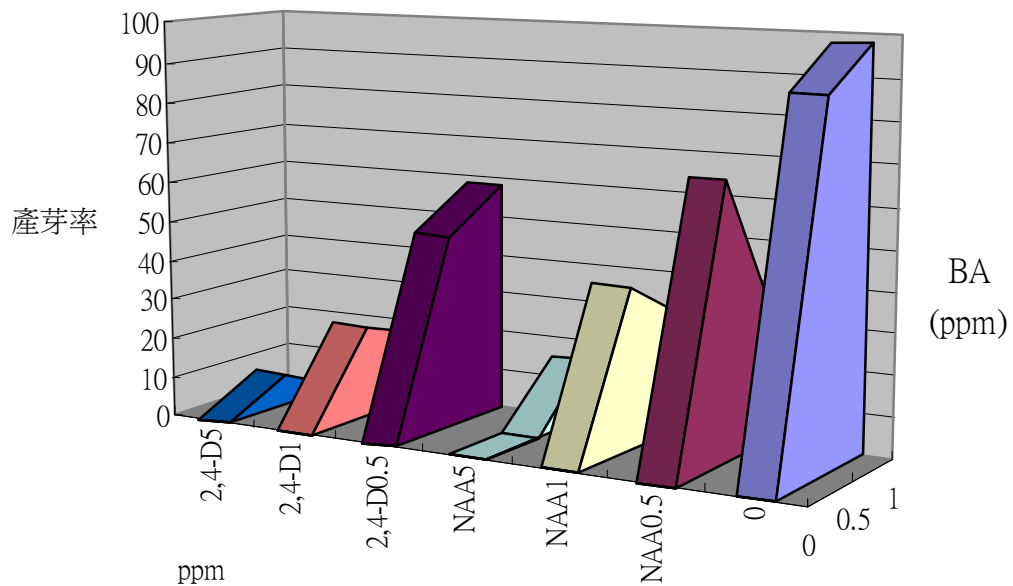
***台灣扁柏胚，培養 30 天後之結果。



圖五、不同濃度的 BA 與 NAA 或 2,4-D 生長調節劑之組合進行台灣扁柏 callus 誘導結果。

*每種處理 16 個培植體，重複三次。

**台灣扁柏胚，培養 30 天後之結果。



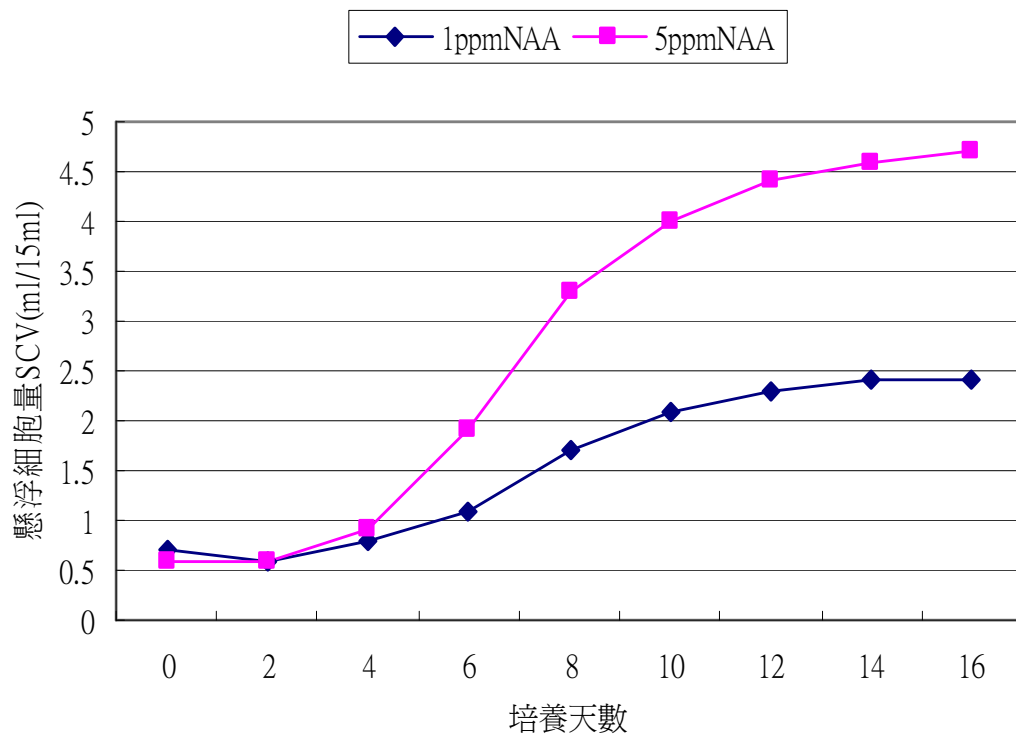
圖六、不同濃度的 BA 與 NAA 或 2,4-D 生長調節劑之組合進行台灣扁柏芽體誘導結果。

*每種處理 16 個培植體，重複三次。

**台灣扁柏胚，培養 30 天後之結果。

3、懸浮細胞培養

將癒合組織再增殖之癒合組織，置入含有 2,4-D WPM 液態培養基中進行懸浮細胞培養，採 SCV(sedimented cell volume)法測量細胞生長曲線，得到圖七懸浮細胞生長曲線，圖中顯示培養 12 天後細胞生長開始減緩，因此繼代培養以 12 天為一次，並以培養 10-12 天的懸浮細胞團為超低溫保存的材料。



圖七、台灣扁柏懸浮細胞在 WPM 液體培養基中，含有不同 NAA 濃度之生長曲線。
*SCV(ml/15ml)；每兩天測一次，每次靜置十分鐘，重複三次。

(三)、超低溫保存試驗

1、浸置不同濃度 PVS2 試驗

(1)、大葉桉浸置不同濃度 PVS2 試驗

大葉桉懸浮細胞經過短暫處理後，其活力與 PVS2 濃度與處理時間有很大的關係(表十三)，處理時間 5 分鐘時，即使 PVS2 濃度提高，細胞活力依然達 75% 以上，提高處理時間會嚴重破壞細胞活力，隨 PVS2 濃度增加而導致活力迅速下降。

大葉桉懸浮細胞經過短暫 PVS2 處理後，處理時間 5 分鐘之懸浮細胞依然能繼續生長，較未處理之細胞生長較緩，如果提高處理時間到 15~30 分鐘，只有較低濃度 PVS2 處理的懸浮細胞能生長。

利用不同濃度的 PVS2 與處理時間得到的結果，可以判定 PVS2 對懸浮細胞的毒性，因此找出最高限度的處理時間與濃度，在此條件下進行不同濃度的 PVS2 與處理時間，再進行超低溫保存，應該可以得到較佳的保存結果。

表十三、大葉桉懸浮細胞經過不同濃度 PVS2 與處理時間之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	處理時間		
PVS2 濃度	5 分鐘	15 分鐘	30 分鐘
20%	0.93	0.87	0.62
50%	0.87	0.61	0.43
80%	0.85	0.45	0.21
100%	0.76	0.32	0.17

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***以 485nm 波長測得之吸光值。

(2)、台灣扁柏浸置不同濃度 PVS2 試驗

台灣扁柏懸浮細胞經過短暫處理後，其活力與 PVS2 濃度與處理時間的關係如下表(表十四)，處理時間 5~30 分鐘對台灣扁柏懸浮細胞影響較 PVS2 濃度低，即使 PVS2 處理時間達 30 分鐘時，細胞活力依然達 60% 以上，提高處理時間與濃度皆會降低細胞活力。

台灣扁柏懸浮細胞經過 PVS2 處理後，處理時間 5~30 分鐘與處理濃度 20%~100% 之懸浮細胞依然能繼續生長(圖十一-C, D)。

利用不同濃度的 PVS2 與處理時間得到的結果，可以判定 PVS2 對懸浮細胞的毒性，因此找出最高限度的處理時間與濃度，在此條件下進行不同濃度的 PVS2 與處理時間，再進行超低溫保存，應該可以得到較佳的保存結果。

表十四、台灣扁柏懸浮細胞經過不同濃度 PVS2 與處理時間之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	處理時間		
PVS2	5 分鐘	15 分鐘	30 分鐘
20%	0.98	0.87	0.86
50%	0.92	0.81	0.79
80%	0.83	0.74	0.69
100%	0.77	0.68	0.65

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***以 485nm 波長測得之吸光值。

超低溫冷凍保存材料進行高濃度 PVS2 處理時對細胞會造成毒性與滲透逆境，並產生細胞質離現象。Fahy(1986)指出冷凍保護劑中的 DMSO 雖然可以減緩低溫下酵素活性與保持細胞膜系完整，但提高 DMSO 濃度並無法使細胞存活率上升，反而隨濃度逐漸上升使得細胞 pH 平衡遭受破壞，存活率急劇下降。但過低濃度之 DMSO 之冷凍保護效果極差，因此在 DMSO 的濃度取捨上將是保存成功與否的重要關鍵。而 EC、glycerol 的影響亦是如此，濃度過高的甘油甚至會導致低溫下細胞受到嚴重的滲透逆境與電解質濃度驟降而死亡。

2、LS(loading solution)試驗

(1)、大葉桉 LS(loading solution)試驗

大葉桉懸浮細胞先經過 LS(2M glycerol+0.4M sucrose in MS medium)溶液處理後，以 TTC 進行活力檢定得到下表結果(表十五)，PVS2 處理 15 分鐘可以維持細胞活力將近 60%(圖十一-A, B)，然而處理時間過長或過短皆會使細胞活力下降，甚至無法再生，實驗結果以 15 分鐘最佳。

大葉桉懸浮細胞經過 LS 溶液處理，再經由 PVS2 處理，確實可以得到具有活力之細胞，處理時間 15 分鐘時，細胞解凍後，近一半的樣本可以透過後期的培養得到再生，LS 溶液處理可以降低 PVS2 毒性，使得冷凍保存存活率大大的提升，並可以誘導出癒合組織。

表十五、大葉桉懸浮細胞先經過 LS 溶液處理 20 分鐘後，經由不同 PVS2 處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	處理時間		
PVS2	5 分鐘	15 分鐘	30 分鐘
sample1	0.21	0.58	0.32
sample2	0.28	0.63	0.18
sample3	0.15	0.48	0.24
sample4	0.17	0.66	0.37
mean	0.2	0.59	0.28

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重，T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***以 485nm 波長測得之吸光值。

****LS 溶液為 2M glycerol+0.4M sucrose in MS medium pH 5.2。

(2)、台灣扁柏 LS(loading solution)試驗

台灣扁柏懸浮細胞先經過 LS(2M glycerol+0.4M sucrose in MS medium)溶液處理後，以 TTC 進行活力檢定得到下表結果(表十六，圖十二-C, D)，PVS2 處理 30 分鐘可以維持細胞活力 60%以上，處理過短皆會使細胞活力嚴重下降，甚至無法再生，試驗結果中以 30 分鐘最佳，處理時間低於 30 分鐘時，細胞活力極低，因此台灣扁柏懸浮細胞要維持一定活力 PVS2 處理至少要 30 分鐘。

台灣扁柏懸浮細胞經過 LS 溶液處理，再經由 PVS2 處理，確實可以得到具有活力之細胞(圖十二-E)，處理時間 30 分鐘時，細胞解凍後，有部分的樣本可以透過後期的培養得到再生(表二十三)，LS 溶液處理可以降低 PVS2 毒性，使得冷凍保存存活率大大的提升。

台灣扁柏懸浮細胞相較於大葉桉而言，需要比較長的 PVS2 處理時間，處理時間不足，會大大的降低細胞活力，然而台灣扁柏細胞對於 PVS2 毒性的耐力力也較大葉桉高。

Matsumoto 等人(1998)發現劇烈脫水時，累積於原生質周圍空間的 LS，可以減緩細胞所受的機械逆境。根據此理論，本實驗中，LS 處理可得到較穩定的細胞存活率。

表十六、台灣扁柏懸浮細胞先經過 LS 溶液處理 20 分鐘後，經由不同 PVS2 處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC	處理時間		
test(t/T)*			
PVS2	5 分鐘	15 分鐘	30 分鐘
sample1	0.14	0.18	0.67
sample2	0.17	0.22	0.73
sample3	0.18	0.15	0.54
sample4	0.22	0.18	0.49
mean	0.18	0.18	0.61

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***以 485nm 波長測得之吸光值。

****LS 溶液為 2M glycerol+0.4M sucrose in WPM medium pH 5.7。

3、超低溫冷凍保存試驗

(1)、大葉桉超低溫冷凍保存試驗

A. 懸浮細胞超低溫保存試驗

懸浮細胞團經液態氮冰凍後取出，表面已呈現暗褐色，但其內部細胞依然保持鮮黃色，放入誘導生長固體培養基中，含 5 ppm 2,4-D 之培養基，比較其誘導恢復生長的情形，放入固體培養基是為了改善保存後懸浮細胞之再生 (Engelmann, 1991)，培養了二十天後有少部分癒合的生長以顯微鏡觀察出，得到表十七之結果。

以 TTC 做活性檢測得表之結果(表十八)，發現懸浮細胞團內部分細胞具活性(圖十二-A)，將懸浮細胞團進行再生，大約一周部分細胞褐化膨大或壞死，只有少部分能再生，50%PVS2 處理 5 分鐘 100%PVS2 處理十分鐘時，33%的懸浮細胞能再生出癒合組織(表二十三)，以 100%PVS2 處理 10 分鐘時，雖然發現有癒合組織生成，但是很快褐化，約五天內，即使繼代培養依然無法繼續生長。

PVS2 冰凍保護劑的毒性很強，處理時間達 30 分鐘，便使懸浮細胞失去活性，或許降低 PVS2 內有毒物質 DMSO 與 ethyl glycol 比例，提高甘油含量或許可以達到更好的成果。

表十七、比較抗凍劑濃度與處理時間對桉樹懸浮細胞，經冷凍保存後試驗結果。

桉樹懸浮細胞團試驗		100%PVS2 處理時間*		
		5 分鐘	10 分鐘	30 分鐘
50%PVS2 處理時間 *	0 分鐘	褐化	癒合組織短暫 生長即褐化	褐化
	5 分鐘	褐化	有少量癒合組 織生成	褐化
	10 分鐘	褐化	褐化	褐化

*先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理，然後經由液態氮凍存，解凍後，細胞生長情形。

表十八、大葉桉懸浮細胞，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	100%PVS2 處理時間(分鐘)**		
50%PVS2 處理時間(分鐘)***	5 分鐘	10 分鐘	30 分鐘
0	0.14	0.52	0.17
5	0.47	0.68	0.19
10	0.11	0.32	0.14

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理。

B. 芽體超低溫保存試驗

芽體經液態氮冰凍後取出，依然呈現鮮綠色，放入誘導生長培養基中，分別為 MS 含 1ppm NAA、0.5ppm BA 與 MS 2,4-D 5ppm，比較其誘導恢復生長的情形，以 MS 培養基含 1ppm NAA、0.5ppm BA 生長情形較佳(表十九)，MS 2,4-D 培養基中大多數芽體經過四天後即呈褐化現象，所有不同濃度抗凍劑與處理時間皆會造成此結果，推論可能是此培養基不適合冰凍後培植體的生長。

冰凍後的芽體經 MS 含 1ppm NAA、0.5ppm BA 培養基誘導後三十天觀察其生長情形，以立體顯微鏡觀察，得到表十九之結果，並以 TTC 做活性檢驗之結果(表二十、圖十二-B)，以 50%PVS2 處理 30 分鐘再以 100%PVS2 處理 60 分鐘，癒

合組織生成情形最佳(表二十三)，然而再經過二十天後，依然沒有芽體生成，還需更長期的觀察，或改變培養基生長調節劑濃度與比例，以期能直接誘導生成芽體。

以 TTC 活性檢測結果有不少具活力之芽體無法成功培養，或許是芽體在冷凍過後已尚失增生能力，或是培養基不適合冷凍過後培植體生長，也許可以添加 1 g/L 活性碳促進其吸收培養基成分。

表十九、比較抗凍劑濃度與處理時間對大葉桉多芽體，經冷凍保存後試驗結果。

桉樹多芽體試驗		100%PVS2 處理時間*		
TTC		30 分鐘	60 分鐘	120 分鐘
50 % PVS2 處理 時間 *	0 分鐘	褐化	褐化	褐化 有少量癒合組織 生成
	30 分鐘	褐化	褐化 有少量癒合組織 生成	褐化
	60 分鐘	褐化	有部分癒合組織 生成	褐化

*先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理，然後經由液態氮凍存，解凍後多芽體生長情形。

表二十、大葉桉多芽體，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	100%PVS2 處理時間(分鐘)**		
50%PVS2 處理時間(分鐘)***	30	60	120
0	0.15	0.46	0.57
30	0.33	0.72	0.17
60	0.25	0.82	0.19

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理。

(2)、台灣扁柏超低溫保存試驗

A. 懸浮細胞超低溫保存試驗

台灣扁柏懸浮細胞團經過不同濃度 PVS2 與處理時間後，50%PVS2 10mins+100%PVS2 30 mins 可以得到最高的細胞活力（表二十一），細胞活力達 64%（圖十一-E, F），比直接使用 100% PVS2 溶液得到較高的細胞活力，而且 17%細胞能再生癒合組織（圖十一-F）。

台灣扁柏懸浮細胞團以 50%PVS2 5mins+100%PVS2 30 mins 及 50%PVS2 10mins+100%PVS2 30 mins 處理皆能再次誘導出癒合組織，誘導率 17%（表二十三），誘導率偏低，如果能配合預處理或是 LS(loading solution)試驗，應該可以增加細胞活力及癒合組織誘導率。

冰凍保護劑為超低溫保存的必要試劑，為避免細胞在保存過程中受到低溫傷害，加入冰凍保護劑可幫助細胞適度的脫水來保護細胞，避免冷凍或解凍過程中細胞冰晶形成，或在細胞內引起冰晶形成之致死現象。

表二十一、台灣扁柏懸浮細胞，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	100%PVS2 處理時間(分鐘)**		
50%PVS2 處理時間(分鐘)**	5 分鐘	10 分鐘	30 分鐘
0	0.22	0.17	0.37
5	0.19	0.29	0.53
10	0.34	0.32	0.64

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理。

B. 芽體超低溫保存試驗

台灣扁柏多芽體經過不同濃度 PVS2 與處理時間後，50 % PVS2 60mins+100%PVS2 60 mins 可以得到最高的細胞活力（表二十二），細胞活力達 76% ，而直接使用 100% PVS2 溶液處理 120 分鐘可以得到 61% 的細胞活力，顯示兩階段 PVS2 濃度處理有助於提高細胞活力。

台灣扁柏多芽體以 100%PVS2 120 mins 及 50%PVS2 60mins+100%PVS2 60 mins 處理皆能再次誘導出癒合組織（表二十三），而以 50%PVS2 60mins+100 %PVS2 60 mins 處理可以得到最高的誘導率，誘導率 33% 。

表二十二、台灣扁柏多芽體，經由不同 PVS2 濃度與處理時間後，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形。

TTC test(t/T)*	100%PVS2 處理時間(分鐘)**		
50%PVS2 處理時間(分鐘)**	30	60	120
0	0.17	0.33	0.61
30	0.19	0.51	0.57
60	0.25	0.76	0.22

* t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重，T:未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重。

**每種處理四個樣本，重複兩次，每個樣本約 0.1g 鮮重。

***先以 50%PVS2 處理再以 100%PVS2 處理。

表二十三、不同 PVS2 濃度與處理時間、方法，進行冷凍保存，解凍清洗後之 TTC 活力檢定情形與癒合組織誘導情形。

Cryopreservation*c	培植體種類	癒合組織誘導率 (%)*b	TTC 活性 (t/T)*a
LS+100%PVS2 15mins*d	大葉桉懸浮細胞	25	0.59
LS+100%PVS2 30mins*d	臺灣扁柏懸浮細胞	17	0.61
100%PVS2 10 mins*e	大葉桉懸浮細胞	0	0.52
50%PVS2 5mins+100%PVS2 5 mins*f	大葉桉懸浮細胞	0	0.47
50%PVS2 5mins+100%PVS2 10 mins*f	大葉桉懸浮細胞	33	0.68
100%PVS2 60 mins*e	大葉桉多芽體	0	0.46
100%PVS2 120 mins*e	大葉桉多芽體	8	0.57
50%PVS2 30mins+100%PVS2 60 mins*f	大葉桉多芽體	25	0.72
50%PVS2 60mins+100%PVS2 60 mins*f	大葉桉多芽體	42	0.82
50%PVS2 5mins+100%PVS2 30 mins*f	臺灣扁柏懸浮細胞	17	0.53
50%PVS2 10mins+100%PVS2 30 mins*f	臺灣扁柏懸浮細胞	17	0.64
100%PVS2 120 mins*e	臺灣扁柏多芽體	8	0.61
50%PVS2 30mins+100%PVS2 60 mins*f	臺灣扁柏多芽體	0	0.51
50%PVS2 30mins+100%PVS2 120 mins*f	臺灣扁柏多芽體	0	0.57
50%PVS2 60mins+100%PVS2 60 mins*f	臺灣扁柏多芽體	33	0.76

*a t/T: t:經過 PVS2 處理後之樣本吸光值/樣本重, T: 未經過任何處理之樣本吸光值/樣本重; 每種處理四個樣本, 重複兩次, 每個樣本約 0.1g 鮮重。

*b 每種處理四個樣本, 重複三次。

*c LS: 2M glycerol+0.4M sucrose in MS or WPM medium。

PVS2: 30%(w/v)glycerol 30%(w/v)+ 15%(w/v)DMSO +15%(w/v) ethyl glycol + 0.4M sucrose。

*d 處理流程: LS=>100%PVS2=>凍存=>解凍(40°C 1mins)=>TTC。

*e 處理流程: 100%PVS2=>凍存=>解凍(40°C 1mins)=>TTC。

*f 處理流程: 50%PVS2=>100%PVS2=>凍存=>解凍(40°C 1mins)=>TTC。

五、結論

大葉桉培植體消毒試驗結果以 2%NaOCl 消毒 30 分鐘污染率最低，可控制在 50% 以下，然而卻大大減低誘導率，以 2%NaOCl 消毒 20 分鐘所造成的污染率最高，高達 91%；在多芽體之誘導與增殖方面，生長良好培植體可產生高達 10~18 個側芽，其中以單一含 BA 的培養基中，BA 0.5 ppm 平均可誘導 10 個芽體，0.5ppm BA 再加入 0~5 ppm NAA 最多可以得到 18 個側芽，癒合組織誘導以生長調節劑 0.1ppm BA、5ppm 2, 4-D 得到最佳的生長結果，添加少量的 BA 配合 2, 4-D 使用，確實可以增進癒合組織之生長，不過當 BA 濃度過高時，反而抑制癒合組織生長，甚至停頓，大葉桉細胞懸浮培養置入含有 2, 4-D 之 MS 液態培養基中，培養 14 天後細胞生長開始減緩，繼代培養以 14 天為一次，並以培養 12-14 天的懸浮細胞團為超低溫保存的材料。

台灣扁柏胚培養中，在 NAA 濃度 0~5ppm 之間，callus 誘導率與 NAA 濃度成正比，BA 會抑制 callus 的誘導與生長，當 BA 濃度大於 0.5ppm 時會嚴重影響 callus 的誘導與生長；台灣扁柏懸浮細胞培養，培養 12 天後細胞生長開始減緩，繼代培養以 12 天為一次，並以培養 10-12 天的懸浮細胞團為超低溫保存的材料。

超低溫保存試驗，在浸置不同濃度 PVS2 試驗中，大葉桉懸浮細胞活力與 PVS2 濃度與處理時間有很大的關係，處理時間 5 分鐘時，即使 PVS2 濃度提高，細胞活力依然達 75% 以上，提高處理時間會嚴重破壞細胞活力，隨 PVS2 濃度增加而導致活力迅速下降；台灣扁柏懸浮細胞經過短暫 PVS2 處理，處理時間 5~30 分鐘對台灣扁柏懸浮細胞影響較 PVS2 濃度低，即使 PVS2 處理時間達 30 分鐘時，細胞活力依然達 60% 以上，提高處理時間與濃度皆會降低細胞活力。

LS (loading solution) 試驗，大葉桉懸浮細胞經過 LS 溶液處理後，再以 PVS2 處理，確實提高保存後細胞之活力，處理時間 15 分鐘時，細胞解凍後，近一半的樣本可以透過後期的培養得到再生，LS 溶液處理可以降低 PVS2 毒性，使得冷凍保存存活率大大的提升；台灣扁柏懸浮細胞經過 LS 溶液處理，在以 PVS2 處理 30 分鐘可以維持細胞活力 60% 以上，處理過短皆會使細胞活力嚴重下降，甚至無法再生，試驗結果中以 30 分鐘最佳，處理時間低於 30 分鐘時，細胞活力極低。

在經由兩種不同 PVS2 濃度與處理時間試驗中，大葉桉懸浮細胞以 50%PVS2 處理時間 5 分鐘再以 100%PVS2 處理 10 分鐘，細胞活力可以高達 68%，並有 33% 能誘導出癒合組織生長，芽體試驗方面，以 50%PVS2 處理時間 60 分鐘再以 100%PVS2 處理 60 分鐘，細胞活力可以高達 82%，並有 42% 能誘導出癒合組織生長；以台灣扁柏懸浮細胞進行不同 PVS2 濃度與處理時間試驗以 50%PVS2 10 分鐘

+100%PVS2 30 分鐘可以得到 64% 的細胞活力，並且有 17%能誘導出癒合組織，改以多芽體進行試驗時，經 50%PVS2 60 分鐘+100%PVS2 60 分鐘處理，可以得到 76% 細胞活力，癒合組織誘導率達 33% 。

在這些試驗中，已進行初步的大葉桉與台灣扁柏玻璃質化法超低溫保存之試驗，試驗結果能保存植物種質種，再進一步試驗後，提高保存後細胞活力與再生能力，將可以大量長期保存並生產健康的組培苗，再加以馴化即可得大量的優良苗木，然而本實驗還有很大的研究空間，以期能更快速的恢復保存後培植體生長及增殖芽體，需進一步的試驗與研究。



六、參考文獻

- 上野洋一郎 等編譯. 2000. 植物組織培養與技術. 藝軒. p. 213-220.
- 王君暉、黃純農. 1997. 植物細胞超低溫保存的研究和應用. 海峽兩岸森林生物技術及環境變遷對森林生態系的影響研討會論文集. p. 74-84.
- 吳雅婷. 1997. 香蕉和流蘇胚性細胞玻璃質化法超低溫保存之研究. 台灣大學園藝學研究所碩士論文. p. 1-20.
- 黃淑珍. 1991. 台灣扁柏與紅檜之胚培養. 台灣大學森林學研究所碩士論文. p. 47-52.
- 蔡佳蓉. 1990. 台灣扁柏與紅檜體胚之發生. 中華林學季刊 24(1):3-19.
- 蔡宗叡. 1991. 雪梨藍桉之組織培養. 台灣大學森林學研究所碩士論文. p. 1-16.
- 薛玉珏. 1994. 香蕉體胚玻璃質化法超低溫保存影響因子之探討. 台灣大學園藝學研究所碩士論文. p. 1-22.
- Benson, E. E. 1994. The triphenyl tetrazolium chloride(TTC) assay. In:R.A.Dixon and R. A. Gonzales(eds) Plant cell cultures:a practical approach. IRL Press,Oxford, pp.164.
- Chen, T. H. H., K. K. Kartha and L. V. Gusta. 1985. Cryopreservation of wheat suspension culture and regenerable callus. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:101-109
- Crowe, J.H., Carpenter J. H., Crowe, L. M. and T. J. Anchordoguy. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Cryobiology 27:219-231.
- Cryopreservation of vitro-growth shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* L. schott) by vitrification. 1. Investigation of basic condition of the vitification procedure. Plant Cell Reports 16:594-599.
- Dixon , R. A. 1985. Plant cell cultures a practical approach. IRL Press,Oxford, p.182-185.
- Dumet, D., Engelmann, F., N. Chabrillange and Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Reports 12:352-355.
- Durand-Cresswell, R., M. Boulay and A. Franclet. 1982. Vegetative propagation of Eucalyptus. In: Tissue Culture in Forestry. p.150-181.

- Dussert, s., M. C. Mauro and F. Engelmann. 1992. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: influence of post-thaw culture conditions and application to different strains. *Cryo-letters* 13:15-22.
- Edward, J. K., K. K. Kartha, J. A. Qureshi and D. Chemak. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygote embryos using an abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Reports* 12:89-94.
- Engelmann, F. 1991. In vitro conservation of tropical plant gerplasm a rview. *Euphytica* 57:227-243.
- Fahy, G. M., D. R. Macfarlane, C. A. Angell and H. T. Meryman 1984. Viterification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 27:407-426.
- Fahy, G.. M.(1986) The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 23:1-13.
- Fantini, M. Jr. and M. E. C. Graca. 1989. A micropropagation system for *Eucalyptus dunnii* X *Eucalyptus* sp. *Ann. Sci. For.* 46suppl. :136-139.
- Gnanapragasam, S. and I. K. Vasil. 1990. Plant regeneration from a cryopreserved embryogenic cell suspension of a commercial sugarcane hybrid (*Saccharum* sp.) *Plant Cell Reports* 9:419-423.
- Graca, M. E. C. and S. Mendes. 1989. Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maid. *Ann. Sci. For.* 46suppl. :140-144.
- Grospietsch, M., E. Stodulkova and J. Zamecnik. 1999. Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *Cryo-Letters* 20:339-346.
- Gupta, P. K. , A. F. Masacrenhas and V. Jagannathan. 1981. Tissue culture of forest trees-clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. *Plant Science Letters* 20:195-201.
- Gupta, P. K. ,U. J. Mehta and A. F. Masacrenhas. 1983. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports* 2:296-299.
- Helliot, B., R. Swennen, Poumay, Y. Frison, E. P. Lepoivre and B. Panis. 2002. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports* 21:1217-1228.

- Hitmi, A., A. Coudret, C. Barthomeuf and H. Sallanon. 1999. The role of sucrose in freezing tolerance in *Chrysanthemum cinerariaefolium* L. cell cultures. *Cryo-Letters* 20:45-54.
- Iida, Y., K. I. Watabe, H. Kamada and H. Harada. 1992. Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryo. *J. Plant Physiol* 140:356-360.
- Jitsuyama, Y., T. Suzuki, T. Harada and S. Fujikawa. 1997. Ultrastructural study on mechanism of increased freezing tolerance due to extracellular glucose in cabbage leaf cells. *Cryo-Letters* 18:33-44.
- Kartha, K. K. 1985. Cryopreservation of plant cell and organs. CRC..
- Kartha, K. K., N. Leung, P. Baudet-Laprairie and F. Constabel. 1982. Cryopreservation of Periwinkle, *Catharanthus roseus* cells culture in vitro. *Plant Cell Reports* 1:135-138.
- Kitahara, E. H. and L. S. Caldas. 1975. Shoot and root formation in hypocotyls callus cultures of Eucalytus. *Forest Science* 21(3):243.
- Kohmura, H., Y. Ikeda and A. Sakai. 1994. Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Cryo-letters* 15 :289-298.
- Koster, K. L., Y. P. Lei, M. Anderson, S. Martin and G. Bryant. 2000. Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel transitions. *Biophysical Journal* 78:1932-1946.
- Kuranuki, Y. and A. Sakai. 1995. Cryopreservation of in vitro-growth shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. *Cryo-letters* 16:345-351
- McComb, J. M. and I. J. Bennett. 1986. Eucalypt. (*Eucalyptus* spp.) In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry I. Trees I.* (ed. By Bajaj Y. P. S.) pp340-346. Springer Verlag, New York.
- Kurkela, S. and M. Franck. 1990. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible Arabidopsis gene.. *Plant Molecular Biology: an international journal on molecular biology, biochemistry and genetic engineering* 15:137-144.
- Langis, R. and P.L. Steponkus. 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant physiology* 92:666-671.

- Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Pro. Inter. Plant Prop. Soc. 30 :421-427.
- Luo, J. and B. M. Reed. 1997. Absciscic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of in vitro currant shoot-tip meristems and callus cryopreservation by vitrification.
- Matsumoto, T., A. Sakai and Y. Nako. 1998. A novel preculturing for enhancing the survival of in vitro-growth meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification. Cryo-letters 19:27-36.
- McComb, J. M. and I. J. Bennett. 1986. Eucalypt. (*Eucalyptus* spp.) In: Biotechnology in Agriculture and Forestry I. Trees I. (ed. By Bajaj Y. P. S.) pp340-346. Springer Verlag, New York.
- Mehra-Palta, A. 1982. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. Plant Science Letters 26:1-11.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nag, K. K. and H. E. Street. 1975. Freeze preservation of culture plant cells. The pretreatment phase. Physiol Plant 34:254-260.
- Olive, A.E., L. M. Crowe and J. H. Crowe. 1998. Methods for dehydration-tolerance: depression of the phase transition temperature in dry membranes and carbohydrate vitrification. Seed Science Research 8:211-221.
- Panis, B. 1995. Cryopreservation of *Musa* germplasm. Informusa 4: 17-20.
- Pennycooke, J. C. and L. E. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from on vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) by vitrification. Plant Cell Reports 19:733-737.
- Pennycooke, J.C. and L.E. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from on vitro plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) by vitrification. Plant Cell Reports 19:733-737.
- Radhamani, J. and K. P. S. Chandel. 1992. Cryopreservation of embryonic axes of trifoliate orange (*Poncirus trifoliate* [L.] RAF.). Plant Cell Reports 11:372-374.
- Rao, K. S. and R. Venkateswara. 1985. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. Plant Science

40:51-55

- Reed, B. M. 1990. Survival of in vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. Hort. Sci. 25(1) : 111-113.
- Reinhoud, P. J., E. W. M. Schrijnemakers, F. Van Iren and J. W. Kijne. 1995. Vitrification and a heat-shoot treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspension compared to two-step freezing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42:261-267.
- Shibli, R. A., D. M. Haagensohn, S. M. Cunningham, W. K. Berg and J. J. Volenec. 2001. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports 20:445-450.
- Sita, G. L. 1979. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary cultures of *Eucalyptus*. Plant Science Letters 14:63-65.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30-33.
- Sita, G. L. and B. S. Rani. 1985. In vitro propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. Plant Cell Reports 4:63-65.
- Steponkus, P. L. 1992. Advances in low temperature biology. JAI. Press Ltd.
- Swan, T. W., D. Hare, R. A. Gill and P. T. Lynch. 1999. Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension cultures of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Cryo-Letters 20:325-336.
- Takagi, 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. JIRCA, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan.
- Takagi, H., N. T. Thinh, O. M. Islam, T. Senboku and A. Sakai. 1997. Thinh, N. T., H. Takagi and S. Yashima. 1999. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of banana (*Musa spp*) by vitrification method. Cryo-Letters 20:163-174.
- Towill, L. E. and R. L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] shoot tips by vitrification. Plant Cell Reports 11 : 175-178.
- Uemura, M. and A. Sakai. 1980. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of

- liquid. *Plant Cell Physiol* 21(1):85-94.
- Vandenbussche, B., S. Leuridan, V. Verdoodt and M. Gysemberg. 1999. Changes in sugar content and fatty acid composition of in vitro sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Regulation* 28:157-163.
- Wang, J. H. 2000. A comprehensive of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation. *Cryobiology* 41:1-9.
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technol.* 47:189-194.
- Wiecheteck, M., M. E. C. Graca and A. JdeAraujo. 1989. Micropropagation of *Eucalyptus viminalis* Labill. *Ann. Sci. For.* 46suppl. :161-164.
- Wolfe, J. and G. Bryant. 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water system. *Cryobiology* 39:103-129.
- Wowk, B., E. Leitl, C. M. Rasch, N. Mesbah-Karimi, S. B. Harris and G. M. Fahy. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 40:228-236.
- Yoshimatsu, K., K. Touno and K. Shimomura. 2000. Cryopreservation of medicinal plant resources: retention of biosynthetic capabilities in transformed cultures. Tsukuba Medicinal Plant Research Station, National Institute of Health Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-843, Japan.

附錄一、基礎培養基組成份一覽表

成分含量(mg/L)	WPM	MS
KNO ₃		1900
NH ₄ NO ₃	400	1650
KH ₂ PO ₄	170	170
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556	
CaCl ₂ ·7H ₂ O	96	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
(NH ₄) ₂ SO ₄		
K ₂ SO ₄	990	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O		22.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KI		0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025
Thiamine·HCl	1.0	0.1
Pyridoxine·HCl	0.5	0.5
Nicotinic acid	0.5	0.5
Glycine	2.0	2.0
Myo-inositol	100	100
sucrose	20000	30000
pH	5.2	5.7

八、照片

圖八、大葉桉癒合組織之誘導。

fig A 大葉桉培植體於含 5ppm 2,4-D 之 MS 培養基誘導癒合組織，15 天之結果。(bar=1mm)。

fig B 大葉桉培植體於含 0.1ppm BA、1ppm 2,4-D 之 MS 培養基癒合組織增殖，30 天之結果。(bar=1mm)。

fig C 大葉桉培植體於含 0.1ppm BA、5ppm 2,4-D 之 MS 培養基癒合組織培養 40 天後葉綠素形成之結果。(bar=1mm)。

fig D 大葉桉培植體於含 5ppm 2,4-D 之 MS 培養基癒合組織培養 80 天後開始褐化之結果。(bar=1mm)。

fig E 大葉桉培植體於含 0.1ppm BA、5ppm 2,4-D 之 MS 培養基癒合組織培養 60 天後開始生根初期。(bar=1mm)。

fig F 大葉桉芽體切除後置於含 0.1ppm BA、5ppm 2,4-D 之 MS 培養基誘導癒合組織 30 天之結果。(bar=1mm)。

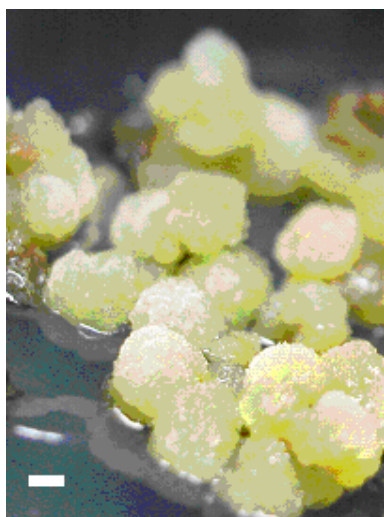


fig A



fig B

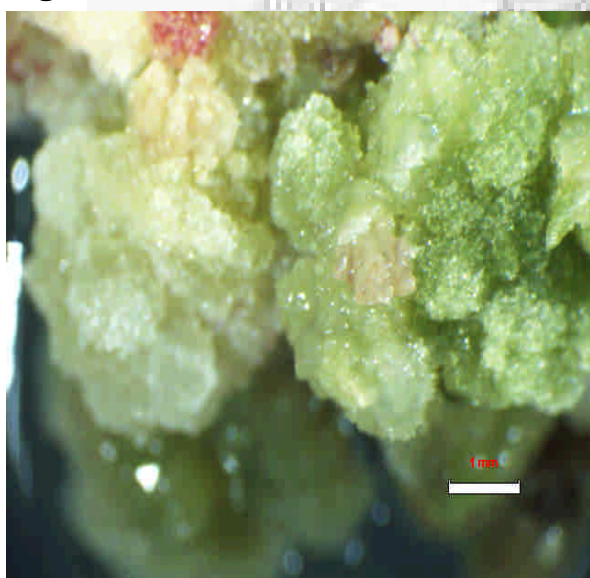


fig C

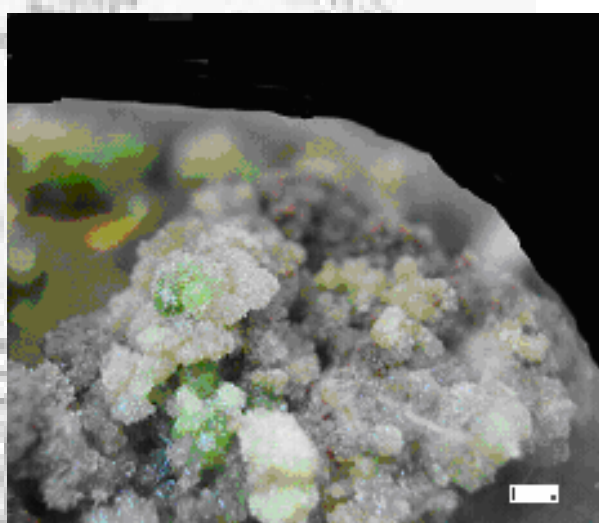


fig D

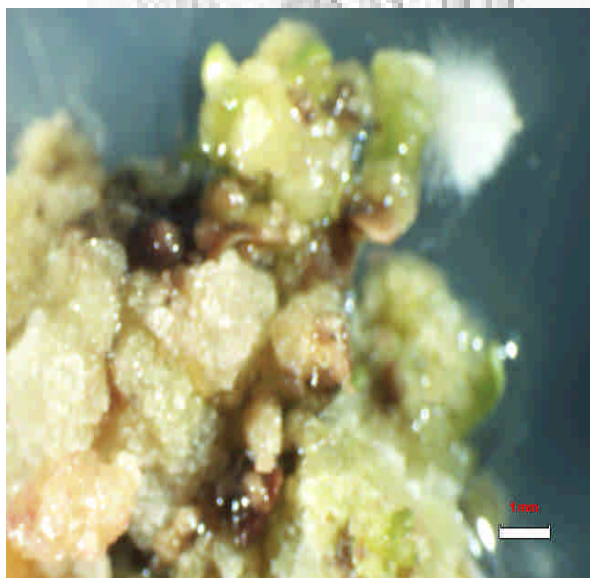


fig E

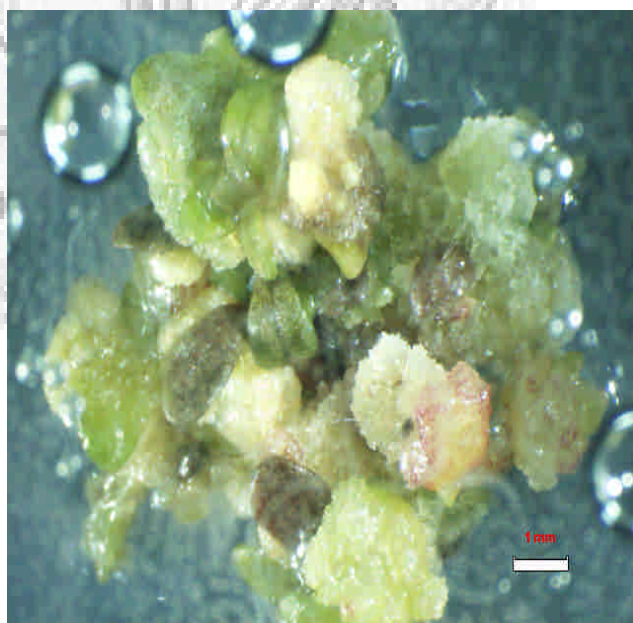


fig F

圖九、大葉桉多芽體之誘導。

fig A 大葉桉萌蘖消毒後放入含 0.5ppm BA、1ppm NAA 之培養基，培養 30 天後芽體生成。(bar=1mm)。

fig B 大葉桉多芽體放入含 0.5ppm BA、1ppm NAA 之培養基，培養 40 天後芽體大量生成。(bar=1mm)。

fig C 大葉桉多芽體放入含 0.5ppm BA、1ppm NAA 之培養基，培養 40 天後芽體大量生成。(bar=1mm)。

fig D 大葉桉多芽體放入含 0.5ppm BA、1ppm NAA 之培養基，培養 70 天後芽體開始增大，競爭養分。(bar=1mm)。

fig E 將大葉桉多芽體放入 1/2MS 培養基含 0.5ppm NAA 時，芽體抽長。

(bar=1cm)。

fig F 切除抽長芽體後放入 MS 培養基，約 15 天後發根。(bar=1cm)。

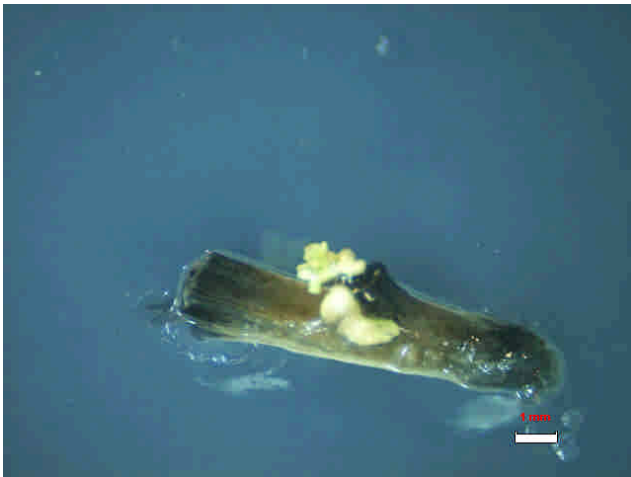


fig A



fig B

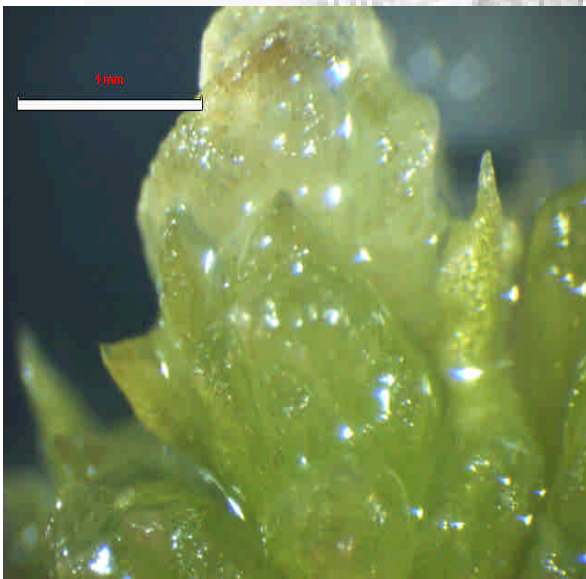


fig C

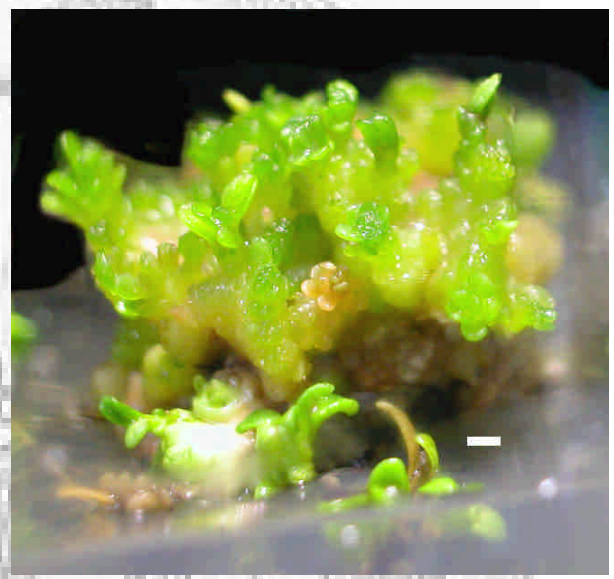


fig D



fig E



fig F

圖十、台灣扁柏多芽體與癒合組織之誘導

fig A 台灣扁柏成熟胚以 0.5ppm BA 之 WPM 培養基誘導多芽體，40 天之結果。(bar=1mm)。

fig B 台灣扁柏成熟胚以 1ppm BA 之 WPM 培養基誘導多芽體，培養 75 天後，芽體增大，芽體之間會彼此競爭。(bar=1mm)。

fig C 台灣扁柏多芽體在 WPM 培養基含 1ppm BA 下，培養 60 天後，以台灣扁柏多芽體之間彼此競爭，產生部份死亡，部分抽長。(bar=1mm)。

fig D 台灣扁柏成熟胚以 5ppm NAA 之 WPM 培養基誘導癒合組織，40 天之結果。(bar=1mm)。

fig E 台灣扁柏癒合組織在含有 5ppm NAA 之 WPM 培養基，培養 40 天之結果。(bar=1mm)。

fig F 台灣扁柏懸浮細胞經過 50%PVS2 處理 10 分鐘，再以 100%PVS2 處理 30 分鐘，進行冷凍保存後，癒合組織於 WPM 培養基含 5ppm NAA 培養之再生情形。(bar=1mm)。

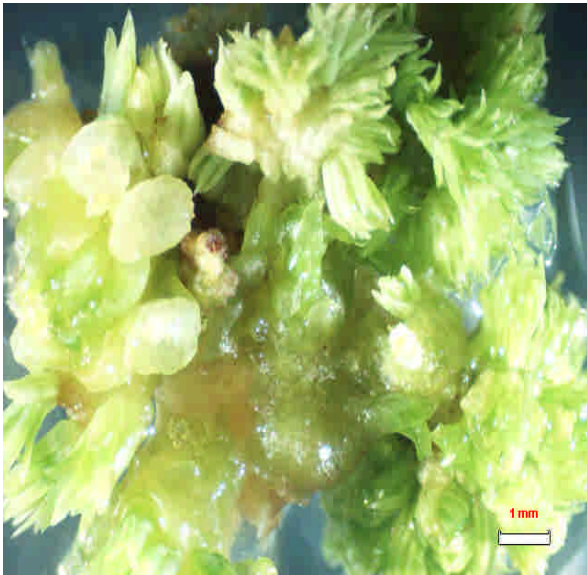


fig A

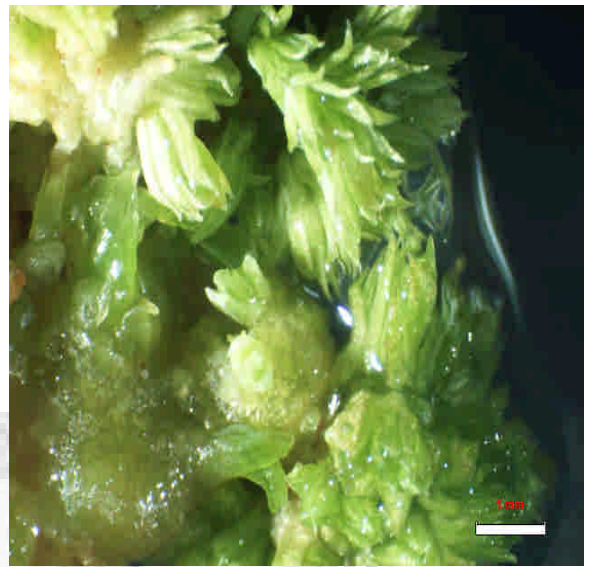


fig B

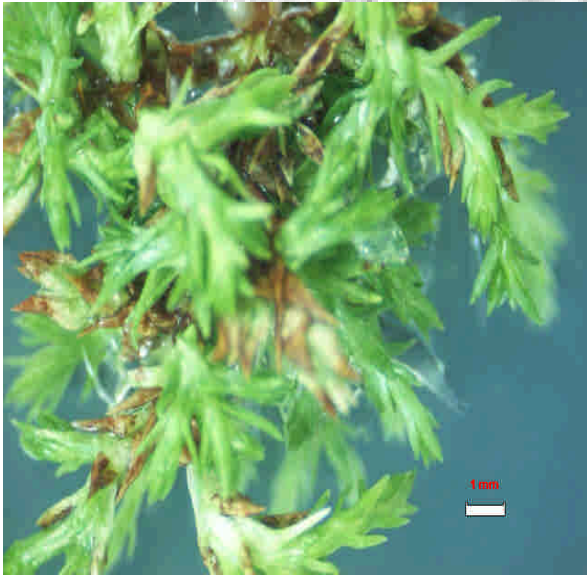


fig C

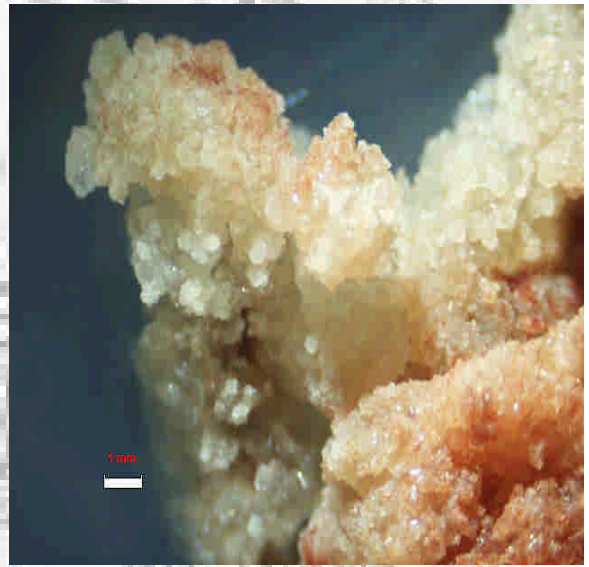


fig D

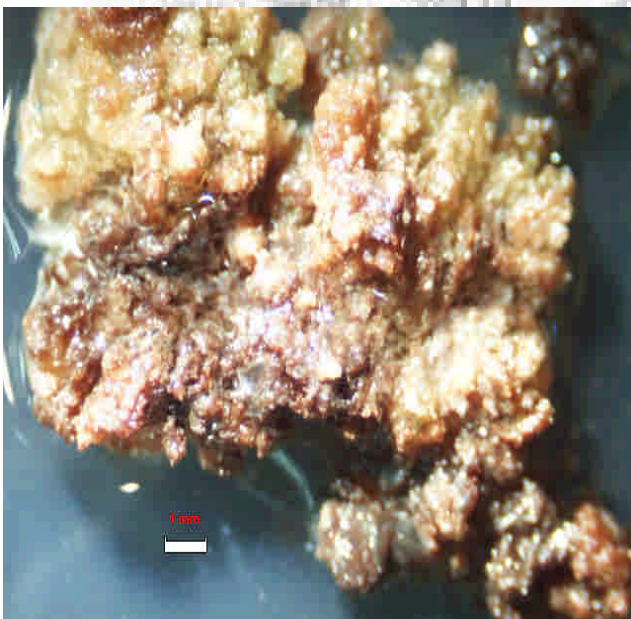


fig E

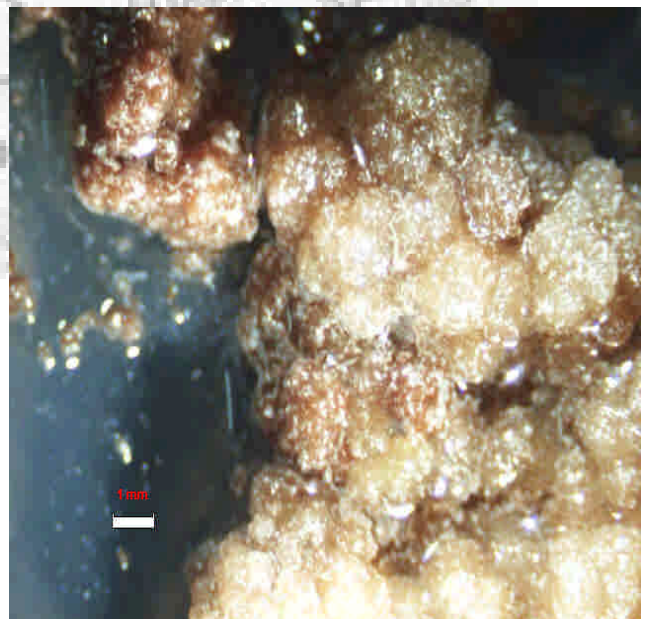


fig F

圖十一、FDA 活力檢定

fig A 大葉桉懸浮細胞經過 LS 處理與 100%PVS2 處理 15 分鐘，經冷凍保存後，以 FDA 進行活力檢定，在普通光源之照片。X25.2

fig B 大葉桉懸浮細胞經過 LS 處理與 100%PVS2 處理 15 分鐘，經冷凍保存後，以 FDA 進行活力檢定，於螢光下之照片。X25.2

fig C 台灣扁柏懸浮細胞經過 PVS2 處理 5 分鐘時，以 FDA 進行活力檢定，於普通光源下之照片。X25.2

fig D 台灣扁柏懸浮細胞經過 PVS2 處理 5 分鐘時，以 FDA 進行活力檢定，於螢光下之照片。X25.2

fig E 台灣扁柏懸浮細胞經過 50%PVS2 處理 10 分鐘，再以 100%PVS2 處理 30 分鐘，進行冷凍保存後，以 FDA 進行活力檢定，於螢光下之照片。X63

fig F 台灣扁柏懸浮細胞經過 50%PVS2 處理 10 分鐘，再以 100%PVS2 處理 30 分鐘，進行冷凍保存後，以 FDA 進行活力檢定，於螢光下之照片。X63

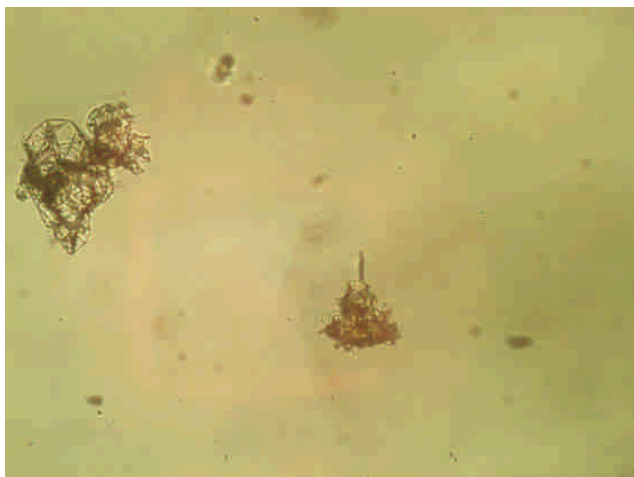


Fig A

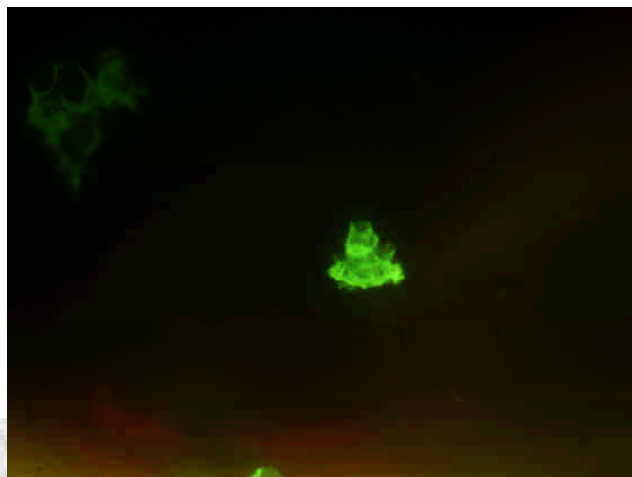


Fig B

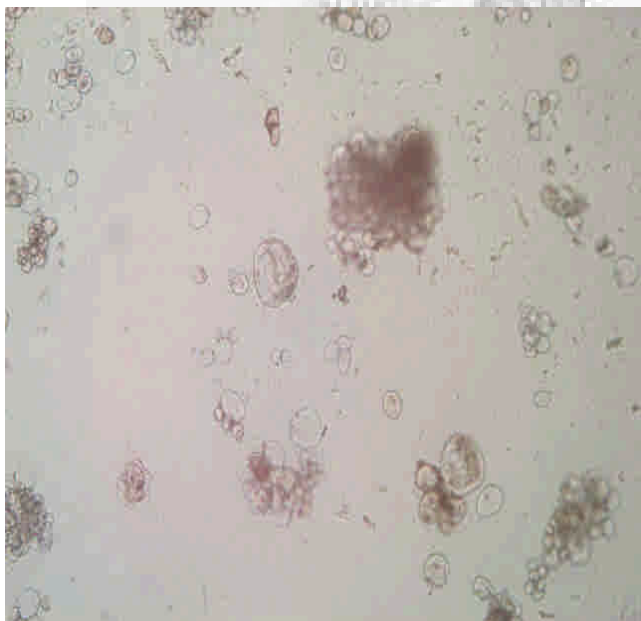


Fig C

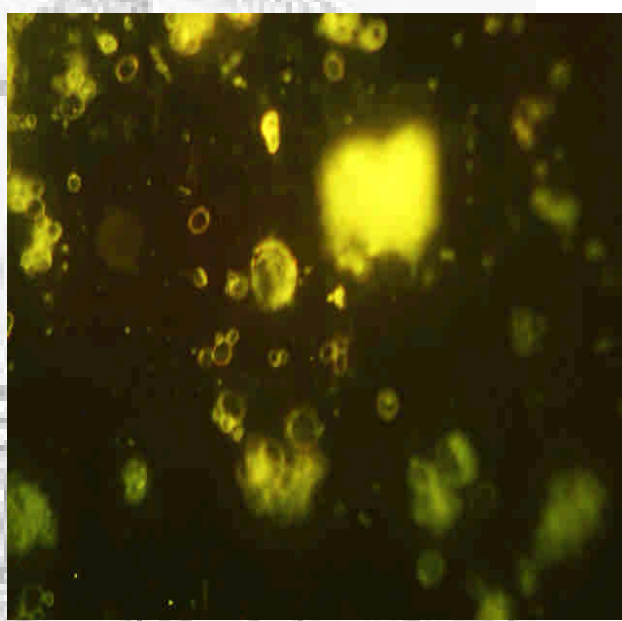


Fig D



Fig E

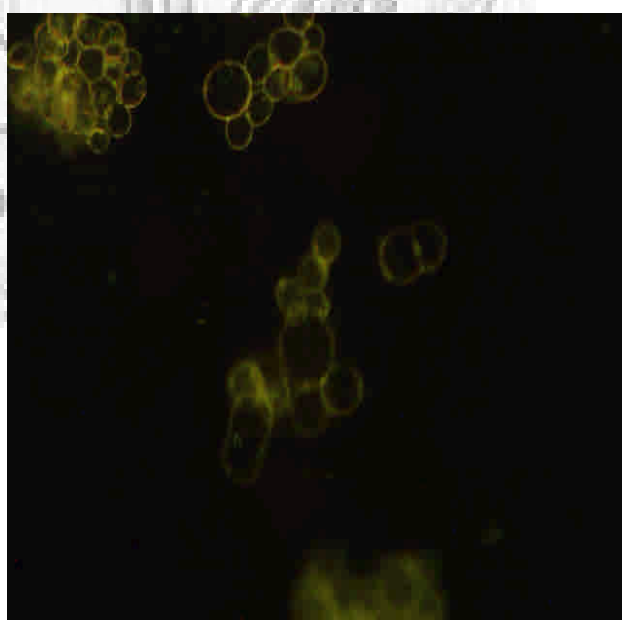


Fig F

圖十二、TTC 活力檢定

fig A 大葉桉懸浮細胞經過 50%PVS2 5mins+100%PVS2 5 mins 處

理，冷凍保存後，以 TTC 進行活力檢定，紅色部分具有活力。

(bar=1mm)。

fig B 大葉桉多芽體經過 50%PVS2 60mins+100%PVS2 60 mins 處

理，冷凍保存後，以 TTC 進行活力檢定，紅色部分具有活力。

(bar=1mm)。

fig C 台灣扁柏懸浮細胞經過 LS 處理與 100%PVS2 處理 30 分鐘，經

冷凍保存後，以 TTC 進行活力檢定，於顯微鏡下之照片。X63

fig D 台灣扁柏懸浮細胞經過 LS 處理與 100%PVS2 處理 30 分鐘，

經冷凍保存後，以 TTC 進行活力檢定，用酒精萃取之照片。

(bar=1cm)。

fig E 台灣扁柏懸浮細胞經過 LS 處理與 100%PVS2 處理 30 分鐘，經

冷凍保存後，以 TTC 進行活力檢定，紅色部分具有活力。

(bar=1mm)。



fig A

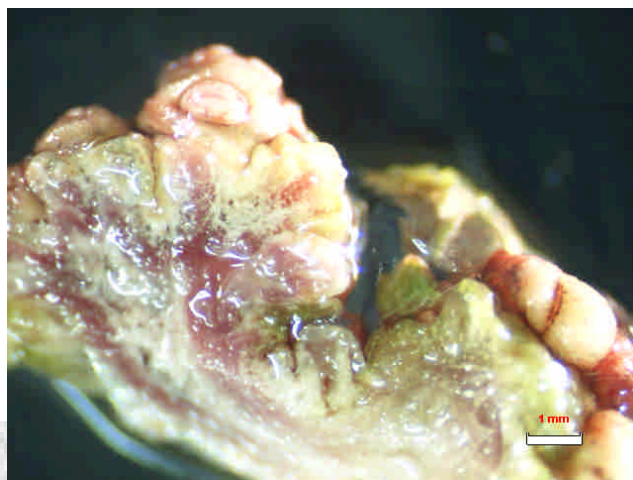


fig B

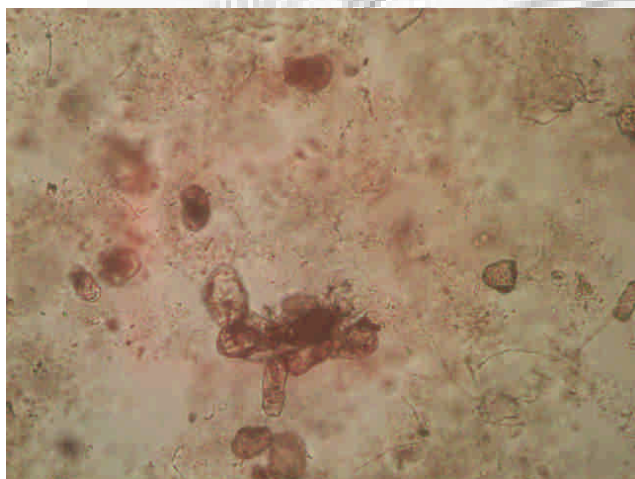


fig C



fig D

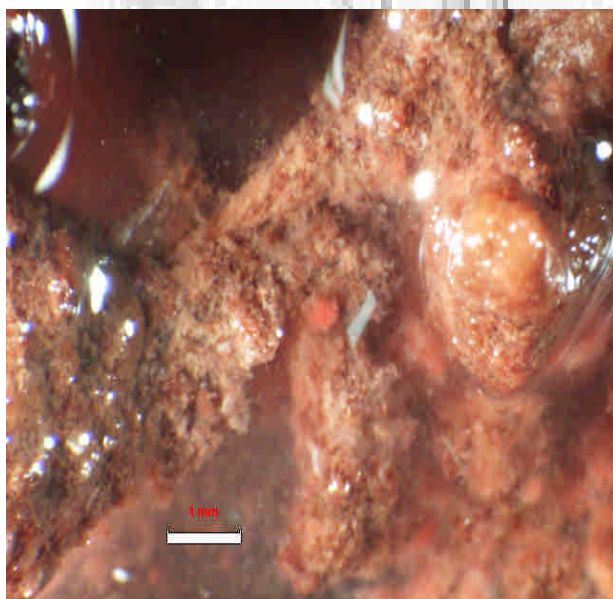


fig E