

國立台灣大學生物資源暨農學院森林環境暨資源所



碩士論文

School of Forestry and Resource Conservation

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

水黃皮之微體繁殖及體胚誘導初步探討

Preliminary study on the micropropagation and somatic
embryogenesis induction of *Pongamia pinnata*

研究生：張文齊

Wen-Chi Chang

指導教授：王亞男 教授

Advisor : Dr. Ya-Nan Wang

中華民國 102 年 1 月

January, 2013

誌謝



本論文得以付梓完成，承蒙指導教授 王亞男博士之悉心教誨，在論文研究寫作期間，不吝地給予指導與協助，使我了解做學問及待人接物應有的態度，委實獲益良多，受用不盡。

口試期間感謝 李明仁老師、張淑華老師、林敏宜老師及林蘭東老師於百忙中撥冗審閱論文及殷切指正，並賜予許多寶貴意見，使本論文更臻充實完備；特別感謝 汪淮教授願意撥空修改英文摘要。

其次，要感謝實驗室的玲薇學姊、學文學長、天培、巍中、忠諺、佳紋、亭潔及唯恩，謝謝大家的陪伴及包容，尤其同窗好友的禹安及俊佑，一路上互相打氣與砥礪，讓我的研究生涯因你們增添不少笑聲，更讓我有重新出發的動力；還有宜俊學長，在我剛進入台大校園，面對新的學校、新的同學及新的生活之際，援助懵懂的我得以順利加入這個溫暖的大家庭；亦由衷感謝忠義學長，我們實驗室的小家長，總是熱心的提供學術上的經驗及生活上的關心。

最後，僅以本論文獻給摯愛的家人，感謝一路上無論精神或生活上，無怨無悔支持我的父母，有你們的後援我才能徜徉肆恣於浩瀚的學術領域中，更能無後顧之憂完成我的碩士學業，回憶往事種種，感激之情，溢於言表；謝謝哥哥祐翔不時的談天鼓勵及提供相機的協助；另感謝親愛的雙胞胎姊姊文慈，這段時間對我無私的付出與關愛，包容我的任性，無論開心傷心的每一天，因為有你的陪伴，都是有意義的每一天；最後是我們家最可愛的德國狼犬 mini，感謝有你安撫我的心情；這段期間有你們默默的付與和關心，我才能努力不懈，很開心能和你們成為一家人，我永遠愛你們。

其中感謝曾經幫助過我的貴人們，因為有你們不吝嗇的伸出援手，我才遂以邁入新的人生階段，未來也希望大家都能平安順心，身體健康。

張文齊 謹誌於

台灣大學森林環境暨資源研究所

2013 年

中文摘要



本試驗目的為建立水黃皮組織培養之微體繁殖及體胚誘導體系。

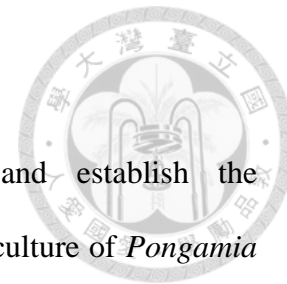
本試驗以水黃皮之帶節莖段為培植體。將帶節莖段先以流水處理2 h，後以稀釋300之安期消毒液震盪30 sec，再以70%之酒精震盪30 sec，最後在5%NaOCl水溶液(含約0.1% (v/v) Tween 20 展著劑)之超音波中震盪30 min，無污染率可達65%。

在器官形成方面：以MS或WPM中添加1 mg/L BA無菌苗之結果較佳。以水黃皮無菌種子苗之子葉節、帶節莖段、莖段及下胚軸為材料，體胚誘導結果以子葉節較佳，以添加1 mg/L BA前處理之子葉節培養1個月後，於MS添加2 mg/L BA及0.1 mg/L NAA中，每個培植體平均可產生5.42個芽體。以水黃皮母樹萌蘖之枝條為培植體，取春季正要突破休眠的春芽，芽體誘導在MS添加1-2 mg/L BA及0.1 mg/L NAA中較佳。芽體伸長結果以在MS添加1 mg/L GA₃及0.2 mg/L BA中最佳(平均1.18 cm)。將單一芽體切下，培養於1/2MS或MS添加IBA之發根培養基中誘導發根，以在1/2MS添加1 mg/L IBA中之處理較佳，達發根率74.55%、平均產生2.96個根，且平均根長度約1.33 cm。以子葉為培植體進行體胚誘導，於MS添加3 mg/L 2,4-D與0.5 mg/L Kn2個月後，體胚誘導率為20.83%，且平均體胚數為3個。

發根的小苗經馴化結果，馴化6週的成活率為85.88%，且莖伸長約0.78 cm。

關鍵字：水黃皮、微體繁殖、體胚誘導、馴化

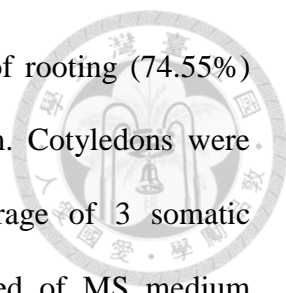
Abstract



The main objectives of this study are to purpose and establish the micropropagation and somatic embryogenesis system in the tissue culture of *Pongamia pinnata*.

Results of nodal stem segments of epicormics culture of *P. pinnata* were as followed: nodal stem segments were first treated with running water for two hr. , shaking in 1/300 (v/v) anticeptol solution (Benzel thyonium chloride U.S.P 10% (w/v) , Alkyl aryl polyether alcohol 10% (w/v)) for 30 sec , then shaking in 70% ethanol solution for 30 seconds, then soaked in 5% NaOCl (supplemented with 0.1% (v/v) Tween 20) and treated with ultrasonic shaking for 30 min and the nodal stem segments obtained 65% non contamination.

In the aspect of organ formation : the medium of 1 mg/L BA in MS or WPM gained the best results of aseptic seedlings. Micropropagation of *P. pinnata* from cotyledonary nodes, nodal stem, epicotyls and hypocotyls explants derived from *in vitro* seedlings. Multiple shoots induction from cotyledonary node explants gained the best result of that from other explants. The greatest shoots were induced from the 1 mg/L BA pretreating of cotyledonary nodes explants was achieved when MS was added with 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA, average of 5.42 shoots per explants were formed in one month. Spring buds at the stage of ready to burst from dormancy and shoot explants in spring were collected from the coppice shoots of *P. pinnata* wild trees. MS medium containing 1-2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA was the best for inducing more shoots. Shoot elongation of these multiple shoots was good at 1 mg/L GA₃ and 0.2 mg/L BA in MS medium. Individual shoot were rooted on 1/2MS or MS supplemented with IBA.



The 1 mg/L IBA in 1/2MS medium gave the highest percentage of rooting (74.55%) with root number of 2.96 roots/shoot and root length of 1.33 cm. Cotyledons were induced with the highest percentage of 20.83% and with average of 3 somatic embryo/per explant of somatic embryogenesis in media composed of MS medium supplemented with 2,4-D 3 mg/L and Kn 0.5 mg/L after two months.

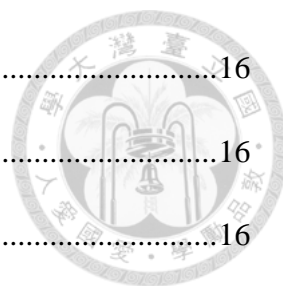
Shoots with roots were suitable for acclimatization. The plantlets survival rates were 85.88% with average shoot length of 0.78 cm after six weeks of acclimatization.

【 Key words 】 *Pongamia pinnata*, micropropagation, somatic embryogenesis, acclimatization

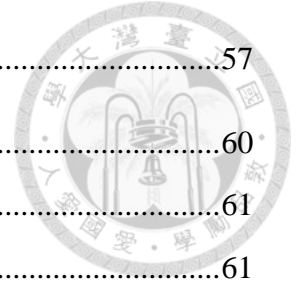
目錄



誌謝	i
中文摘要	ii
英文摘要	iii
目錄	v
表目次	ix
圖目次	xi
壹、前言 (Introduction)	1
貳、前人研究 (Literature Review)	3
一、水黃皮之介紹	3
(一) 生質能源	3
(二) 植生復育	3
(三) 生藥功能	4
二、微體繁殖的定義	6
三、微體繁殖的步驟	6
四、水黃皮之微體繁殖	7
(一) 培養基	7
(二) 培植體	7
(三) 器官發生	7
(四) 體胚發生	12
參、材料與方法 (Materials and Methods)	16
一、材料	16

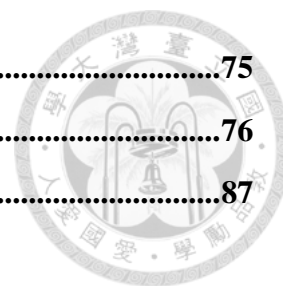


(一) 種子	16
(二) 萌蘖枝條	16
(三) 水黃皮之微體繁殖	16
(四) 水黃皮組培苗之馴化	17
(五) 水黃皮體胚之誘導	17
二、方法	17
(一) 種子處理	17
(二) 試驗項目	18
(三) 培養基	22
(四) 培養環境	22
(五) 形態觀察	23
(六) 統計分析	23
肆、結果 (Results).....	28
一、水黃皮野外帶節莖段之表面消毒.....	28
二、水黃皮無菌種子苗之培養與生長.....	30
三、水黃皮之芽體誘導試驗.....	34
(一) 種子苗材料	34
(二) 野外材料.....	49
四、水黃皮之芽體伸長試驗.....	53
五、水黃皮芽體誘導發根之試驗.....	55
六、水黃皮切片觀察結果.....	57
(一) 芽體試驗	57
(二) 芽體伸長試驗	57



(三) 發根試驗	57
七、水黃皮組培苗之馴化.....	60
八、水黃皮體胚誘導之初步探討.....	61
(一) 培植體特性	61
(二) 各植物生長調節劑誘導	61
伍、討論 (Discussion)	66
一、水黃皮野外帶節莖段之表面消毒.....	66
二、水黃皮無菌種子苗之培養與生長.....	66
(一) 發芽率	66
(二) 平均根長度	67
(三) 平均莖長度	67
三、水黃皮芽體誘導試驗.....	68
(一) 種子苗材料	68
(二) 野外材料	70
四、水黃皮之芽體伸長試驗.....	71
(一) 培植體差異	71
(二) GA ₃ 與 BA 兩种植物生長調節劑之影響.....	71
五、水黃皮芽體誘導發根之試驗.....	72
(一) 基礎培養基	72
(二) IBA 對發根之影響	72
六、水黃皮組培苗之馴化.....	73
七、水黃皮體胚誘導之初步探討.....	73
(一) 培植體特性	73
(二) 各植物生長調節劑誘導	74

陸、結論 (Conclusion)	75
柒、參考文獻 (References).....	76
捌、附錄 (Appendix).....	87

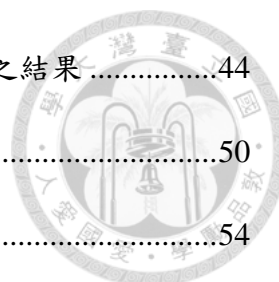


表目次



表 1 水黃皮之藥用功能	5
表 2 水黃皮莖段誘導之結果	9
表 3 水黃皮莖段伸長之結果	11
表 4 水黃皮根的誘導結果	12
表 5 豆科樹種體胚誘導之結果	13
表 6 水黃皮帶節莖段之表面消毒試驗組合	18
表 7 水黃皮無菌種子苗誘導在 MS、1/2MS 及 WPM 之組合	19
表 8 水黃皮芽體伸長在 MS 添加 BA 與 GA ₃ 之試驗組合	20
表 9 水黃皮發根試驗在 MS 或 1/2MS 添加 IBA 之組合	21
表 10 水黃皮體胚誘導在 MS 添加 Kn、BA 與 2,4-D 之組合	22
表 11 水黃皮野外帶節莖段表面消毒及芽體誘導之結果	29
表 12 水黃皮無菌種子苗誘導與培養 2 個月之枝條生長結果	31
表 13 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 WPM 前處理於 BA 與 NAA 不同組合對芽體 之誘導結果	40
表 14 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 GA ₃ 前處理下於 BA 與 NAA 不同組合對芽體 誘導之結果	41
表 15 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 BA 前處理於 BA 與 NAA 不同組合對芽體誘 導之結果	42
表 16 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 BA 前處理於 BA 與 IBA 不同組合對芽體誘導 之結果	43

表 17 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 TDZ 不同濃度對芽體誘導之結果.....	44
表 18 水黃皮生長點在不同 BA 及 NAA 組合下枝條生長之結果.....	50
表 19 水黃皮子葉節及帶節莖段芽體伸長試驗之結果.....	54
表 20 水黃皮發根試驗之結果.....	55
表 21 水黃皮未成熟胚誘導體胚之結果.....	62
表 22 水黃皮未成熟胚與子葉誘導體胚之結果.....	63



圖目次



圖 1 水黃皮	24
圖 2 水黃皮種子發育之各階段	26
圖 3 水黃皮帶節莖段未受汙染之結果	29
圖 4 水黃皮之種子苗培養 2 個月	32
圖 5 水黃皮在 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 之芽體誘導結果	37
圖 6 水黃皮前處理子葉節與帶節莖段在 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 中芽體誘導之 結果	39
圖 7 水黃皮子葉節在 BA 前處理與 BA 及 0.1 mg/L NAA 中 1 個月芽體數誘導之結 果	39
圖 8 水黃皮以莖段及下胚軸為培植體培養於不同培養基誘導之芽體及癒合組織	45
圖 9 水黃皮芽體誘導之結果	51
圖 10 水黃皮野外帶節莖段經表面消毒後芽體誘導之結果	56
圖 11 水黃皮在 0.2 mg/L BA 及 1 mg/L GA ₃ 中 1 個月芽體伸長之結果	56
圖 12 水黃皮子葉節芽體在 1/2MS 添加 1 mg/L IBA 中 1 個月發根之結果	56
圖 13 水黃皮切片之結果	58
圖 14 水黃皮組培苗馴化之結果	60
圖 15 水黃皮體胚誘導 2 個月之結果	64

壹、前言 (Introduction)




水黃皮 (*Pongamia pinnata*) 為豆科 (Fabaceae) 蝶形花亞科 (Faboideae) ，原產於印度的中型喬木，具有景觀樹木、防風樹種、木材利用、飼料，葉與種子經榨油後的種餅 (seed cake) 可作為牛及禽畜的飼料，且種餅經醱酵後所產生的生物氣 (biogas) 亦可用於瓦斯燃料 (Sugla *et al.*, 2007) 等功能。其種子油可作為生質能源，豆莢與柴薪亦可供第二代生質能源纖維乙醇 (cellulosic ethanol) 之原料，另民俗療法，可用其治療風濕病、皮膚病等；樹葉可作綠肥 (徐聖等，2010；應紹舜，2011) 。

面對有限之石化燃料、原油價格高漲及溫室氣體日增等問題，尋找永續、具再生性且對環境友善的新能源已成為一個國家賴以生存及發展經濟所必須努力的目標。因油料作物生長過程中所吸收的二氧化碳可抵銷使用過程中二氧化碳的釋放，不會造成大氣中二氧化碳濃度的上升，故生質柴油被視為碳中性 (carbon neutral) 的綠色能源 (Kumar and Sharma, 2011) ，如此不僅可減少石化燃料之使用，並能降低溫室氣體的排放。

現今面臨石化原料逐漸耗竭以及環保意識形成，台灣目前對於重金屬污染土壤之處理採取休耕策略，如能於休耕或受重金屬污染之土地中種植能源作物，在所種植植物生產之生質能合乎法規要求之前提下，利用此生質能源，不但達到受污染土地再利用的目的，對於環境品質而言更可以達到減少溫室氣體之目的 (賴鴻裕及盧至人，2007) ，另外藉由植物生長也可將土壤重金屬吸收，累積一定濃度之重金屬，以幫助土壤復育。

鑒於上述水黃皮之效用，若其成為經濟造林木並大量推廣栽植，常受下列因素影響：(1) 種子活性低；(2) 種子儲藏時因真菌感染而使種子發芽率降低而匱乏；(3) 種苗易受根腐病菌 (*Rhizoctonia hiemalis*) 之感染，會有未成熟落葉、枯萎和生長不良等症狀；(4) 因種皮過厚而難以發芽 (Sugla *et al.*, 2007) 。水黃皮可利用扦插、嫁接進行無性繁殖，但利用此方式種植出之植株扎根不深，因此非常容易傾倒 (Azam *et al.*, 2005) ，故無法在貧瘠和邊際土壤進行栽植。

水黃皮在國內並未有組織培養方面相關的研究，本研究期望藉由水黃皮培養之種子苗其子葉節、莖段、下胚軸及帶節莖段，以及野外萌蘖生長點和葉片為材



料，誘導產生水黃皮芽體，並建立其微體繁殖體系（micropropagation system）；利用3種發育階段之未成熟胚與成熟胚之胚與子葉，誘導水黃皮體胚發生（somatic embryogenesis），體胚培養主要有以下優點：(1) 根芽同步發生，可減少繼代次數與多次操作受污染之風險；(2) 體胚體積小可高密度培養；(3) 無需切割分離，簡化操作流程並減少對培植體之需求；(4) 可製成人工種子，利於貯藏運送；(5) 便於進行基因轉殖以達品種改良之目的（林敏宜，2001；王亞男，2006）。以期將來大量栽植時能節省成本、縮短收穫時間，且收穫之時間容易預期等優勢，期望提供未來學術研究及商業應用上參考。

貳、前人研究 (Literature Review)

一、水黃皮之介紹

水黃皮花冠蝶形呈淡紫色，總狀花序腋生，花期為春秋兩季，約4-5月及9-11月 (圖1-A)；葉為奇數羽狀複葉 (圖1-B)；果為莢果呈橢圓形，內含種子一粒，鮮有兩粒；種子富含油質，長10-20 cm (Kesari and Rangan, 2010)。水黃皮適合生長於年降雨量500至2,500 mm之潮濕及亞熱帶環境 (Kumar and Sharma, 2011)。

(一) 生質能源

水黃皮於栽植4-7年後開始結果，且單株林木的種子產量約為9-90 kg，推估種植密度為100株/ha水黃皮，則有900-9,000 kg/ha的種子產量潛力 (Karmee and Chadha, 2005)。水黃皮含油量隨著地區及品種的不同會略有變化，有報告指出採集自印度德干高原西部之瑪哈拉希特拉省 (Maharashtra state) 種子含油量高達49.8% (Manjare *et al.*, 2003)，油質分析方面，其脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl ester, FAME) 的性能符合美國 (ASTM D6751)、德國 (DIN 51606) 及歐盟 (EN 14214) 生物柴油標準規範，適合作為生物柴油 (Azam *et al.*, 2005; Karmee and Chadha, 2005)，這些性能包括：碘價 (iodine value) 為74.78-100.98，表示油品長期存放的穩定性；十六烷值 (cetane number) 為50.85-59.11表示其具燃料燃燒能力 (Mukta *et al.*, 2009)。

水黃皮做為能源樹種的優勢為：(1) 不屬於農作物，因此不會產生糧食危機的問題 (徐聖等, 2010)；(2) 水黃皮可忍受半乾燥邊陲地帶，種子苗能種植在邊際性土地 (marginal land)；(3) 種子高產量、高油量且品質優良；(4) 屬於豆科植物，能行固氮作用 (nitrogen fixation)，可降低氮肥使用量。因此商業化栽培水黃皮已成為有利可圖之產業 (Karmee and Chadha, 2005)。

(二) 植生復育

Shirbhate及Malode (2012) 以水黃皮實生苗栽植於受重金屬污染之土壤中2個月，分析其重金屬含量，結果顯著降低了銅、鋅、鉻及錳等重金屬含量，水黃皮根可耐鹽在鹹水中生長良好，並可種植在退化、荒地或休耕的土地 (Tomar and Gupta, 1985; Kumar and Sharma, 2011)，其具有改善土質的優點 (徐聖等, 2010)，

為具植生復育潛力之樹種。如其建立無菌體系後，可以嘗試基因轉殖工程，利用基因轉殖形成金屬螯合素 (phytochelatin, PC)，利用金屬螯合素可以緊緊的把重金屬抓住，以植生復育達到去除重金屬之目的 (林梓銘, 2005)。



(三) 生藥功能

近幾年來也有越來越多研究指出水黃皮之藥用潛力 (表1)，其根的皮分離出 pongabiflavone 及 karanjabiflavone，有治療牛皮癬的研究 (Ghosh *et al.*, 2011)，並使用乙醇萃取根部，取得水黃皮根總黃酮 (puerariae radix flavones, PRF)，可能與減少自由基生成、抑制脂質過氧化反應與增強氧化能力，以干預聚糖硫酸鈉 (dextran sulfate sodium, DSS) 誘導潰瘍性結腸炎小鼠作用顯著 (李靖等, 2008)，乙酸乙酯萃取物 (acetic ether extract from *P. pinnata* roots, PRA) 可抑制胃粘膜炎組織超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性降低、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 生成增加及一氧化氮減少，可抗小鼠實驗性胃潰瘍及抗炎鎮痛 (劉可雲等, 2007；劉可雲和朱毅, 2010)；花的萃取物對順雙氮雙氯鉑 (cisplatin) 和全達素 (gentamicin) 所引起的腎損傷具有抗氧化活性，對腎臟有保護作用 (Shirwaikar *et al.*, 2003) 並抗糖尿病 (Punitha and Manoharan, 2006)；果之種子油可抗菌，且利用乙醇萃取後，水黃皮醇及水黃皮素可降血糖 (Tamrakar *et al.*, 2008；Kesari *et al.*, 2010；Tamrakar *et al.*, 2011)，果萃取物可抗血脂異常及抗病毒 (Elanchezhiyan *et al.*, 1993；Bhatia *et al.*, 2008；Vadivel and Biesalski, 2011)；葉子乙醇萃取物有抗血脂及抗氧化 (Essa and Subramanian, 2006；Essa *et al.*, 2010)，可作為合成抗蟲劑 (Sunilson *et al.*, 2009) 等。

表 1 水黃皮之藥用功能

Table1. Medicinal function of *P. pinnata*



Plant parts	Medicinal value	Reference
Roots	anti-inflammation	劉可雲等 (2007)
	inhibit gastric ulcer	劉可雲等 (2007) ; 劉可雲及朱毅 (2010)
	inhibit ulcerative colitis	李靖等 (2008)
	cure psoriasis	Ghosh <i>et al.</i> (2011)
Flower	protective renal	Shirwaikar <i>et al.</i> (2003)
	inhibit alloxan induced diabetic	Punitha and Manoharan (2006)
Seed	antihyperglycemic and antilipidperoxidative	Elanchezhiyan <i>et al.</i> (1993)
	anti-dyslipidemic activity	Bhatia <i>et al.</i> (2008)
	antihyperglycemic activity	Tamrakar <i>et al.</i> (2008) ; Tamrakar <i>et al.</i> (2011)
	antimicrobial activity	Kesari <i>et al.</i> (2010)
	against herpes simplex virus HSV-1 and HSV-2	Vadivel and Biesalski (2011)
Leaf	against cholera and enteroinvasive bacterial	Brijesh <i>et al.</i> (2006)
	anti-hyperammonemic and antioxidant	Essa and Subramanian (2006)
	inhibited White Spot Syndrome Virus	Rameshthangam and Ramasamy (2007)
	antimicrobial agent	Bajpai <i>et al.</i> (2009)
	resistance to synthetic anti-lice agents	Sunilson <i>et al.</i> (2009)
	hypolipidaemic and antihyperlipidaemic	Essa <i>et al.</i> (2010)
	anticonvulsant activity	Manigauha and Patel (2010)



二、微體繁殖的定義

微體繁殖為組織培養範疇之一，利用植物細胞分化全能性 (totipotency)，即每個細胞都具有該植物遺傳信息的特性，離體細胞在一定培養條件下，經過逆分化 (dedifferentiation) 和再分化 (redifferentiation) 的步驟，藉由器官發生 (organogenesis) 或體胚發生兩條途徑，重新合成具再生完整能力的個體，以達到大量繁殖的目的。

三、微體繁殖的步驟

最初由 Murashige (1974) 將微體繁殖概分為無菌苗的建立、誘導並增殖芽體或體胚、發根及馴化等三個階段；至今 Debergh 及 Maene (1981) 為求商業生產效率及經濟考量所需，將其分成五個階段：第零階段為培植體準備階段：母株或培植體在人為控制環境下培養，或給予適當的處理，以獲得更健康且均質之培植體。第壹階段為無菌體系之建立：此階段培植體需達無菌條件外，還須考慮額外添加劑 (如：抗生素或抗氧化劑) 對培植體存活率及再生率之影響，Robert 及 Dennis (2000) 指出能成功建立第壹階段的四個因素，分別為：(1) 培植體的生理時間；(2) 培植體的取材位置；(3) 培植體的大小；(4) 培植體的褐化問題。第貳階段為增殖階段：在適當的培養方式下，先產生器官發生並促進芽體大量生長，而器官發生途徑有二，一為直接器官發生，即由培植體直接誘導器官形成；二為間接器官發生，先由培植體產生癒合組織 (callus)，再進行誘導器官體系形成，但根據 Cecchini 等 (1992) 利用荷蘭豆 (*Pisum sativum*) 芽體作為培植體誘導癒合組織及間接產生芽體測試 DNA 含量，結果兩者在 DNA 含量皆降低，顯示癒合組織在長時間繼代培養下對 DNA 含量可能產生的變異，對種原保存及大量繁殖苗木而言，並不是一種理想繁殖方式。第參階段為芽體的伸長、根原體誘導及根系發育階段，使其可成功移植到土壤環境中生長所準備，許多木本植物在此階段以添加細胞生長素 (auxin) 類之植物生長調節劑 (plant growth regulators, PGRs)，在適當的植物生長調節劑種類與濃度下有助於植物體之發根。第肆階段為移植階段：剛自植株培養在無菌容器移出於自然環境時，主要將其營養來源由混營性 (mixotrophy) 或異營性 (heterotrophy) 生長，達到進行光自營性 (photoautotrophy) 生長之能力，藉由馴

化 (acclimatization) 及健化 (hardening) 的步驟，使植株能適應外界水分逆境、病蟲危害及溫度、光度等變化，使組織培養苗可面對自然環境的劇烈變化，能存活且健康的生長。



四、水黃皮之微體繁殖

(一) 培養基

一般植物較常採用的是 Murashige and Skoog (MS) 培養基，而木本植物以 woody plant medium (WPM) 培養基 (Lloyd and McCown, 1980) 培養基最常見。MS 培養基之鹽類配方在芽體誘導及開始階段較佳，但過高的鹽類濃度較不適合大多數木本植物之芽體培養 (Tonon *et al.*, 2001)，故許多木本植物會以調整過鹽類較低的 1/2MS 或 WPM 基本培養基進行試驗。

為了培植體的誘導反應，我們會在培養基上添加各種不同的植物生長調節劑，常用的植物生長調節劑分為細胞生長素 (auxins, a)、細胞分裂素 (cytokinins, c) 和激勃素 (gibberellins) 三大類；在植物組織和器官培養的應用上，細胞生長素和細胞分裂素是目前調節生長和形態發生最重要的調節劑。前人研究發現細胞生長素與細胞分裂素的比率 (a/c) 降低時，可促進芽的分化；比率提高時，則可促進根及癒合組織的形成 (Sita, 1979)。

(二) 培植體

利用植物體之組織或器官作為培養材料稱為培植體，包括植物根、莖、葉、芽及胚等。培植體會因來源部位、生理狀態等條件而影響試驗結果 (George and Sherrington, 1984)。水黃皮芽體誘導最常被使用的培植體就是子葉節 (cotyledonary nodes)，Bailey (1956) 指出子葉節位於子葉之著生點，與維管束 (vascular strands) 相接連，且為幼苗之原始部分。

(三) 器官發生

器官發生為培植體經誘導後再生成新的再生體 (regenerant)，為形態發生的途徑之一，不同於體胚發生為具有形態雙極性，即在發育的早期階段從方向相反的

兩端分化出莖端及根端，而器官發生需要透過各種植物生長調節劑，使其進一步再分化出芽原體 (primordial shoot)，原生莖段不具封閉型維管束，並埋於培植體組織內，其伸長出成莖段，再經由莖段基部發根成獨立植株 (George and Sherrington, 1984)。

1. 芽體誘導

Sugla 等 (2007) 指出水黃皮子葉節在未添加 PGRs 的 MS 或 WPM 基本培養基中，即無莖段增生現象，若添加相同濃度 N⁶-benzylaminopurine (BA) 於 WPM 及 MS 培養基，則在 MS 培養基中有較佳芽體誘導的效果，水黃皮的微體繁殖中，以 MS 培養基較常被使用 (Purohit and Singhvi, 1998)。

至於添加的植物生長調節劑，Murthy 等 (1998) 認為在培養基內添加高濃度的細胞分裂素能促進芽體大量增殖，但低濃度的 thidiazuron (TDZ) 就能促進組織生長，且芽體的再生能力與其他細胞分裂素相同。Sugla 等 (2007) 利用對水黃皮子葉節誘導芽體之結果發現 BA 比 kinetin (Kn) 更具影響且細胞分裂素的種類與濃度對芽體生長具深遠的影響。TDZ 在水黃皮的微體繁殖中有雙重作用，將其選擇性的加強分生組織細胞以產生更多具分化成地上部的芽 (caulogenic buds) 細胞，但同時抑制這些細胞及分生組織分化成莖段 (Sujatha and Hazra, 2007; Shrivastava and Kant, 2010)，此也表示在高濃度會明顯抑制分生細胞快速的增殖 (Sujatha and Hazra, 2007)。大體而論，水黃皮以子葉節、子葉及帶節莖段為培植體，主要誘導芽體的培養基為 TDZ 或 BA 並輔以低濃度細胞生長素 (表2)。

Belide 等 (2010) 指出在含有 1 mg/L BA 的 MS 培養基中先進行種子萌芽之前處理，可觀察到比對照組更大且發育更完整的葉原體 (leaf primordial)，並可誘導出約兩倍的芽體數，將其子葉節培養於 1 mg/L TDZ 及 200 mg/L adenine sulfate (ADS) 的 MS 培養基中，可誘導出最多芽體數，以證明 ADS 具有促進細胞分裂活性，添加於培養基中可促進芽體生長或加強反應。Sugla 等 (2007) 對於水黃皮的種子苗誘導，得到將去種皮種子培養於添加 1.0 μM gibberellic acid (GA₃) 的 MS 培養基中，94% 再生單一芽體，不添加 PGRs 的 MS 培養基之再生芽體則為 28%，顯示植物生長調節劑有利於水黃皮去種皮之種子萌芽。

表 2 水黃皮莖段誘導之結果

Table 2 . The induced results of shoot of *P. pinnata*



Explants	MS medium + PGRs	Induction time(days)	Results	Reference
Cotyledonary nodes	7.5 μ M BA	12	6.8 shoots / explant shoot length : 0.67 cm 87% shoot induction	Sugla <i>et al.</i> (2007)
Nodal explant	4.54 μ M TDZ	28	10.7shoots /explant shoot length : 0.83 cm 66% shoot induction	Sujatha and Hazra (2007)
Cotyledon	200 mg/L ADS 11.35 μ M TDZ	20	93% shoot induction 205 buds /explants 66.9% bud induction	Sujatha <i>et al.</i> (2008)
Cotyledonary nodes	1 mg/L BA pretreatmenting 1 mg/L TDZ	28	32.2 shoots /explant	Belide <i>et al.</i> (2010)
Cotyledonary nodes	8.8 μ M BA+0.53 μ M NAA	28	2.2 shoots /explant shoot length : 5.4 cm 80% shoot induction	Shrivastava and Kant (2010)

2. 芽體伸長

自增殖體誘導最佳莖段的培養條件建立後，當培養基養分不足或植物已可自行合成 PGRs 時則需改變 PGRs，即需離體繼代在新鮮培養基或減少細胞分裂素濃度，以伸長芽體。水黃皮芽體伸長之配方，主要以減少細胞分裂素濃度或輔以低濃度 GA₃ 的培養基作為繼代培養配方 (表 3)。Sugla 等 (2007) 指出少量的 GA₃ 能有效影響水黃皮芽體的伸長，且添加 BA 於培養基中具促進發育不良的芽體伸長的效果。Sujatha 等 (2008) 以水黃皮子葉誘導芽體於 TDZ 誘導中發現，雖然 TDZ 可誘導芽體但不能使其同時分化，子葉組織所誘導的芽沒有分化及伸長現象，故在無 TDZ 的 MS 基礎培養基下繼代培養，再培養於 1/2MS 添加 0.25% 活性炭作芽體伸長。

同樣 Shrivastava 及 Kant (2010) 以子葉節作為增殖體的則離體繼代於去除 α -naphthaleneacetic acid (NAA) 的培養基，可產生莖段團並進一步減少癒合組織及促進芽體伸長。隨後 Belide 等 (2010) 甚至將子葉節重複繼代至不含 PGRs 之培養基中。

Sujatha 及 Hazra (2007) 自野外成熟的水黃皮取得帶節莖段作為增殖體，發現含 TDZ 的培養基會抑制帶節莖段分生組織之分化，在高濃度 TDZ 誘導莖段需歷經多次繼代且延遲發根階段，故先降低 TDZ 濃度以維持芽體數，而後移轉至無 PGRs 的 1/2MS 培養基中，使芽原體分化為芽體。

表 3 水黃皮莖段伸長之結果

Table3. The results of shoot elongation of *P. pinnata*



Explants	Time (days)	1 st subculture	2 st subculture	Results	References
Cotyledonary nodes	10	MS+2.5 μM GA3+7.5 μM BA	-	shoot length: 4.31cm	Sugla <i>et al.</i> (2007)
Nodal explant	15- 28	MS+0.45 μM TDZ	PGRs-free 1/2MS+0.25%AC	shoot length 3-4cm	Sujatha and Hazra (2007)
Cotyledonary	-	PGRs-free 1/2MS+0.25%AC	-	shoot length 3-4cm	Sujatha <i>et al.</i> (2008)
Cotyledonary nodes	84	MS+8.8 μM BA	-	shoots /explant: 0.6 shoot length: 1.6 cm shoot induction: 10%	Shrivastava and Kant (2010)
Cotyledonary nodes	14-21	PGRs-free MS	-	shoot length 3-5cm	Belide <i>et al.</i> (2010)

3.根之誘導

添加細胞生長素於培養基對芽體誘導發根是必要的。Sugla 等 (2007) 添加不同濃度的 indole-3-butyric acid (IBA)、indole-3-acetic acid (IAA) 及 NAA 於全量或 1/2MS 培養基中對子葉節所誘導芽體的發根量，MS 添加 1 μ M IBA 的結果較佳，顯示 IBA 對誘導發根有影響。在水黃皮組織培養研究中，多以添加 IBA 誘導發根 (表 4)，且由於植物的莖頂會自動合成細胞生長素並誘導根部的發展，因此也有將已伸長的芽體轉移至不添加任何植物生長調節劑的 MS 或 1/2MS 培養基中成功發展出根部 (Sujatha and Hazra, 2007；Sujatha *et al.*, 2008)。

表 4 水黃皮根的誘導結果

Table 4. The induced results of root of *P. pinnata*

(由張文齊彙整)

Medium	Induction time (days)	Results	References
MS+1 μ M IBA	7-9	92% rooting 3.4 roots/shoot	Sugla <i>et al.</i> (2007)
MS	28	70% rooting	Sujatha and Hazra (2007)
1/2MS +0.25% AC	28	87.5% rooting	Sujatha <i>et al.</i> (2008)
MS+9.8 μ M IBA	28	93% rooting 2.5 roots/shoot root length : 4.3 cm	Shrivastava and Kant (2010)
1/2MS+1 mg/L IBA	28	64.5% rooting 5.3 roots / shoot	Belide <i>et al.</i> (2010)

(四) 體胚發生

體胚發生為體細胞 (somatic cell) 在適當的誘導下，朝向具有胚性細胞發育，生長分化後成體胚 (somatic embryo)，為具形態雙極性之獨立個體，形成胚的發育程序是從原胚開始，進入球胚期、心臟期、魚雷期與子葉期，而發芽為完整植株，

體胚發生的過程與結合子胚發育的過程相當類似，但未經過細胞融合階段，為無性胚。

Gaj (2004) 指出，80%以上的研究只單獨用細胞生長素誘導體胚發生或結合細胞分裂素，可能因細胞生長素及細胞分裂素高度參與細胞週期之調控與細胞分裂，故成為體胚發生的關鍵因素，其中Raemakers等 (1995) 提出各細胞生長素中，使用最多的是2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (49%)，接著是NAA (27%)、IAA (6%)、IBA (6%)、picloram (5%)與dicamba (5%)；細胞分裂素則以BA是最常被使用 (57%)，再來是Kn (37%)、zeatin (3%) 與TDZ (3%)。

豆科植物之體胚誘導，培植體以年輕之分生組織為主，如未成熟胚或葉子居多，Aitken-Christie 等 (1985) 指出放射松 (*Pinus radiata*) 子葉之年齡，直接影響芽體形成，可能是較老的子葉，所含內生性細胞分裂素和激勃素量少，不易形成分生組織。誘導配方則以細胞生長素搭配細胞分裂素，較少單獨添加細胞分裂素作誘導配方，以細胞生長素而言，根據物種及細胞生長素種類具有顯著差異性，豆科植物多使用細胞生長素 2,4-D，能產生高頻率的體胚再生，但可能造成形態異常及轉換植株上的困難 (Weaver and Trigiano, 1991; Lakshmanan and Taji, 2000)，由於水黃皮之體胚誘導方面尚無研究發表，故本章僅以豆科木本植物之體胚誘導研究結果作為參考 (如下表 5)。

表 5 豆科樹種體胚誘導之結果

Table 5 . The induced results of somatic embryogenesis of legumes trees

(由張文齊彙整)

Species	Explant	Medium	Induction pathway	Induction time (days)	Results	References
<i>Acacia arabica</i>	immature embryo	MS+Kn 0.5mg/L+ 2,4-D 3 mg/L	indirect	28	72.5% Somatic Embryogenesis	Das (2011)
<i>Acacia catechu</i>	immature embryo	MS+ Kn 1.5mg/L+ 2,4-D 2 mg/L	indirect	28	66.2% Somatic Embryogenesis	Das (2011)

表 5 (續) 豆科樹種體胚誘導之結果

Table5 (continued). The induced results of somatic embryogenesis of legumes trees

Species	Explant	Medium	Induction pathway	Induction time (days)	Results	References
<i>Acacia nilotica</i>	immature endosperm	1 st MS+2,4-D 2.5µM+BA 5µM 2 st MS+2,4-D 10µM+BA 25 µM	indirect	77	7% Somatic Embryogenesis	Garg <i>et al.</i> (1996)
<i>Albizia richardiana</i>	hypocoty	MS+BA 10 ⁻⁵ M	indirect	40	1.4 Somatic Embryos/explan	Tomar and Gupta (1988)
<i>Cajanus cajan</i>	cotyledon	MS+TDZ 10 µM	indirect	42	33.8 Somatic Embryos/explant 45.3% Somatic Embryogenesis	Sreenivasu <i>et al.</i> (1998)
	leaf	MS+TDZ 10 µM	indirect	42	47.8 Somatic Embryos/explan 73.6% Somatic Embryogenesis	
	cotyledon	EC6+TDZ 4.54 µM	direct	28	38.4 Somatic Embryos/explan 97% Somatic Embryogenesi	Mohan and Krishnamurthy (2002)
	cotyledon	MS+TDZ 2 mg/L	direct	42	73.34% Somatic Embryogenesi	Aboshama (2011)
<i>Calliandra tweedii</i>	internode	MS+2iP 10 µM			22.33 Somatic Embryos/explan 85% Somatic Embryogenesis	Kumar <i>et al.</i> (2002)
	petiole	MS+2iP 5 µM	direct	90	26.47 Somatic Embryos/explan 69% Somatic Embryogenesis	
<i>Cassia angustifolia</i>	cotyledon	MS+2,4-D 10µM+ BA 2.5µM	indirect	60	14.36 Somatic Embryos/explan 70% Somatic Embryogenesis	Agrawal and Sardar (2007)
<i>Ceratonia siliqua</i>	somatic embryos	MS+IBA 0.5µM +BA4.4 µM	direct	84	33.8% Somatic Embryogenesi	Canhoto <i>et al.</i> (2006)

表 5 (續) 豆科樹種體胚誘導之結果

Table5 (continued). The induced results of somatic embryogenesis of legumes trees

Species	Explant	Medium	Induction pathway	Induction time (days)	Results	References
<i>Cercis canadensis</i>	ovule	SH+2,4-D 9 μ M	direct	42	4.6 Somatic Embryos/explants 33% Somatic Embryogenesis	Buckley and Trigiano (1994)
<i>Cladrastis lutea</i>	immature embryo	SH+2,4-D 9 μ M	direct	42	46% Somatic Embryogenesis	Weaver and Trigiano (1991)
<i>Dalbergia latifolia</i>	immature embryo	MS+2,4-D 2 mg/L+ Kn 0.1 mg/L	direct	28	32 Somatic Embryos/explants 94.5% Somatic Embryogenesis	Rao and Lakshmisita (1996)
<i>Dalbergia sissoo</i>	cotyledon	MS+ 2,4-D 9.04 μ M + Kn0.46 μ M	indirect	40-50	26.5 Somatic Embryos/explants 55% Somatic Embryogenesis	Singh and Chand (2003)
	immature embryo	MS+ Kn 1.5mg/L+ 2,4-D 2 mg/L	indirect	28	76.2% Somatic Embryogenesis	Das (2011)
<i>Delonix regia</i>	immature zygotic embryos immature embryo	MS+2,4-D 2 mg/L +BA0.25mg/L	indirect	28-35	45% Somatic Embryogenesis 46% Somatic Embryogenesis	Abdi and Hedayat (2011)
<i>Hardwickia binata</i>	immature cotyledon	MS+ Kn 4.64 μ M+ NAA5.37 μ M	indirect	21	56.8 Somatic Embryos/explants 18.3 Somatic Embryos/explants	Das <i>et al.</i> (1995) Chand and Singh (2001)
	semi-mature embryos	MS+2,4-D 2.26 μ M	direct	49	72.3% Somatic Embryogenesis	
	immature embryo	MS+ Kn 0.5mg/L+ 2,4-D 3 mg/L	indirect	28	78.4% Somatic Embryogenesis	Das (2011)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	immature seed	FM+ 2,4-D 45 μ M+ BA2.2 μ M	direct	60	26.8Somatic Embryos/explan	Arrillaga <i>et al.</i> (1994)

參、材料與方法 (Materials and Methods)



一、材料

(一) 種子

本試驗在 2011 及 2012 年春季 (約 4、5 月) 及夏季 (約 7、8 月)，在台灣大學校本部隨機採集 8 棵水黃皮 (圖 1-C) 之成熟但外表呈綠色之莢果 (圖 1-D、E)。

(二) 萌蘗枝條

本試驗在 2011 年約 5、6 月隨機採集 8 棵水黃皮，選取健康無病蟲害之萌蘗 (圖 1-F)，採集天氣皆為晴天，將其切成 2-4 cm 之帶節莖段，每一帶節莖段皆含一個節作為培植體。

(三) 水黃皮之微體繁殖

1. 水黃皮芽體誘導試驗

(1) 無菌苗為培植體

由近成熟的綠色果莢 (圖 2-A) 所建立之無菌苗於 3 種不同培養基 (WPM、WPM+1 mg/L BA 及 WPM+0.35 mg/L GA₃) 培養下，取其帶節莖段、莖段、子葉節及下胚軸為誘導芽體之培植體。

a、莖段、帶節莖段

無菌苗長至 3-5 cm 時，取長約 0.5-1 cm 不帶節之莖段及帶一個節之帶節莖段，進行培養。

b、子葉節及下胚軸

無菌苗長至 0.5 至 1 cm 時，取約 0.5-1 cm 長之下胚軸，及各帶 1/3 之子葉之子葉節，進行培養。

(2) 野外材料

本實驗在 2012 年春季 (5、6 月)，在台灣大學校本部隨機採集 8 棵水黃皮之萌蘗，取葉片及側芽進行培養。

a、葉片

以解剖刀將葉片切成大小約 1.5×1.5 cm²，進行培養。



b、生長點

以解剖刀將芽切開，並用鑷子小心挑出約0.2-0.3 cm之生長點作培養。

(3) 水黃皮之芽體伸長試驗

取 3 種培植體作芽體伸長試驗，分別為帶節莖段及子葉節所誘導的芽體 (將 3-5 個芽體為一個培植體)及生長點。

(4) 水黃皮芽體誘導發根之試驗

以子葉節誘導出之芽體取已抽長約 2-3 cm 為培植體。

(四) 水黃皮組培苗之馴化

選取發根試驗中植株完全展葉且根長達 2-4 cm 時作出瓶馴化。

(五) 水黃皮體胚之誘導

本試驗在2011及2012年6-7月，於台灣大學校本部所種植8棵水黃皮隨機採集不同成熟程度之種子。

1.帶胚乳之未成熟胚

當水黃皮花期結束約1個月後(約6月)採集莢果，參考張淑華等(2002)不同發育階段牛樟(*Cinnamomum kanehirae*)種子的胚培養，依子葉佔種子內部體積的比例，將胚的成熟度分成3種階段：未成熟胚A：子葉佔種子內部體積75%以上，其餘為胚乳(圖2-B)。未成熟胚B：子葉佔種子體積之50-75%(圖2-C)。未成熟胚C：子葉佔種子體積50%以下(圖2-D)，取上述3種不同發育情況進行黑暗培養。

2.無胚乳未成熟胚

當水黃皮花期結束後約2個月後(約7月)之莢果，取種子佔整個莢果大小約50-70%(圖2-E)，並切大小約 $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ 之子葉及胚，進行培養。

二、方法

(一) 種子處理

建立離體培養時汙染為主要遭遇的問題，儘管經過幾個殺菌劑的反覆試驗和各種消毒程序，高微生物及酚滲出物使成熟種子難建立種子苗，為了減少這些限制，需在落果之前取得近成熟的綠色果莢，選取大小、形狀相似的種子作為發芽

試驗培植體 (Sujatha *et al.*, 2008)，採集後的成熟莢果以封口袋密封後置於 15°C 冰箱冷藏，所有種子在 1 個月內使用完畢，並參考 Kumar 等 (2007) 以新鮮水黃皮種子於 60°C 熱水處理 15 min，可使休眠種子發芽達 100%，以此作為破除種子因冷藏後可能造成種子休眠之問題。水黃皮種子表面消毒以安期消毒液稀釋三百倍置於超音波震盪器震盪 10 min，然後再於 70% 酒精震盪 5 min，兩步驟皆以二次水沖洗 3 次，而後以 2% 次氯酸鈉 (NaOCl) 消毒 (含 0.1% (v/v) tween20)，最後移入無菌操作台，以無菌水沖洗 3 次。

(二) 試驗項目

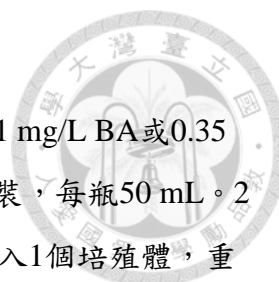
1. 水黃皮野外帶節莖段之表面消毒

先以流水處理 2 h 再以安期消毒液稀釋 300 倍置於超音波震盪器震盪 30 sec，然後再於 70% 酒精震盪 30 sec，兩步驟皆以二次蒸餾水沖洗 4 次，而後以次氯酸鈉 (NaOCl) 消毒。比較次氯酸鈉溶液 (含 0.1% (v/v) tween 20) 1-5% 濃度於 10 及 20 min 的消毒效果 (表 6)，於培養第 10 天記錄污染率，且考慮到消毒藥劑過量可能造成細胞喪失誘導活性，故於 1 個月後記錄芽體誘導率，共 10 個處理，每瓶放 1 個培植體，重複 7 次。

表 6 水黃皮帶節莖段之表面消毒試驗組合

Table 6. Surface sterilization of nodal stems of *P. pinnata* by using different combined test for disinfectants

Test code	NaOCl (%)	Time (min)
A1	1	10
A2	1	20
A3	2	10
A4	2	20
A5	3	10
A6	3	20
A7	4	10
A8	4	20
A9	5	10
A10	5	20



2.無菌種子苗之培養與生長

以MS、1/2MS及WPM為基礎培養基，並以MS或WPM添加1 mg/L BA或0.35 mg/L GA₃的組合進行試驗，如下表（表7），以125 mL三角瓶分裝，每瓶50 mL。2個月後記錄發芽率、發根率與根莖平均長度，7種處理，每瓶放入1個培植體，重複5次。

表 7 水黃皮無菌種子苗誘導在 MS、1/2MS 及 WPM 之組合

Table7. Aseptic seedlings induction of *P. pinnata* in MS、1/2MS and WPM compositions

Medium \ PGRs	Test code
1/2MS	1
MS	2
WPM	3
MS+0.35 mg/L GA ₃	4
WPM+0.35 mg/L GA ₃	5
MS+1 mg/L BA	6
WPM+1 mg/L BA	7

3.水黃皮之微體繁殖

(1) 水黃皮芽體誘導試驗

a、無菌苗為培植體

Purohit 及 Singhvi 於 1998 指出水黃皮的微體繁殖，以 MS 培養基較常被使用，故以 MS 為基礎培養基添加不同濃度的 TDZ：0.1、1、2、3 mg/L 及 BA：0、0.5、1、2 mg/L 並另外添加 NAA：0、0.5、1、2 mg/L，並以較佳結果再以 MS 加入 IBA：0、0.5、1、2 mg/L 的組合誘導芽體，每錐形瓶放入 4 個培植體，重複 3 次。

b、野外材料

為維持萌藥活性，材料皆為當天早上約七點採回直接使用，選取健康無病蟲害之野外萌藥，以清水沖洗表面並將萌藥切成約 1 cm 帶腋芽之莖段及葉片，流水

處理 2 h 後，進行表面消毒後，以 MS 為基礎培養基添加 0.1 mg/L 及 0.5 mg/L NAA 與 1-5 mg/L BA 的組合，葉片每瓶接種 1 個培植體，每組做 10 瓶，重複 3 次；側芽生長點，每瓶放入 1 個培植體，重複 5 次。誘導芽體結果皆為 1 個月後計算其芽體數量，並觀察紀錄之。

(2) 水黃皮之芽體伸長試驗

取 3 種培植體：A 帶節莖段 B 子葉節所誘導的芽體（將 3-5 個芽體為一個培植體）C 生長點作芽體伸長試驗。放入 MS 添加不同濃度的 BA 及 GA₃ 之組合（表 8），使用 125 mL 三角瓶，每瓶裝 50 mL 培養基，每錐形瓶放入 4 個培植體，重複 3 次，1 個月後記錄芽體伸長長度。

表 8 水黃皮芽體伸長在 MS 添加 BA 與 GA₃ 之試驗組合

Table 8. Shoot elongation of *P. pinnata* in MS with different combination of BA and GA₃

Medium code	GA ₃ (mg/L)				
	0	0.1	0.5	1	1.5
0	BG1	BG2	BG3	BG4	BG5
0.1	BG6	BG7	BG8	BG9	BG10
0.2	BG11	BG12	BG13	BG14	BG15
0.5	BG16	BG17	BG18	BG19	BG20

(3) 水黃皮芽體誘導發根之試驗

以子葉節誘導出之芽體為培植體，將已抽長約 2-3 cm 的芽體放入 1/2MS 或 MS 添加 IBA 組合（表 9）進行發根試驗，以 100 mL 試管分裝，每管含 25 mL 培養基，共 8 個處理，每瓶放 1 個培植體，重複 11 次。1 個月後記錄發根數及發根長度。

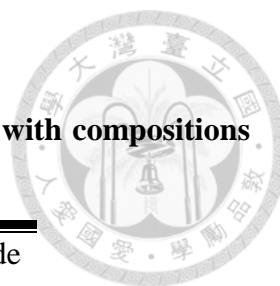


表 9 水黃皮發根試驗在 MS 或 1/2MS 添加 IBA 之組合

Table 9. Root induction induction of *P. pinnata* in MS or 1/2MS with compositions of IBA

Medium (strength) + auxin (mg/L)	Test code
MS ($\frac{1}{2}$)	1
MS	2
MS ($\frac{1}{2}$) + IBA (0.5)	3
MS ($\frac{1}{2}$) + IBA (1)	4
MS ($\frac{1}{2}$) + IBA (1.5)	5
MS + IBA (0.5)	6
MS + IBA (1)	7
MS + IBA (1.5)	8

(4) 水黃皮組培苗之馴化

選取發根試驗中已完全展葉且根長達 2-4 cm 植株作出瓶馴化，先以自來水徹底清洗後再移植到經過高溫高壓殺菌的蛭石/泥炭土/土壤=1:1:1 的混合介質中。介質保持完全濕潤而不積水，培植容器置於簡易網室，並將容器以透明塑膠袋罩住，每 2 週剪去塑膠袋一邊的角落，於第 6 週移除塑膠袋並記錄其存活率及莖平均長度，共馴化 85 盆植株。

4.水黃皮體胚之誘導

考慮種子為未成熟階段，不宜使用熱水 (60°C) 處理種子，故試驗材料材料皆為當天早上約七點採回直接使用，將各種發育階段的種子進行表面消毒後，以解剖刀及鑷子去除種皮，以未成熟胚之帶子葉之胚及半成熟胚之胚及子葉為培植體，培養於 Kn 及 BA 與 2,4-D 之組合表 (表 10) 及 TDZ: 0.5、1、2 及 3 mg/L 中進行培養。以 125 mL 三角瓶分裝，每瓶 50 mL，共 22 種處理，每錐形瓶放入 8 個培植體，重複 3 次，2 個月後記錄誘導結果。



表 10 水黃皮體胚誘導在 MS 添加 Kn、BA 與 2,4-D 之組合

Table 10. Somatic embryogenesis induction of *P. pinnata* in MS with Kn、BA and 2,4-D

Medium code		2,4-D (mg/L)		
		1	2	3
Kn (mg/L)	0.1	KD1	KD2	KD3
	0.5	KD4	KD5	KD6
	1.5	KD7	KD8	KD9
BA (mg/L)	0.5	BD1	BD2	BD3
	1.5	BD4	BD5	BD6
	2.5	BD7	BD8	BD9

(三) 培養基

所進行之各項試驗採用以MS、1/2MS (Murashige and Skoog, modified)、WPM3種培養基為基礎培養基。在進入121°C、1.05 kg/cm²高溫高壓滅菌20 min前，以二次蒸餾水溶解各種無機鹽類、有機物質及植物生長調節劑，試驗所用之培養基，除了TDZ及GA₃因高溫滅菌會破壞而需以過濾方式加入外，其它的化合物均於滅菌前加入，並添加3%蔗糖及0.8%洋菜粉 (difco bacto agar)，再以0.1 N及1 N NaOH或0.1 N及1 N HCl分別調整pH值至pH 5.7 (MS)、pH 5.7 (1/2MS) 與pH 5.2 (WPM)。

本試驗所使用的各種無機鹽類、有機物質、植物生長調節劑、洋菜粉及蔗糖皆為Sigma Chemical (Mo., U.S.A.)。

(四) 培養環境

培養室溫度25±1 °C恆溫，光源為光度50±5 μmole/ m²s之螢光燈 (Philips)，光照16 h；暗處理則培養於培養室之紙箱完全黑暗環境下。



(五) 形態觀察

1. 以複式顯微鏡觀察外表形態並拍照記錄。

2. 石蠟切片及徒手切片。

(1) 石蠟切片

為觀察水黃皮芽體發生之情形，將誘導之芽體埋於蠟塊內，連同蠟塊一起切片，除去石蠟再經染色和封片而成。製片過程如下 (蔡淑華, 1975)：

a、固定、洗滌：以2.5% Karnovsky固定，固定後用15-50%酒精沖洗約10 min。

b、脫水：以乙醇混合液 (TBA-series) 脫水劑 (蒸餾水+乙醇+三級丁醇將組織細胞內的水份置換、透明化，先用50%浸漬數小時後，更換數次濃度逐漸提高之TBA，直到100%。

c、浸蠟：依序間隔2 h，將組織依序浸入石蠟。

d、埋蠟：將組織及液狀蠟倒入模型，置於冷水中使之快速冷卻凝固，形成固體蠟塊。

e、切片：把多餘的蠟塊剔除，固定在小木塊上，利用切片機切片。

f、脫水、染色：先用黏附劑張貼切片，將蠟帶用二甲苯溶解後，用高濃度的酒精逐漸移至染料 (Eosin) 溶液中進行染色。

(2) 徒手切片

為觀察水黃皮芽體伸長、發根及體胚發生之情形，利用切片直接觀察或染色觀察，染色處理使用雙重染色，先以Safranin-O染色1 min後，用清水清洗，後使用Stevenel's Blue染色1 min，再用清水清洗。

(六) 統計分析

1. 以完全逢機設計，進行變異數分析。

2. 若處理間差異達到顯著水準 ($\alpha = 0.05$) 時，則使用鄧肯氏新多變域檢定法 (duncan's new multiple range test, DMRT) 比較。

圖 1 水黃皮

Fig1. The *P. pinnata*



圖1-A. 開花期之水黃皮。

Fig1-A. The flowering stage of *P. pinnata*.

圖1-B. 水黃皮之奇數羽狀複葉。

Fig1-B. The odd-pinnately compound leaf of *P. pinnata*.

圖1- C. 台灣大學校本部電機二館旁的水黃皮，樹高約4 m。

Fig1-C. The site of four meters high *P. pinnata* is located beside the second building of the Graduate Institute of Electrical Engineering, National Taiwan University

圖1-C. 水黃皮約花期結束後1個月 (6月)之莢果。

Fig1-C. The pods ripen about one month after flowering stage (in June) of *P. pinnata*.

圖1-D. 水黃皮約花期結束後2個月(7月)之莢果。

Fig1-D. The pods ripen about two months after flowering stage (in July) of *P. pinnata*.

圖1-F. 水黃皮萌蘖之枝條。

Fig1-F. The burst from coppice shoots of *P. pinnata* .

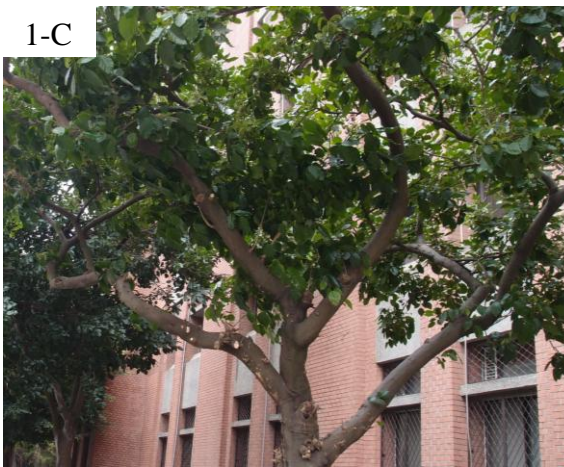


圖 2 水黃皮種子發育之各階段

Fig2. Different development stage of the seeds of *P. pinnata*



圖 2-A.水黃皮花期後約 3 個月 (8 月) 成熟之種子。 (Bar = 2 cm)

Fig2-A. The mature seeds of *P. pinnata* were collected about three months after flowering (in August). (Bar = 2 cm)

圖 2-B.水黃皮未成熟之種子，子葉佔種子內部體積 75% 以上。 (Bar = 1 cm)

Fig2-B. The immature seeds of *P. pinnata* with a cotyledon more than 75 percent of the seed volume. (Bar = 1cm)

圖 2-C.水黃皮未成熟之種子，子葉佔種子體積之 50-75% 。 (Bar = 5 mm)

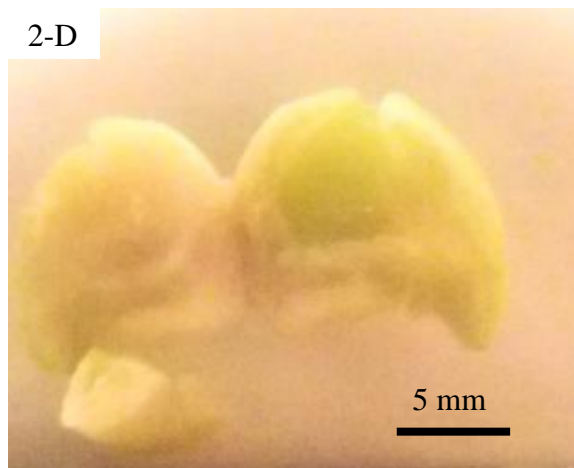
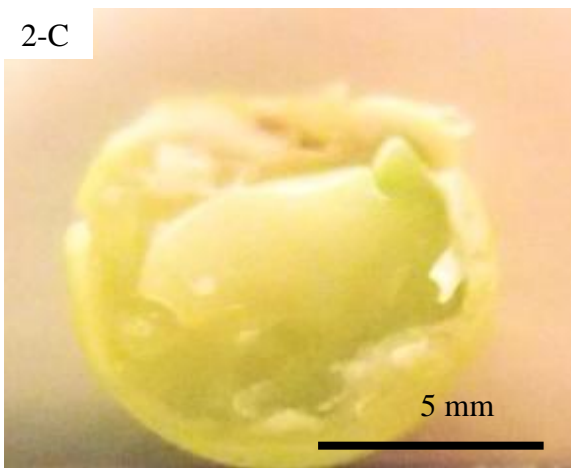
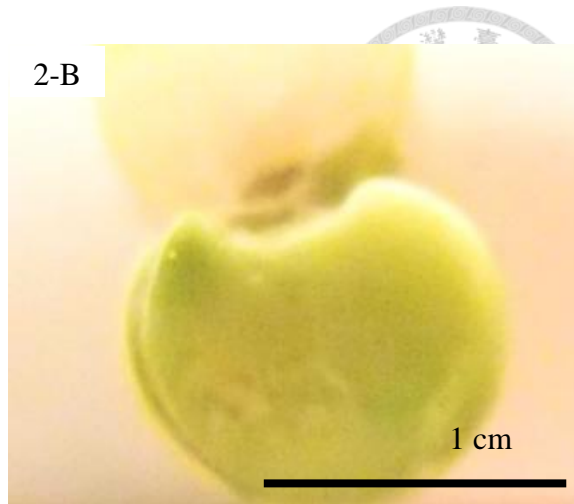
Fig2-C. The immature seeds of *P. pinnata* with a cotyledon between 50 - 75 percent of the seed volume. (Bar=5 mm)

圖 2-D.水黃皮未成熟之種子，子葉佔種子體積 50% 以下。 (Bar = 5 mm)

Fig2-D. The immature seeds of *P. pinnata* with a cotyledon less than 50 percent of the seed volume. (Bar = 5 mm)

圖 2-E.水黃皮花期後約 2 個月 (7 月) 未成熟之種子。 (Bar = 1 cm)

Fig2-E. The immature seeds of *P. pinnata* were collected about two months after flowering (in July). (Bar=1cm)



肆、結果 (Results)



一、水黃皮野外帶節莖段之表面消毒

帶節莖段經培養約 5-7 天為發霉的最高峰，根據蔡國書 (2005) 在大葉桉 (*Eucalyptus robusta*) 表面消毒之培植體消毒後 10 天內會因消毒不完全而發生霉變，10 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 10 天計算。

本試驗利用不同濃度 NaOCl (1-5%) 配合不同消毒時間 (10 或 20 min) 處理消毒水黃皮帶節莖段，調查其存活率及污染率。帶節莖段培養約 1 週後，可觀察培植體周圍與其接觸之培養基邊緣，開始出現汙染之現象，通常有發霉及乳白色或黃色的分泌物感染較為常見，培養中期 (4、5 天) 汙染多屬前者，培養末期 (7、8 天) 甚至培養 10 天以上，多出現後者之感染徵狀。

試驗結果自野外採回之材料，經表面消毒後污染率仍高 (表 11)，試驗中所測試之處理時間，並無法達到正面之消毒成效，延長處理時間比不上提高 NaOCl 濃度效果好，單就討論消毒時間而論，都是消毒 20 min 的污染率低於消毒 10 min (圖 3)，但在統計上並無差異性。NaOCl 濃度 5% 消毒 20 min 污染率較低 (64.76%)，汙染的時間多發生在培養末期，消毒時間與 NaOCl 濃度越大，帶節莖段兩端白化的範圍也會增加，於操作台中修切時易造成較大的傷口，褐化率較高；1% NaOCl 消毒 10 min 污染率較高，並於培養初期易造成全面性的汙染狀況，褐化程度較輕微。

培植體誘導結果都不高，1% NaOCl 消毒 10 min 有較高的誘導率 (22%)，但汙染也高，誘導多為側芽，而 NaOCl 濃度以 5% 消毒 20 min 污染率雖低，卻會降低誘導率，無芽體誘導之帶節莖段多褐化死亡，或產生微量乳黃色癒合組織，且癒合組織並無進一步產生逆分化。

表 11 水黃皮野外帶節莖段表面消毒及芽體誘導之結果

Table 11. The results of the nodal stems surface sterilization and shoot induction of *P. pinnata*

Test code	NaOCl (%)	Time (min)	Sterilized numbers	Sterilized rate (%)	Induction number of explants	Shoot Induction(%)
A1	1	10	23	22 ± 7.67 ^{cd}	5	21.74
A2	1	20	35	33.29 ± 9.62 ^{bcd}	0	0
A3	2	10	16	15.14 ± 4.9 ^d	2	12.5
A4	2	20	51	48.43 ± 6.14 ^{ab}	3	5.88
A5	3	10	24	22.86 ± 2.48 ^{bcd}	0	0
A6	3	20	35	33.57 ± 7.52 ^{bcd}	2	5.71
A7	4	10	27	25.71 ± 6.03 ^{bcd}	0	0
A8	4	20	38	36.29 ± 4.63 ^{bc}	2	5.26
A9	5	10	44	41.86 ± 4.88 ^{ab}	0	0
A10	5	20	68	64.71 ± 2.8 ^a	4	5.88

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row show that the values are significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

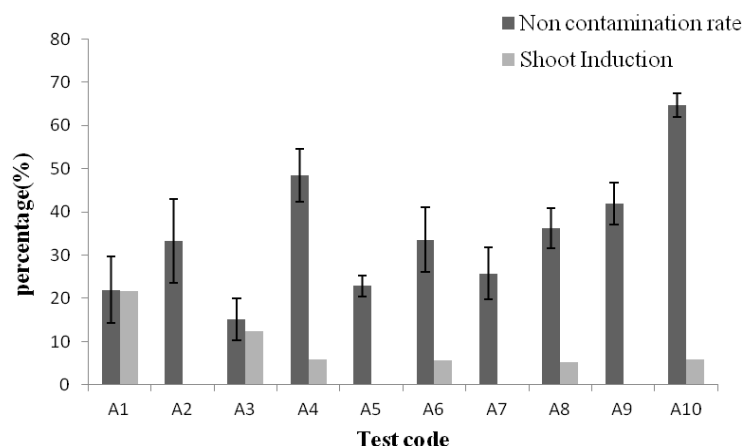
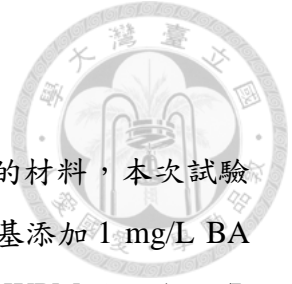


圖 3 水黃皮帶節莖段未受汙染之結果

Fig 3. The results of the the nodal stems with sterilized rate of *P. pinnata*



二、水黃皮無菌種子苗之培養與生長

此試驗目的為培養健康生長之無菌種子苗，提供微體繁殖的材料，本次試驗採 MS、1/2MS 及 WPM 為基礎培養基，再以 MS 及 WPM 培養基添加 1 mg/L BA 或 0.35 mg/L GA₃ 探討無菌種子苗培養情形，結果在發芽方面，以 WPM 添加 1 mg/L BA 可達高約 79.97% 的發芽率，其次為 MS 添加 1 mg/L BA (79.74%)，發芽率較低分別為 WPM、MS 及 1/2MS，發芽率依序為 42.75%、36.38% 與 33.55% (表 12)，但在種子苗莖部生長狀況則以 WPM 培養基較良好，莖部肥大，葉片茂盛、顏色呈現墨綠色 (圖 4-A)；而添加 BA 植物生長調節劑處理結果，於種子苗子葉節位置誘導 2-3 根側芽，其生長狀況較細且葉片較小 (圖 4-B)；添加 GA₃ 處理結果，莖段更為細長，以 WPM 添加 GA₃ 為例莖段長達 5.56 cm，且葉片較小、顏色淡 (圖 4-C)，小苗也較容易掉葉。

根部生長情形，則以 WPM 培養基及添加 GA₃ 處理下，種子苗之主根明顯，長度約 7-8 cm，側根茂盛 (圖 4-D、E)；BA 處理下，主根不明顯，長度僅上述根之一半 (3 cm)，側根較少發生 (圖 4-F)。

表 12 水黃皮無菌種子苗誘導與培養 2 個月之枝條生長結果

Table 12. The results of shoot growth of *P. pinnata* from aseptic seeds as induced and cultured *in vitro* for two months

Medium	Number of explants	Germination rate (%)	Mean length of root (cm)	Mean length of shoot (cm)
1/2MS	120	33.55±2.47 ^c	8.52±1.18 ^a	2.44±0.7 ^{bc}
MS	120	36.38±1.85 ^c	7.41±1.5 ^a	1.4±0.62 ^c
WPM	120	42.75±6.52 ^c	8.26±0.8 ^a	2.8±1.17 ^{bc}
MS+0.35 mg/L GA ₃	120	46.41±5.44 ^c	7.36±0.29 ^a	3.9±0.41 ^{ab}
WPM+0.35 mg/L GA ₃	120	54.17±6.85 ^{bc}	9.38±0.33 ^a	5.56±0.83 ^a
MS+1 mg/L BA	120	79.74±6.76 ^a	3.29±0.14 ^b	3.09±0.07 ^{bc}
WPM+1 mg/L BA	120	79.97±5.59 ^{ab}	3.2±0.15 ^b	3.97±0.13 ^{ab}

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row show that the values are significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat:5

圖 4 水黃皮之種子苗培養 2 個月

Fig4. Aseptic seedling of *P. pinnata* cultured for two months



圖 4-A. 水黃皮種子苗在 WPM 培養基中莖之形態。(Bar = 1 cm)

Fig4-A. The morphology of stem from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM medium. (Bar = 1cm)

圖 4-B. 水黃皮種子苗在 WPM 添加 0.35 mg/L GA₃ 中莖之形態。(Bar = 2 cm)

Fig4-B. The morphology of stem from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM with 0.35 mg/L GA₃ treatment. (Bar = 2 cm)

圖 4-C. 水黃皮種子苗在 WPM 添加 1 mg/L BA 中莖之形態。(Bar = 1 cm)

Fig4-C. The morphology of stem from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM with 1 mg/L BA treatment. (Bar = 1 cm)

圖 4-D. 水黃皮種子苗在 WPM 培養基中根之形態。(Bar = 1 cm)

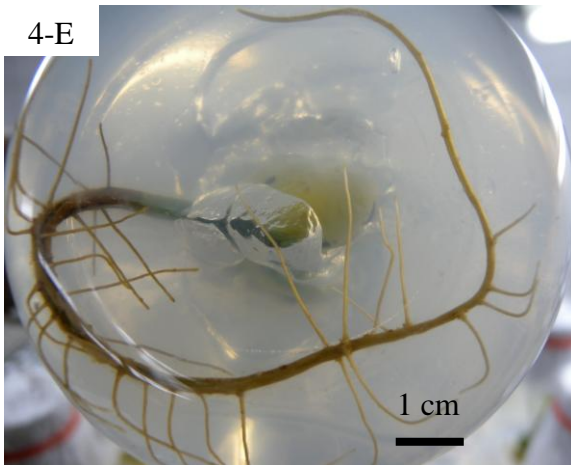
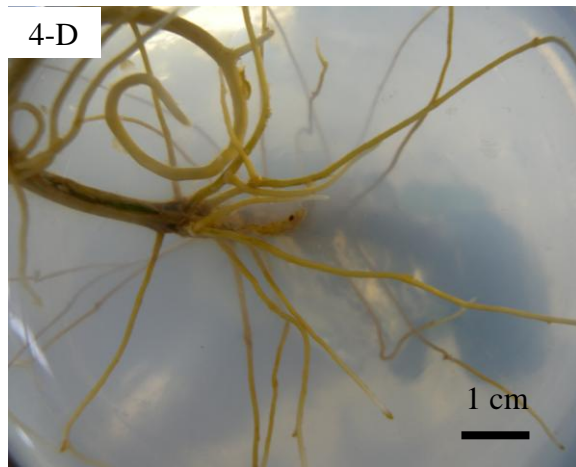
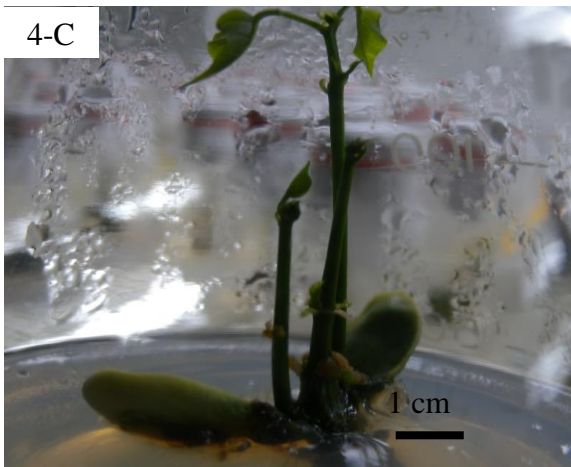
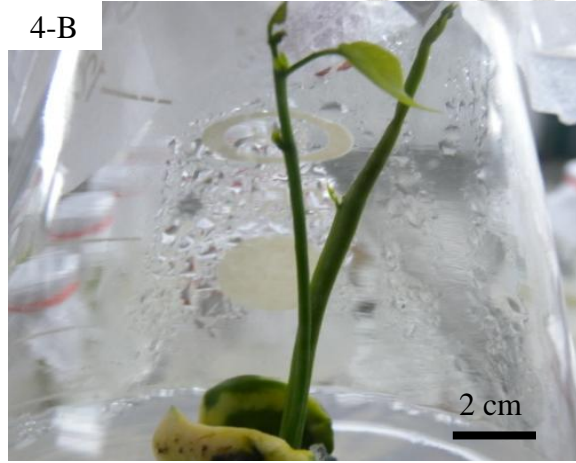
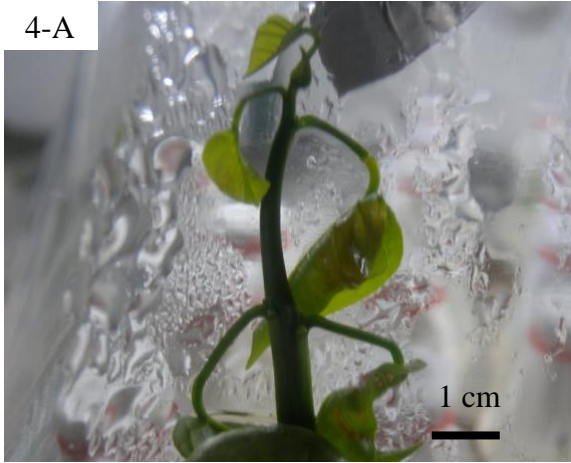
Fig4-D. The morphology of root from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM medium. (Bar = 1cm)

圖 4-E. 水黃皮種子苗在 WPM 添加 0.35 mg/L GA₃ 中根之形態。(Bar = 1 cm)

Fig4-E. The morphology of root from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM with 0.35 mg/L GA₃ treatment. (Bar = 1 cm)

圖 4-F. 水黃皮種子苗在 WPM 添加 1 mg/L BA 中根之形態。(Bar = 1 cm)

Fig4-F. The morphology of root from aseptic seeds of *P. pinnata* cultured on WPM with 1 mg/L BA treatment. (Bar = 1 cm)





三、水黃皮之芽體誘導試驗

(一) 種子苗材料

經無菌培養試驗，選生長及發芽率較佳之 WPM 作為基礎培養基，或添加 BA 與 GA₃ 兩種生長調節劑，取其作為培植體誘導之芽體，探討經此 3 種不同培養基之種子苗培養之培植體於芽體誘導下彼此間之影響。

1. 培植體部位與芽體發生之關係

無菌種子苗長至 0.5-1.0 cm 或 3-5 cm 時，各別取子葉節及下胚軸或莖段和帶節莖段進行培養，子葉節與帶節莖段之芽體誘導率最高皆可達 100%，然莖段及下胚軸培植體誘導率僅 20% 以下，莖段及下胚軸多誘導出癒合組織，僅少數由培植體表面產生芽體；子葉節自子葉間處產生芽體；而帶節莖段部分，芽體或源於原本存在於葉腋之潛伏芽、或自節間處產生。

2. 前處理間的差異

3 種前處理 (WPM、WPM+1 mg/L BA 及 WPM+0.35 mg/L GA₃)，帶節莖段之芽體形態並無太大差異 (圖 5-A、B、C)；子葉節誘導芽體形態以 WPM 及 GA₃ 處理結果之芽體數較少但較長 (圖 5-D、E) (表 13、14)，BA 處理之芽體較多但較短 (圖 5-F)；芽體數誘導結果於 3 種前處理下雖無顯著差異，但以 BA 前處理結果芽體數較高 (圖 6)。癒合組織形成之形態和誘導率與前處理間之差異亦不明顯，下胚軸及莖段為培植體主要產生癒合組織，僅少數芽體產生，WPM 前處理下皆有芽體產生，GA₃ 及 BA 前處理僅莖段部分有芽體產生。空白試驗 (對照組) 在 BA 前處理下，僅帶節莖段有誘導出少量之芽體 (33.33%)。

3. 各植物生長調節劑誘導結果

(1) BA 與 NAA 不同濃度組合誘導芽體結果

試驗結果，子葉節與帶節莖段都以 BA 前處理下添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 的誘導下結果較佳 (表 15)，且平均芽體數隨 BA 濃度增加而提高 (0-2 mg/L)，當 BA 濃度高於 2 mg/L 時，芽體數達最大值且趨勢線趨於平緩 (圖 7)。子葉節誘導芽體數較高，平均為 5.42 個芽，單一培植體最高芽體數 15 個，且芽體發生於子葉節之分生組織，其次為帶節莖段 (平均 3.17 個芽)，單一培植體最高芽

體數為 7 個，芽體多自側芽誘導出其他芽體；莖段與下胚軸，於 GA₃ 前處理以莖段為培植體添加 0.5 mg/L BA 及 1 mg/L NAA 平均誘導 0.25 個芽體數 (誘導率 13.33%) (圖 8-A) 及 WPM 前處理下添加 2 mg/L BA 及 2 mg/L NAA 平均誘導 0.83 個芽體數 (誘導率 20%) (圖 8-B)；下胚軸僅在 WPM 前處理下，添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 可平均誘導 0.33 個芽體數 (誘導率 8.33%) (圖 8-C)。

(2) BA 與 IBA 不同濃度組合誘導芽體之結果

鑑於 BA 添加 NAA 與各前處理誘導結果，BA 前處理芽體數較高，故於此階段試驗以 BA 前處理為主。BA 添加與 NAA 相同濃度之 IBA 誘導結果，以子葉節培植體較佳配方為 2 mg/L BA 添加 0.5 mg/L IBA，平均誘導 4.33 個芽體；帶節莖段平均誘導 3.42 個芽體 (表 16)；莖段與下胚軸無任何芽體產生，僅癒合組織發生。

(3) TDZ 不同濃度誘導芽體結果

試驗結果，子葉節與帶節莖段皆以 BA 前處理下添加 0.1 mg/L TDZ 的誘導下結果較佳 (表 17)，子葉節平均誘導 3.86 個芽體，隨 TDZ 濃度增加 (0.1-3 mg/L)，不僅降低芽體數，並於子葉節切口處伴隨更多之癒合組織；帶節莖段平均誘導 2.5 個芽體；0.1 mg/L TDZ 以莖段為培植體以 WPM 前處理下平均產生 4.5 個芽體 (誘導率 13.33%) (圖 8-D)，GA₃ 前處理可誘導平均 3 個芽體 (誘導率 13.33%) (圖 8-E、F)；下胚軸為培植體在 1 mg/L TDZ 誘導下以 BA 前處理可產生平均 2 個芽體 (誘導率 6.67%) (圖 8-G)，WPM 前則誘導平均 3 個芽體 (誘導率 13.33%) (圖 8-H)。

試驗觀察中發現，不添加任何植物生長調節劑，帶節莖段僅經過 BA 前處理下有芽體誘導；子葉節無任何生長反應；下胚軸及莖段則於傷口處有褐化及黑化的現象，亦無芽體或癒合組織的產生。

IBA 或 NAA 與 BA 交叉組合下誘導芽體或癒合組織形態上無太大差異，芽體誘導數以 BA 和 NAA 組合結果較 IBA 高；子葉節和帶節莖段培植體與培養基接觸之處會有癒合組織發生；下胚軸與莖段培植體之癒合組織則形成自上方之一面，或自破脹之表皮處，使整個培植體狀似鼓槌 (圖 8-I、J)，故發現，水黃皮莖段與下胚軸培植體，雖平躺於培養基上，其生理反應仍具極性。癒合組織呈黃色且形質鬆軟，部分子葉節培植體癒合組織之表層會形成一層白色絨毛狀之細胞，當提

高 NAA、IBA 或 BA 濃度皆促使癒合組織之形成，且當 NAA 或 IBA 濃度高於 BA 濃度時，會產生微量之不定根。

TDZ 與 BA 交叉組合誘導結果隨 TDZ 濃度提高會促使癒合組織產生，其形態堅硬、呈鮮綠色 (圖 8-K、L)，且無法進一步分化產生不定根；誘導芽體則會先誘導葉原體 (圖 9-A)，芽體伸長受限，尤其於高濃度 (3 mg/L) 更產生出叢生狀芽體 (圖 9-B)，即使將其誘導之芽體進一步做為芽體伸長預備試驗，亦無芽體伸長之結果，芽體皆無反應，異於 NAA 或 IBA (圖 9-C、D) 誘導芽體可自體伸長，並以 NAA 誘導較佳之培養基與培植體做為後續芽體伸長試驗之培植體。

圖 5 水黃皮在 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 之芽體誘導結果

Fig5. The results of shoots inducted of *P. pinnata* from the best formulation of MS with 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA



圖 5-A. 水黃皮帶節莖段在 WPM 之結果。 (Bar = 1 cm)

Fig5-A. The results of stem with node of *P. pinnata* was cultured on WPM. (Bar = 1 cm)

圖 5-B. 水黃皮帶節莖段在 0.35mg/L GA₃ 處理之結果。 (Bar = 1 cm)

Fig5-B. The results of stem with node of *P. pinnata* was cultured on 0.35 mg/L GA₃. (Bar = 1 cm)

圖 5-C. 水黃皮帶節莖段在 1mg/L BA 處理之結果。 (Bar = 1 cm)

Fig5-C. The results of stem with node of *P. pinnata* was cultured on 1 mg/L BA . (Bar = 1 cm)

圖 5-D. 水黃皮子葉節在 WPM 處理之結果。 (Bar = 1 cm)

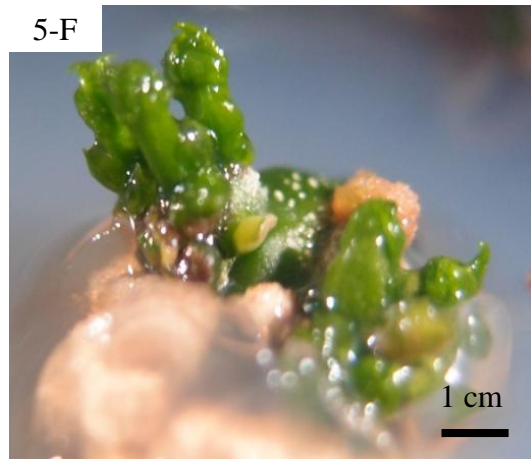
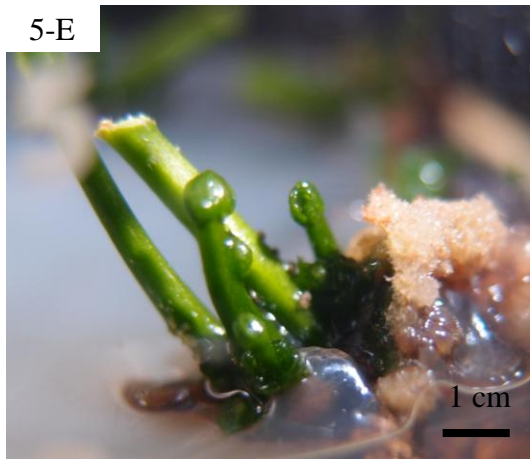
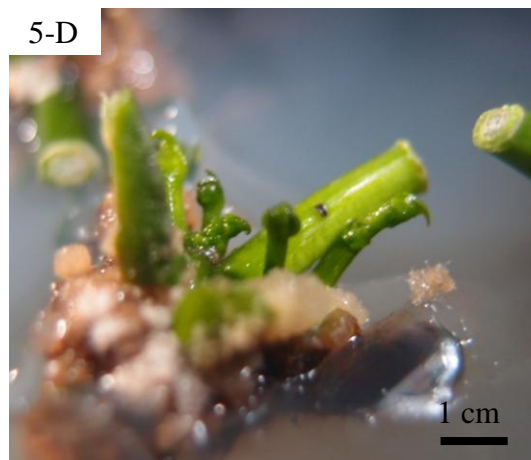
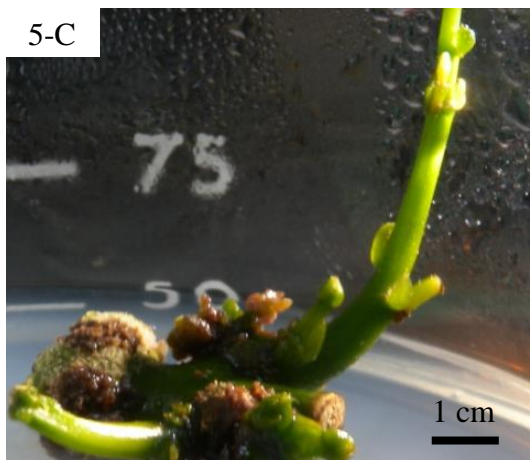
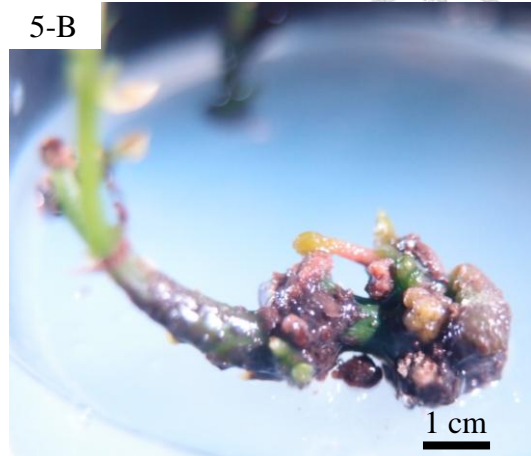
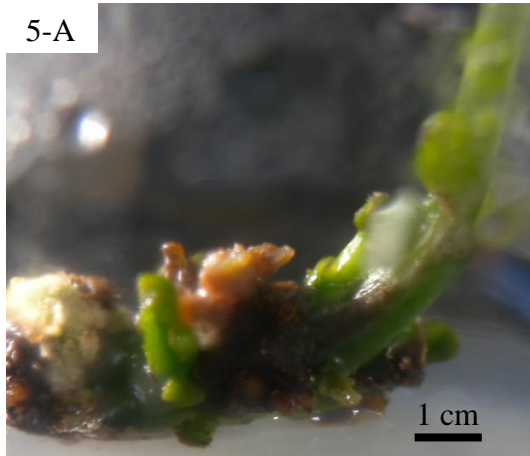
Fig5-D. The results of cotyledonary nodes of *P. pinnata* were cultured on WPM. (Bar = 1 cm)

圖 5-E. 水黃皮子葉節在 0.35mg/L GA₃ 處理之結果。 (Bar = 1 cm)

Fig5-E. The results of cotyledonary nodes of *P. pinnata* were cultured on 0.35 mg/L GA₃. (Bar =1 cm)

圖 5-F. 水黃皮子葉節在 1mg/L BA 處理之結果。 (Bar = 1 cm)

Fig5-F. The results of cotyledonary nodes of *P. pinnata* were cultured on 1 mg/L BA. (Bar = 1 cm)



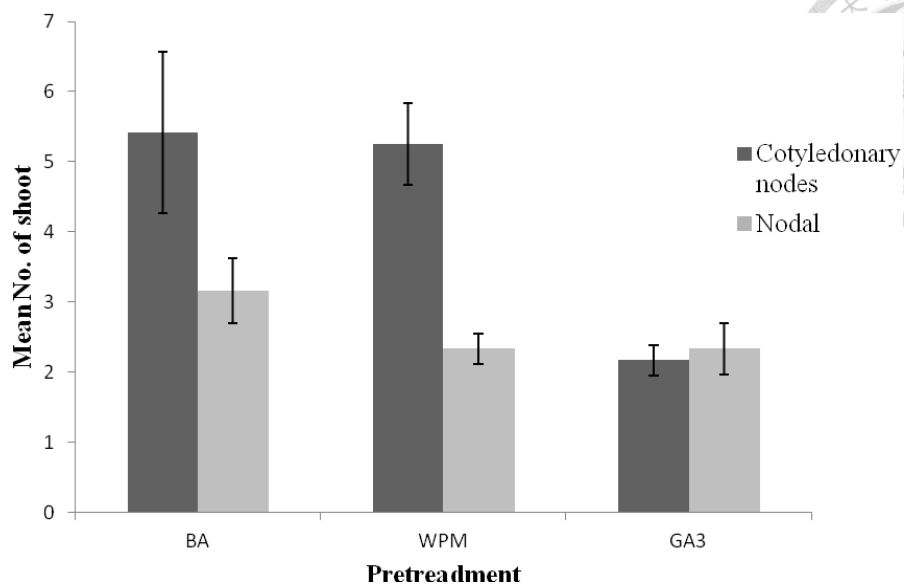


圖 6 水黃皮前處理子葉節與帶節莖段在 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 中芽體誘導之結果

Fig6. A comparison of cotyledonary nodes and nodal stems shoot of *P. pinnata* with three pretreatments were induced with 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA treatment

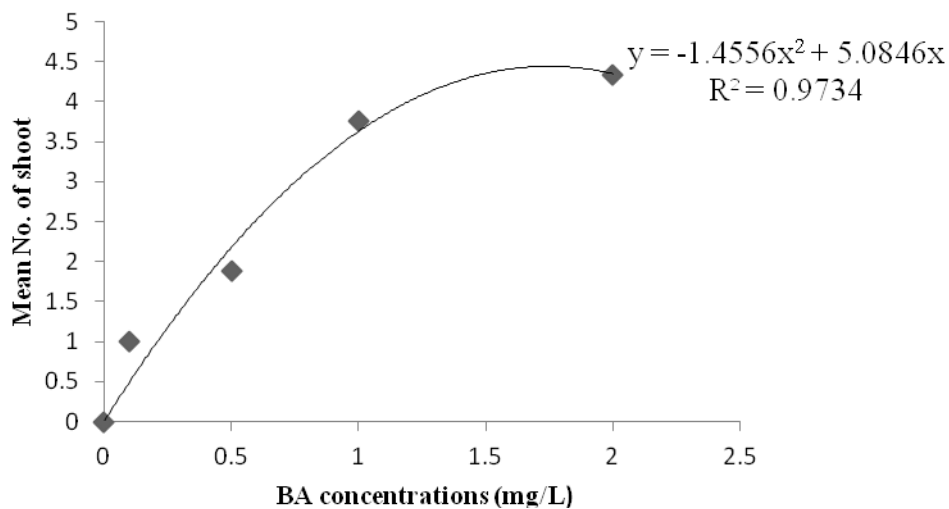


圖 7 水黃皮子葉節在 BA 前處理與 BA 及 0.1 mg/LNAA 中 1 個月芽體數誘導之結果

Fig7. The result of different of BA concentrations with 0.1 mg/L NAA on the number of shoots of BA pretreated cotyledonary nodes of *P. pinnata* for one month induction

表 13 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 WPM 前處理於 BA 與 NAA 不同組合對芽體之誘導結果

Table13. The effect of different compositions of BA and NAA on the shoot induction from WPM pretreated cotyledonary node and nodal stem explantest of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)		Cotyledonary node		Nodal stem	
BA	NAA	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explants	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explants
	Control	0 ^e	0 ^f	0 ^c	0 ^d
0.1		58.33±16.67 ^{abcd}	2±0.19 ^{bcde}	91.67±8.33 ^{ab}	1.31±0.19 ^{bc}
	0.1	41.67±8.33 ^{bcde}	1.17±0.17 ^{def}	83.33±8.33 ^{ab}	1.78±0.22 ^{abc}
	0.5	58.33±16.67 ^{abcd}	2.22±0.11 ^{bcde}	91.67±8.33 ^{ab}	1.36±0.07 ^{bc}
	1	25±14.43 ^{de}	0.67±0.33 ^{ef}	83.33±8.33 ^{ab}	1.19±0.1 ^{bc}
	2	66.67±8.33 ^{abcd}	1.61±0.06 ^{bcdef}	58.33±8.33 ^b	1.17±0.17 ^c
0.5		83.33±8.33 ^{abc}	1.81±0.1 ^{bcdef}	91.67±8.33 ^{ab}	1.61±0.14 ^{abc}
	0.1	75 ^{abcd}	1.44±0.11 ^{cdef}	100 ^a	1.67±0.17 ^{abc}
	0.5	66.67±8.33 ^{abcd}	1.33±0.19 ^{def}	100 ^a	1.17±0.08 ^c
	1	33.33±16.67 ^{cde}	0.67±0.33 ^{ef}	100 ^a	2.42±0.08 ^a
	2	58.33±8.33 ^{abcd}	1.72±0.15 ^{bcdef}	91.67±8.33 ^{ab}	1.83±0.08 ^{abc}
1		100 ^a	2.92±0.22 ^{bcd}	100 ^a	2 ^{abc}
	0.1	100 ^a	3.08±0.22 ^{bcd}	100 ^a	2±0.14 ^{bcdefgh}
	0.5	58.33±8.33 ^{abcd}	1.89±0.11 ^{bcdef}	91.67±8.33 ^{ab}	1.81±0.23 ^{abc}
	1	50 ^{bcd}	1.67±0.17 ^{bcdef}	75±14.43 ^{ab}	1.56±0.06 ^{abc}
	2	91.67±8.33 ^{ab}	2.64±0.07 ^{bcd}	83.33±8.33 ^{ab}	1.72±0.15 ^{abc}
2		91.67±8.33 ^{ab}	3.42±0.3 ^{ab}	91.67±8.33 ^{ab}	2.08±0.08 ^{ab}
	0.1	100 ^a	5.25±0.58 ^a	100 ^a	2.33±0.22 ^a
	0.5	91.67±8.33 ^{ab}	1.97±0.26 ^{bcde}	100 ^a	2±0.14 ^{abc}
	1	83.33±8.33 ^{abc}	3.36±0.22 ^{abc}	100 ^a	1.92±0.17 ^{abc}
	2	100 ^a	2.5±0.25 ^{bcde}	100 ^a	1.67±0.08 ^{abc}

※ Mean ± SE

※ Mean values superscripted with the same letters did not differ significantly

表 14 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 GA₃ 前處理下於 BA 與 NAA 不同組合對芽體誘導之結果

Table14. The effect of different compositions of BA and NAA on the shoot induction from GA₃ pretreated cotyledonary node and nodal stem explants of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)		Cotyledonary node		Nodal stem	
BA	NAA	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/explants	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/explants
Control		0 ^c	0 ^f	0 ^c	0 ^d
0.1		58.33±8.33 ^{abcd}	1.44±0.06 ^{cdef}	58.33±22.05 ^{ab}	1.17±0.17 ^c
	0.1	50 ^{bcd}	1.67±0.17 ^{cdef}	66.67±22.05 ^{ab}	1.28±0.15 ^{bc}
	0.5	41.67±22.05 ^{cde}	0.89±0.48 ^{def}	75±14.43 ^{ab}	1.36±0.07 ^{bc}
	1	33.33±8.33 ^{cde}	1.83±0.17 ^{cdef}	83.33±8.33 ^{ab}	1.31±0.19 ^{bc}
	2	33.33±16.67 ^{cde}	0.67±0.33 ^{ef}	83.33±16.67 ^{ab}	1.33±0.08 ^{bc}
0.5		50±14.43 ^{bcd}	2.11±0.11 ^{bcd}	91.67±8.33 ^{ab}	1.47±0.12 ^{abc}
	0.1	75 ^{abcd}	1.44±0.11 ^{cdef}	91.67±8.33 ^{ab}	1.69±0.33 ^{abc}
	0.5	25±14.43 ^{de}	0.83±0.44 ^{def}	75±14.43 ^{ab}	1.75±0.14 ^{abc}
	1	41.67±16.67 ^{bcd}	1.56±0.29 ^{cdef}	83.33±16.67 ^{ab}	1.67±0.17 ^{abc}
	2	58.33±8.33 ^{abcd}	2.11±0.44 ^{bcd}	50±25 ^{bc}	1.14±0.57 ^c
1		75 ^{abcd}	2.44±0.29 ^{abcde}	91.67±8.33 ^{ab}	1.56±0.06 ^{abc}
	0.1	100 ^a	2.58±0.33 ^{abcd}	100 ^a	1.67±0.08 ^{abc}
	0.5	58.33±8.33 ^{abcd}	3.94±0.53 ^{ab}	91.67±8.33 ^{ab}	1.94±0.24 ^{abc}
	1	83.33±8.33 ^{abc}	2.36±0.22 ^{abcde}	75 ^{ab}	1.56±0.11 ^{abc}
	2	50 ^{bcd}	1.5±0.29 ^{cdef}	83.33±8.33 ^{ab}	1.58±0.13 ^{abc}
2		91.67±8.33 ^{ab}	3.25±0.25 ^{abc}	91.67±8.33 ^{ab}	2.17±0.22 ^{ab}
	0.1	100 ^a	4.17±0.3 ^a	100 ^a	2.33±0.36 ^a
	0.5	100 ^a	3.17±0.17 ^{abc}	100 ^a	1.86±0.34 ^{abc}
	1	100 ^a	2.92±0.08 ^{abc}	91.67±8.33 ^{ab}	1.72±0.15 ^{abc}
	2	91.67±8.33 ^{ab}	2.61±0.2 ^{abcd}	66.67±22.05 ^{ab}	1.25±0.14 ^c

※ Mean ± SE

※ Mean values superscripted with the same letters did not differ significantly

表 15 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 BA 前處理於 BA 與 NAA 不同組合對芽體誘導之結果

Table15. The effect of different compositions of BA and NAA on the shoot induction from BA pretreated cotyledonary node and nodal stems explants of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)		Cotyledonary node		Nodal stem	
BA	NAA	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/explants	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/explants
Control		0 ^d	0 ^d	33.33±22.05 ^{de}	0.19±0.09 ^e
0.1		25 ^{cd}	2±0.58 ^{bc}	58.33±8.33 ^{bcd}	2 ^{bcd}
	0.1	41.67±8.33 ^{bcd}	1.67±0.44 ^{cd}	75 ^{abcd}	2±0.19 ^{bcd}
	0.5	66.67±8.33 ^{abc}	2±0.19 ^{bc}	83.33±8.33 ^{abc}	1.53±0.24 ^d
	1	50 ^{bc}	2±0.29 ^{bc}	83.33±8.33 ^{abc}	1.44±0.29 ^d
	2	83.33±8.33 ^{abc}	1.42±0.13 ^{cd}	100 ^a	1.83±0.08 ^{bcd}
0.5		41.67±8.33 ^{bcd}	2±0.29 ^{bc}	83.33±8.33 ^{abc}	1.94±0.24 ^{bcd}
	0.1	66.67±8.33 ^{abc}	1.56±0.22 ^{cd}	91.67±8.33 ^{ab}	1.89±0.18 ^{bcd}
	0.5	75 ^{abc}	1.89±0.29 ^{bcd}	91.67±8.33 ^{ab}	2.72±0.15 ^{abc}
	1	75 ^{abc}	2 ^{bc}	83.33±8.33 ^{abc}	2.14±0.19 ^{abcd}
	2	33.33±8.33 ^{cd}	2±0.58 ^{bc}	75 ^{abcd}	1.44±0.11 ^d
1		100 ^a	2.33±0.33 ^{bc}	91.67±8.33 ^{ab}	2.53±0.12 ^{abcd}
	0.1	100 ^a	3.83±0.33 ^{ab}	100 ^a	2.42±0.08 ^{abcd}
	0.5	91.67±8.33 ^{ab}	1.81±0.37 ^{cd}	83.33±8.33 ^{abc}	2.11±0.11 ^{abcd}
	1	50±14.43 ^{bc}	2.61±0.45 ^{bc}	91.67±8.33 ^{ab}	1.72±0.03 ^{bcd}
	2	91.67±8.33 ^{ab}	1.78±0.28 ^{cd}	91.67±8.33 ^{ab}	1.69±0.19 ^{cd}
2		100 ^a	3.33±0.71 ^{bc}	91.67±8.33 ^{ab}	2.81±0.37 ^{ab}
	0.1	100 ^a	5.42±1.16 ^a	100 ^a	3.17±0.46 ^a
	0.5	100 ^a	2.5±0.29 ^{bc}	100 ^a	2.5 ^{abcd}
	1	83.33±8.33 ^{abc}	2.92±0.21 ^{bc}	91.67±8.33 ^{ab}	2.42±0.22 ^{abcd}
	2	100 ^a	3.17±0.08 ^{bc}	100 ^a	1.75 ^{bcd}

※ Mean ± SE

※ Mean values superscripted with the same letters did not differ significantly

表 16 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 BA 前處理於 BA 與 IBA 不同組合對芽體誘導之結果

Table16. Effect of different compositions of BA and IBA on the shoot induction from BA pretreated cotyledonary node and nodal stem explants of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)		Cotyledonary node		Nodal stem	
BA	IBA	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explants	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explant
0.1	0.1	16.67±8.33 ^{bcd}	1.67±0.88 ^{bcde}	33.33±22.05	0.67±0.33 ^d
	0.5	16.67±8.33 ^{bcd}	1±0.58 ^{cde}	91.67±8.33	1.47±0.24 ^{cd}
	1	0 ^d	0 ^e	83.33±16.67	1.33±0.08 ^{cd}
	2	25 ^{cd}	0.33±0.33 ^{de}	91.67±8.33	1.17±0.08 ^{cd}
0.5	0.1	8.33±8.33 ^{abcd}	1.72±0.15 ^{bcde}	83.33±16.67	1.83±0.17 ^{cd}
	0.5	58.33±8.33 ^{abcd}	1.89±0.11 ^{bcde}	91.67±8.33	1.94±0.31 ^{bcd}
	1	50 ^{abcd}	2.33±0.17 ^{abcd}	91.67±8.33	1.67±0.17 ^{cd}
	2	66.67±8.33 ^{abc}	1.72±0.15 ^{bcde}	83.33±16.67	1.58±0.22 ^{cd}
1	0.1	91.67±8.33 ^a	3.08±0.36 ^{abc}	75±25	1.75±0.14 ^{cd}
	0.5	100 ^a	3.75±0.38 ^{ab}	100	2.33±0.08 ^{abc}
	1	83.33±8.33 ^{ab}	2.19±0.1 ^{bcd}	91.67±8.33	2.17±0.17 ^{abc}
	2	83.33±16.67 ^a	2±0.14 ^{b^{bcde}}	91.67±8.33	2.14±0.32 ^{abc}
2	0.1	100 ^a	3.58±0.22 ^{ab}	91.67±8.33	2.28±0.15 ^{abc}
	0.5	100 ^a	4.33±0.65 ^a	83.33±16.67	3.42±0.08 ^a
	1	100 ^a	2.5±0.38 ^{abc}	91.67±8.33	3.14±0.79 ^{ab}
	2	100 ^a	2.75±0.29 ^{abc}	100	1.92±0.22 ^{bcd}

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT

※ The number of repeat:3

表 17 水黃皮之子葉節與帶節莖段在 TDZ 不同濃度對芽體誘導之結果

Table17. Effect of different concentrations of TDZ on the shoot induction from cotyledonary node and nodal stem explants of *P. pinnata*

Treat		Cotyledonary node		Nodal stem	
Pretreatment	TDZ(mg/L)	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explant	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/ explants
WPM	0.1	100 ^a	3±0.63 ^{ab}	91.67±8.33 ^{ab}	1.75±0.14 ^{abc}
	1	75 ^{abc}	1.89±0.11 ^{bc}	91.67±8.33 ^{ab}	1.61±0.14 ^{abc}
	2	50±14.43 ^{abc}	1.5±0.29 ^{b^{bc}}	83.33±8.33 ^{abc}	1.39±0.06 ^{bc}
	3	16.67±8.33 ^c	1±0.58 ^c	66.67±8.33 ^{bc}	1.72±0.15 ^{abc}
WPM+GA ₃	0.1	100 ^a	3±0.38 ^{ab}	91.67±8.33 ^{ab}	2.19±0.23 ^{ab}
	1	100 ^a	2.5±0.25 ^{abc}	91.67±8.33 ^{ab}	1.61±0.13 ^{abc}
	2	41.67±8.33 ^{bc}	1.83±0.17 ^{bc}	58.33±16.67 ^{bc}	1.56±0.56 ^{abc}
	3	41.67±8.33 ^{bc}	1.17±0.17 ^c	50±14.43 ^c	1 ^c
WPM+BA	0.1	91.67±8.33 ^{ab}	3.86±0.34 ^a	100 ^a	2.5 ± 0.5 ^a
	1	75±14.43 ^{abc}	3 ^{ab}	83.33±16.67 ^{abc}	2.42±0.3 ^a
	2	75±14.43 ^{abc}	2.42±0.36 ^{abc}	75 ^{abc}	2.33±0.38 ^{ab}
	3	25±14.43 ^c	1.33±0.67 ^{bc}	66.67±8.33 ^{bc}	1.83±0.25 ^{abc}

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat:3

圖 8 水黃皮以莖段及下胚軸為培植體培養於不同培養基誘導之芽體及癒合組織

Fig 8. The results of the epicotyls and hypocotyls explants of *P. pinnata* were cultured on different medium treatment to induce multiple shoots and callus

圖 8-A. 水黃皮莖段於 GA₃ 前處理在 MS 添加 0.5 mg/L BA 及 1 mg/L NAA 誘導芽體之結果。(Bar = 5 mm)

Fig8-A. The results of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.5 mg/L BA and 1 mg/L NAA to induce shoots with GA₃ pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-B. 水黃皮莖段於 WPM 前處理在 MS 添加 2mg/L BA 及 2mg/L NAA 誘導芽體之結果。(Bar = 1 mm)

Fig8-B. The results of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2mg/L BA and 2mg/L NAA to induce shoots with WPM pretreatment. (Bar = 1 mm)

圖 8-C. 水黃皮下胚軸於 WPM 前處理在 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 誘導芽體之結果。(Bar = 2 mm)

Fig8-C. The results of the hypocotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA to induce shoots with WPM pretreatment. (Bar = 2 mm)

圖 8-D. 水黃皮莖段於 WPM 前處理在 MS 添加 0.1mg/L TDZ 誘導芽體之結果。(Bar = 5 mm)

Fig8-D. The results of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1mg/L TDZ to induce shoots with WPM pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-E. 水黃皮莖段於 GA₃ 前處理在 MS 添加 0.1 mg/L TDZ 誘導芽體之結果。(Bar = 5 mm)

Fig8-E The results of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1mg/L TDZ to induce shoots with GA₃ pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-F. 水黃皮莖段於 GA₃ 前處理在 MS 添加 0.1 mg/L TDZ 誘導芽體之結果。(Bar = 5 mm)

Fig8-F. The results of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1mg/L TDZ to induce shoots with GA₃ pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-G. 水黃皮下胚軸於 BA 前處理在 MS 添加 1 mg/L TDZ 誘導芽體之結果。(Bar = 5 mm)

Fig8-G. The results of the hypocotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 1 mg/L TDZ to induce shoots with BA pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-H. 水黃皮下胚軸於 WPM 前處理在 1 mg/L TDZ 誘導芽體之結果。(Bar = 2 mm)

Fig8-H. The results of the hypocotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 1 mg/L TDZ to induce shoots with WPM pretreatment. (Bar = 2 mm)

圖 8-I. 水黃皮莖段於 BA 前處理在 MS 添加 0.1 mg/L BA 及 2 mg/L NAA 下癒合組織之形態。(Bar = 5 mm)

Fig8-I. Morphology of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1 mg/L BA and 2 mg/L NAA to induce callus with BA pretreatment. (Bar = 5 mm)

圖 8-J. 水黃皮莖段於 BA 前處理在 MS 添加 2 mg/L BA 及 2 mg/L NAA 癒合組織之形態。(Bar = 5 mm)

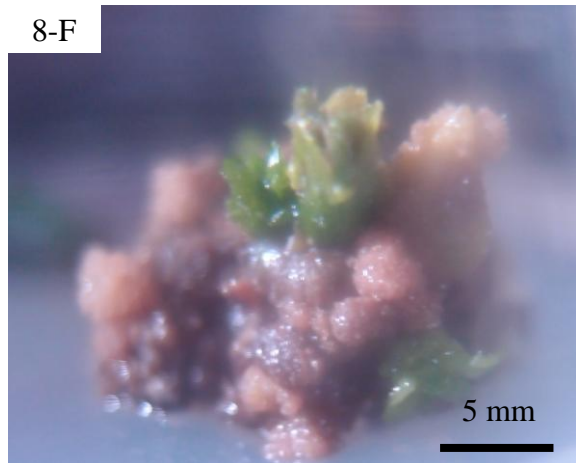
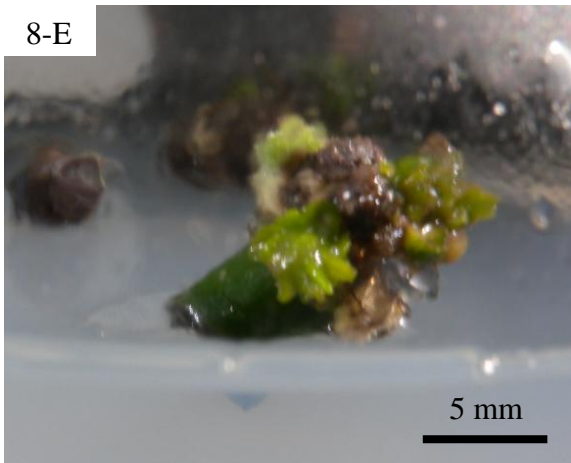
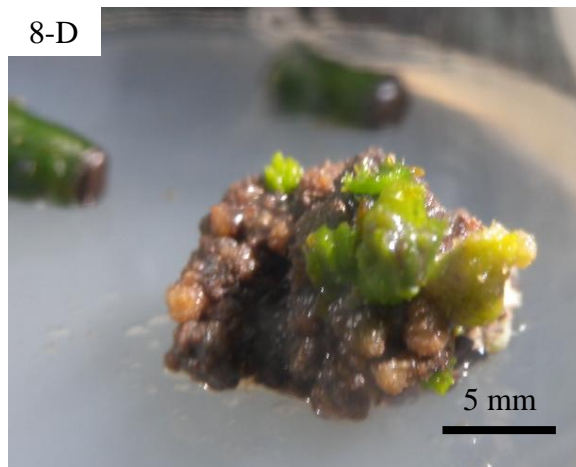
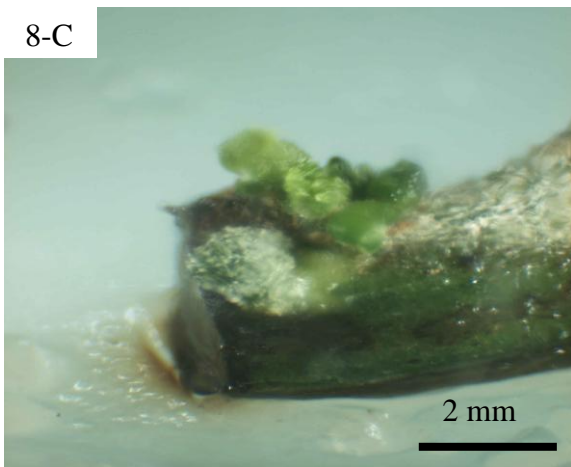
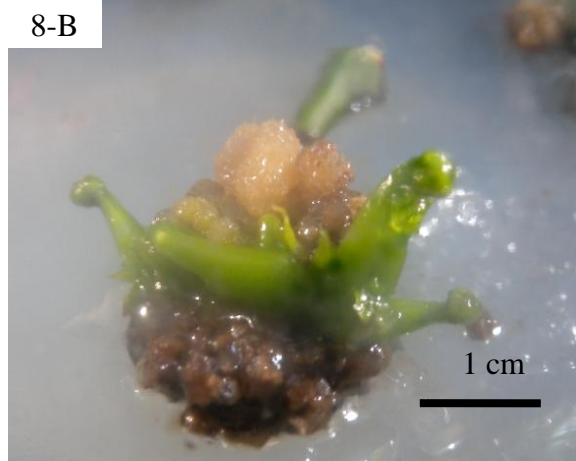
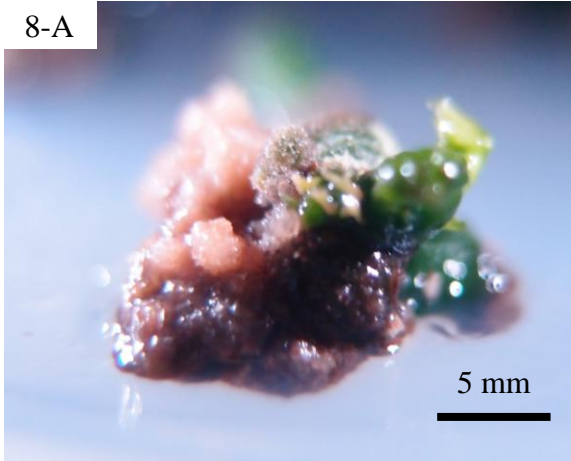
Fig8-J. Morphology of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L BA and 2 mg/L NAA to induce callus with BA pretreatment. (Bar = 5 mm)

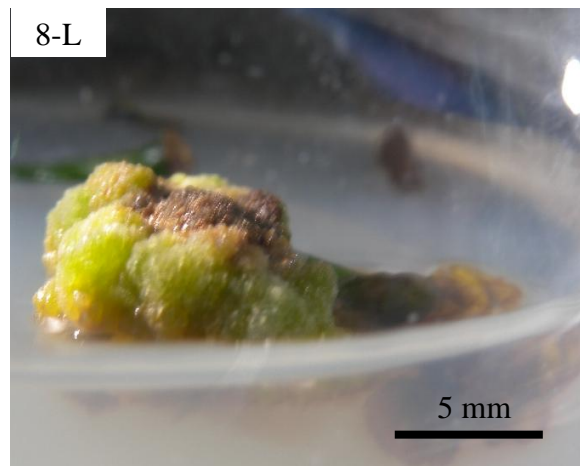
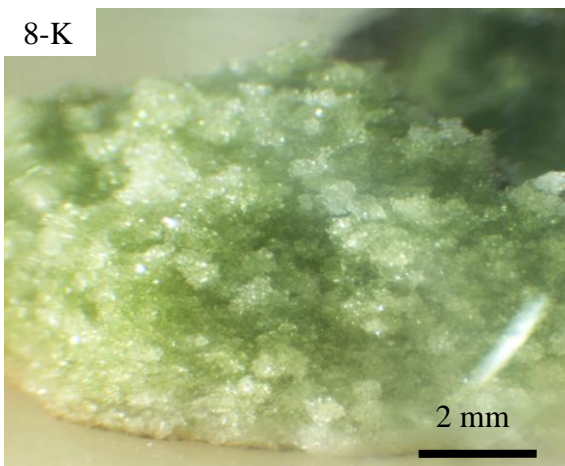
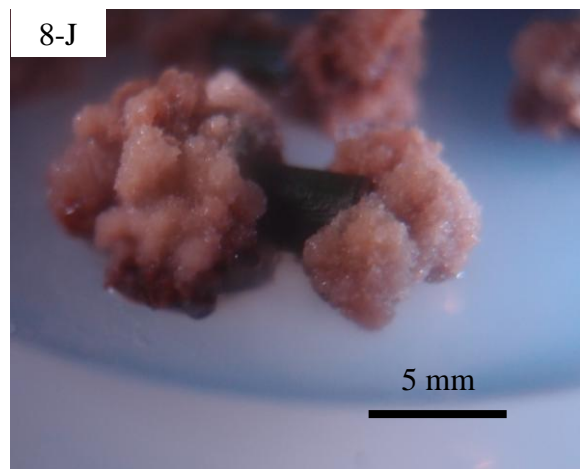
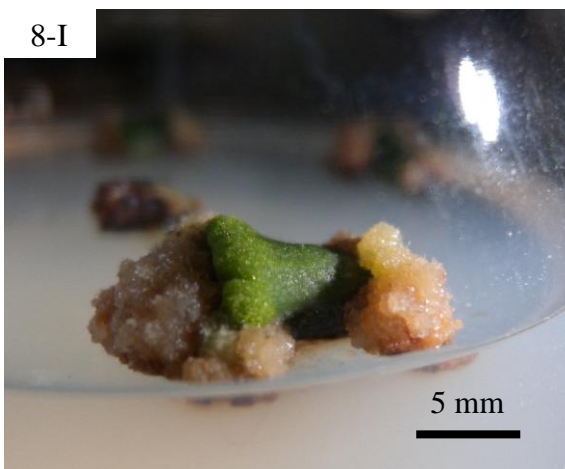
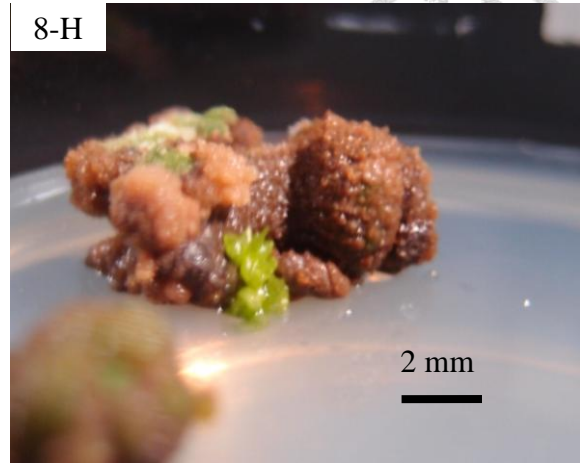
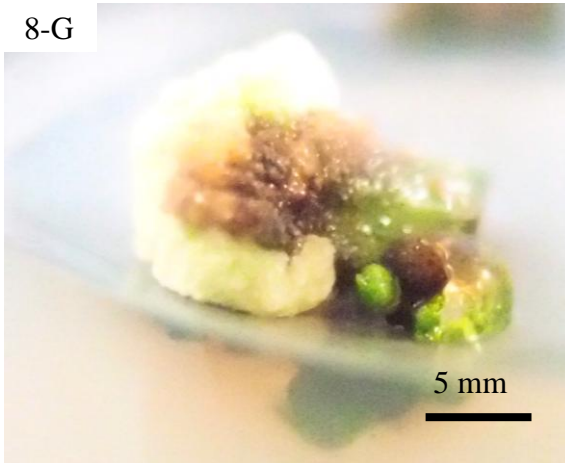
圖 8-K. 水黃皮莖段於 BA 前處理在 MS 添加 0.1mg/L TDZ 下癒合組織之形態。(Bar = 2 mm)

Fig8-K. Morphology of the epicotyls of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1mg/L TDZ to induce callus with BA pretreatment. (Bar = 2 mm)

圖 8-L. 水黃皮莖段於 BA 前處理在 MS 添加 1 mg/L TDZ 下癒合組織之形態。(Bar = 5 mm)

Fig8-L. Morphology of the epicotyls *P. pinnata* cultured on basic MS with 1mg/L TDZ to induce callus with BA pretreatment. (Bar = 5 mm)







(二) 野外材料

取自野外萌蘖之水黃皮枝條，經流水處理及消毒後，於無菌操作台中取葉片和生長點，進行芽體誘導試驗。

以葉片作培植體，僅少數於 MS 培養基添加高濃度 BA (5 mg/L) 處理下於葉片切口處產生淡綠色結構鬆散之癒合組織，但最高誘導率僅 37.5%，大多數沒反應之葉片皆褐化死亡，由葉片誘導出之癒合組織無分化現象，且繼代培養於原來培養基中進行誘導，但癒合組織逐漸褐化死亡。

生長點於 MS 培養基添加 1 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 為誘導芽體較佳配方，平均誘導 2.34 個芽體，誘導率達 88%，其次為 2 mg/L BA 與 0.1 mg/L NAA 處理下，平均誘導 2.32 個芽體數，誘導率達 82.17% (表 18)。

生長點培養約 2 週就有芽體生長的狀況，通常會先誘導出葉原體，且無癒合組織發生 (圖 9-E、F)，較野外利用帶節莖段直接消毒後誘導結果速度快 (圖 10)。當 BA 濃度超過 2 mg/L 時，誘導率及芽體數都有降低的趨勢，培養期間會因為操作過程或消毒不完全而污染，通常污染約 4 天後出現，通常為黃色分泌物，且由於誘導芽體體積甚小不易觀察，故以複式微鏡觀察外表形態並拍照記錄。

表 18 水黃皮生長點在不同 BA 及 NAA 組合下枝條生長之結果

Table18. The results of the meristem tips cultured on different compositions of BA and NAA to induce shoots growth.

PGRs(mg/L)		Number of explants	Contamination rate (%)	Total number of shoots	Shoot Induction(%)	Mean No. of shoots/explant
BA	NAA					
	Control	70	22.86	44	73.18±12.35 ^{abcd}	1.34±0.14 ^c
1	0.1	70	38.57	86	88.06±6.85 ^a	2.34±0.29 ^a
	0.5	70	57.14	46	77±9.4 ^{abc}	1.98±0.12 ^{abc}
2	0.1	70	37.14	86	82.17±3.11 ^{abc}	2.32 ±0.21 ^a
	0.5	70	42.86	74	80±6.37 ^{abc}	2.27 ±0.21 ^{ab}
3	0.1	70	37.14	70	78.17±7.43 ^{abc}	1.92 ±0.16 ^{abc}
	0.5	70	42.86	65	81.83±7.3 ^{ab}	1.97 ±0.14 ^{abc}
4	0.1	70	21.43	56	60.67±4.88 ^{bcd}	1.73 ±0.27 ^{abc}
	0.5	70	42.86	43	67.5±5 ^{bcd}	1.60 ±0.26 ^{bc}
5	0.1	70	28.57	35	52±3.74 ^d	1.35 ±0.07 ^c
	0.5	70	54.29	23	56.67±6.67 ^{cd}	1.3 ±0.12 ^c

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat:5

圖 9 水黃皮芽體誘導之結果

Fig 9. The results of shoot induction of *P. pinnata*



圖 9-A. 水黃皮子葉節在 MS 添加 0.1mg/L TDZ 誘導芽體之結果。 (Bar = 5 mm)

Fig9-A. The results of the cotyledonary nodes of *P. pinnata* cultured on basic MS with 0.1 mg/L TDZ to induce shoots. (Bar = 5 mm)

圖 9-B. 水黃皮帶節莖段在 MS 添加於 3mg/L TDZ 誘導生長異常芽體之結果。 (Bar = 5 mm)

Fig9-B. The results of the stem with node of *P. pinnata* cultured on basic MS with 3 mg/L TDZ to induce abnormal shoots. (Bar = 5 mm)

圖 9-C. 水黃皮子葉節在 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.5 mg/L IBA 誘導芽體之結果。 (Bar = 5 mm)

Fig9-C. The results of the cotyledonary nodes of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA to induce shoots. (Bar = 5 mm)

圖 9-D. 水黃皮帶節莖段在 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.5 mg/L IBA 誘導芽體之結果。 (Bar = 5 mm)

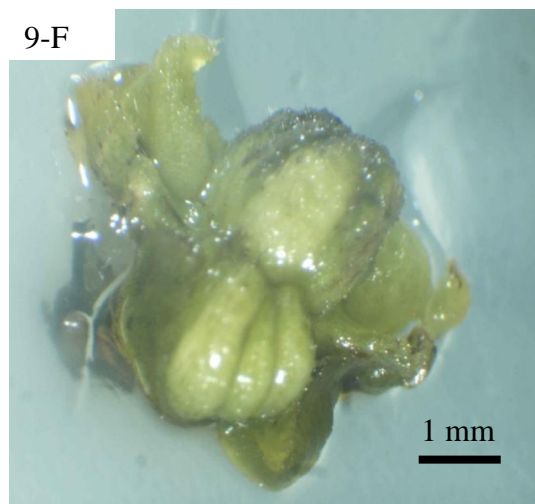
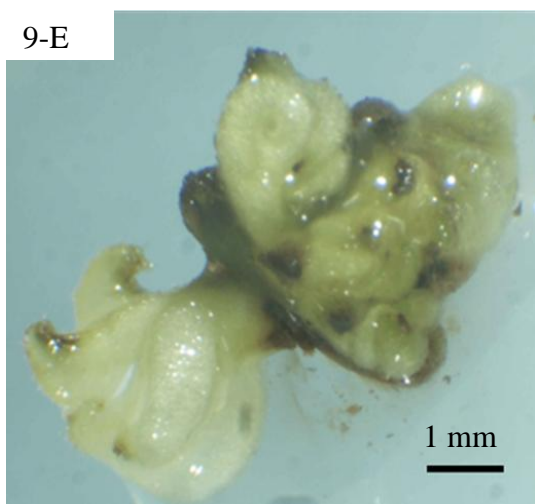
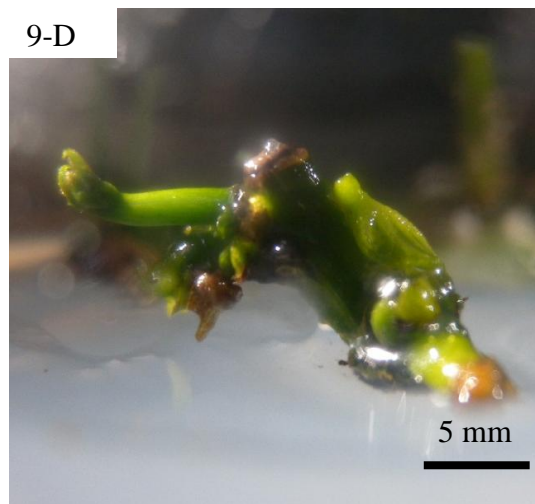
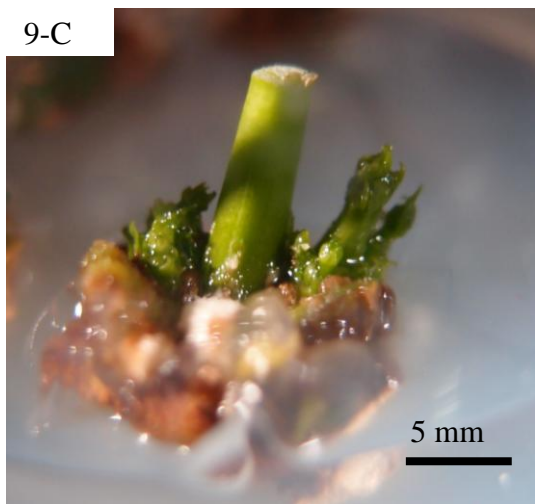
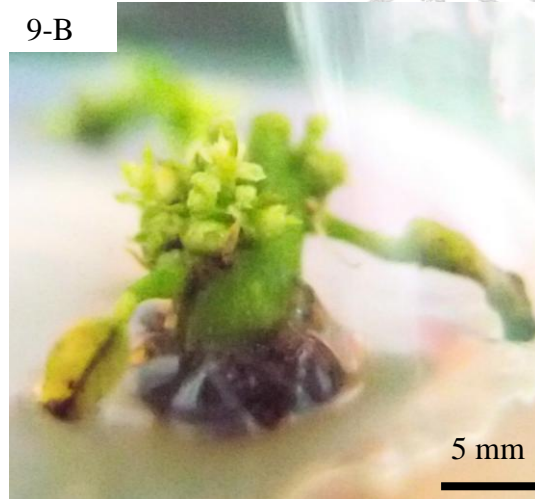
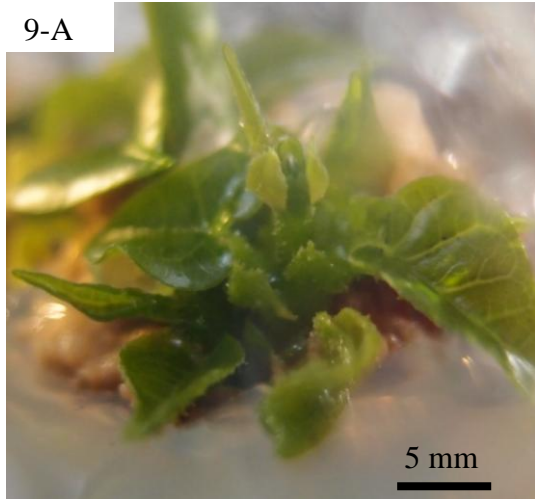
Fig9-D. The results of the stem with node of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA to induce shoots. (Bar = 5 mm)

圖 9-E. 水黃皮生長點在 MS 添加 1 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 芽體誘導之結果。 (Bar = 1 mm)

Fig9-E. The results of the meristem tips of *P. pinnata* cultured on basic MS with 1 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA to induce shoots. (Bar = 1 mm)

圖 9-F. 水黃皮生長點在 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 培養 1 個月誘導芽體之結果。 (Bar = 1 mm)

Fig9-F. The results of the meristem tips of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA to induce shoots after one month of induction. (Bar = 1 mm)



四、水黃皮之芽體伸長試驗

取誘導芽體較佳配方，以子葉節及帶節莖段為培植體於 MS 培養基添加 2 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 誘導芽體，以 3-5 芽體數切離培植體進行伸長試驗；生長點以 MS 添加 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 誘導芽體，但因為誘導的芽體不易切離，故直接培養在 BA 和 GA₃ 的組合。

伸長結果以子葉節為培植體伸長結果較佳（圖 11-A），在 MS 添加 1 mg/L GA₃ 及 0.2 mg/L BA 培養下的芽體，平均伸長約 1.13cm，芽體最高伸長可達 4 cm，誘導率 44.44%；培養在 0.5 mg/L GA₃ 和 0.2 mg/L BA 具有較高誘導率（67%）；其次以帶節莖段為培植體，於 MS 添加 0.5 mg/L GA₃ 培養下芽體平均伸長約 0.38 cm，芽體最高伸長為 1 cm，最高誘導率 25%（圖 11-B）；生長點伸長結果不佳，幾乎都不反應，僅少數芽體有伸長反應（伸長長度不超過原培植體之 1/3）（圖 11-C）。

表 19 水黃皮子葉節及帶節莖段芽體伸長試驗之結果

Table 19. The results of shoot elongation test of cotyledonary node and nodal stem explants of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)		Number of explants	Cotyledonary node		Nodal stem	
GA ₃	BA		Elongation Induction (%)	Mean shoot length (cm)	Elongation Induction (%)	Mean shoot length (cm)
Control		12	3.7±1.85 ^e	0.2 ±0.14 ^d	2.78±2.78 ^{bc}	0.03±0.03 ^{cd}
0.1		12	55.56±14.7 ^{ab}	0.95 ±0.42 ^{abc}	2.78±2.78 ^{bc}	0.03±0.03 ^{cd}
0.1	0.1	12	44.44±5.56 ^{abc}	0.51±0.13 ^{abcd}	19.44±2.78 ^{ab}	0.25±0.05 ^{abc}
0.1	0.2	12	25±9.62 ^{abcde}	0.35±0.08 ^{cd}	8.12±0.21 ^{abc}	0.1±0.06 ^{bcd}
0.1	0.5	12	33.33±17.35 ^{abcde}	0.36±0.26 ^{cd}	13.89±7.35 ^{abc}	0.07±0.03 ^{bcd}
0.5		12	40.6±1.07 ^{abcd}	0.9 ±0.03 ^{abc}	25±8.33 ^a	0.38±0.06 ^a
0.5	0.1	12	22.22±10.02 ^{bcde}	0.46 ±0.21 ^{bcd}	22.22±7.35 ^{ab}	0.27±0.05 ^{ab}
0.5	0.2	12	66.67±16.67 ^a	0.68±0.11 ^{abcd}	2.78±2.78 ^{bc}	0.17±0.17 ^{abcd}
0.5	0.5	12	38.89±14.7 ^{abcd}	0.69±0.21 ^{abcd}	0 ^c	0 ^d
1		12	47.62±22.62 ^{abc}	0.53±0.15 ^{abcd}	11.11±5.56 ^{abc}	0.2±0.16 ^{abcd}
1	0.1	12	48.41±15.08 ^{abc}	1.07±0.15 ^{ab}	19.44±2.78 ^{ab}	0.22±0.02 ^{abcd}
1	0.2	12	44.44±10.02 ^{abc}	1.13± 0.22 ^a	16.03±8.03 ^{abc}	0.12±0.07 ^{bcd}
1	0.5	12	30.56±2.78 ^{abcde}	1.08±0.27 ^{ab}	8.33±4.81 ^{abc}	0.07±0.03 ^{bcd}
1.5		12	33.33±12.73 ^{abcde}	0.54±0.14 ^{abcd}	19.44±10.02 ^{abc}	0.09±0.05 ^{bcd}
1.5	0.1	12	44.44±7.35 ^{abc}	0.69±0.08 ^{abcd}	8.33±4.81 ^{abc}	0.17±0.09 ^{abcd}
1.5	0.2	12	50±14.43 ^{abc}	0.78±0.37 ^{abcd}	0 ^c	0 ^d
1.5	0.5	12	44.44±10.02 ^{abc}	0.68±0.21 ^{abcd}	0 ^c	0 ^d
	0.1	12	38.89±19.44 ^{abcd}	0.33±0.06 ^{cd}	22.22±5.56 ^a	0.27±0.04 ^{abc}
	0.2	12	13.89±2.78 ^{cde}	0.22 ±0.07 ^d	16.67±12.73 ^{abc}	0.18±0.13 ^{abcd}
	0.5	12	8.33±4.81 ^{de}	0.13 ± 0.07 ^d	0 ^c	0 ^d

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat:3



五、水黃皮芽體誘導發根之試驗

以子葉節誘導芽體為培植體，將已抽長約2-3 cm長，帶1-2片之展開葉，將其單獨切離，以進行發根試驗。結果如下：

以基礎培養基MS及1/2MS誘導發根結果，以1/2MS添加1 mg/L IBA較佳（圖12），發根率達75%，可平均誘導出最多2.96根，及平均根長度1.33 cm；其次為以1/2MS添加0.5 mg/L IBA較佳。當IBA濃度提高（0-1.5 mg/L）會影響發根率與發根長度（表20），然對根形態無明顯差異性，較為細長且無癒合組織產生。

表 20 水黃皮發根試驗之結果

Table 20. The results of rooting test of *P. pinnata*

Medium (strength)	Auxin(mg/L) IBA	Number of explants	Percentage of rooting (%)	Mean number roots per shoot	Mean length of root (cm)
MS	0	55	17.27±5.06 ^e	1.32±0.47 ^c	0.35±0.11 ^c
	0.5	55	27.27±5.57 ^{de}	1.61±0.33 ^{bc}	0.88±0.17 ^{abc}
	1	55	38.18±5.69 ^{cde}	2.06±0.36 ^{abc}	0.98±0.27 ^{ab}
	1.5	55	45.45±10.12 ^{bcd}	2.58±0.51 ^{ab}	0.69±0.17 ^{bc}
1/2MS	0	55	50.91±6.8 ^{abcd}	1.58±0.22 ^{bc}	0.69±0.12 ^{bc}
	0.5	55	69.09±5.63 ^{ab}	2.47±0.24 ^{ab}	0.94±0.19 ^{ab}
	1	55	74.55±6.08 ^a	2.96±0.25 ^a	1.33±0.17 ^a
	1.5	55	61.82±9.89 ^{abc}	2.11±0.36 ^{abc}	0.96±0.17 ^{ab}

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat: 11

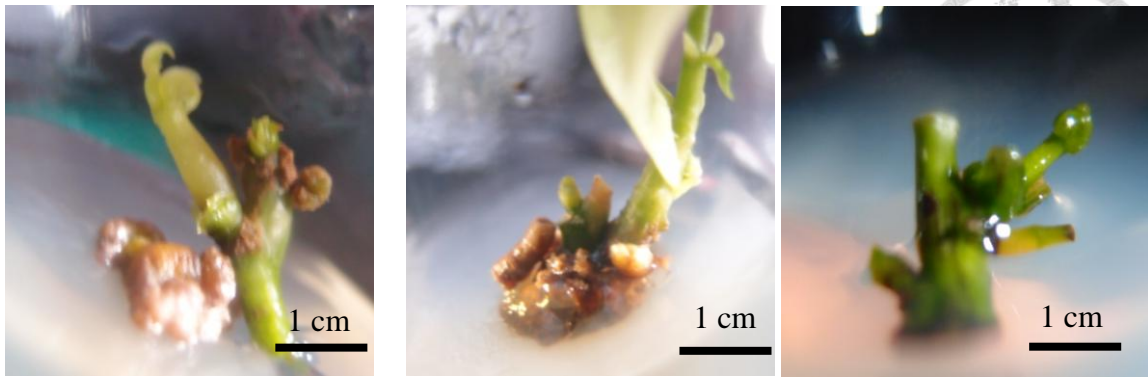


圖 10 水黃皮野外帶節莖段經表面消毒後芽體誘導之結果

Fig10.The results of the shoots induction after surface sterilization of nodal stems

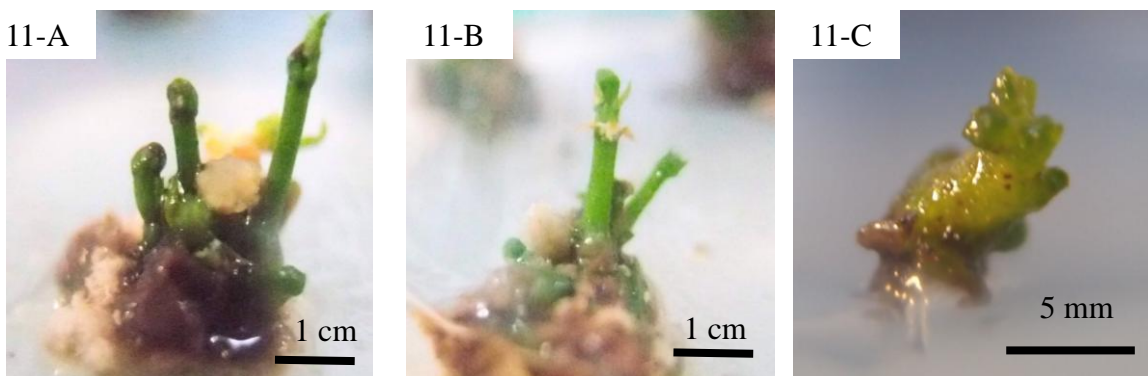


圖 11 水黃皮在 0.2 mg/L BA 及 1 mg/L GA₃ 中 1 個月芽體伸長之結果

圖 11-A 子葉節。圖 11-B 帶節莖段。圖 11-C 生長點。

Fig11. Shoot elongation cultured on 0.2 mg/L IBA and 1 mg/L GA₃ after one month of induction

Fig 11-A. cotyledonary node. Fig 11-B. nodal stems .Fig 11-C. meristem tips.



圖 12 水黃皮子葉節芽體在 1/2MS 添加 1 mg/L IBA 中 1 個月發根之結果

Fig12. The results of cotyledonary node of *P. pinnata* cultured on 1/2MS with 1 mg/L IBA to induce root after one month of induction



六、水黃皮切片觀察結果

(一) 芽體試驗

以子葉節培植體於 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 培養 1 個月後之芽體，經過石蠟切片結果可觀察出誘導之芽體與正常芽體在形態上並無太大差異 (圖 13-A、B)，與後續芽體生長及伸長皆與正常芽體無異。

(二) 芽體伸長試驗

將培養自在 MS 添加 1 mg/L GA₃ 及 0.2 mg/L BA 培養下芽體伸長之莖段進行徒手切片觀察細胞排列，莖是組成植物地上部分的骨幹，它的主要功能是運輸和支持，其次還有貯藏和繁殖的功能，誘導芽體伸長之莖段細胞排列較為疏鬆且細胞大 (圖 13-C)。

(三) 發根試驗

將伸長之芽體培養於 1/2MS 添加 1 mg/L IBA 誘導之根部做徒手切片之觀察結果發現，雖細胞排列較稀疏，且隨分化不明顯，輸導組織不發達，但仍可觀察到內皮層及皮層等構造 (圖 13-D)。

圖 13 水黃皮切片之結果

Fig13. The results of tissue sections of *P. pinnata* by microtome technique



圖 13-A.水黃皮子葉節誘導芽體 1 個月之石蠟切片形態觀察。(Bar = 100 μ m)

Fig13-A. The observation of the shoot from cotyledonary nodes of *P. pinnata* embedded in paraffin one month after induction by microtome technique. (Bar = 100 μ m)

圖 13-B.水黃皮子葉節誘導芽體 1 個月之石蠟切片形態觀察。(Bar = 50 μ m)

Fig13-B. The observation of the shoot from cotyledonary nodes of *P. pinnata* embedded in paraffin one month after induction by microtome technique. (Bar = 50 μ m)

圖 13-C. 水黃皮子葉節芽體伸長莖段徒手切片形態觀察。(Bar = 200 μ m)

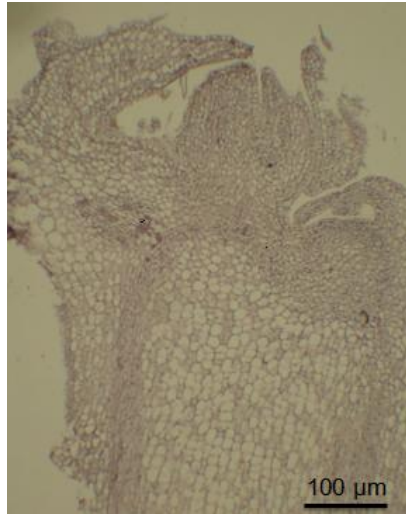
Fig13-C. The observation of the shoot elongation from cotyledonary nodes of *P. pinnata* by free-hand sections method. (Bar = 200 μ m)

圖 13-D.水黃皮子葉節芽體發根根部徒手切片形態觀察。(Bar = 200 μ m)

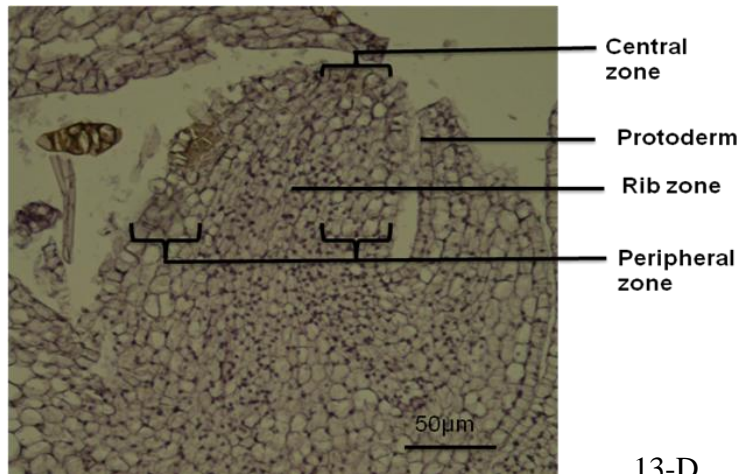
Fig13-D. The observation of the shoot elongation from cotyledonary nodes of *P. pinnata* by free-hand sections method. (Bar = 200 μ m)



13-A

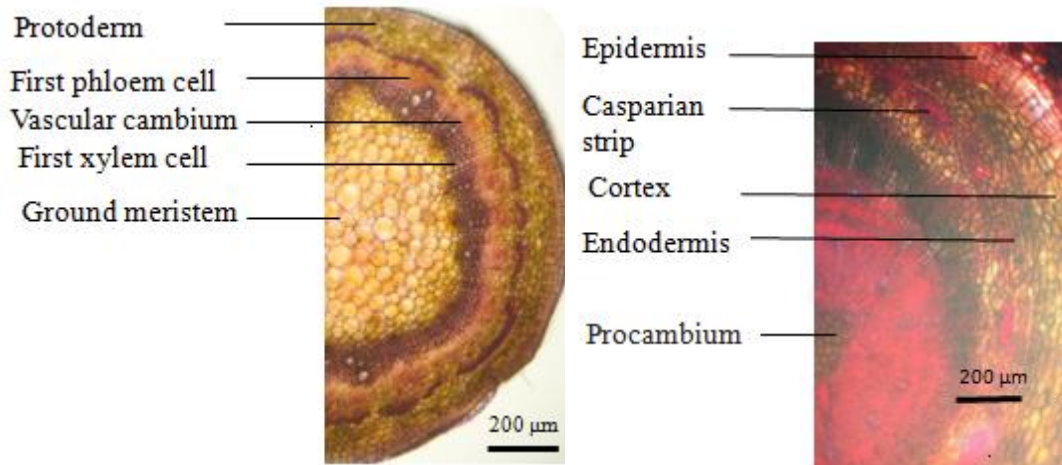


13-B



13-D

13-C



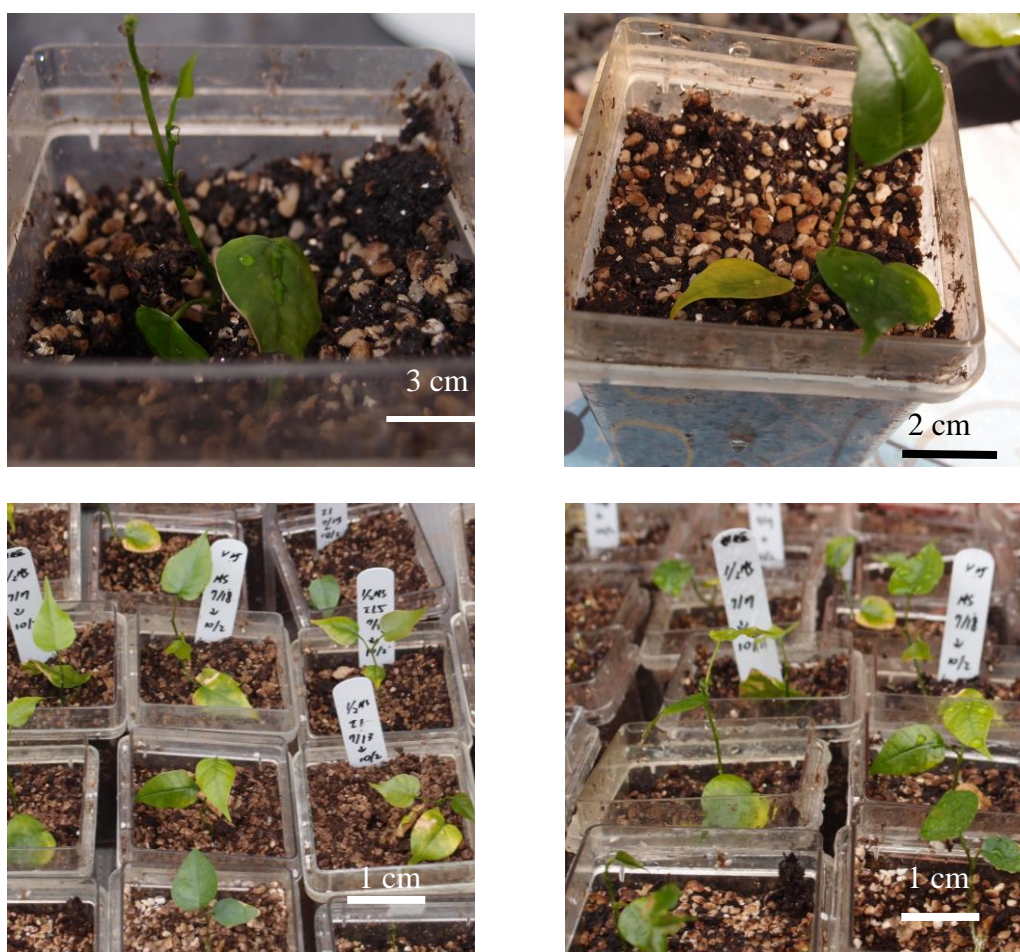


七、水黃皮組培苗之馴化

試驗結果發現，小苗死亡都集中在離瓶2週內，由於前2週以透明塑膠袋罩住容器，維持較高的濕度，推測死亡原因可能為溫度變化劇烈所致，小苗大多能承受去掉塑膠袋後的濕度的變化，存活下來的小苗約4週左右長出新葉，生長6週後植株生長良好，未有生長惰性之現象（圖14），馴化6週後小苗具有85.88%之存活率，平均伸長長度約0.78 cm，最高伸長長度可達1.5 cm。然值得注意的是，有些小苗會有落葉的現象，但仍能陸續萌生側芽，顯出其旺盛之生命力。

圖 14 水黃皮組培苗馴化之結果

Fig14. The results of tissue cultures seedling of *P. pinnata* acclimatization





八、水黃皮體胚誘導之初步探討

(一) 培植體特性

1. 帶胚乳之未成熟胚

未成熟胚 C (子葉佔種子體積 50% 以下) 僅有白色鬆軟之癒合組織產生 (圖 15-A)，沒有大量的逆分化或是體胚發生，多數褐化死亡。未成熟胚 B (子葉佔種子體積之 50-75%) 是 3 種不同發育程度胚，誘導體胚結果較高 (表 21)，雖彼此在統計上並無顯著差異，但在誘導體胚成熟度上可能較為適宜，直接體胚生成之位置多在與培養基接觸的子葉邊緣或子葉節部位 (圖 15-B、C)。未成熟胚 A (子葉佔種子內部體積 75% 以上，其餘為胚乳) 在 2,4-D 與 Kn 處理下，則從黃色顆粒狀癒合組織處生長的不定根，只有少數培植體上有黃色顆粒狀或白色癒合組織發生，體胚發生的位置與未成熟胚 B 相似 (圖 15-D)。

2. 無胚乳之半成熟胚

由本試驗結果來看 (表 22)，體胚誘導結果皆不顯著，各培植體誘導結果以半成熟胚之子葉，體胚誘導率較高 (20.83%)，體胚多發生在子葉接觸培養基的地方 (圖 15-E)，以胚為培植體，多生成黃色鬆軟之癒合組織，且多成長為完整之小苗。

將誘導之體胚進行徒手切片觀察，可觀察到體胚維管組織分佈呈獨立的半封閉，且更無與母體相連接 (圖 15-F)。

(二) 各植物生長調節劑誘導

胚作為培植體，在 2,4-D 濃度 1 mg/L 以下無反應，但與 BA 組合下，有助於胚的發芽現象，當提高 2,4-D 濃度 (2-3 mg/L)，無論是否添加 BA 或 Kn 都有發芽現象，且添加 2,4-D 或與 Kn 組合誘導下，較與 BA 組合下利於分化出不定根。

表 21 水黃皮未成熟胚誘導體胚之結果

Table21. The results of induced somatic embryogenesis of immature embryos of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)				embryo<50		embryo50-75		embryo>75	
2,4-D	Kn	BA	TDZ	response (%)	somatic embryos/explant	response (%)	somatic embryos/explant	response (%)	somatic embryos/explant
1	0			c	-	c, r, g	-	c, r	-
1	0.1			c	-	c, r	-	0.67±0.67	-
1	0.5			c	-	g	-	c, g	-
1	1.5			c	-	c	-	c, r	-
1	0.5			c	-	c, r	-	-	-
1	1.5			c	-	c	-	c, g	-
1	2.5			c	-	c, g	-	c	-
2	0			c	-	c, r	-	c, r, g	-
2	0.1			c	-	8.33±8.33	2±2	c, g	-
2	0.5			c	-	4.17±4.17	1.33±1.33	c, g	-
2	1.5			c	-	c, r	-	c, r, g	-
2	0.5			c	-	c, r	-	c	-
2	1.5			c	-	c	-	c	-
2	2.5			c	-	c	-	c	-
3	0			c	-	c, r	-	c, r, g	-
3	0.1			c	-	c, r, g	-	c, r, g	-
3	0.5			c	-	16.67±16.67	2.08±1.23	12.5±12.5	1.56±1.56
3	1.5			c	-	c, r	-	c	-
3	0.5			c	-	c, r	-	c	-
3	1.5			c	-	c, g	-	c	-
3	2.5			c	-	c	-	c	-
			0.5	c	-	c	-	c	-
			1	c	-	c	-	c	-
			2	c	-	c	-	c	-
			3	-	-	c	-	c	-

※ Mean ± SE

※ The number of repeat:3

※ c:callus, r:rooting, g:germination

表 22 水黃皮未成熟胚與子葉誘導體胚之結果

Table22. The results of induced somatic embryogenesis of immature embryo and cotyledon of *P. pinnata*

PGRs(mg/L)				cotyledon		embryo	
2,4-D	Kn	BA	TDZ	response (%)	somatic embryos/explant	response (%)	somatic embryos/explant
1	0			-	-	-	-
1	0.1			c, r	-	-	-
1	0.5			c, r	-	-	-
1	1.5			-	-	-	-
1		0.5		c	-	c, g	-
1		1.5		c	-	4.17±1.17	0.33±0.33
1		2.5		c	-	c, g	-
2	0			c, r	-	4.17±1.17	0.67±0.67
2	0.1			4.17±1.17 ^b	0.33±0.33 ^c	4.17±1.17	1±1
2	0.5			c,r	-	8.33±8.33	1.67±1.67
2	1.5			4.17±1.17 ^b	0.33±0.33 ^c	c, g	-
2		0.5		c	-	c, g	-
2		1.5		c, r	-	c, g	-
2		2.5		c	-	c, g	-
3	0			8.33±4.17 ^b	2.22±1.47 ^{ab}	c, g	-
3	0.1			8.33±8.33 ^b	1.33±1.33 ^{abc}	c, g	-
3	0.5			20.83±11.02 ^a	3±1.53 ^a	c, g	-
3	1.5			4.17±1.17 ^b	1±1 ^{bc}	c, g	-
3		0.5		c	-	c, g	-
3		1.5		c	-	c, g	-
3		2.5		c	-	c, g	-
			0.5	c	-	c	-
			1	c	-	c	-
			2	c	-	c, g	-
			3	c	-	c, g	-

※ Mean ± SE

※ Different letters in the same row showed that the values were significantly different by DMRT ($\alpha = 0.05$)

※ The number of repeat:3

※ c:callus, r:rooting, g:germination



圖 15 水黃皮體胚誘導 2 個月之結果

Fig15. Results of somatic embryogenesis test of *P. pinnata* after two months of induction.

圖 15-A.水黃皮未成熟胚 B 在 3 mg/L 2,4-D 及 1.5mg/L Kn 癒合組織誘導狀況。(Bar = 3mm)

Fig15-A. The immature embryos of *P. pinnata* at stage B cultured on basic MS with 3 mg/L 2,4-D and 1.5mg/L Kn to induce callus. (Bar = 3 mm)

圖 15-B.水黃皮未成熟胚 B 在 MS 添加 2 mg/L 2,4-D 及 0.1mg/L Kn 體胚誘導狀況。(Bar = 3 mm)

Fig15-B. The immature embryos of *P. pinnata* at stage B cultured on basic MS with 2 mg/L 2,4-D and 0.1mg/L Kn to induce somatic embryogenesis. (Bar = 3 mm)

圖 15-C. 水黃皮未成熟胚 B 在 MS 添加 3 mg/L 2,4-D 及 0.5mg/L Kn 體胚誘導狀況。(Bar = 1 cm)

Fig15-C. The immature embryos of *P. pinnata* at stage B cultured on basic MS with 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L Kn to induce somatic embryogenesis. (Bar = 1 cm)

圖 15-D. 水黃皮未成熟胚 A 在 MS 添加 2 mg/L 2,4-D 及 0.1mg/L Kn 體胚誘導狀況。(Bar = 1 cm)

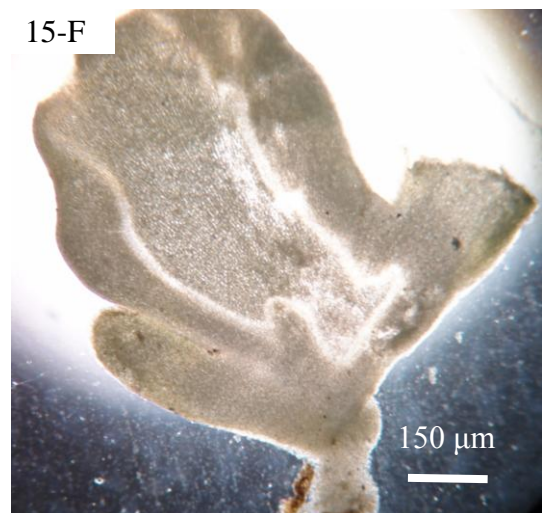
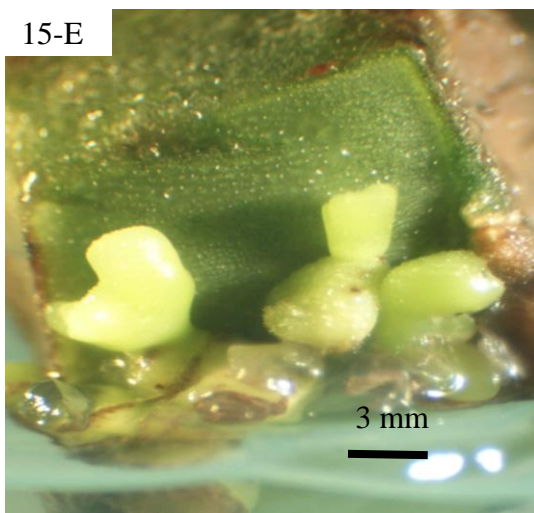
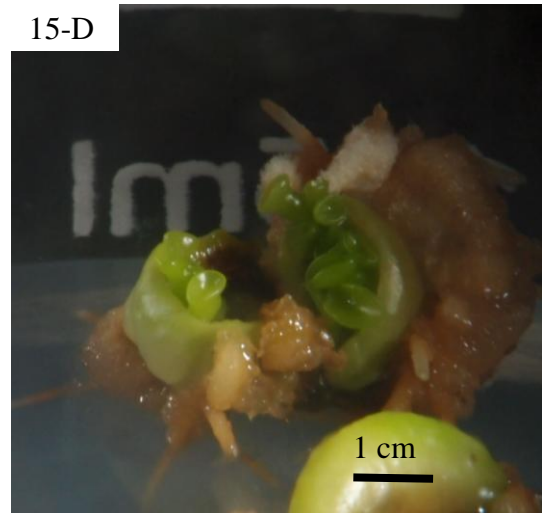
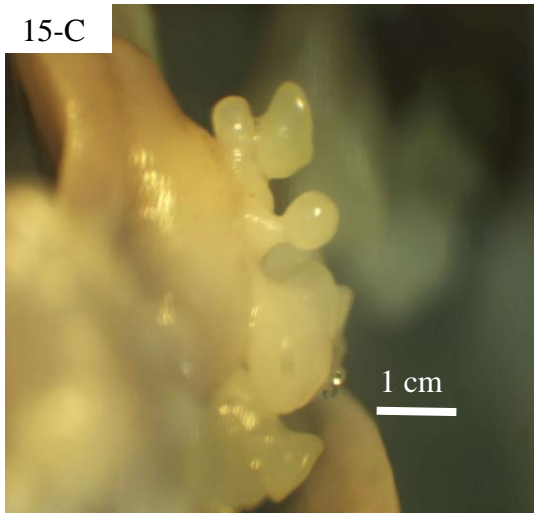
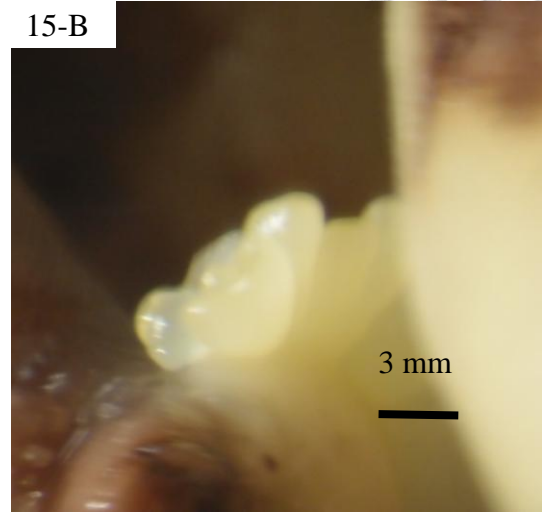
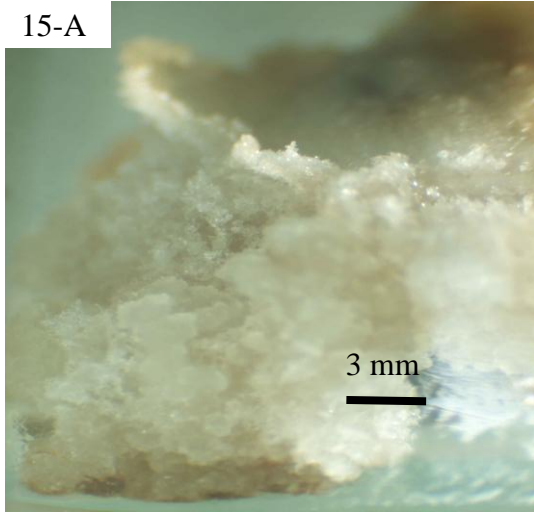
Fig15- D. The immature embryos of *P. pinnata* at stage A cultured on basic MS with 2 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L Kn to induce somatic embryogenesis. (Bar = 1 cm)

圖 15-E.水黃皮子葉在 MS 添加 3 mg/L 2,4-D 及 0.5mg/L Kn 體胚誘導狀況。(Bar = 3 mm)

Fig15-E. The cotyledons of *P. pinnata* cultured on basic MS with 2 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L Kn to induce somatic embryogenesis. (Bar = 3 mm)

圖 15-F.水黃皮子葉在 MS 添加 3 mg/L 2,4-D 及 0.5 mg/L Kn 誘導體胚之徒手切片觀察。(Bar = 150 μ m)

Fig15-F. The observation of somatic embryogenesis from cotyledons of *P. pinnata* cultured on MS with 3 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L Kn. (Bar = 150 μ m)



伍、討論 (Discussion)



一、水黃皮野外帶節莖段之表面消毒

木本植物因生長週期長，易受野外環境汙染，加上台灣氣候溫暖潮濕，有利於微生物之滋生。一般組織培養由野外取材，會先以流水處理將培植體表面附著之孢子及灰塵作初步清洗，再採藥劑消毒，消毒液濃度與處理時間則視培植體情況而異，消毒液的種類也對不同微生物的抑制程度亦有所差別，Ramakrishna等(1991) 對接種微生物之大麥 (*Hordeum vulgare*) 種子進行表面消毒，其中化學消毒方面使用NaOCl及HgCl₂兩種消毒藥劑，NaOCl可降低鐮刀菌(*Fusarium spp.*)、附球菌屬 (*Epicoccum spp.*) 及桿菌屬 (*Bacillus spp.*) 含量，但無法殺死鏈格孢菌 (*Alternaria alternata*)，鏈格孢菌以HgCl₂消毒效果佳。本試驗使用的消毒藥劑為NaOCl，使用5%濃度並搭配20 min的震盪時間消毒效果較佳，濃度與時間處理並無明顯的趨勢，但在20 min震盪比10 min震盪的消毒結果佳，與George及Sherrington(1984) 所提出使用高濃度的消毒液則浸泡時間短；使用低濃度的消毒液則時間長之結論不同，可能試驗設計並未達到消毒液之高濃度標準，故無此現象。

二、水黃皮無菌種子苗之培養與生長

根據水黃皮無菌培養之前人報告，以基礎培養基MS，添加BA及GA₃植物生長調節劑為主 (Sugla *et al.*, 2007; Belide *et al.*, 2010)，故本次試驗採MS、1/2MS及WPM為基礎培養基，並以添加BA及GA₃兩者植物生長調節劑做討論。

(一) 發芽率

以WPM或MS添加1 mg/L BA可達高約80%的發芽率，而1/2MS培養基發芽率最低僅33%。雖然在豆科植物組織培養文獻中提出透過GA₃的 α -澱粉酶及其他其他水解酶的合成可刺激種子發芽 (Shahzad *et al.*, 2007; Parveen *et al.*, 2010)，但依本試驗結果效果不彰，反而是細胞分裂素BA的添加有利於水黃皮種子的發芽，和其他豆科植物文獻相同，如Avenido及Hattori(2000) 赤豆 (*Vigna angularis*) 之種子苗發芽結果及Sussex等(1975) 在四季豆 (*Phaseolus vulgaris*) 之發芽試驗，後者更指

出BA會促進RNA的合成及ABA的降解。根據Kirmizi及Güteryüz (2006) 在蠶豆 (*Vicia faba*) 中之研究指出添加GA₃及BA之子葉含有較高的游離胺基酸 (free amino acid) , 有助於蛋白分解酵素 (proteolytic enzymes) 活性, 並促進種子發芽, 但BA更能提高白胺酸胺基酵素 (leucine aminopeptidase, LAP) 及總可溶性蛋白質 (soluble protein) 含量, 高含量的LAP即為種子發芽之開始現象, 僅在含有細胞分裂素處理中發現具促進蛋白移動 (protein mobilization) 的影響。

(二) 平均根長度

結果觀察到添加細胞分裂素BA的根較未添加者為短胖 (圖5-B) , 主根較不明顯 (圖4-F) , 進一步統計分析結果顯示添加1 mg/L BA對根長度抑制具有顯著差異。Baskin等 (1995) 指出細胞分裂素對根會造成橫向的生長, 並抑制根的長度, 主要是因細胞分裂素會促使根部膨脹, 且引導乙烯抑制根部伸長。

(三) 平均莖長度

結果為未添加植物生長調節劑之種子苗莖平均長度最短 (MS、1/2MS及WPM) , 推測可能因水黃皮種子是先發根再長地上部, 無添加植物生長調節劑之培養下因較遲的發芽現象, 故長度皆不長。在MS添加1 mg/L BA發莖長度與無添加植物生長調節劑長度無顯著差異, 得知BA可能亦抑制莖的生長長度, 此結果與高濃度BA會抑制荷蘭豆 (Fis'erova'et al., 2006) 、黃芪 (*Astragalus nitidiflorus*) (Cano-Castillo et al., 2009)及豇豆 (*V. unguiculata*) (Aasim et al., 2012) 結果相似, Fis'erova'等 (2006) 更提出抑制莖與根的長度比具有1.14的關係。添加0.35 mg/L GA₃有促進莖段的伸長, 且與WPM生長形態 (圖5-A) 相較下, 莖較為細長且側芽數較少 (圖5-D) 。

水黃皮種子苗之發芽試驗結果, 以添加1 mg/L BA較其他三組基礎培養基培養下, 可有效縮短發芽時間, 但會抑制其根的發育長度, 而添加0.35 mg/L GA₃有利於地上部莖段的生長 (圖5) 。



三、水黃皮芽體誘導試驗

(一) 種子苗材料

1. 培植體部位與芽體發生之關係

植物體各部位因形態機能之分化及生理與生化變異，改變其再生能力，受到外在環境誘導後的反應也有所差異，故培植體的選擇對組織培養的成功與否具有關鍵性的影響。本研究採取子葉節、帶節莖段、莖段及下胚軸於各個處理結果，以子葉節誘導結果較佳，其次為帶節莖段，莖段與下胚軸幾乎不會誘導芽體，多誘導癒合組織，目前也有其他豆科植物以子葉節為培植體成功誘導芽體的報告，如赤豆(Avenido and Hattori, 2000)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) (Neves *et al.*, 2001)、黎豆 (*Mucuna pruriens*) (Faisal *et al.*, 2006)、牧豆樹 (*Prosopis laevigata*) (Buendia-Gonzalez *et al.*, 2007)、蝶豆 (*Clitoria ternatea*) (Barik *et al.*, 2007; Singh and Tiwari, 2010)、鐵刀木 (*Cassia siamea*) (Parveen *et al.*, 2010)等。

下胚軸誘導芽體出現於BA與NAA組合及TDZ，但誘導率皆很低，分別為8.33%和6.67%，結果與Hasancebi等 (2011) 以豆科植物雙槽紫雲英 (*Astragalus chrysochlorus*) 15天齡之種子苗，取0.5 cm下胚軸為培植體誘導芽體，結果為BA濃度0.5 mg/L和1 mg/L或添加各濃度之NAA處理下，誘導芽體率皆很低 (分別為13%與36%)，而Buendia-Gonzalez等 (2007) 以牧豆樹種子苗取各培植體誘導芽體結果，下胚軸僅癒合組織產生，以子葉節為培植體才誘導出芽體。

2. 前處理間的差異

Belide 等 (2010) 於掃描式電子顯微鏡觀察下，種子苗經 BA 前處理或對照組獲得之培植體誘導出芽體形態比較，前處理之芽體較大且發育更完整，試驗結果也發現於最佳誘導培養基下 (MS+2 mg/L BA+0.1 mg/L NAA)，芽體誘導數結果三者間雖無顯著差異，但以 BA 前處理結果芽體數總體而言較高，空白試驗僅在 BA 前處理下，帶節莖段有誘導出芽體，推測 BA 前處理可能會促進芽體之生長。值得一提的是，莖段與下胚軸培植體在 3 種前處理誘導結果，GA₃ 及 WPM 都有少量芽體產生，獨 BA 前處理於誘導無誘導任何芽體，可能是培植體差異所致。

3. 各植物生長調節劑誘導結果



(1) BA 與 NAA 不同濃度組合誘導芽體結果

3種種子苗培養的前處理植株作為培植體誘導結果，子葉節與帶節莖段都以MS添加2 mg/L BA及0.1 mg/L NAA的誘導下結果較佳。於1 mg/L BA前處理下以子葉節為培植體，誘導芽體率達100%，平均芽體數為5.42個；帶節莖段多誘導休眠的側芽為主，誘導率於各處理間較子葉節高，平均芽體數為3.17個。

BA與NAA誘導之癒合組織，培養至後期多褐化死亡，值得注意的是，子葉節培植體所觀察到的白色絨毛狀細胞，吳淑華 (1989) 威氏帝杉 (*Pseudotsuga wilsoniana*) 之胚軸培植體也觀察到此現象，並以電子顯微鏡及組織切片作觀察，發現其為長條狀之細胞群，認為該種形態之癒合組織通常不再繼續分化。

(2) BA 與 IBA 不同濃度組合誘導芽體之結果

以子葉節為培植體於0.5 mg/L BA及0.5 mg/L IBA時平均誘導4.33個芽體，於最高誘導芽體數培養配方下，與上述使用不同，NAA添加濃度較高，推測因IBA活性較NAA低，故濃度較NAA高。

(3) TDZ 不同濃度誘導芽體結果

以子葉節為培植體，TDZ誘導結果以0.1 mg/L低濃度的結果較佳，平均芽體數為3.86個，但當TDZ濃度超過0.1 mg/L時每一培植體的芽體數及平均芽體長度都逐漸降低，有抑制芽體生長及葉形態異常的現象，TDZ在高濃度會抑制生長及伸長效果也發現在其他的木本樹種如鐵刀木 (Parveen *et al.*, 2010)。在微體繁殖培養中，TDZ會降低植物體之酵素敏感度，使敏感度低於內源細胞分裂素，故TDZ比BA更具有生物活性且所需濃度低，經試驗TDZ對許多物種，尤其對木本植物都有效 (Mok *et al.*, 1987; Lu, 1993)，但對某些物種TDZ會造成芽體及葉形態的異常，並抑制芽體伸長 (Tegeder *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 2006)，細胞分裂素會抑制莖的伸長可能是TDZ的高細胞分裂素活性形成發育不良的芽體或抑制節間伸長 (Mok *et al.*, 1982)。

以莖段在培植體WPM前處理下在0.1 mg/L TDZ平均產生4.5個芽體，GA₃前處理平均3個芽體；下胚軸則以BA前處理下在1 mg/L TDZ莖段平均2個芽體，結果莖段及下胚軸在誘導芽體數結果TDZ較BA佳，其與Mongomake等 (2009) 非洲土豆 (*Vigna subterranea*) 之種子苗取其胚培養後，以莖段和下胚軸為培植體進行離

體培養結果，以細胞分裂素BA較TDZ能誘導較多芽體數的結果不同，但於低濃度TDZ對莖段及下胚軸誘導結果較佳相似。

總結而論，種子苗培植體以子葉節誘導效果較佳，而以BA添加細胞生長素NAA或IBA，其芽體數皆會隨BA濃度提高而增加，結果同於Parveen等 (2010)。而BA分別與NAA及IBA兩種細胞生長素的組合誘導結果，皆以添加低濃度的細胞生長素能誘導較多的芽體數，研究結果與其他豆科植物相似，如兒茶 (Kaur *et al.*, 1998)、黎豆(Faisal *et al.*, 2006)、耶利哥香脂樹(*Balanites aegyptiaca*) (Anis *et al.*, 2010) 及鐵刀木 (Parveen *et al.*, 2010)。細胞分裂素以BA誘導結果較TDZ佳，結果與其他豆科植物相同，如蒺藜苜蓿 (Neves *et al.*, 2001)、鐵刀木(Parveen *et al.*, 2010)。

(二) 野外材料

野外使用葉片，因分化能力低，誘導結果大多無反應，僅產生少數的癒合組織，且無逆分化能力，無誘導出其他器官之現象；生長點於較佳配方為MS添加1 mg/L BA及0.1 mg/L NAA，平均芽體數為2.34個，芽體誘導數偏低，可能受限生長空間，或取生長點時側芽苞鱗並未去除完整所致，根據Wareing (1969)認為休眠芽(dormant buds) 通常不生長的原因為分生組織之生長抑制劑及限制氧氣與其他氣體的流動，故剝離苞鱗使分生組織能充分與氣體接觸，使休眠芽能增長。

利用生長點繁殖除了可以去除病源病毒，可維持與母樹相同基因型苗木，建立健康無病毒苗外，但由試驗結果顯示出，還是有57%的汙染率，推測取生長點過程中人為汙染，生長點生長初期維管束尚未接連下，為無菌的環境，但需要很高的技術，並受限於採集季節時間的缺點。

生長點誘導結果可看出，於BA及NAA交叉組合處理下各誘導率偏高，即使是對照組也有73%之誘導率，但芽體數不高(平均1.34個芽體數)，可能是生長點本身具備的分生能力。結果顯示高濃度的BA會抑制芽體增殖，以低濃度細胞分裂素及細胞生長素為較佳配方，推測可能因為培植體取自4-5月春季，正值細胞生長旺季，富含內源性營養成分和植物荷爾蒙，外源植物生長調節劑濃度不需太高，當植物生長調節劑濃度高至超出植物體本身的負荷量時反而會對植物體本身產生毒害。



四、水黃皮之芽體伸長試驗

(一) 培植體差異

伸長結果以子葉節為培植體伸長結果較佳，但同一培植體很少使芽體同時抽長至2 cm以上，可能與生長空間限制有關；帶節莖段為培植體時，則芽體伸長度受限；以生長點為培植體結果不佳，芽體多無法伸長，可能是生長點誘導的芽體生長較不健全且生長勢弱。

(二) GA₃ 與 BA 兩種植物生長調節劑之影響

子葉節伸長結果在MS添加1 mg/L GA₃及0.2 mg/L BA培養下芽體平均伸長約1.13 cm，芽體最多伸長可達4 cm；培養在0.5 mg/L GA₃和0.2 mg/L BA具有較高誘導率 (67%)，顯示出較高濃度的GA₃搭配較低濃度BA結果較佳，與Gopalakrishnan等 (2009) 以溫室栽培之烏面馬 (*Plumbago rosea*) 葉片為培植體，將誘導之芽體伸長試驗結果相似。

1. GA₃伸長結果

Cosgrove及Sovonick-Dunford (1989) 在豆科植物荷蘭豆莖段伸長試驗結果指出，GA的影響結果與細胞生長素相似，但反應在其莖部細胞壁特性下，異於細胞生長素之處，在於不影響細胞壁的含水量下，可加強鬆弛速率 (relaxation rate)，亦改變了細胞壁之機械特性；而GA則影響細胞壁的鬆弛速率及含量，但大多不會使細胞壁機械特性變動。Cleland等 (1968) 提出相似的結果，GA會增加木胡瓜 (*Averrhoa bilimbi*) 下胚軸的生長，但不影響細胞壁塑性，反之，細胞生長素不僅增加細胞壁生長量，亦增加其塑性，推測GA作用於細胞壁及細胞生長之滲透壓 (osmotic pressure)。根據Sauter及Kende (1992) 以GA₃處理深水型稻作 (*Oryza sativa*) 結果指出，GA處理後會增加分生細胞在S階段及G2階段細胞核之百分比，以促進細胞分裂速率，並藉由增加新細胞的體積長度達到莖節伸長率的效果。

2. BA伸長結果

將誘得之芽體移至含低濃度細胞分裂素之培養基中，有助於芽體的伸長 (Gupta *et al.*, 1983; Khalekuzzaman *et al.*, 2003)。Sita (1979) 則發現，將多芽體繼

代培養至含微量細胞分裂素與細胞生長素的培養基，芽之生長活力較佳。



五、水黃皮芽體誘導發根之試驗

(一) 基礎培養基

以基礎培養基MS及1/2MS於IBA各濃度組合發根結果，減少MS礦物質 (1/2MS) 有利於水黃皮之發根， Fotopoulos及Sotiropoulos (2005) 在桃 (*Prunus persica*) 的發根試驗結果指出，礦物質的濃度會影響發根特性，為減半之礦物質培養基 (1/2MS)，有助於發根，與榕樹 (*Ficus anastasia*) (Khaled *et al.*, 2009) 誘導發根具有相同結果。

(二) IBA 對發根之影響

誘導發根於 1/2MS 添加 IBA 濃度 1 mg/L 時，無論發根率、平均發根長度結果較佳。在不添加任何植物生長調節劑之基礎培養基(MS 及 1/2MS)，其發根率較都低 (Shahzad *et al.* 2007；Singh and Tiwari, 2010)，MS 及 1/2MS 培養基隨 IBA 濃度的增加 (0-1 mg/L)，會促進發根率、平均發根長度及發根數，IBA 除了有利於發根外，亦可降低癒合組織產生，增加野外出栽生存率 (Komalavalli and Rao, 2000)。IBA 為 1 mg/L 較佳濃度，此結果與棗 (*Zyziphus jujuba*) (Hossain *et al.*, 2003)、日本女貞 (林梓銘, 2005)、大葉山螞蝗 (*Desmodium gangeticum*) (Puhan and Rath, 2012) 誘導濃度相同，但當 IBA 濃度高於誘導最佳濃度 (1 mg/L) 時，會降低根長度，結果與匙羹藤(*Gymnema sylvestre*) (Komalavalli and Rao, 2000)、桃 (Fotopoulos and Sotiropoulos, 2005)、狹葉番瀉葉 (*Cassia angustifolia*) (Siddique and Anis, 2006)、蝶豆 (Singh and Tiwari, 2010)、鐵刀木 (Parveen *et al.*, 2010)、大葉山螞蝗 (Puhan and Rath, 2012)一致，Ozel 等 (2006) 指出當高濃度的 IBA 作用於植物體時，使細胞生長素由根原體轉移至芽體，不僅會抑制芽體並進一步停止根的形成。



六、水黃皮組培苗之馴化

培養容器內外的生長條件差異甚大，如何使瓶苗適應此劇變，並逐漸適應自然環境（物理、化學環境）中，需藉著不同出栽條件以提高苗木存活。剛由無菌環境移出之植株，易有水分喪失的問題，且抵抗力較弱，故需給予高相對濕度及乾淨介質之培養環境。利用塑膠袋罩著育苗之容器口，使其保持較為密閉的培養環境，雖能有效提高相對濕度而達到植株馴化目的，但可能會受通風或排水不良，甚至氣溫的變化，都會造成苗木生長不良。

研究馴化6週後小苗具有85.88%之存活率，根據水黃皮組織培養的馴化條件多以維持溫度約25-30°C，並以塑膠袋蓋住以維持相對濕度，存活率皆可達70%以上 (Sujatha and Hazra, 2007；Sugla *et al.*, 2007；Shrivastava and Kant, 2010)。

七、水黃皮體胚誘導之初步探討

(一) 培植體特性

1. 帶胚乳之未成熟胚

未成熟胚因生長勢弱，在預備試驗 16 h 光照處理下，多呈現白化死亡的狀態，推測可能是胚原生長在黑暗環境下，且生理機能發育尚未成熟，於光照處理下可能造成培植體的危害，且培植體培養在黑暗或低光的環境下，亦能降低褐化現象及酚類物質產生，Pierik (1987) 指出較高的光度會增加酚類化合物之形成，不僅會降低植物生長調節劑之活性，亦造成培植體毒性，導致褐化死亡，故未成熟胚皆於黑暗環境下作誘導。

2. 無胚乳之未成熟胚

胚作為培植體，以 2,4-D 濃度 2-3 mg/L 處理下，有較高的胚發芽率，也許可供更有效率的種子苗培養途徑。由本試驗結果來看，體胚誘導結果皆不顯著，各培植體誘導結果以半成熟種子之子葉，體胚誘導率較高 (20.83%)，早期豆科木本植物使用子葉誘導體胚的報告，如樹豆 (Sreenivasu *et al.*, 1998；Mohan and Krishnamurthy, 2002；Aboshama, 2011)、廣葉黃檀 (Singh and Chand, 2003)、亞尼

安蘇木(Das *et al.*, 1995)、狹葉番瀉葉(Agrawal and Sarada, 2007)。Finer 等 (1989) 以東部白松 (*Pinus strobus*) 子葉培養出胚原性癒合組織。

(二) 各植物生長調節劑誘導

體胚誘導結果，觀察出可單獨使用細胞生長素或搭配較其低濃度的細胞分裂素，即可誘導出體胚，Zimmerman (1993) 認為細胞生長素為開啟體胚發生程序之關鍵，因為細胞生長素會促使某些基因表現並合成體胚所需之物質 (mRNAs 及蛋白質)。Aboshama (2011)指出以樹豆之子葉為培植體直接誘導體胚，植物生長調節劑需要高濃度的細胞生長素或是高 a/c 比。

TDZ 誘導體胚結果，僅有綠色的癒合組織產生，並無任何的體胚誘導，但 Aboshama (2011)提出 TDZ 因作用與細胞分裂素類似(cytokinin-like)，可促進細胞分裂與分化，並取代使用細胞生長素，為誘導體胚發生 (embryogenic competence) 之關鍵，Victor 等 (1999) 以 TDZ 誘導花生 (*Arachis hypogaea*) 體胚的試驗中，提出 TDZ 有助於細胞發育時可利用嘌呤 (purine) 的聚積。嘌呤和嘧啶 (pyrimidine) 類的含氮鹼基，在體胚發育時細胞快速分化及蛋白質合成，甚至植株的再生過程中，都扮演維持生理反應功能之角色 (Fujimura and Komamine, 1979)，或許可利用 TDZ 或誘導之癒合組織作為體胚間接誘導之材料，但是否可行性仍待進一步的研究。

關於水黃皮體胚誘導方面，本次試驗中雖誘得少量體胚，然而再現率偏低。可能因基因間的差異性，使試驗結果產生誤差。本次水黃皮之體胚誘導僅能為初步嘗試，今後有志於水黃皮之體胚誘導者，則在植物生長劑之使用、培植體種類(莖段、根部、癒合組織等)及體胚進一步轉化上，應多做嘗試，以期獲得更佳的結果。

除 TDZ 誘導之癒合組織間接誘導體胚外，結果也觀察到使用 2-4,D 與 Kn 誘導之癒合組織具有分化出不定根的現象，但亦未見體胚或不定芽發生，該如何自其癒合組織中獲得有效的分化，仍極待進一步研究。

陸、結論 (Conclusion)



水黃皮帶節莖段之表面消毒：經流水處理 2 h，後以稀釋 300 之安期消毒液震盪 30 sec，再以 70% 之酒精震盪 30 sec，並在 5% NaOCl 水溶液 (含約 0.1% (v/v) Tween 20 展著劑) 之超音波中震盪 30 min，無污染率可達 65%。

種子苗試驗：以添加 1 mg/L BA 之發芽率較高，但以添加 0.35 mg/L GA₃ 較能促進莖段伸長。在未添加植物生長調節劑之培養基中，莖部肥大，且葉片茂盛。

芽體誘導：以子葉節為較佳培植體，且經 1mg/L BA 前處理，而後於 MS 添加 2 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 的誘導芽體最佳，平均 5.42 個芽，單一培植體誘導之最高芽體數 15 個。以春季水黃皮母樹萌蘖之枝條取正要突破休眠的春芽為培植體，在 MS 添加 1 mg/L BA 及 0.1 mg/L NAA 中多芽體誘導結果最佳，平均 2.34 個芽體，誘導率 88%。

芽體伸長：以子葉節為培植體，在 MS 添加 1 mg/L GA₃ 及 0.2 mg/L BA 中，芽體伸長最佳，平均長度 1.18 cm。

發根試驗：以 1/2MS 添加 1 mg/L IBA 較適合水黃皮之發根，發根率 74.55%，平均誘導出 2.96 支根及 1.33 cm 長。

體胚誘導：以未成熟胚之子葉為培植體，在添加 3 mg/L 2,4-D 及 0.5 mg/L Kn 中，平均誘導 3 個體胚，誘導率為 20.83%。

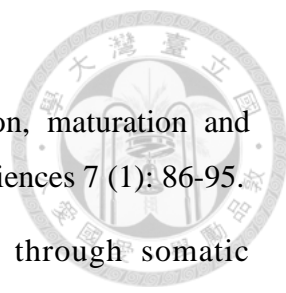
馴化：馴化 6 週後的存活率 85.88%，平均莖伸長長度約 0.78 cm，伸長長度最大可達 1.5 cm

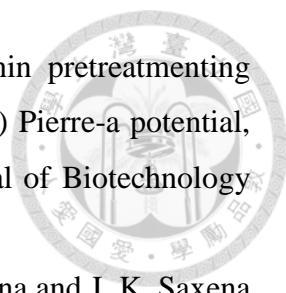
柒、參考文獻 (References)



- 王亞男 (2006) 紅檜組織培養之應用。農業生技產業季刊 5: 30-34。
- 吳淑華 (1989) 台灣杉及威氏帝杉之組織培養。台灣大學森林學研究所碩士論文 p34-61。
- 李靖、朱毅、董志、陳國彪 (2008) 水黃皮根總黃酮對乙酸誘導大鼠潰瘍性結腸炎的作用。中藥材 31(3):424-427。
- 林敏宜 (2001) 利用細胞懸浮培養進行紅檜體胚誘導及台灣扁柏人工種子研製。台灣大學森林學研究所博士論文 p14-17。
- 林梓銘 (2005) 日本女貞之微體繁殖。台灣大學森林學研究所碩士論文 p 1-35。
- 徐聖、羅漢強、王亞男、柯淳涵 (2010) 水黃皮種子油做為生質能源之潛力回顧。中華林學季刊 43(3):489-504。
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩 (2002) 牛樟之組織培養。台灣林業科學 17(4):491-501。
- 劉可雲、朱毅(2010)水黃皮根總黃酮抗大鼠幽門結紮型胃潰瘍作用。中國公共衛生。26(1):78-80。
- 劉可雲、朱毅、陳國彪、董志、趙毓梅、李備、劉春、李靖 (2007) 水黃皮根乙醇提取物的抗炎鎮痛作用及其急性毒性的實驗研究(英文)。中藥材 29 (2) 179 - 183。
- 賴鴻裕、盧至人 (2007) 植生復育重金屬污染土壤-國內研究之回顧及大豆生質能應用之探討。台灣土壤及地下水環境保護協會簡訊 22:9-19。
- 蔡淑華 (1975) 植物組織切片技術綱要。茂昌圖書，台灣， p 30-58。
- 蔡國書 (2005) 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。台灣大學森林學研究所碩士論文 p 15-24。
- 應紹舜 (2011) 生質柴油潛在樹木—水黃皮。台灣林業 37(6):101-104。
- Aasim, M., S. F. Ozcan, K. M. Khawar and S. Ozcan (2012) Comparative studies on the competence of axillary shoot regeneration on unsliced and longitudinally sliced cotyledon nodes of *Vigna unguiculata*. Turkish Journal of Botany 36:281-287.
- Abdi, G. H. and M. Hedayat (2011) Induction of Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryo and Immature Seed of Royal Poinciana (*Delonix regia*). World

Applied Sciences Journal 13 (3): 391-395


- 
- Abooshama, H. M. S. (2011) Somatic embryogenesis proliferation, maturation and germination in *Cajanus cajan* World. Journal of Agricultural Sciences 7 (1): 86-95.
- Agrawal, V. and P. R. Sardar (2007) *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. *In Vitro cellular and Developmental Biology* 43:585-592.
- Aitken-Christie, J., A. P. Singh, K. J. Horgan and T. A. Thorpe (1985) Explant development state and shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. *Bot. Gaz.* 146:196-203.
- Anis, M., A. Varshney and I. Siddique (2010) *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *Agroforestry System* 78:151-158
- Arrillaga, I., J. J. Tobolski and S. A. Merkle (1994) Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Reports* 13:171-175.
- Avenido, R. A. and K. Hattori (2000) Benzyladenine-induced adventitious shoot regeneration from hypocotyls of adzuki bean (*Vigna angularis* {Willd.} ohwi and ohashi), *Plant Growth Regulation.* 31:147-153.
- Azam, M. M., A. Waris and N. M. Nahar (2005) Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy* 29:293-302.
- Bailey, K. W. (1956) Nodal anatomy in retrospect. *J. Arnold Arbor.* 37:269-287.
- Bajpail, V. K., A. Rahman¹, S. Shukla, A. Mehta, S. Shukla, S. M. Y. Arafat, M. M. Rahman and Z. Ferdousi (2009) Antibacterial activity of leaf extracts of *Pongamia pinnata* from India. *Pharmaceutical Biology.* 47(12):1162-1167.
- Barik, D. P., S. K. Naik, A. Mudgal and P. K. Chand (2007) Rapid plant regeneration through *in vitro* axillary shoot proliferation of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) – a twining legume. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43:144-148.
- Baskin, T. I., Cork, A., Williamson, R. E. and Gorst, J.R. (1995) Stunted plant 1, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. *Plant Physiology* 107:233-243.

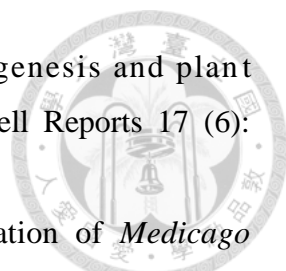
- 
- Belide, S., R. R. Sajjalaguddam and A. Paladugu (2010) Cytokinin pretreatment enhances multiple shoot regeneration in *Pongamia pinnata* (L.) Pierre—a potential, non-edible tree seed oil source for biodiesel. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(6):1-9.
- Bhatia, G., A. Puri, R. Maurya, P. P. Yadav, M. M. Khan, A. K. Khanna and J. K. Saxena (2008) Antidyslipidemic and antioxidant activities of different fractions of *Pongamia pinnata* fruits. *Medicinal Chemistry Research* 17:281-289.
- Brijesh, S., P. G. Daswani, P. Tetali, S. R. Rojatar, N. H. Antia and T. J. Birdi (2006) Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism(s) of action in infectious diarrhea. *Journal of Zhejiang University (Science) B* 7:665-674.
- Buckley, L. G. and R. N. Trigiano (1994) Changes in ovule protein profiles associated with somatic embryogenesis in *Cercis canadensis* (redbud). *Plant Cell Reports*. 14, 27 - 30.
- Buendia-Gonzalez, L., J. Orozco-Villafuerte, F. Cruz-Sosa, V. M. Chavez-Avila and E. J. Vernon-Carter (2007) Clonal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd. M.C. Johnston). I. Via cotyledonary nodes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43:260-266.
- Canhoto, J. M., S. Rama and G. S. Cruz (2006) Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42:514-519.
- Cano-Castillo, M., F. Serrano-Martínez and J. L. Casas (2009) *In vitro* Propagation of *Astragalus nitidiflorus* (Leguminosae). An Endemic and Endangered Species from South-East of Spain. *ISHS Acta Horticulturae* 812:545-550.
- Cecchini, E., L. Natali, A. Cavallini and M. Durante (1992) DNA variations in regenerated plants of pea (*Pisum sativum* L). *Theoretical and Applied Genetics* 84:874-879.
- Chand, S. and A. K. Singh (2001) Direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of a timber-yielding leguminous tree, *Hardwickia binata* Roxb. *Current Science* 80(7):882-887.
- Cleland, R., M. L. Thompson, D. L. Rayle and W. K. Purves (1968) Differences in effects of gibberellins and auxins on wall extensibility of cucumber hypocotyls.

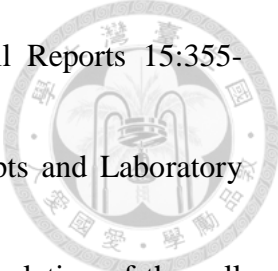
- Nature 219: 510-511.
- Cosgrove, D. J. and S. A. Sovonick-Dunford (1989) Mechanisms of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiology* 89:184-191.
- Das, P. (2011) Somatic embryogenesis in four tree legumes. *Biotechnology Research International* 1:1-8.
- Das, A. B., G. R. Rout and P. Das (1995) *In vitro* somatic embryo-genesis from callus culture of the timber yielding tree *Hardwickia binata* Roxb. *Plant Cell Reports* 15: 147 - 149.
- Debergh, P.C. and L. J. Maene (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Horticultural Science* 14: 335-345.
- Elanchezhiyan, M., M. Rajarajan, P. Rajendran, S. Subramanian and S. P. Thyagarajan, (1993) Antiviral properties of the seed extract of an Indian medicinal plant, *Pongamia pinnata* Linn., against herpes simplex viruses:*In vitro* studies on Vero cells. *Journal of Medical Microbiology*. 38:262-264.
- Essa, M. M. and P. Subramanian (2006) *Pongamia pinnata* modulates the oxidant-antioxidant imbalance in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 20:299-303.
- Essa, M. M., A. A. Ali, M. I. Waly, G. J. Guillemain and P. Subramanian (2010) Effect of leaves on serum lipids in ammonium chloride induced experimental hyperammonemic rats *Pongamia pinnata*. *International Journal of Biological and Medical Research*. 1(3):71-73.
- Faisal, M., I. Siddiqui and M. Anis (2006) An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC) using cotyledonary node explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 42:59-64.
- Finer, J. J., H. B. Kriebal and M.R. Becwar (1989). Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus*). *Plant Cell Reports* 8: 203-206.
- Fišerová H., J. Šebaňek, J. Hradilík, P. Doležel and H. Vítková (2006) Role of cytokinins in growth correlations between roots and stems in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant, Soil and Environment* 52:159-163.
- Fotopoulos, S. and T. E. Sotiropoulos. (2005) *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration

- of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research* 3 (1): 3-8.
- Fujimura, T. and A. Komamine (1979) Model of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* 99 (1): 1–8.
- Garg, L., N. N. Bhandari, V. Rani, and S. S. Bhojwani (1996) Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endo-sperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Reports*. 15:855 - 858.
- Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43:27–47.
- George, E. F. and P. D. Sherrington (1984) *Plant propagation by tissue culture :Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. p.1-64.
- Ghosh, A., S. Mandal, A. Banerji, M. Kar, K. Hazra, and J. Banerji. (2011) A novel biflavonyloxymethane from *Pongamia pinnata* and its radical quenching activity. *Natural Product Communications* 6 (5):625-626.
- Gopalakrishnan, M., B. Janarthanam, G. L. Sai, and T. Sekar, (2009) Plant regeneration from leaf explants of *Plumbago rosea* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 19(1):79-87.
- 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.
- Hasancebi, S., N. Turgut Kara, O. Cakır and S. Ari (2011). Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Turkish Journal of Botany* 35:203-210.
- Hossain, S. N., M.K Munshi, M. R. Islam, L. Hakim and M. Hossain (2003) *In vitro* Propagation of Plum (*Zyziphus jujube* Lam.) *Plant Tissue Culture* 13(1):81-84
- Karmee, S. K. and A. Chadha (2005) Preparation of biodiesel from crude oil of *Pongamia pinnata*. *Bioresource Technology* 96 (13):1425-1429.
- Kaur, K., B. Verma and U. Kant (1998) Plants obtained from the Khair tree (*Acacia catechu* Wild) using mature nodal segment. *Plant Cell Report* 17:427-429.
- Kesari, V. and L. Rangan (2010) Development of *Pongamia pinnata* as an alternative

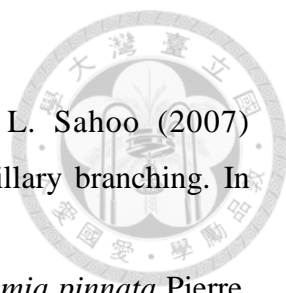
- biofuel crop - current status and scope of plantations in india. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 13 (3):127-137.
- Kesari, V., D. Archana and L. Rangan (2010) Physico-chemical characterization and antimicrobial activity from seed oil of *Pongamia pinnata*, a potential biofuel crop. *Biomass and Bioenergy* 34:108-115.
- Khalekuzzaman, M., M. F. Alam, M., Nuruzzaman, N. Begum, M.G. Ahmed, M. A. Islam, and O. I. Joarder (2003) Clonal propagation of *Averrhoa carambola* linn. through nodal culture of mature tree. *International Journal of Biological Sciences* 3:1153-1157.
- Khaled, M., A. H. Ameena, A. I. Maleki and S. Elmeer (2009). Effect of medium strength charcoal combined with IBA and NAA on root initiation of *Ficus anastasia*. *Academic Journal Plant Sciences* 2 (3): 169-172.
- Kim, M. K., H. E. Sommer, B. C. Bongarten and S. A. Merkle (1997) High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidamba styraciflua* L. by hidiazuron. *Plant Cell Report.* 16:536-540.
- Kirmizi, S. and G. Gülerüz (2006) Protein Mobilization and Proteolytic Enzyme Activities during Seed Germination of Broad Bean (*Vicia faba* L.) *Z. Naturforsch.* 61c:222-226.
- Komalavalli, N. and M. V. Rao (2000) *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* – a multipurpose medicinal plant. *Cell Tissue Organ Culture* 61:97–105.
- Kumar, S., V. Agrawal and S. C. Gupta (2002) Somatic embryogenesis in woody legume *Calliandra tweedii*. *Plant Cell, Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 71:77-80.
- Kumar, S., J. Radhamani, A. K. Singh and K. S. Varaprasad (2007) Germination and seed storage behaviour in *Pongamia pinnata* L. *Current Science* 93:910–911.
- Kumar, A. and S. Sharma (2011) Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: an indian perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 1791-1800.
- Lakshmanan, P. and A. Taji (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology* 2:136–148.
- Lloyd, G. and B. McCown (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator's Society* 30:421-427.

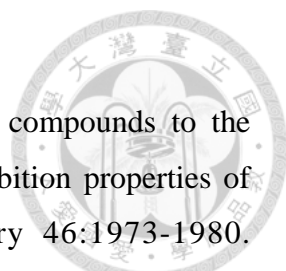
- 
- Lu, C. Y. (1993) The use of TDZ in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 29P:92-96.
- Manigauha, A. and S. Patel (2010) Anticonvulsant study of *Pongamia pinnata* Linn against pentlenetetrazole induced convulsion in rats. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences* V1(2):1-4.
- Manjare, M. R., C. J. Sonawane, N. A. Jadhav and N. T. Kunjir (2003) Proceedings of the national workshop on *Jatropha* and other perennial oilseed species. Baif Development Research Foundation p98-99.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai and T. Okamoto (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-1, 2, 3-Thidiazil-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* 21:1509-1511.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Turner and C. V. Mujer (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active henylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience* 22:1194-1196.
- Mohan, M. L. and K. V. Krishnamurthy. (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in pigeonpea. *Biology Plant* 45:19-25.
- Mohamed, S. V., J. M. Sung, T. L. Jeng, and C. S. Wang (2006) Organogenesis of *Phaseolus angularis* L: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 86:187-199.
- Mongomake, K., K. T. Hilaire, K. Daouda, Z. Michel, K. Y. Justin and S. J. Ochatt.(2009) *In vitro* plantlets regeneration in Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.)Verdc.(Fabaceae)] through direct shoot bud differentiation on hypocotyl andepicotyls cuttings. *African Journal of Biotechnology* 8(8) 1466-1473.
- Mukta, N., I. Y. L. N. Murthy and P. Sripal (2009) Variability assessment in *Pongamia pinnata* (L.) Pierre germplasm for biodiesel traits. *Industrial Crops and Products* 29:536-540.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166.
- Murashige, T and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.

- 
- Murthy, B. N. S. and P. K. Saxena (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Plant Cell Reports* 17 (6): 469-475.
- Neves, L. O., L. Tomaz and P. Fevereiro (2001) Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. *narbonensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 67:81-84.
- Ozel, C. A., K. H. Khawar, S. Mirici, O. Arslan and O. Sebahattin (2006). Induction of *ex vitro* adventitious roots on softwood cuttings of *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. et. Mey using indil-3-butyric acid and naphthalene acetic acid. *International Journal of Agriculture and Biology* 1: 66-69.
- Parveen, S., A. Shahzad and S. Saema (2010) *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance. *Agroforestry System* 80:109-116.
- Pierik, R. L. M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht p 60-66.
- Puhan, P. and S. P. Rath (2012) *In vitro* Micropropagation of *Desmodium gangeticum* (L.)DC (Fam-Fabaceae): A Medicinal Legume through Axillary Bud Multiplication *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(10):477-483.
- Punitha, R. and S. Manoharan (2006) Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of *Pongamia pinnata* (Linn.) Pierre flowers in alloxan induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol* 105:39-46.
- Purohit, S. D. and A. Singhvi (1998) Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturae* 76:219-229.
- Raemakers, C. J. J. M., E. Jacobsen and R. G. F. Visser (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93–107.
- Rameshthangam, P. and P. Ramasamy (2007) Antiviral activity of bis (2-methylheptyl) phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against white spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricius. *Virus Research* 126:38-44.
- Ramakrishna, N., Lacey J. and J. E. Smith (1991) Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *International Journal of Food Microbiology* 13:47-54.
- Rao, M. M. and G. Lakshmisita (1996) Direct somatic embryogenesis from immature

- 
- embryos of rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.) Plant Cell Reports 15:355-359.
- Robert, N. T. and J. G. Dennis (2000) Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises p79-85.
- Sauter, M and H. Kende (1992) Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368.
- Shahzad, A., M. Faisal ,M. Anis (2007) Micropropagation through excised root culture of *Clitoria ternatea* and comparison between *in vitro* regenerated plants and seedlings. *Annals of Applied Biology* 150:341-349.
- Shirbhate, N. and S. N. Malode (2012) Heavy metals phytoremediation by *Pongamia pinnata* (L.) growing in contaminated soil from municipal solid waste landfills andcompost sukali depot, Amravati (M.S.) *International Journal of Advanced Biological Research* 2(1):147-152.
- Shirwaikar, A., S. Malini and S. C. Kumari (2003) Protective effect of *Pongamia pinnata* flowers against cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal Experimental Biology* 1:58–62.
- Shrivastava, V. and T. Kant (2010) Micropropagation of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre- a Native Indian Biodiesel Tree from Cotyledonary Node. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6(4):555-560.
- Siddique, I. and M. Anis (2006) Thidiazuron induced high frequency shoot bud formation and plant regeneration from cotyledonary node explants of *Capsicum annum* L. *Indian J Biotechnol* 5:303–308.
- Singh, A. K. and S. Chand(2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of a timber-yielding leguminous tree, *Dalbergia sissoo* Roxb. *Journal of Plant Physiology* 160:415-421.
- Singh, J. and K.N. Tiwari (2010) Evaluation of cotyledonary node of *Clitoria ternatea* L.for high frequency *in vitro* axillary shoot proliferation. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 351-357.
- Sita, G L. (1979) Morphogenesis and plant regeneration form cotyledonary cultures of Eucalyptus. *Plant Science Letters* 14:63-65.
- Sreenivasu, K., S. K. Malika, P. A. Kumar and R. P. Sharma (1998) Plant regeneration via somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Plant Cell*

Reports 17, 294 – 297.

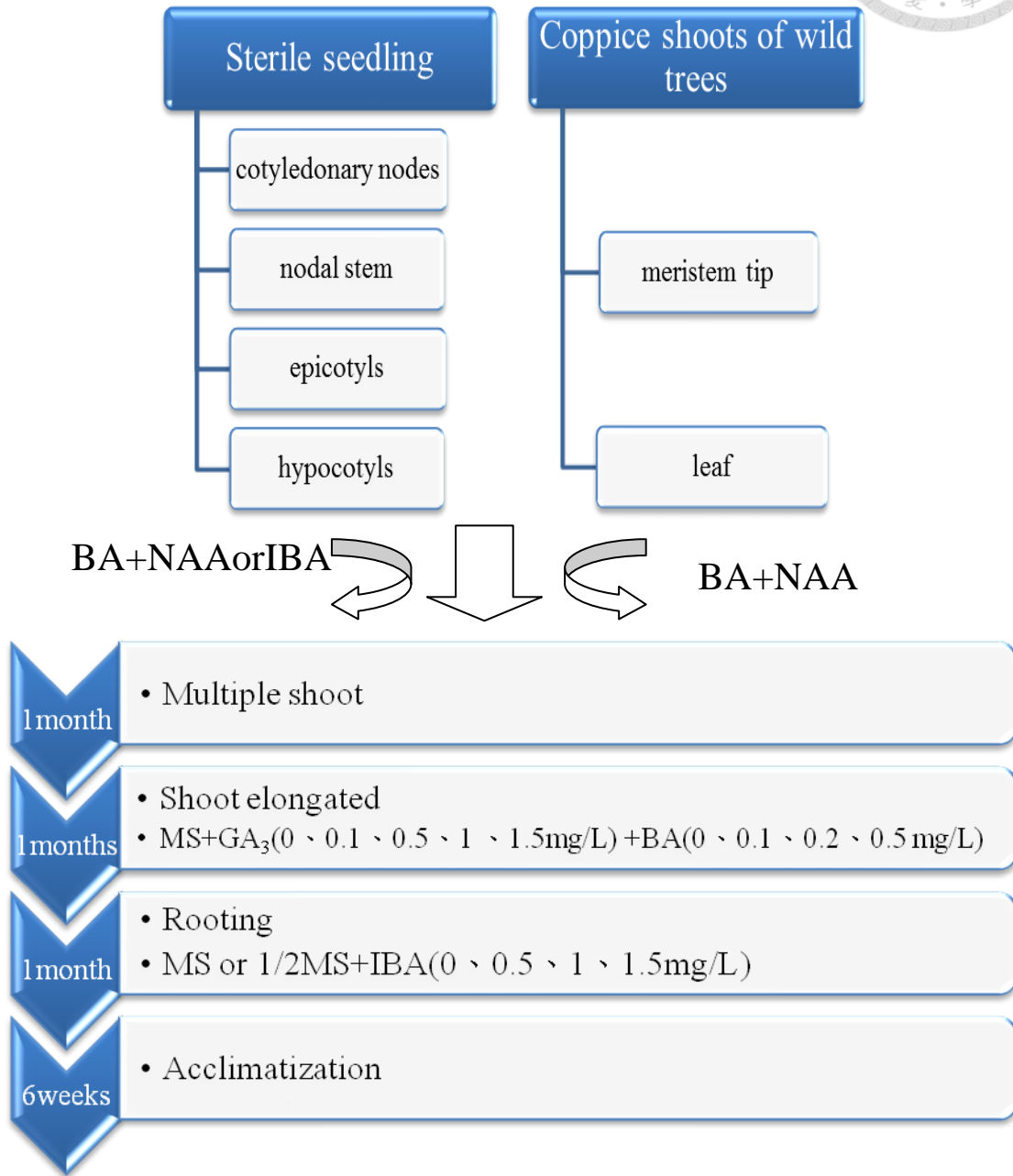
- 
- Sugla, T., J. Purukayastha, S. K. Singh, S. K. Solleti and L. Sahoo (2007) Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43:409-414.
- Sujatha, K. and S. Hazra (2007) Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43:608-613.
- Sujatha, K., B. M. Panda and S. Hazra (2008) De novo organogenesis and plant regeneration in *Pongamia pinnata*, oil producing tree legume. *Trees* 22:711-716.
- Sunilson, J. S. A. J., R. Suraj, G. Rejitha, K. Anandarajagopal, A. G. Vimala and H. A. Husain (2009) *In vitro* screening of anti-lice activity of *Pongamia pinnata* leaves. *The Korean Journal of Parasitology* 47(4):377-380.
- Sussex, I., M. Clutter and V. Walbot (1975) Benzyladenine reversal of abscisic acid inhibition of growth and RNA synthesis in germinating bean axes. *Plant Physiology* 56:575-578.
- Tamrakar, A.K., P.P. Yadav, P. Tiwari, R. Maurya and A.K. Srivastava (2008) Identification of pongamol and karanjin as lead compounds with antihyperglycemic activity from *Pongamia pinnata* fruits. *J. Ethnopharmacol* 18: 435-439.
- Tamrakar A. K., N. Jaiswal, P. P. Yadav, R. Maurya and A. K. Srivastava (2011) Pongamol from *Pongamia pinnata* stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 339:98–104.
- Tegeder, M. D. Gebhardt, O. Schieder and T. Pickardt T (1995) Thidiazuron -induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. *Plant Growth Regulation* 15:164-169.
- Tomar, O. S. and R. K. Gupta. (1985) Performance of some forest tree species in saline soils under shallow and saline water-table conditions. *Plant Soil* 87:329-335.
- Tomar, U. K. and S. C. Gupta (1988) Somatic embryogenesis and organogenesis in callus cultures of a tree legume - *Albizia richardiana* King. *Plant Cell Reports* 7:70-73.
- Tonon, G., G. Berardi, C. Rossi and U. Bagnaresi (2001) Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of *Fraxinus angustifolia*. *In Vitro*

- 
- Cellular and Developmental Biology-Plant 37:462-465.
- Vadivel, V. and H. K. Biesalski (2011) Contribution of phenolic compounds to the antioxidant potential and type II diabetes related enzyme inhibition properties of *Pongamia pinnata* L. Pierre seeds. *Process Biochemistry* 46:1973-1980.
- Victor, J. M. R., B. N. S. Murthy, S. J. Murch, S. KrishnaRaj and P. K. Saxena (1999) Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regulation* 28: 41 – 47.
- Wareing, P. F. (1969) Germination and Dormancy, in M.B. Wilkins (Ed.) *The Physiology of Plant Growth and Development*, McGraw-Hill p.605.
- Weaver, L. E. and R. N. Trigiano (1991) Regeneration of *Cladrastis lutea* (Fabaceae) via somatic embryogenesis. *Plant cell tissue and organ culture* 10:183-186
- Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5:1411-1423.

捌、附錄 (Appendix)



附錄一:水黃皮微體繁殖試驗流程



附錄二:樹種學名對照表

學名	中文名	學名	中文名
<i>Acacia Arabica</i>	金合歡	<i>Desmodium gangeticum</i>	大葉山螞蝗
<i>Acacia catechu</i>	兒茶	<i>Eucalyptus robusta</i>	大葉桉
<i>Acacia nilotica</i>	阿拉伯金合歡	<i>Ficus anastasia</i>	榕樹
<i>Albizia richardiana</i>	利巧氏合歡	<i>Gymnema sylvestre</i>	匙羹藤
<i>Arachis hypogaea</i>	花生	<i>Hardwickia binata</i>	亞尼安蘇木
<i>Astragalus chrysochlorus</i>	雙槽紫雲英	<i>Hordeum vulgare</i>	大麥
<i>Astragalus nitidiflorus</i>	黃芪	<i>Medicago truncatula</i>	蒺藜苜蓿
<i>Averrhoa bilimbi</i>	木胡瓜	<i>Mucuna pruriens</i>	黎豆
<i>Balanites aegyptiaca</i>	耶利哥香脂樹	<i>Oryza sativa</i>	水稻
<i>Calliandra tweedii</i>	艷紅合歡	<i>Phaseolus vulgaris</i>	四季豆
<i>Cassia angustifolia</i>	狹葉番瀉葉	<i>Pisum sativum</i>	荷蘭豆
<i>Cladrastis lutea</i>	黃木香槐	<i>Plumbago rosea</i>	烏面馬
<i>Cajanus cajan</i>	樹豆	<i>Prosopis laevigata</i>	牧豆樹
<i>Ceratonia siliqua</i>	角豆樹	<i>Prunus persica</i>	桃
<i>Cercis Canadensis</i>	加拿大紫荊	<i>Pseudotsuga wilsoniana</i>	威氏帝杉
<i>Cinnamomum kanehirae</i>	牛樟	<i>Robinia pseudoacacia</i>	刺槐
<i>Cassia siamea</i>	鐵刀木	<i>Vicia faba</i>	蠶豆
<i>Clitoria ternatea</i>	蝶豆	<i>Vigna angularis</i>	赤豆
<i>Dalbergia latifolia</i>	廣葉黃檀	<i>Vigna subterranea</i>	非洲土豆
<i>Dalbergia sissoo</i>	印度黃檀	<i>Vigna unguiculata</i>	豇豆
<i>Delonix regia</i>	鳳凰木	<i>Zyziphus jujuba</i>	棗

附錄三:縮寫字



AC	activated carbon
ADS	adenine sulphate
2,4-D	2, 4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	2 isopentenly-adenine
BA	N ⁶ -benzylaminopurine
FM	Fibroblast medium
GA ₃	gibberellic acid
IBA	indole-3-butyric acid
Kn	Kinetin
MS	Murashige and Skoog (1962)
1/2MS	Murashige and Skoog , Half conc.
NAA	α -naphthaleneacetic acid
PGRs	plant growth regulators
SH	Schenk and Hildebrandt medium
TDZ	thidiazuron-N-phenyl-N' -1,2,3-thiadiazol-5-ylurea
WPM	woody plant medium (Loyd and McCown , 1980)



附錄四:基礎培養基成分一覽表

component	MS(mg/L)	1/2MS(mg/L)	WPM(mg/L)
Macro elements			
KNO ₃	1,900	950	-
NH ₄ NO ₃	1,650	825	400
CaCl ₂ -2H ₂ O	440	220	96
MgSO ₄ -7H ₂ O	370	185	370
KH ₂ PO ₄	170	85	170
K ₂ SO ₄	-	-	990
Ca(NO ₃) ₂ -4H ₂ O	-	-	556
Micro elements			
CoCl ₂ -6H ₂ O	0.02	0.02	-
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.02	0.02	0.25
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ -H ₂ O	22.3	22.3	16.9
KI	0.83	0.83	-
NaMoO ₄ -2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
ZnSO ₄ -7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
Iron compounds			
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ -7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Vitamins			
Thiamin-HCL	0.1	0.1	1
Glycine	2	2	2
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine-HCL	0.5	0.5	0.5
Organic substance			
My-inositol	100	100	100
Sucrose(g/L)	30	30	20
pH	5.7	5.7	5.2
Difco Bacto-agar(g/L)	8	8	8