

臺灣三角楓癒合組織誘導及細胞懸浮培養

吳宗賢¹、王亞男²

(收件日期：民國 92 年 2 月 19 日、接受日期：民國 92 年 3 月 9 日)

【摘要】以台灣三角楓成熟胚之胚軸與子葉，培養於 MS 培養基，添加 0.5 ppm 2,4-D 及 0.5 ppm BA，可得較佳誘導效果。在癒合組織增生上，以添加 1 ppm NAA 及 1 ppm BA 可得最大癒合組織鮮重，在添加 TDZ 之培養基中，則可培養出綠色、密實之癒合組織。細胞懸浮培養以使用 3%(w/v)蔗糖濃度最佳，使用生物反應器進行大量增生時，以攪拌轉速 30/50 rev/min 兩階段式培養可獲得最大細胞收率，細胞 SCV 達 660 (mL/1300mL)。

【關鍵詞】台灣三角楓、癒合組織、細胞懸浮培養、生物反應器。

CALLUS INDUCTION AND CELL SUSPENSION CULTURE OF *ACER BUERGERIANUM* MIQ. VAR. *FORMOSANUM* (HAYATA) SASAKI

Zong-Xian Wu¹ Ya-Nan Wang²

(Received February 19, 2003; Accepted March 9, 2003)

【Abstract】 Hypocotyls and cotyledons from mature embryos of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in MS basal medium supplemented with 0.5 ppm 2,4-D and 0.5 ppm BA could obtain the best callus induction rate. To obtain maximum fresh weight increase, We cultured callus in MS basal medium supplemented with 1 ppm NAA and 1 ppm BA. Green and compact callus was produced from cells cultured in MS basal medium supplemented with TDZ. The better result for suspension culture was 3% (w/v) sucrose. Two-step process (30/50 rev/min) cultured in the bioreactor could obtain the better cell mass yield **【SCV = 660 (mL/1300mL)】**.

【Key words】 *Acer buergerianum*, callus, cell suspension culture, bioreactor.

I、前言

臺灣三角楓屬槭樹科，為臺灣特有變種，但由於族群常遭人為破壞，現已被列為嚴重瀕臨絕滅之物種 (呂、林，1996)。有關槭樹科

植物之組織培養研究，King and Morehart (1987) 曾誘導及培養 *Acer rubrum* L. 癒合組織、Wilson (1976)、Stevenson *et al.* (1986) 及 Li *et al.* (1990) 培養 *Acer pseudoplatanus* L. 懸浮細胞、Kern and Meyer (1986) 誘導 *Acer*

¹ 國立台灣大學森林系碩士班研究生。

Graduate Student, Department of Forestry, National Taiwan University.

² 國立台灣大學森林系教授，通訊作者。

Professor, Department of Forestry, National Taiwan University, Correspondent Author.

freemanni 芽體發生 及 Wilhelm (1999) 誘導 *Acer pseudoplatanus* L. 不定芽發生等。

癒合組織是植物經逆分化作用所形成的一群薄壁細胞之特殊組織。癒合組織可提供許多與植物組織培養相關研究之材料，如植物細胞生理、生態、解剖、生化、病理及基因方面之研究 (James, 2000)，故癒合組織誘導及培養為植物組織培養之重要步驟。

植物體許多部位皆可做為培植體進行癒合組織誘導，然而以年青幼嫩的組織較佳，如頂芽、形成層、胚等。癒合組織的誘導除了與試驗材料有關外，其他如培養基種類、植物生長調節劑、培養環境等因子皆可能影響癒合組織發生 (Auge, 1995)。

本研究為第一篇關於臺灣三角楓組織培養之研究報告，目的為利用臺灣三角楓之成熟胚誘導癒合組織發生，並利用生物反應器及懸浮培養技術，進行大量增殖，以供探討間接再生作用及保育利用。

II、材料與方法

(I) 材料

臺灣三角楓成熟種子於民國90年8月採自台灣大學校園內之母樹，種子經去翅後以濕水苔層積冷藏於4°C冰箱中，以備使用。

(II) 種子表面消毒消毒

將經過層積處理一個月之種子取出，以紗布包裹，進行流水處理24小時。以稀釋1/400安期-A消毒液(中國化學製藥公司)浸泡5分鐘、70%酒精處理3分鐘、3%NaOCl(100ml加一滴Tween20)殺菌25分鐘進行種子表面消毒，所有過程均以超音波震盪器震盪。種子表面消毒後於無菌操作台中以無菌水沖洗三次。

(III) 癒合組織誘導

消毒後之種子在無菌環境下將其胚體取出，水平放置於空白之MS(Murashige and Skoog, 1962)培養基中，培養5天後可發現胚體抽長及子葉開展現象。將子葉及胚軸切下，並水平培養於含不同植物生長調節劑之MS培養基中。培養環境為25°C光照(27 μE·m⁻²·s⁻¹, 16 hr光週期)。受測之植物生長調節劑之組合為：

1. 0.1~5 ppm 2,4-D。
2. 0.1~5 ppm NAA。
3. 0.5 ppm 2,4-D 及 0.1~1 ppm BA 之組合。
4. 0.5 ppm 2,4-D 及 0.1~1 ppm TDZ 之組合。

蔗糖濃度為3% (w/v)、洋菜0.7% (w/v) (Pronadisa)，pH值5.7，在120°C，壓力1.2 kg/cm²下滅菌15分鐘。本誘導試驗於50 ml三角錐型瓶(Kimax)培養，每瓶倒入約25 ml培養基，接種6個培植體，重複5次。

(IV) 癒合組織之增生

取誘導出之癒合組織約0.5 g(鮮重)，移至以MS為基礎培養基之125 ml三角錐型瓶中，測試：

1. 0.1~0.5 ppm 2,4-D 與 0~1 ppm BA 之組合。
2. 0.1~0.5 ppm 2,4-D 與 0~0.5 ppm TDZ 之組合。
3. 0.5~1 ppm NAA 與 0~1 ppm BA 之組合。
4. 0.5~1 ppm NAA 與 0~0.5 ppm TDZ 之組合對癒合組織增殖之影響。

在光照環境下培養30天，將癒合組織取出並計算其鮮重。每125 ml三角錐型瓶置入約50 mL培養基，重複3次。

(V) 細胞懸浮培養

將鮮重約1 g之癒合組織培養於MS液態培養基添加1 ppm NAA及0.5 ppm BA之125 ml三角錐型瓶內，15天後，以60 mesh濾網過濾去除粗顆粒，收取均質之細胞(圖1)進行改以1 ppm NAA及1 ppm BA並以三種不同蔗糖濃度【1%、3%、5% (w/v)】進行培養，培

養瓶置於轉速 90 rpm 震盪培養器。(HOTECH, orbital shaker model : 722), 培養過程中以 SCV (settled cell volume) 法每二天測細胞生長量。125ml 三角錐型瓶內置入約 50ml 液態培養液, 重複 3 次, 取平均值, 30 天後, 繪其細胞生長曲線。

(VI) 大量增殖

2 公升攪拌式生物反應器(BELLCO Glass, INC, MICROCARRIER SPINNER FLASK) (圖 2) 內加入 1200ml 培養液 (MS 培養基, 1 ppm NAA 及 1 ppm BA, 3% sucrose), 滅菌前調整 pH 值至 5.7, 待培養液冷卻後, 取懸浮培養試驗蔗糖濃度 3%, SCV 約為 12 (ml/15ml) 共兩瓶, 連同原培養液直接倒入反應器中, 並以三種不同培養方式, 即 1. 30 (rev/min) 攪拌轉速培養。2. 30 (rev/min) 轉速並注入以 0.22 μm 薄膜過濾之無菌空氣 (EYELA aeration unit MAU-1, TOKYO RIKAKIKAI CO., L.T.D., air pressure 0.1 kg/cm², air flow 0.45 ml/min) 培養。3. 30 (rev/min) 轉速進行培養, 當細胞生長量無明顯增加時, 再將攪拌轉速調整 50

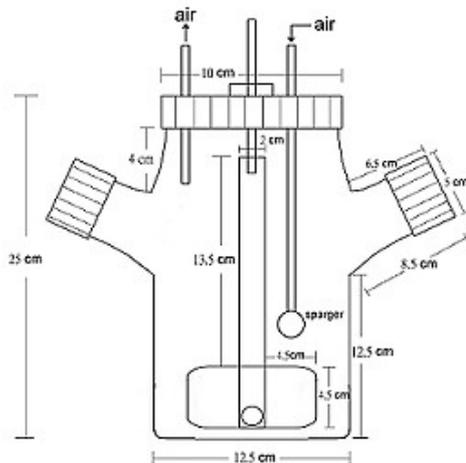


圖 2 2L 攪拌式生物反應器之設計圖

Fig. 2 A design chart of stirred bioreactor

(rev/min) 培養。培養時以 pH 值記錄器 (pH Indicator, DPD-3, 日製) 及 pH 電極 (Broadley

James Co., Ltd) 監測 pH 值, 並記錄 SCV 之生長變化。

(VII) 統計分析

1. 癒合組織誘導為單因子試驗, 其結果僅以百分比表示。
2. 癒合組織增殖之試驗為兩因子試驗, 以 SAS 軟體提供之 PROC GLM 分析。(1)當處理均數有顯著差異, 而試驗結果呈現具交感效應時, 以最小平方均值 (least squares mean : lsmeans) 法求其最佳組合。(2)若無交感效應時, 則以鄧肯新多變域 (Duncan's New Multiple Test) 比較各處理效應。

III、結果

(I) 癒合組織之誘導

臺灣三角楓成熟胚之子葉和胚軸皆可以誘導出癒合組織, 其結果詳如表 1。

1. 單以 2,4-D 或 NAA 即可誘導癒合組織發生, 其中以 2,4-D 於濃度 0.5 ppm 時誘導率較佳, 以胚軸為培植體其誘導率可達 50%, 而以子葉為培植體則可達 36.7%。
2. 2,4-D 及 NAA 雖於適當濃度下皆可誘導癒合組織發生, 且癒合組織多為淡黃色、濕軟緊密狀, 但培養 30 天後, 顯示以 2,4-D 處理之試驗組有不定根發生現象 (圖 3), 其中以 2,4-D 濃度在 0.1 ppm 時發生不定根之頻率最高。
3. 在 2,4-D 與 BA 或 TDZ 組合上, 以 0.5 ppm 2,4-D 與 0.5 ppm BA 組合, 培植體為胚軸之誘導率較高, 可達 70%, 誘導出之癒合組織亦為淡黃色、濕軟緊密狀, 但組合 auxin 與 cytokinin 之試驗組中皆無不定根發生現象。
4. 整個誘導試驗以同植物生長調節劑及同濃度觀之, 以胚軸為培植體皆較子葉可得較高誘導率。

(II) 癒合組織增殖

1. auxin 與 cytokinin 之組合

(1) auxin 與 cytokinin 之組合試驗中，所有處理之癒合組織鮮重都有增加之現象，若單以培養 30 天後的平均鮮重而言，2,4-D 與 cytokinin 之組合，以 0.5 ppm 2,4-D 與 1 ppm BA 組合所得的癒合組織鮮重最大，為 20.68 g，而 NAA 與 cytokinin 組合則以 0.5 ppm NAA 與 1 ppm BA 所得之癒合組織鮮重 20.93 g 最大。

(2) BA 與 TDZ 對癒合組織形態發展上有明顯不同，以 BA 而言，無論與 2,4-D 或 NAA 之組合，癒合組織表面光滑且呈淡黃色，而 TDZ 與 2,4-D 或 NAA 之組合，癒合組織雖開始時呈淡黃色，但隨培養時間增加，癒合組織會逐漸轉變成

綠色 (圖 4)。

2. 2,4-D 與 BA 或 TDZ 之組合效應

(1) 2,4-D 與 BA 之組合沒有交感效應存在，但 2,4-D 單獨有顯著差異，而 BA 則有極顯著差異 (表 2)，以鄧肯新多變域法比較 2,4-D 與 BA 之單獨效應，結果為 2,4-D 濃度在 0.5 ppm，BA 濃度在 1 ppm 時較適合癒合組織增殖。

(2) 2,4-D 與 TDZ 有極顯著的交感效應存在 (表 3)，以最小平方均值法比較各處理組合，2,4-D 與 TDZ 之組合中以 2,4-D 濃度 0.5 ppm 與 TDZ 濃度 0.1 ppm 組合較適合癒合組織增殖。(表 4)

3. NAA 與 BA 或 TDZ 之組合效應

(1) NAA 與 BA 有顯著的交感效應 (表 5)，利用最小平方均值法比較各處理組合，以 0.5 ppm NAA 與 0.1 ppm BA、

表 1 不同濃度 2,4-D、NAA、2,4-D 組合 BA 及 2,4-D 組合 TDZ 對台灣三角楓胚軸與子葉培植體癒合組織誘發率之影響

Table 1 Callus induction rate of hypocotyl and cotyledon of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in MS medium supplemented with different concentration of 2,4-D, NAA, combination of 2,4-D and BA and combination 2,4-D and TDZ

植物生長調節劑種類				培植體種類	
2,4-D ppm	NAA ppm	BA ppm	TDZ ppm	胚軸 誘發率 (%)	子葉 誘發率 (%)
--	--	--	--	16.17	6.7
--	0.1	--	--	13.3	6.7
--	0.5	--	--	33.3	20
--	1	--	--	40	20
--	3	--	--	6.7	10
--	5	--	--	3.3	0
0.1	--	--	--	23.3	20
0.5	--	--	--	50	36.7
1	--	--	--	33.3	23.3
3	--	--	--	10	33.3
5	--	--	--	0	0
0.5	--	0.1	--	56.7	26.7
0.5	--	0.5	--	70	43.3
0.5	--	1	--	63.3	40
0.5	--	--	0.1	60	40
0.5	--	--	0.5	46.7	43.3
0.5	--	--	1	26.7	23.3

表 2 不同濃度 2,4-D 與 BA 組合對台灣三角楓癒合組織增殖之變方分析

Table 2 The variance analysis of callus proliferation of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in the medium supplemented with 2,4-D and BA

變異來源	自由度	均方	F 值
2,4-D	1	7.58	8.55*
BA	2	57.38	64.7**
2,4-D×BA	2	2.58	2.91
機差	12	0.89	
總計	17		

*表示達 5% 顯著水準

**表示達 1% 極顯著水準

表 3 不同濃度 2,4-D 與 TDZ 組合對台灣三角楓癒合組織增殖之變方分析

Table 3 The variance analysis of callus proliferation of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in the medium supplemented with 2,4-D and TDZ

變異來源	自由度	均方	F 值
2,4-D	1	38.37	53.90**
TDZ	2	24.95	35.05**
2,4-D×TDZ	2	6.89	9.67**
機差	12	0.71	
總計	17		

*表示達 5% 顯著水準

**表示達 1% 極顯著水準

表 4 不同濃度 2,4-D 與 BA 及 2,4-D 與 TDZ 組合對臺灣三角楓癒合組織形成之影響與鄧肯氏新多變域檢定及最小平方均值檢定結果

Table 4 The effect in combination of 2,4-D and BA, and combination of 2,4-D and TDZ on callus multiplication of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki and results of Duncan's multiple range test and least squares mean test

2,4-D ppm	BA ppm	TDZ ppm	平均鮮重 g	Duncan		Lsmeans
				2,4-D	BA	
0.1	0	--	13.96	16.67b (0.1ppm)	13.92c	D
	0.5	--	16.79		(0.1ppm)	
	1	--	19.26		18.07b	
0.5	0	--	13.89	17.97a (0.5ppm)	(0.5ppm)	D
	0.5	--	19.34		19.97a	
	1	--	20.68		(1ppm)	
0.1	--	0	13.69			D
	--	0.1	15.7		C	
	--	0.5	13.54		D	
0.5	--	0	14.18			D
	--	0.1	20.23		A	
	--	0.5	17.29		B	

2,4-D+BA 採用鄧肯氏新多變域檢定法，同行數值後之字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

2,4-D+TDZ 採用最小平方均值檢定法，效果由最佳至最差為 A>B>C>D，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

表 5 不同濃度 NAA 與 BA 組合對台灣三角楓癒合組織增殖之變方分析

Table 5 The variance analysis of callus multiplication of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in the medium supplemented with NAA and BA

變異來源	自由度	均方	F 值
NAA	1	5.45	7.53*
BA	2	93.83	129.83**
NAA×BA	2	3.09	4.28*
機差	12	0.72	
總計	17		

*表示達 5%顯著水準

**表示達 1%極顯著水準

表 6 不同濃度 NAA 與 TDZ 組合對台灣三角楓癒合組織增殖之變方分析

Table 6 The variance analysis of callus multiplication of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in the medium supplemented with NAA and TDZ

變異來源	自由度	均方	F 值
NAA	1	16.92	13.77**
TDZ	2	18.04	14.69**
NAA×TDZ	2	1.11	0.9
機差	12	1.23	
總計	17		

*表示達 5%顯著水準

**表示達 1%極顯著水準

0.1 ppm NAA 與 0.5 ppm BA 及 0.5 ppm NAA 與 0.1 ppm BA 之組合最適合癒合組織增殖。

(2) NAA 與 TDZ 之組合無交感效應 (表 6)，以鄧肯新多變域法比較 NAA 與 TDZ 之單獨效應，結果為 NAA 濃度在 1 ppm，TDZ 濃度在 0.1 ppm 時最適合癒合組織增殖 (表 7)。

(III) 細胞懸浮培養

三種不同 sucrose 濃度處理之細胞生長 (圖 5)，以 3% sucrose 培養效果較好，於培養終止時，細胞濃度可達 12 (ml/15ml) (圖 6)。添加 1% sucrose 培養，雖於培養初期細胞生長情況較 5% 佳，但至培養中期細胞即無明顯增值現象，至培養終了其細胞濃度為 5.2 (ml/15ml)。以 5% sucrose 培養，細胞生長之誘發期 (lag phase) 明顯較其他兩試驗長，培養至第 14 天後，細胞濃度開始有增加現象，

但其增殖速率仍較 3% sucrose 差，培養終了時細胞濃度可達 7.4 (ml/15ml)。

(IV) 大量增殖

三種不同方式培養台灣三角楓細胞生長曲線及 pH 直變化情形詳如圖 7。

試驗 1：細胞於培養至第 16 天時細胞濃度開始增加，第 28 天後細胞濃度增加速率漸趨平緩，培養 50 天後細胞濃度可達 410 (ml/1300ml)。

試驗 2：細胞增殖量於培養後第 36 天開始明顯增加，但增加之速度不若試驗 1 快速，於培養後第 46 天細胞增殖量之增加速率開始平緩，最終濃度可達 380 (ml/1300ml)。

試驗 3：前半期細胞生長情形類似試驗 1，但在培養至第 38 天後將攪拌轉速調高至 50 (rev/min)，結果本已停滯生長之細胞又開始繁殖，最終細胞濃度可達 660 (ml/1300ml) (圖 8)。

表 7 不同濃度 NAA 與 BA 及 NAA 與 TDZ 組合對台灣三角楓癒合組織增殖之影響與鄧肯式新多變域檢定及最小平方均值檢定結果

Table 7 The effect of combination of NAA and BA and combination of NAA and TDZ on callus multiplication of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki and results of Duncan's multiple range test and least squares mean test

NAA ppm	BA ppm	TDZ ppm	鮮重 g	Duncan		Lsmeans
				NAA	TDZ	
0.5	0	--	12.68			C
	0.5	--	19.94			B
	1	--	20.93			A
1	0	--	13.49			C
	0.5	--	19.6			A
	1	--	20.76			A
0.5	--	0	12.91	13.96b (0.5ppm)	13.42b	
	--	0.1	15.47		(0ppm)	
	--	0.5	13.51		16.83a	
1	--	0	13.93	15.9a (1ppm)	(0.1ppm)	
	--	0.1	18.19		14.53a	
	--	0.5	15.59		(0.5ppm)	

NAA+TDZ 採用鄧肯新多變域檢驗法，同行數值後之字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

NAA+BA 採用最小平方均值檢驗法，效果由最佳至最差為 A>B>C，字母相同者表示差異未達 5% 顯著水準

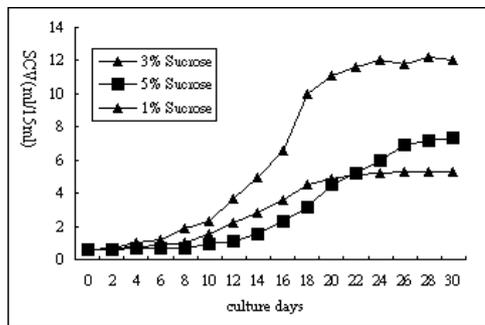


圖 5 不同蔗糖濃度對台灣三角楓細胞生長之影響

Fig. 5 The effect of sucrose concentration on growth rate on cell suspension culture of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki

三種試驗之 pH 皆為一開始先下降，之後隨培養時間增加而增加，試驗 1 與試驗 3 之 pH 值變化模式較相似。試驗 2 之 pH 值雖隨培養時間增加，但較緩慢，且其培養終了時之 pH

值為 5.97，亦較其他處理低。

IV、討論

台灣三角楓之癒合組織誘導，單獨添加 auxin，不論是子葉或胚軸都可誘導癒合組織發生，但其效果皆不若以 auxin 組合 cytokinin 之處理，故 cytokinin 對癒合組織誘導具有促進的效用。誘導率最佳者為以 2,4-D 0.5 ppm 與 BA 0.5 ppm 組合，培植體為胚軸所得之效率最高。

cytokinin 對癒合組織之增殖，當 BA 濃度增加時所得的癒合組織鮮重愈大，但 TDZ 在 0.5 ppm 時已超出最適癒合組織增殖範圍。King and Morehart (1987) 研究 BA、NAA 及 2,4-D 對 *Acer rubrum* L. 癒合組織形成之關係，指出 BA、NAA 及 2,4-D 對癒合組織不論在誘導或增殖上皆有影響，且組合使用較單獨使用效果更顯著，此與本研究結果相似。

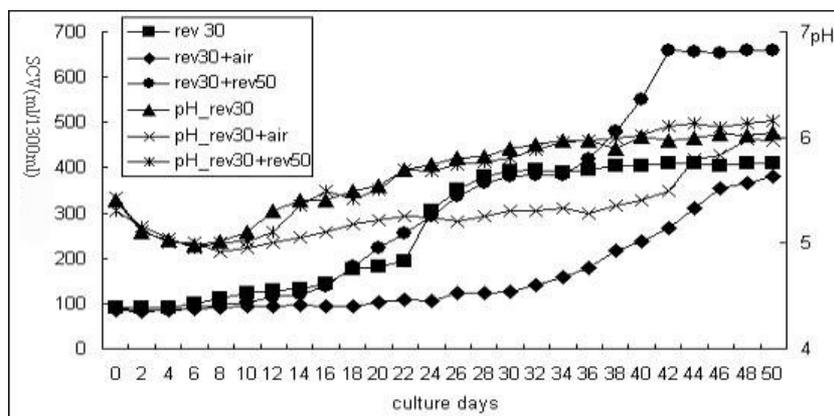


圖 7 三種不同方式培養台灣三角楓細胞於 2 公升生物反應器其細胞生長曲線與 pH 值變化情形
Fig. 7 Three models of cell growth curve and pH value of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Haya) Sasaki cultured in 2L bioreactor

sucrose 為維持細胞生長的碳水化合物來源之一，除維持生長外亦影響滲透壓及某些形態發育 (Bonga and Aderkas 1993)。在本研究中，以 3% sucrose 最適合細胞生長，而 1% sucrose 效果最差，雖 Kozai *et al.* (1988) 認為在低濃度碳水化合物環境培養下有助於植物細胞發展光合作用能力，但本試驗無此現象發生，其原因可能為缺少高濃度 CO_2 及強烈光照所致。5% sucrose 培養發現細胞之誘發期較其他試驗長，可能因高濃度 sucrose 造成不適細胞生長之滲透壓，Do and Cormier (1990) 培養葡萄 (*Vitis vinifera*) 細胞時，發現高濃度 sucrose 或 mannitol 會導致水壓過高，影響細胞生長。

是否通入空氣對台灣三角楓細胞生長不為一限制因子，通入氣體反而使細胞生長適應期增加，且培養之最終濃度減少，推測原因有 3：(I) 通氣改變生物反應器內之氣體組成，Gathercole *et al.* (1976) 培養 *Acer pseudoplatanus* 懸浮細胞，發現細胞生長需要約 1% CO_2 才能快速增殖。(II) 氣泡易將細胞推擠至培養液面，於培養液表面形成泡沫，Wongsamuth and Doran (1994) 認為生物反應器培養時所形成的泡沫會減少反應器之工作體積，Ingram and Mavituna (2000) 指出泡沫會包覆細胞並使沉澱，此現象會影響生物反應器的質傳效果。(III)

通氣造成細胞爬壁現象，黏附在槽壁及轉軸之細胞因未接觸培養液而逐漸壞死，將壞死之細胞可能會分泌 proteases 而抑制其他細胞生長 (Piehl *et al.* 1988)。

三種方式培養 pH 值皆隨培養時間增加而升高，試驗 1 和 3 最終 pH 值都超過 6，而試驗 2 為 5.97，此種 pH 值上升現象應和細胞分泌物有關，Goodchild and Givan (1990) 培養 *Acer pseudoplatanus* 懸浮細胞，其培養液之 pH 值可增加至 6 以上，原因為細胞內累積 ammonium、glutamine、glutamate 及 asparagine 所致。

V、結論

台灣三角楓為台灣特有變種植物，且瀕臨滅絕，實有必要積極進行復育以恢復其族群數目。本研究雖已成功誘導出台灣三角楓之癒合組織，並利用生物反應器大量增殖，然而尚未進行微體繁殖之研究，且在大量培養下，細胞是否仍具細胞全能性尚未確定，故後續之研究重點應著重於癒合組織之誘導分化及懸浮細胞全能性之探討。

VI、引用文獻

- 呂勝由、林明志 (1996) 台灣稀有及瀕危植物之分級—彩色圖鑑(1)。行政院農委會。35-36 頁。
- 楊金昌、王亞男、李衛宗 (2002) 青剛櫟懸浮細胞建立與多酚性化合物分析。中華林學季刊 35(1) : 9-19。
- Auge, R. (1995) The Physiological phenomena related to the realisation of culture *in vitro*. In: Vidalie, H. (ed) *In Vitro Culture and Its Application in Horticulture*. Science Publishers, Inc. 16-31 pp.
- Bonga, J. M. and P. Von. Aderkas (1993) *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Press, London. 45-46 pp.
- Do, C. B. and F. Cormier (1990) Accumulation of anthocyanins enhanced by high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 9: 143-146.
- Gathercole, R. W. E., K. J. Masfield and H. E. Street (1976) Carbon dioxide as an essential requirement for culture sycamore cell. *Physiol. Plant* 37: 213-217.
- Goodchild, J. A. and C. V. Givan (1990) Influence of ammonium and extracellular pH on amino and organic acid contents of suspension of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol. Plant.* 78: 29-37.
- Huetteman, C. A. and J. E. Preece (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 33: 105-121.
- Ingram, B. and F. Mavituna (2000) Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo cultures. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 61: 87-96.
- James, D. C. (2000) Nutrition of callus cultures. In: Trigiano, R. N. and D. J. Gray (eds) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* (2nd.) CRC Press, New York. 39-44 pp.
- Kerns, H. R. and M. M. Jr-Meyer (1986) Tissue culture propagation of *Acer freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. *HortScience* 21(5): 1209-1210.
- King, S. M. and A. L. Morehart (1987) Effect of BA NAA and 2,4-D on red maple callus growth. *Plant Cell, Tis. and Org. Cult.* 10: 57-63.
- Kozai, T., Y. Koayama and I. Watanabe (1988) Multiplication of potato plantlet *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta. Hortic.* 230: 121-127.
- Li, Z. S., J. Attias and M. Thellier (1990) Filtration stress-induced variations of peroxidase activity in cell suspension cultures of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cells. *Physiol. Plant.* 78: 22-28.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Piehl, G. W., J. Berlin, C. Mollenschott and J. Lehman (1988) Growth and alkaloid production of a cell suspension culture of *Thalictrum rugosum* in shake flasks and membrane-stirrer reactor with bubble free aeration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 456-461.
- Stevenson, T. T., M. McNeil, A.G. Darvill and P. Albersheim (1986) Structure of plant cell walls: An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 80: 1012-1019.
- Wilson, G (1976) A simple and inexpensive design of chemostat enabling steady-state growth of *Acer pseudoplatanus* L. cell under phosphate-limiting conditions. *Ann. Bot.* 40: 919-932.
- Wilhelm, E. (1999) Micropropagation of

juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 57: 57-60.

Wongsamuth, R. and P. M. Doran (1994) Foaming and cell flotation in suspended plant cell cultures and the effect of chemical

antifoams. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 481-488.

Yusnita, S., R. L. Geneve and S. T. Kester (1990) Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis Canadensis* var. *alba* L.). *J. Environ. Hort.* 8: 177-179.



圖 1 台灣三角楓之懸浮細胞 (bar = 1cm)
Fig. 1 Suspension cells of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki. (bar = 1cm)



圖 6 以 MS 培養基添加 1ppm NAA 及 1ppm BA 培養台灣三角楓懸浮培養 30 天之情形
Fig. 6 Suspension culture of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in MS basal liquid medium supplemented with 1ppm NAA and 1ppm BA after 30 days



圖 3 癒合組織培養於 MS 培養基添加 0.1 ppm 2,4-D 有不定根發生現象 (bar = 1 mm)
Fig. 3 Adventitious rooting from callus cultured in MS basal medium supplemented with 0.1 ppm 2,4-D (bar = 1 mm)



圖 8 兩段式培養台灣三角楓懸浮細胞於 2L 攪拌式生物反應器 50 天之情形
Fig. 8 Two-step process culture of *Acer buergerianum* Miq. var. *formosanum* (Hayata) Sasaki cultured in 2L stirred bioreactor after 50 days



圖 4 Auxin 與 BA 或 TDZ 組合對癒合組織形態發育之影響
Fig. 4 The effect of BA or TDZ combined with auxin on morphogenesis of callus

