

## 研究報告

## 激勃素(GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸及頭孢噻肟應用於槲櫟微體繁殖芽之抽長

廖宇賡<sup>1,2)</sup> 林冠里<sup>1)</sup>

## 摘要

本研究將激勃素(gibberellic acid, GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)及頭孢噻肟(cefotaxime, CEF)應用在槲櫟(*Quercus aliena* Blume var. *aliena*)之微體繁殖，探討其促進芽體抽長之可行性。利用組織石蠟切片技術，觀察處理後產生之大芽(> 1.5 cm)中髓細胞(pith cell)長度之變化，藉以瞭解添加這三種化合物，對芽體抽長及其在細胞伸長上所形成之不同效果，並追蹤芽體在後續發根及馴化階段是否受到影響。試驗步驟(對照組)採用該樹種於前人研究中已發表的最佳培養條件，係取成熟林木主幹萌櫟(epicormic shoot)之莖節(nodal segment)為材料，待誘導其側芽形成後取為培植體，以含有6-benzylaminopurine (BAP)及17.67 μM硝酸銀之GD<sub>1</sub>培養基進行8週的增殖培養，處理組則以對照組為基礎，在8週增殖培養期間各自加入三種化合物進行測試，各以添加0.5 μM GA<sub>3</sub> (2週)、1.43 μM IAA及250 mg L<sup>-1</sup> CEF (均為8週)之結果較對照組為佳，其中以GA<sub>3</sub>處理者形成之大芽數為其對照組之4倍具有應用潛力。又經組織解剖觀察顯示芽體髓細胞在距離莖頂0.4 cm處會顯著伸長，然經GA<sub>3</sub>處理形成之大芽，髓細胞伸長在鄰近莖頂0.2 cm即可開始。芽體在誘導發根時，經三種處理所得之大芽發根率相近(63~74%)，但以CEF處理者，其後續小植株移盆馴化存活率最低(49.1%)。

關鍵詞：抗生素、保育、微體繁殖、麻櫟屬、芽體抽長。

廖宇賡、林冠里。2022。激勃素(GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸及頭孢噻肟應用於槲櫟微體繁殖芽之抽長。台灣林業科學37(1):21-39。

<sup>1)</sup>國立嘉義大學森林暨自然資源學系，600355嘉義市學府路300號 Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi Univ., 300 Xuefu Rd., Chiayi 600355, Taiwan, ROC.

<sup>2)</sup>通訊作者 Corresponding author, e-mail:yklliao@mail.ncyu.edu.tw

2021年11月送審 2022年6月通過 Received November 2021, Accepted June 2022.

Research paper

## Application of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>), Indole-3-Acetic Acid and Cefotaxime in the Micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* for Shoot Elongation

Yue-Ken Liao<sup>1,2)</sup> Kuan-Li Lin<sup>1)</sup>

[ Summary ]

Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), indole-3-acetic acid (IAA), and cefotaxime (CEF) were applied for the micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* to evaluate their potential in promoting shoot elongation. Based on a paraffin sectioning method, we observed the length of pith cells in elongated large shoots (> 1.5 cm) obtained from the micropropagation experiments. These examinations provided anatomical information to demonstrate the influence of the 3 chemicals on promoting shoot growth and to understand their impacts on pith cell elongation. *In vitro* rooting and subsequent acclimatization of the regenerated shoots were also monitored to determine if any carryover effects existed. A procedure for the additional supplementation of the test chemicals was adopted in a documented culture method (as a control in this study), which was previously determined to be an effective treatment for culturing the same species. Nodal segments collected from epicormic shoots of mature trees were used as initial explants. Axillary shoots induced from the explants were harvested as experimental materials; they were cultured for 8 wk on GD<sub>1</sub> medium containing 6-benzylaminopurine (BAP) and 17.67 μM AgNO<sub>3</sub> as the control. The incorporation of 0.5 μM GA<sub>3</sub> (for 2 wk), 1.43 μM IAA, or 250 mg L<sup>-1</sup> CEF (both for 8 wk) into the control proved beneficial for large shoot formation. Regeneration of large shoots from GA<sub>3</sub> treatment was 4-fold greater than those from the control indicating a better potential of GA<sub>3</sub> for practical application. The anatomical analysis revealed that pith cell elongation was clearly observed at a position 0.4 cm below the shoot apical meristem (SAM). However, such elongation was detected much closer to the SAM (0.2 cm) in large GA<sub>3</sub>-induced shoots. The elongated shoots obtained from all chemical treatments achieved similar rooting percentages (63~74%). Plantlets derived from CEF-treated shoots exhibited the worst survival rate (49.1%).

**Key words:** antibiotic, conservation, micropropagation, *Quercus*, shoot elongation.

**Liao YK, Lin KL. 2022.** Application of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), indole-3-acetic acid and cefotaxime in the micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* for shoot elongation. Taiwan J For Sci 37(1):21-39.

### 緒言

槲櫟(*Quercus aliena* Blume var. *aliena*)，屬殼斗科(Fagaceae)麻櫟屬(*Quercus* L.)落葉小喬木，原生於東北亞暖溫帶之落葉林(Fujiwara and

Harada 2015)。在Yang et al. (2020)發現苗栗的新族群之前，學者一直認為台灣僅在新竹縣新豐鄉的牛牯嶺有一個隔離的族群存在，分布面積在

1.5 ha以內，此生育環境屬於典型亞熱帶常綠闊葉林，有別於該種在國外常出現在高緯度(Liang et al. 2006)或高海拔(Phengkhai 2006)地區。基於過去對新竹縣這個族群的瞭解，以及苗栗族群的發現，榲欖在臺灣形成這種退縮性的殘存分布方式，是研究族群遺傳歧異度(genetic diversity)與親緣地理(phylogeography)的良好題材。惟新竹的榲欖族群因不敵周遭林木競爭及疫病侵染，導致林下小苗更新不易，目前個體數僅存不到百株，且有逐年遞減的趨勢(Chao and Liao 2018)，而苗栗的族群規模在初步調查後，亦少於百株(Yang et al. 2020)。臺灣維管束植物紅皮書將其列為國家級極危(nationally critically endangered)的保育等級(Editorial Committee of the Red List of Taiwan Plants 2017)，屬於族群小且分布狹隘的樹種，亟需透過人為方式進行復育以保存其種質資源。

國外有多種瀕危的麻櫟屬植物，已開始利用植物組織培養技術進行域外保育(*ex situ* conservation)研究，可彌補該屬植物種子為異儲型(recalcitrant)且產量有豐歉年差異的缺點(Brennan 2016)，在歉年或無足夠繁殖材料時仍能穩定維持苗木供應。早期組織培養在操作麻櫟屬植物微體繁殖時，*Q. shumardii* Buckl. 與英國櫟(*Q. robur* L.)在誘導芽體形成後，僅能獲得約20%的大芽(Bennett and Davies Jr. 1986, Volkaert 1990)，而*Q. lobata* Nee及部分麻櫟(*Q. acutissima* Carruth)的營養系也有平均芽長不及1 cm的困擾(Johnson and Walker 1990, Shoyama et al. 1992)，顯示有很高比例的芽體會喪失抽長能力，無法被有效利用，因此芽體抽長程度成為整個繁殖系統是否有效的關鍵之一。

在組織培養操作過程中，促進芽體抽長的方法多元，惟各物種相異。已知植物生長調節劑(plant growth regulators, PGRs)中的激勃素(gibberellic acids, GAs)及生長素(auxin)可促進植物細胞伸長，故有許多實際用於芽體抽長的研究報告發表(Reeves et al. 1985, Gubbuk and Pekmezci 2004, Golegaonkar and Kantharajah 2006, Kumar et al. 2010, Gonbad et al. 2014)。而在研究抗生素的領域中，學

者觀察到某些抗生素會具有與PGR相仿的功效，如氨基糖苷類(aminoglycoside)的抗生素kanamycin及streptomycin可誘導菸草(*Nicotiana tabacum* L.)葉片癒傷組織產生不定芽(Owens 1979)， $\beta$ -內醯胺類( $\beta$ -lactam)抗生素penicillin G與carbenicillin具有促進癒傷組織增生(Holford and Newbury 1992)、不定芽再生與芽體抽長的效果(Wei et al. 2003, Bosela 2009)，頭孢噻肟(cefotaxime, CEF)則可誘導體胚發生(Nakano and Mii 1993)、芽體的再生及抽長(Rao et al. 1995, Kaur et al. 2008, Bosela 2009)。雖其等作用機制仍待研究，但已知從penicillin G和carbenicillin之水解產物中可找到苯乙酸(phenylacetic acid, PAA)及苯丙二酸(phenylmalonic acid, PMA) (Holford and Newbury 1992)兩種可能影響生長的物質。PAA是一種生物活性低於吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的天然生長素，有促進芽體抽長的作用(Dhaka and Kothari 2002)，而PMA也可自發性地經由去羧基作用(decarboxylation)再產生PAA (Bosela 2009)，這些是目前可以解釋抗生素為何具有類似PGR作用的部分立論。

Liao and Chuang (2014)及Li et al. (2019)曾進行過榲欖的微體繁殖研究，前者嘗試以添加硝酸銀、活性碳及移除大芽等方式來改善芽體抽長問題，但僅限硝酸銀有促進效果，惟仍存在多達半數以上的小芽未獲改善。而後者只有紀錄芽體增殖數量，未針對芽體抽長進行探討。本研究依循Liao and Chuang (2014)所發表榲欖之培養模式，測試添加激勃素(GA<sub>3</sub>)、IAA及CEF等化合物，是否能使芽體抽長有較佳的效果，並製備組織的石蠟切片，觀察抽長芽體中其莖頂髓細胞(pith cell)伸長之變化作為輔助資訊。同時也追蹤受前述化合物處理後的芽體，其後續發根及馴化情形是否受影響，以瞭解這些處理對培養中榲欖芽體抽長的效果為何。

## 材料與方法

### 一、植物材料準備

本研究植物材料取自新竹縣牛牯嶺榲

櫟族群成熟植株因風折後殘存樹幹上之萌櫟 (epicormic shoot)，於2016年10月取長度約10~30 cm當年萌生之幼嫩枝條，去除頂芽及葉片後以Liao and Chuang (2014)報告之方法進行表面殺菌，之後截成1-3 cm長的莖節作為培植體，每培植體至少保留一個節，植入內含12.5 mL GD<sub>1</sub>培養基(Gresshoff and Doy 1972)的試管中，培養基添加3% (w/v)蔗糖、0.75% (w/v) Difco Bacto agar及2.22  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine (BAP, B-3408, Sigma, St. Louis, MO, USA)，pH定為5.6，經高溫高壓滅菌後作為新芽誘導培養基。植入後次日將培植體移動一次，移往無酚類物質(褐化現象)產生的位置繼續培養，之後每2 wk繼代一次，直至側芽產生。

## 二、微體繁殖多芽體之抽長試驗

### (一)多芽體增殖

待新誘導的側芽長度達1.5 cm時，將其從莖節培植體上切離進行多芽體增殖培養，依Liao and Chuang (2014)報告中最佳之處理方法，去除其頂芽及葉片，將莖段橫放培養於增殖培養基上，此培養基為GD<sub>1</sub>培養基添加3%蔗糖及0.75% Difco Bacto agar，pH調至5.6，並添加17.67  $\mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub>。此增殖過程又分為再誘導及抽長兩階段，主要以添加的BAP濃度不同加

以區分。於再誘導階段之培養基中添加0.88  $\mu\text{M}$ 之BAP以利芽體形成；為期2 wk，之後進入抽長階段，此時BAP濃度調降至0.44  $\mu\text{M}$ ；為期6 wk，期間每2週繼代到相同培養基一次(此流程呈現於Table 1, SI)。待完成全部兩階段8 wk之培養後將大芽切離培植體，即為芽體抽長試驗之材料，或作為再次循環培養芽體增殖的培植體。本研究即將此處理用於後續各試驗中作為對照組，將其與添加GA<sub>3</sub>、IAA及CEF等不同化合物之處理進行比較。

### (二)促進多芽體抽長試驗

芽體抽長試驗是以前一節所述多芽體增殖培養之流程為對照組，但在該流程中分別加入三種化合物進行測試。試驗一是於再誘導之後進入為期6 wk之芽體抽長階段時，於不同時段加入不同濃度GA<sub>3</sub> (G-7645, Sigma)並觀察芽體抽長效應(Table 1, SII~SV)，另外也測試於再誘導或芽體抽長階段加入0.5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>，何者是最適當之添加時機(Table 1, TI~TIII)。試驗二及三分別測試在芽體增殖培養之全程(8 wk)均加入IAA (I-2886, Sigma)或CEF (Loforan<sup>®</sup>, 政德製藥, 臺灣)，並觀察其對芽體抽長之效果。以上三種化合物及AgNO<sub>3</sub>均經孔徑0.2  $\mu\text{m}$ 無菌過濾器(Acrodisc<sup>®</sup>, Pall, Port Washington, NY, USA)過濾後加入高溫高壓滅菌過之培養基中使用。

**Table 1. Assigned gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) concentrations ( $\mu\text{M}$ ) and scheme of application for shoot elongation in micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena***

Treatment <sup>1)</sup>	Initiation <sup>2)</sup>		Elongation <sup>3)</sup>		
	2 wk	2 wk	2 wk	2 wk	2 wk
Test of concentration	SI (control)	0.0	0.0	0.0	0.0
	SII	0.0	0.5	0.0	0.0
	SIII	0.0	0.5	0.5	0.0
	SIV	0.0	10.0	0.0	0.0
	SV	0.0	10.0	10.0	0.0
Test of application stage	TI	0.0	0.5	0.0	0.0
	TII	0.5	0.0	0.0	0.0
	TIII	0.5	0.5	0.0	0.0

<sup>1)</sup> All cultures were incubated on GD<sub>1</sub> medium.

<sup>2)</sup> Initiation media were additionally supplemented with 0.88  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine (BAP).

<sup>3)</sup> BAP was reduced to 0.44  $\mu\text{M}$  throughout the elongation stages (6 wk).

在試驗一GA<sub>3</sub>濃度試驗中(Table 1)，以前人研究(Liao and Chuang 2014)之最佳處理，亦即前一節所述多芽體增殖之流程作為無添加GA<sub>3</sub>的對照組(Table 1, SI)，而其它添加GA<sub>3</sub>處理者，則於芽體抽長階段之第一次繼代(1~2 wk)及第二次繼代(3~4 wk)時，分別於培養基中加入0.5 μM (Table 1, SII與SIII)及10 μM GA<sub>3</sub> (Table 1, SIV與SV)，因此施用期有2週或4週之分，共計5種處理。GA<sub>3</sub>添加時機之試驗，則是以濃度試驗中最佳反應之處理(抽長階段第一次繼代時添加0.5 μM GA<sub>3</sub>; Table 1, SII)為對照組；在此試驗中改以TI處理稱之，測試在另外兩個不同的時間點加入GA<sub>3</sub>之效果，各為誘導階段(Table 1, TII)或兩者兼施(Table 1, TIII)。試驗二及試驗三中IAA(0.72, 1.43及2.85 μM)與CEF (250, 500及1000 mg L<sup>-1</sup>)的濃度試驗，是在8 wk循環培養的再誘導及抽長階段全程添加，並以未添加者(亦即Table 1, SI)為對照組。

以上各試驗每一處理使用10個培植體並均重複2次，並於8 wk培養結束後量測各培植體所增殖芽體中最大葉幅指標(maximum leaf index)，以游標卡尺量測各培植體最大葉片之長軸×寬軸，作為評估不同化合物影響培植體葉片生長之依據，並紀錄增殖之芽數(大芽:長度>1.5 cm; 小芽:長度介於0.1~1.5 cm)、大芽長度及其所佔百分比等以進行統計分析。另將各試驗中處理組所產生的大芽數除以該試驗對照組之大芽數求得(相對其對照組)大芽之增殖倍率(large shoot proliferation rate, LSPR)，以評估處理間之差異，此數據於對照組則為1.0。大芽百分比計算公式如下：

百分比(%) = 大芽數 / (大芽數 + 小芽數) × 100%.

### 三、製備石蠟切片

待8週芽體抽長試驗結束，將各次試驗之對照組及其最佳之處理組(GA<sub>3</sub>為Table 1, SII、IAA為1.43 μM及CEF為250 mg L<sup>-1</sup>)中所產生之大芽，各取5個最長者以游標卡尺測量其長度，求得平均大芽長，並將這些芽體依據Tsai (1975)所發表之流程，埋蠟後進

行組織切片觀察，此步驟隨試驗之重複亦進行2次。其過程係將芽體莖頂1.0 cm之區段切下，浸入50% FAA溶液(50 mL 95% ethyl alcohol: 5 mL 100% glacial acetic acid: 5 mL 40% formaldehyde: 35 mL double-distilled (dd)H<sub>2</sub>O)固定1 wk後，在真空幫浦抽氣下，以不同比例*t*-butylalcohol (TBA)-ethanol混合液進行系列濃度置換脫水，TBA濃度依序為10、20、35、55、75及100%。之後將樣本放入60~65°C之烘箱中，將固狀蠟片(cat. no. 39601006, Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA)熔融後進行滲蠟約3~5次，使組織中的TBA完全以蠟液置換。將芽體水平橫置於含純蠟液之包埋模型中，完全凝固後使用切片機縱向切下10 μm厚之蠟帶，展片後以二甲苯脫蠟，並由高濃度ethanol逐漸移至含1% safranin O與0.5% fast green溶液進行染色，再以封片膠(Entellan®, Merck, Darmstadt, Germany)完成封片。

### 四、大芽之解剖構造觀察

大芽解剖觀察係參考Sommer et al. (1999)量測組織細胞長度的方法，取芽體之石蠟切片，於目鏡具比例尺刻度之光學顯微鏡(YS100, Nikon, Tokyo, Japan)下觀察，選定距頂端生長點(shoot apical meristem, SAM) 0.2、0.3及0.4 cm三個距離處，各隨機選取3組有20個連續生長且具代表性之髓細胞(pith cell)串，量取其長度。每一大芽共收取9筆數據，其平均值除以20之後求出該芽體在觀測區域中單一髓細胞平均長度。並以處理組之數據除以對照組數據，以其商數大於或小於1來呈現芽體在處理後細胞長度是增或減。細胞長度計算方式如下：

單一髓細胞長(μm) = (0.2 + 0.3 + 0.4 cm處20個細胞總長度之平均)/20.

本研究也同時在各次試驗中較佳處理及其對照組所形成之芽體上，分析與SAM不同距離三個取樣位置點間單一髓細胞長度的差異變化，以瞭解這些鄰近SAM處髓細胞的伸長，是否受到其與SAM距離逐漸增加時而有影響。



### 五、發根試驗

誘導發根所用之芽體，長度介於1.5至2 cm，源自芽體抽長試驗中不同化合物之處理，取自GA<sub>3</sub>處理者，為芽體在抽長階段除0.44 μM BAP之外，曾給予0.5 μM GA<sub>3</sub>處理2週(Table 1, SII)，以IAA處理者為芽體培養期間全程(8週)添加1.43 μM IAA，而取自CEF處理者則是以250 mg L<sup>-1</sup> CEF全程處理8週，同時也取對照組之芽體進行比較。於8 wk培養結束時去除新增殖芽體基部之葉片，直立培養於含有1/3巨量元素之GD<sub>1</sub>培養基，並添加3% (w/v)蔗糖、0.75% (w/v) Difco Bacto agar及123.0 μM indole-3-butyric acid (IBA, I-5386, Sigma)之發根培養基中(pH 5.6) (Liao and Chuang 2014)。植入48 h後，再將培植體移至不添加任何PGR之相同培養基，於5 wk後觀察記錄芽體基部所發出之不定根，以至少出現一條且長度達0.5 cm以上者為成功發根，紀錄發根芽體所佔百分比(發根率)、根數及最長根長，以檢視在增殖階段進行促進芽體抽長的處理對後續發根及根生長是否有影響。本試驗重複2次，每次試驗不同處理及對照組之芽體均為50個，每10個培植體置入一蘭花育苗培養盒(Type CK-B, 清科企業, 臺灣)中培養。

發根率計算如下:

$$\text{發根率}(\%) = (\text{成功發根芽體數} / \text{受測芽體數}) \times 100\%。$$

### 六、植株馴化

將成功發根之芽體(小植株)以清水洗淨基部培養基殘留物，移植於泥炭土、蛭石與珍珠石等體積之混合介質，以方形塑膠網籃(長49.5×寬38.5×高12.5 cm)盛裝，並將此網籃置於無孔洞方形外籃(長60.5×寬48×高16 cm)中，外籃內並注入適量蒸餾水，網籃底部以塑膠培養皿(高2.0 cm)墊高，另在方形外籃上覆蓋透明壓克力板保持籃內相對濕度，介質定期施以蒸餾水，於培養室(23±1°C)中馴化30 d。之後移至有遮陰網之溫室中再置放30 d，並逐漸移開壓克力板減少濕度。比較化合物之處理對小植株後續馴化(存活)率有否影響。

馴化率(%)計算如下:

$$(\text{存活小植株個數} / \text{置入馴化試驗之小植株個數}) \times 100\%。$$

### 七、培養環境

本研究新芽誘導以長115×直徑22 mm玻璃試管為容器，多芽體增殖及抽長試驗皆使用厚25×直徑90 mm之無菌培養皿，芽體發根試驗係使用高104×直徑90 mm之蘭花育苗培養盒。所有的試驗環境皆設定為21±1°C，並以冷白螢光燈配合白熾燈泡提供68 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>光子通量及16/8 h光週期。惟馴化時培養室溫度提升至23±1°C，光子通量為40~50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>。

### 八、試驗設計與分析

促進多芽體抽長試驗採完全隨機設計(completely randomized design)，在記錄大、小芽體數量及葉幅後，大芽百分比數據以角度轉換(arcsine transformation)，數據以單因子變異數分析(one-way analysis of variance, ANOVA)，檢測GA<sub>3</sub>在不同濃度與不同之添加時機之間；以及施用不同濃度IAA及CEF之處理中，何者能使芽體獲致較佳的抽長效果，葉幅數據則作為影響芽體生長狀況之評估依據。篩選出各化合物處理中最佳條件者，以其產生之大芽進行組織解剖觀察以及後續發根試驗。

芽體的解剖觀察中，分別將大芽長度及髓細胞長度以獨立樣本t檢定(independent sample t-test)分析，檢測各化合物處理與對照組之間是否存在差異。其中芽體在不同位置(0.2、0.3與0.4 cm)間的細胞長度另以one-way ANOVA分析，瞭解促進抽長之化合物在芽體不同位置對細胞生長之促進作用是否一致。發根試驗中，單一芽體發根數及最長根長，以及經角度轉換的發根率與馴化存活率也以one-way ANOVA檢測處理間之差異。以上數據資料利用SPSS 12.0軟體進行分析，處理均數值之間差異達顯著水準( $p < 0.05$ )時，再以最小顯著差異測驗法(least significant difference (LSD) test)比較各處理間之效應。

## 結果

### 一、多芽體抽長試驗

#### (一) 添加GA<sub>3</sub>之效應

##### 1. 濃度試驗

在GA<sub>3</sub>濃度試驗中(Table 1, SI~SV), 所有施用GA<sub>3</sub>的處理均能促進大芽百分比增加(Table 2), 並以施用濃度為0.5 μM時(Table 2, SII及SIII)與對照組(Table 2, SI; Fig. 1A)相比達顯著差異( $p < 0.05$ ), 其中以SII處理大芽最多可增加17.9%, 且大芽增殖數目相對為對照組的4倍, 為本試驗所有處理中最高者。若將GA<sub>3</sub>濃度增加至10 μM時, 大芽百分比較0.5 μM處理者為低, 且對芽的增殖有顯著的抑制作用, 使所獲得的大芽數目相對減少(Table 2)。GA<sub>3</sub>除了有濃度效應外, 施用期之久暫亦產生影響, 於SII處理中, 添加0.5 μM GA<sub>3</sub>於培養2 wk結束時, 已觀察到有部分芽體伸長至大芽等級, 後續再移到不含GA<sub>3</sub>之培養基中, 大芽持續發生(Fig. 1B)。若處理時間延長為4 wk時(SIII 處理), 大芽的比例略為下降, 但芽體增殖情形顯著的減

少( $p < 0.05$ ), 顯示延長GA<sub>3</sub>處理時間, 並不會促進芽體增殖及其進一步之抽長。

此外, 在觀察各處理增殖芽體的生長情形時, 受GA<sub>3</sub>處理者, 葉幅普遍縮小(Table 2), 置於10 μM GA<sub>3</sub>中或培養達4 wk者, 容易發生葉片萎黃或頂芽壞疽等現象, 又以SV處理為最(數據未呈現)。故以GA<sub>3</sub>作為促進芽體抽長之處理時, 低劑量(0.5 μM)及短期間(2 wk)培養(Table 2, SII)是較有利的選擇。

##### 2. 添加時機試驗

為檢測在誘導階段即先加入0.5 μM GA<sub>3</sub>是否也能促進芽體抽長, 將GA<sub>3</sub>施用時機提前, 並以濃度試驗中的SII為對照(在本試驗中設為TI), 測試後並無促進大芽生長之效果(Table 2, TII vs. TI)。而連續施至抽長階段時, 也不能增加大芽比例(Table 2, TIII vs. TI), 並且使芽體增殖數目略減(未達顯著差異), 因此在誘導階段以GA<sub>3</sub>處理培植體無助大芽抽長, 建議在抽長階段施用就可獲得最佳效果。在此試驗中, 觀察芽體之葉幅大小, GA<sub>3</sub>若僅在誘導期施用(Table 2, TII), 葉幅尚可伸展增大, 而一旦在芽體抽長階段加入GA<sub>3</sub>時, 葉幅普遍縮減

**Table 2. Shoot production, large shoot formation (elongation), and maximum leaf index obtained from *Quercus aliena* Blume var. *aliena* explants as affected by gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) given in different combinations of concentrations and durations as shown in Table 1**

GA <sub>3</sub> treatment <sup>1)</sup>	Shoot production		Large shoot formation		Leaf index length × width <sup>2)</sup>
	No. (explant) <sup>-1 2)</sup>	No. (explant) <sup>-1 2)</sup>	Percentage (%) <sup>2,3)</sup>	LSPR <sup>4)</sup>	
SI	5.4 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>bc</sup>	6.34 ± 1.9 <sup>c</sup>	1.00	74.5 ± 9.9 <sup>a</sup>
SII	6.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	24.4 ± 5.1 <sup>a</sup>	4.00	51.5 ± 7.0 <sup>b</sup>
SIII	4.5 ± 0.5 <sup>bc</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	20.8 ± 4.9 <sup>ab</sup>	2.25	33.6 ± 5.3 <sup>c</sup>
SIV	4.3 ± 0.6 <sup>bc</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>bc</sup>	10.6 ± 3.1 <sup>bc</sup>	1.25	17.8 ± 3.7 <sup>cd</sup>
SV	3.1 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	8.50 ± 3.7 <sup>c</sup>	0.75	12.2 ± 2.1 <sup>d</sup>
TI	5.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	27.1 ± 5.6 <sup>a</sup>	1.00	29.4 ± 4.8 <sup>b</sup>
TII	5.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	16.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	0.54	54.5 ± 6.5 <sup>a</sup>
TIII	4.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	19.4 ± 5.8 <sup>a</sup>	0.54	21.6 ± 4.3 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> See Table 1 for treatment codes, GD<sub>1</sub> medium was used in all treatments.

<sup>2)</sup> Mean ± standard error ( $n = 10$ ) followed by different superscript letters significantly differ as detected by the least significant difference test at  $p < 0.05$ .

<sup>3)</sup> Percentage data of large shoot formation were subjected to arcsine transformation before analysis.

<sup>4)</sup> LSPR, large shoot proliferation rate; see text for definition.

(Table 2, TI及TIII)，應是葉片伸展發生在芽體抽長階段，此時添加GA<sub>3</sub>抑制了這個過程。

## (二) 添加IAA之效應

在測試IAA的試驗中，添加不同濃度對大芽百分比均無顯著影響，處理組僅比無添加IAA之對照組(Fig. 1C)多4~5% (Table 3)。但在比較增殖芽數時，IAA濃度高於1.43 μM時有促進芽體增殖之效果(Table 3)。在大芽比例相近的前提下，這個效果等於增加了大芽的數目，換算後每個培植體產生的大芽是對照組的2.2倍，故IAA亦有增加大芽產出之效果。而與施用GA<sub>3</sub>相似者，是在濃度增加後會使葉幅顯著縮小，尤其在IAA達2.85 μM時，葉幅之數值縮減達50%以上(Table 3)。不同的是IAA濃度增加對芽體增殖並無抑制作用，反而有促進效果，尤其在已有大芽形成的莖節處常再度增生小芽，同時IAA濃度升高的處理中不會有頂芽壞疽或葉片枯黃等反應(Fig. 1D)。

## (三) 添加CEF之效應

在添加CEF的試驗中，對照組(Fig. 1E)與高劑量(500 或1000 mg L<sup>-1</sup>)的處理，其芽體增殖與抽長情形均不及250 mg L<sup>-1</sup>的劑量，後者可獲較高之大芽百分比，且顯著高於對照組，該濃度處理後芽體增殖也明顯較對照組多( $p <$

0.05)，其形成之大芽數量是對照組的1.88倍 (Table 4)。以葉片幅度評量芽體生長情形時，CEF在高劑量時會使葉幅縮減，而250 mg L<sup>-1</sup>的處理，葉幅沒有受到影響(Table 4, Fig. 1F)，其芽體增殖情形與IAA處理者類似，在大芽節間處會再生多數小芽，但數量不及IAA處理者，惟少數葉片有玻璃質化(hyperhydricity)現象發生。

## 二、大芽之髓細胞伸長

### (一) 三種化合物處理後細胞之伸長

將GA<sub>3</sub> (SII)處理後形成之大芽與對照組(SI)中所形成者互為比較，前者在大芽的平均長度上顯著大於對照組( $t = 3.25 > \text{table value } t_{(0.05/2, 9)} = 2.26$ ) (Table 5)，且其SAM鄰近處的髓細胞長度，也顯著大於對照組(+1.13倍)，可知此試驗中髓細胞的伸長是芽體抽長之重要因素。1.43 μM IAA處理對促進芽體抽長的效果不顯著，其所形成之大芽在芽體及髓細胞的長度雖然都稍大於對照組，但皆未達顯著差異(Table 5)，促進芽體抽長效果有限。在分析250 mg L<sup>-1</sup> CEF促進芽體抽長之效果時，觀察到CEF對SAM鄰近處髓細胞的長度有明顯促進效果( $t = 7.67 > \text{table value } t_{(0.05/2, 89)} = 1.99$ ，+1.2倍)，但是比較大芽長度卻沒有差異，應該是SAM鄰近處髓細胞雖然受處理影響

**Table 3. Shoot production, large shoot formation (elongation), and maximum leaf index obtained from *Quercus aliena* Blume var. *aliena* explants (incubated on GD<sub>1</sub> medium) as affected by indole-3-acetic acid (IAA) given at both the initiation (2 wk) and elongation (6 wk) stages, 6-benzylaminopurine (BAP) (0.88 and 0.44 μM) was respectively applied in each stage as noted in Table 1**

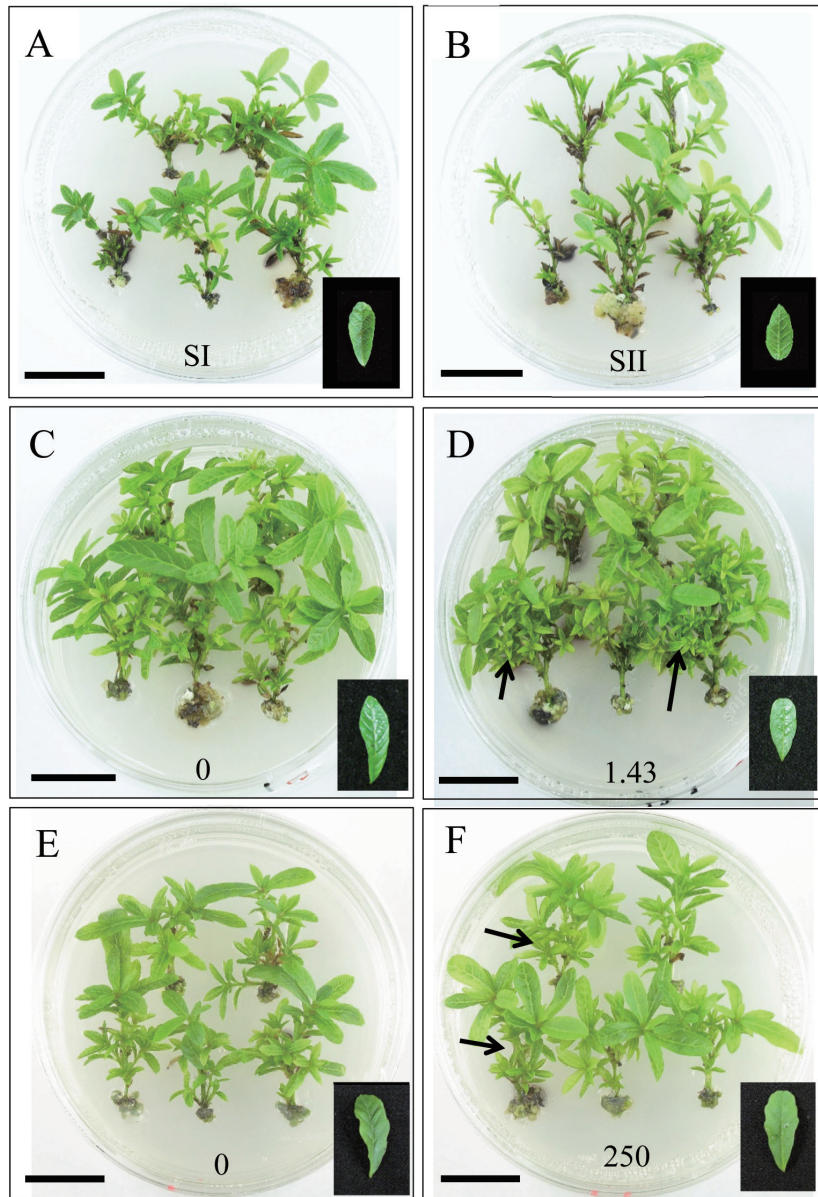
IAA (μM)	Shoot production No. (explant) <sup>-1 1)</sup>	Large shoot formation			Leaf index length × width <sup>1)</sup>
		No. (explant) <sup>-1 1)</sup>	Percentage (%) <sup>1,2)</sup>	LSPR <sup>3)</sup>	
0.00	6.50 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>bc</sup>	28.1 ± 4.1 <sup>a</sup>	1.00	104.0 ± 9.0 <sup>a</sup>
0.72	7.30 ± 1.5 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.3 <sup>b</sup>	33.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	1.39	92.7 ± 5.5 <sup>a</sup>
1.43	12.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	32.6 ± 2.9 <sup>a</sup>	2.22	73.4 ± 5.0 <sup>b</sup>
2.85	10.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.4 <sup>ab</sup>	32.0 ± 3.9 <sup>a</sup>	1.83	49.0 ± 5.7 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± standard error ( $n = 10$ ) followed by different superscript letters significantly differ as detected by the least significant difference test at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup> Percentage data of large shoot formation were subjected to arcsine transformation before analysis.

<sup>3)</sup> LSPR, large shoot proliferation rate; see text for definition.





**Fig. 1.** *In vitro* micropropagated shoots of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* obtained from shoot elongation experiments. Shoot growth on GD<sub>1</sub> medium was monitored to identify the effects of adding gibberellic acid (GA<sub>3</sub>), indole-3-acetic acid (IAA), and cefotaxime (CEF). (A) Non-treated control of the GA<sub>3</sub> experiment and (B) the best shoot elongation response to GA<sub>3</sub> application (SII treatment as described in Table 1). (C) Non-treated control of the IAA experiment and (D) the best shoot elongation response to IAA treatment (1.43 μM). (E) Non-treated control of the CEF experiment and (F) the best shoot elongation response to CEF treatment (250 mg L<sup>-1</sup>). Shown in small pictures are their maximum leaf expansion. Arrows in D and F show abundant axillary shoots secondarily regenerated from large shoots. Bars = 2.0 cm.

而伸長，但是無法持續延伸。合併以上觀察，GA<sub>3</sub>、IAA及CEF對芽體抽長的促進效果不盡相同，依本研究中所施給之濃度及不同的施用方法雖皆能使髓細胞伸長，但以GA<sub>3</sub>的處理(SII)較具

潛力，值得持續研究以求其最佳化。

## (二) 莖頂不同位置間之細胞伸長

在觀察三個試驗中的對照組時，與SAM

**Table 4. Shoot production, large shoot formation (elongation), and maximum leaf index obtained from *Quercus aliena* Blume var. *aliena* explants (incubated on GD<sub>1</sub> medium) as affected by cefotaxime (CEF) given at both the initiation (2 wk) and elongation (6 wk) stages, 6-benzylaminopurine (BAP) (0.88 and 0.44 μM) was respectively applied in each stage as noted in Table 1**

CEF (mg L <sup>-1</sup> )	Shoot production No. (explant) <sup>-1</sup> <sup>1)</sup>	Large shoot formation <sup>1,2)</sup>			Leaf index length × width <sup>1)</sup>
		No. (explant) <sup>-1</sup> <sup>1)</sup>	Percentage (%) <sup>1,2)</sup>	LSPR <sup>3)</sup>	
0	6.00 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	12.3 ± 2.3 <sup>b</sup>	1.00	93.7 ± 10 <sup>a</sup>
250	8.00 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	19.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	1.88	94.6 ± 9.6 <sup>a</sup>
500	6.90 ± 0.6 <sup>ab</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	12.6 ± 2.9 <sup>b</sup>	1.00	66.7 ± 5.8 <sup>b</sup>
1000	6.00 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	4.56 ± 1.6 <sup>c</sup>	0.38	50.3 ± 5.0 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± standard error ( $n = 10$ ) followed by different superscript letters significantly differ as detected by the least significant difference test at  $p < 0.05$ .

<sup>2)</sup> Percentage data of large shoot formation were subjected to arcsine transformation before analysis.

<sup>3)</sup> LSPR, large shoot proliferation rate; see text for definition.

**Table 5. When incubated on GD<sub>1</sub> medium, elongated large shoots of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* induced from selected treatments of Tables 2, 3, and 4 exhibiting difference in growth and length of pith cells compared to their controls (untreated explants)**

Treatment	Shoot length (mm) <sup>1)</sup> ( $n = 5$ )	Cell length (μm) <sup>2,3)</sup> ( $n = 45$ )
GA <sub>3</sub>		
SI	17.6 ± 1.6	36.5 ± 0.6
SII	24.9 ± 1.6	41.3 ± 0.9
<i>t</i> -value	3.25*	4.51* (1.13)
IAA		
0 μM	24.5 ± 0.5	40.9 ± 0.7
1.43 μM	25.2 ± 0.6	41.2 ± 0.6
<i>t</i> -value	0.91	0.35 (1.01)
CEF		
0 mg L <sup>-1</sup>	18.5 ± 0.9	35.3 ± 0.6
250 mg L <sup>-1</sup>	19.9 ± 0.4	42.5 ± 0.7
<i>t</i> -value	1.36	7.67* (1.20)

<sup>1)</sup> Shoot length (mean ± standard error (SE)) analyzed by an independent sample *t*-test showing a significant difference (\*) in gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) treatment ( $t$ -value = 3.25 > table value  $t_{(0.05/2, 9)} = 2.26$ ).

<sup>2)</sup> Cell length (mean ± SE) analyzed by an independent sample *t*-test showing a significant difference (\*) in GA<sub>3</sub> and cefotaxime (CEF) treatments ( $t$ -value = 4.51(GA<sub>3</sub>) and 7.67 (CEF) > table value  $t_{(0.05/2, 89)} = 1.99$ ).

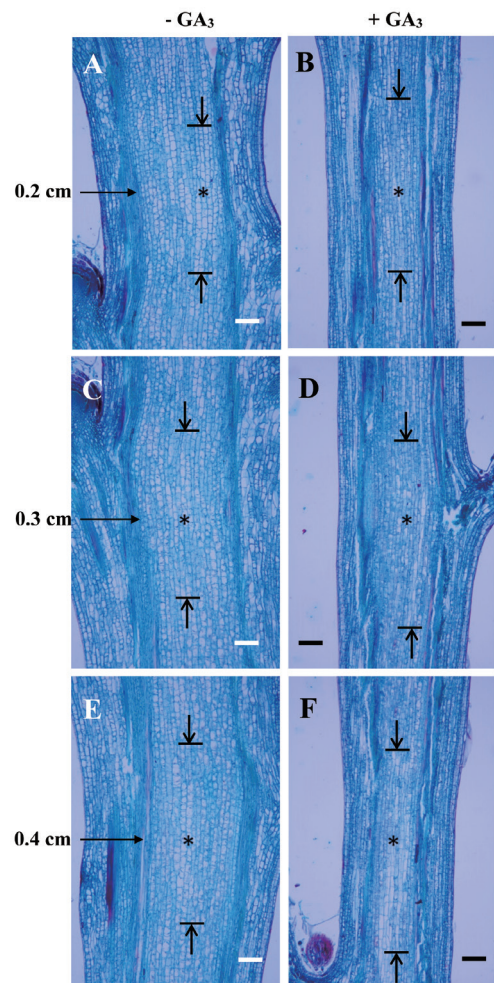
<sup>3)</sup> Numbers in the parentheses are percentage increases in the selected treatments vs. their controls.

IAA, indole-3-acetic acid.

鄰近處髓細胞的伸長有一相同趨勢，都是當細胞距離SAM越遠，其長度越長，且大致是在距離0.4 cm時出現顯著差異(Table 6)。這個趨勢在各處理組所形成之大芽上則有些微變化，經GA<sub>3</sub> (SII)處理後形成之大芽，其芽體之髓細胞長度在各取樣點皆大於對照組(Table 6)，當計數20個細胞之後，其總長度也呈現這種趨勢(Fig. 2)，顯示GA<sub>3</sub>促進細胞伸長的區域廣泛，從SAM下方0.2 cm處即可讓細胞伸長(顯著大於對照組)，並持續到0.4 cm處，在該處才與對照組細胞的長度接近(失去顯著性差異， $t = 1.79 < \text{table value } t_{(0.05/2, 29)} = 2.05$ ) (Table 6)。此外GA<sub>3</sub>促進細胞伸長的效應，更改了前述SAM鄰近處髓細胞伸長的模式，即在切片觀察區內，各取樣點之細胞伸長是一致的，長度沒有差別(Table 6)，並沒有距離SAM越遠而細胞長度會越增長的情形發生，這也說明了GA<sub>3</sub>促進髓細胞伸長的效果，在鄰近SAM處即可發生作用。

以IAA作為促進芽體抽長之處理時，其促進細胞伸長之效果不明顯，在各切片取樣點的髓細胞長度，皆與對照組相近，其t檢定的分析結果皆無顯著差異，意味在觀測範圍內(離SAM 0.2~0.4 cm處)，IAA並沒有引發明顯的細胞伸長，足以讓處理組細胞長度大於對照組，因此20個髓細胞長度，在不同量測點之間亦相近(Fig. 3)。本試驗中，髓細胞長度的解剖分析，僅有一項性狀與前述試驗中所描述者相同，就是當距離SAM越遠時，髓細胞長度會逐漸增加，使各量測點間呈現顯著差異(Table 6)。

CEF的處理僅稍微呈現出促進細胞伸長的效果，處理組(250 mg L<sup>-1</sup>)中形成之大芽在三個取樣點的細胞長度雖然都顯著大於對照組(Table 6)，也使其20個細胞的總長度呈現相同趨勢(Fig. 4)，但是與GA<sub>3</sub>處理相異之處，在於其無法有效影響SAM鄰近的細胞並促其伸長。因為在這組試驗中，CEF處理後形成之大芽，其距離SAM 0.2、0.3及0.4 cm處的髓細胞仍然是逐漸伸長的，且在統計上有顯著差異，與各試驗中對照組的細胞伸長模式相同。亦即CEF的處理並未能如同SII的處理一樣，讓SAM鄰近處



**Fig. 2.** GD<sub>1</sub> medium supplemented with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (SII treatment in Table 1) for micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* to enhance shoot elongation which influenced the length of pith cells. (A, C, E) Measurements of cell length in elongated shoots of non-treated controls at positions marked with '\*' at 0.2, 0.3, and 0.4 cm, respectively, below the shoot apical meristem. (B, D, F) The same measurements were taken in the counterparts collected from GA<sub>3</sub>-treated shoots. Opposite arrows in the pair in each figure indicate the measurement range of 20 cells. Bars = 100  $\mu$ m.

(0.2及0.3 cm處)之髓細胞也能伸長，達到與0.4 cm處之細胞等長之情形。

### 三、誘導發根與馴化

以多芽體抽長試驗中產生之大芽進行發根誘導，芽體基部會在移至PGR-free的培養基中培養2 wk時開始膨大，並伴隨不定根形成，到第5週結束時，對照組僅有43%的發根率，相較之下，IAA及CEF處理所形成之芽體發根率較高(69~74%) ( $p < 0.05$ ) (Table 7)。在計數不定根的數目時，不同處理所形成之芽體發根數目相近，只有在觀察根的長度時，GA<sub>3</sub>施於培植體所形成之芽體，其不定根的伸展受到限制( $p < 0.05$ ) (Table 7, Fig. 5)。

槲櫟的小植株在結束長達60 d的馴化培養後，將存活者從網籃移植至5吋育苗盆中，此時以IAA或GA<sub>3</sub>處理過之發根芽體與對照組相比有

相近之存活率，而受CEF處理過之發根芽體馴化失敗者最多( $p < 0.05$ ) (Table 7)。顯示在使用不同化合物處理促進芽體抽長之際，其後續對發根及馴化表現的負面影響，必須留意。

### 討論

同時使用BAP與GA<sub>3</sub>刺激芽體生長並抽長，曾在北美紅櫟(*Quercus rubra* L.)子葉節培植體進行過研究(Vengadesan and Pijut 2009)，以4.4 μM BAP搭配0.29 μM GA<sub>3</sub>培養比單獨使用BAP，產出更多達1 cm以上的芽體，但要在培養的過程中將BAP濃度降至0.44 μM才能正常抽長，而GA<sub>3</sub>濃度若增加到2.9 μM，也無進一步的促進效果，顯示高濃度BAP及GA<sub>3</sub>均不利該物種芽體抽長。在本研究中，芽體也是以0.44 μM BAP搭配0.5 μM GA<sub>3</sub>處理有較佳的抽

**Table 6. When incubated on GD<sub>1</sub> medium, elongated large shoots of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* induced from selected treatments of Tables 2, 3, and 4 exhibited differences in length of pith cells at assigned apical stem positions compared to their controls (untreated explants)**

Treatment	Cell length (μm, $n = 15$ ) at different positions (Distance below the shoot apical meristem)		
	0.2 cm <sup>1)</sup>	0.3 cm <sup>1)</sup>	0.4 cm <sup>1)</sup>
GA <sub>3</sub>			
SI <sup>2)</sup>	35.8 ± 1.0 <sup>b</sup>	35.2 ± 0.7 <sup>b</sup>	38.6 ± 1.1 <sup>a</sup>
SII <sup>2)</sup>	40.7 ± 1.7 <sup>a</sup>	41.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	42.0 ± 1.6 <sup>a</sup>
<i>t</i> -value	2.48*	3.75*	1.79
IAA			
0 μM <sup>2)</sup>	39.0 ± 1.4 <sup>b</sup>	40.8 ± 1.3 <sup>ab</sup>	42.9 ± 1.0 <sup>a</sup>
1.43 μM <sup>2)</sup>	38.2 ± 0.9 <sup>c</sup>	40.9 ± 0.9 <sup>b</sup>	44.7 ± 1.0 <sup>a</sup>
<i>t</i> -value	0.50	0.08	1.22
CEF			
0 mg L <sup>-1 2)</sup>	32.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	35.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	38.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
250 mg L <sup>-1 2)</sup>	38.0 ± 0.9 <sup>c</sup>	42.6 ± 1.2 <sup>b</sup>	47.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
<i>t</i> -value	4.12*	4.75*	5.75*

<sup>1)</sup> *t*-values greater than the table value  $t_{(0.05/2, 29)} = 2.05$  (marked with\*) represent a significant difference as detected by an independent sample *t*-test where cell length (mean ± standard error) was compared between a selected treatment vs. its control at three assigned positions below the shoot apical meristem.

<sup>2)</sup> Mean values of cell length followed by different superscript letters in the same row (among positions) significantly differ as detected by a least significant difference test at  $p < 0.05$ .

GA<sub>3</sub>, gibberellic acid; IAA, indole-3-acetic acid; CEF, cefotaxime.



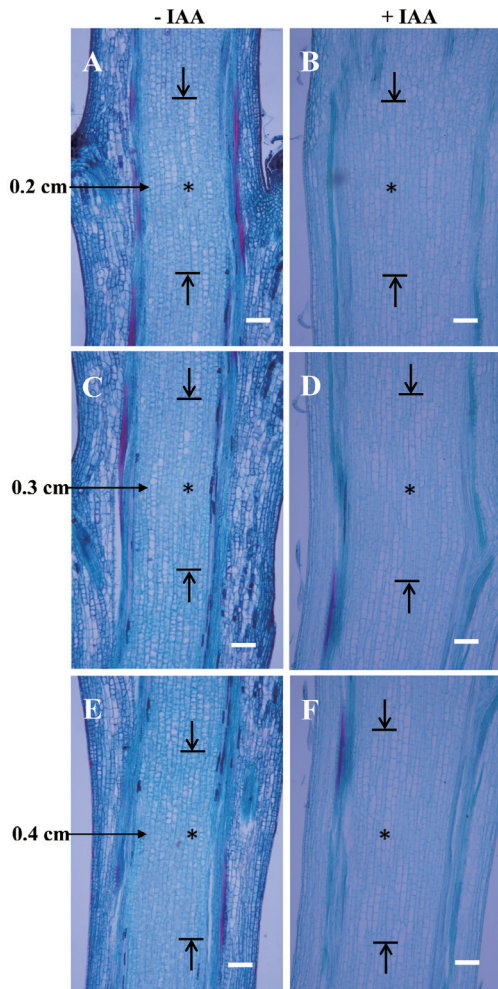


Fig. 3. GD<sub>1</sub> medium supplemented with 1.43 μM indole-3-acetic acid (IAA) for micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* to enhance shoot elongation which influenced the length of pith cells. (A, C, E) Measurements of the cell length in elongated shoots of non-treated controls at positions marked with ‘\*’ at 0.2, 0.3, and 0.4 cm, respectively, below the shoot apical meristem. (B, D, F) The same measurements were taken in the counterparts collected from IAA-treated shoots. Opposite arrows in the pair in each figure indicate the measurement range of 20 cells. Bars = 100 μm.

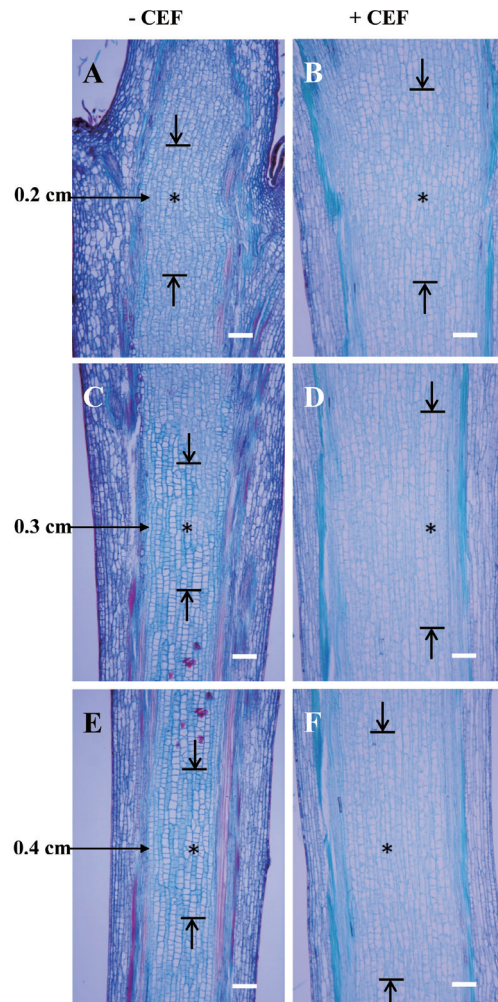


Fig. 4. GD<sub>1</sub> medium supplemented with 250 mg L<sup>-1</sup> cefotaxime for micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* to enhance shoot elongation which influenced the length of pith cells. (A, C, E) Measurements of cell length in elongated shoots of non-treated controls at positions marked with ‘\*’ at 0.2, 0.3, and 0.4 cm, respectively, below the shoot apical meristem. (B, D, F) The same measurements were taken in the counterparts collected from cefotaxime-treated shoots. Opposite arrows in the pair in each figure indicate the measurement range of 20 cells. Bars = 100 μm.

**Table 7. Rooting performance and acclimatization survival of regenerated shoots obtained from *Quercus aliena* Blume var. *aliena* explants that previously received different elongation treatments**

Elongation treatment origin	Rooting percentage (%) <sup>1,2)</sup>	Number of roots <sup>1)</sup>	Longest root (cm) <sup>1)</sup>	Acclimatization survival (%) <sup>1,2)</sup>
SI control	43.0 ± 7.3 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	85.8 ± 5.0 <sup>a</sup>
GA <sub>3</sub> (SII)	63.0 ± 5.8 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>bc</sup>	73.7 ± 7.0 <sup>a</sup>
1.43 μM IAA	69.0 ± 7.1 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>	83.1 ± 3.0 <sup>a</sup>
250 mg L <sup>-1</sup> CEF	74.0 ± 5.6 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	49.1 ± 4.8 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Data (mean ± standard error,  $n = 50$ ) followed by different superscript letters in the same column significantly differ as detected by a least significant difference test at  $p < 0.05$ .

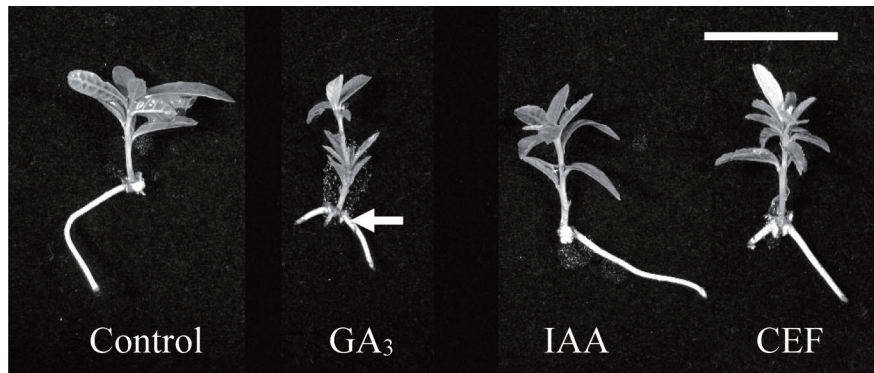
<sup>2)</sup> Percentage data of rooting and acclimatization survival were subjected to arcsine transformation before analysis. GA<sub>3</sub>, gibberellic acid; IAA, indole-3-acetic acid; CEF, cefotaxime.

長表現 (Table 2, SII)。目前在多數與麻櫟屬物種相關的研究報告中，使用GA<sub>3</sub>時多偏重於濃度上的差異比較，較少對培養時間及添加時機作探討，惟有文獻指出施用時機不當，有可能發生抑制作用。例如Jarret et al. (1981)在誘導馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.)塊莖切片產生不定芽時，在誘導前期添加0.3 μM GA<sub>3</sub>，會抑制芽體的SAM形成周邊組織區(peripheral zone)，如延至後期繼代再施用，則誘導情形較佳。本研究若將GA<sub>3</sub>的使用提前到誘導階段 (Table 2, TIII)，芽體增殖及大芽形成的比例的確受到影響，惟尚未達顯著差異。而在抽長階段連續2次繼代皆添加GA<sub>3</sub>時，也會降低芽體增殖與抽長能力 (Table 2, SIII及SV)，有可能是GA<sub>3</sub>濃度在0.5 μM以上時對槲櫟而言仍屬偏高，不適合長期施用。

微體繁殖將培植體頂芽及葉片去除後採橫放培養，可改變內源PGR和營養物質的分布及其運輸方式以提升增殖效率 (San-Jose et al. 1988, Vieitez et al. 1993)。但Kaminek et al. (1997)及Ito et al. (1999)認為，如此操作會間接減少組織中內源性IAA和GAs含量，進而影響芽體高度。IAA在植物體中進行極性運輸時，會因為運輸蛋白PIN-FORMED1 (PIN1)無法對側芽輸出IAA，導致側芽生長受阻形成頂端優勢 (Ferguson and Beveridge 2009)。施用外源IAA時則可透過韌皮部向上運移至莖頂與幼葉中，補足側芽生長所需之濃度，就不易形成

頂端優勢 (Goldsmith et al. 1974, Michniewicz et al. 2007)。本研究在橫放培養的狀態下添加IAA可能因此使頂端優勢沒有發生，反而因濃度增加而有助於多芽體在莖節處增殖 (Fig. 1D)，且能產生更多大芽。但是比較其處理效應，以1.43 μM IAA處理後大芽之LSPR值為2.22 (Table 3)，仍不及GA<sub>3</sub> (SII)處理後LSPR為4.0 (Table 2)。

抗生素如penicillin G及carbenicillin有促進芽體抽長之效，乃由於其代謝物質中存在結構類似生長素的化學物質所導致，已於本文之緒言中陳述。而CEF代謝產物中卻無類似結構物 (Holford and Newbury 1992)，同時CEF也不會使內源性細胞分裂素、生長素及GAs含量增加 (Mathias and Mukasa 1987)，因此CEF促進芽體抽長的機制尚不明確。有研究指出CEF會減少乙烯的產生改善培養環境而使芽體抽長 (Pius et al. 1993)，在其研究中曾將CEF與幾種乙烯合成抑制劑 (如NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, and O-acetyl salicylic acid)與乙烯受體抑制劑 (如AgNO<sub>3</sub>)進行比較，確實是以CEF有最佳的抑制效果。惟本研究是在既有17.67 μM AgNO<sub>3</sub>的情況下搭配CEF使用，理論上乙烯的影響應該已經受到AgNO<sub>3</sub>控制，此時出現促進芽體抽長的作用應該是CEF具有其他機制所造成，惟須待後續研究解析。在本研究中250 mg L<sup>-1</sup> CEF雖能使大芽百分比提升，但由其大芽數求算之LSPR為1.88 (Table 4)，也不及GA<sub>3</sub> (Table 2, SII)處理之結果。且在



**Fig. 5. Rooting of *in vitro* micropropagated *Quercus aliena* Blume var. *aliena* shoots on modified GD<sub>1</sub> medium that previously received shoot elongation treatments using chemicals as noted in the figure. Roots that developed from gibberellic acid (GA<sub>3</sub>)-treated shoots showed dark-brown coverage on the root surface (arrow). Bar = 2.0 cm.**

觀察其影響髓細胞伸長之試驗中，雖獲得增加伸展之結果，但未能影響芽的長度(Table 5)，又以其會減損後續馴化階段小植株之成活率(Table 7)，因此不建議使用。

植物在鄰近SAM的組織中通常細胞分裂之活性較高(Heupel and Kutschera 1996)，而距離莖頂越遠時，細胞伸長所需相關蛋白之活性才逐漸提昇，例如細胞壁鬆軟因子(wall loosening factor)-木葡聚糖內酯基轉移酶(xyloglucan endotransglycosylase)。已知GA<sub>3</sub>在誘導生長期間能有效提升該轉移酶之活性(Potter and Fry 1993, Jan et al. 2004)，因此可能是促進芽體抽長原因之一。本研究中，櫟櫟微體繁殖大芽的髓細胞明顯發生抽長的區域，在鄰近SAM 0.4 cm處開始呈現，因為幾次重複的觀測中，該處細胞與相鄰SAM較近區域的細胞相比，皆有一個長度明顯增加的轉變，而更接近SAM的髓細胞就比較短(Table 6)。但在三種化合物促進芽體抽長的試驗中，惟有GA<sub>3</sub>呈現之趨勢與此不同，因為它能使細胞在鄰近SAM 0.2 cm處就開始伸長，使得各觀測點的細胞長度沒有顯現差異。我們因此認為，雖然三種化合物都有促進芽體抽長之效應，但因為GA<sub>3</sub>有這種效果，應該是較具應用潛力，值得持續研究的對象。本研究在分析這些細胞長度的變化時，雖然在解剖觀測區中，細胞長度均有增加，惟觀察範圍

侷限在莖端0.4 cm內，該處因鄰近SAM，可能細胞伸長效應還沒有完全展現。未來若進行相似研究，可再擴大觀測芽體抽長的區間，朝細胞分裂活性較少的芽體遠端(0.4 cm以外的部分)進行分析，應能更明確的獲得細胞伸長的反應數據。

本研究以GA<sub>3</sub>、IAA及CEF處理後形成之大芽，在後續發根及馴化時表現互異，雖然這些大芽發根數量沒有差別，但是發根率均較對照組提升(Table 7)。Eshed and Riov (1996)以IBA組合GA<sub>3</sub>浸泡*Q. ithaburensis* Deche.插穗時也有促進發根的效果。Ford et al. (2002)在*Prunus avium* L.的三個栽培種之間所做的研究也顯示，事先以GA<sub>3</sub>處理過的插穗，發根率較高。惟GA<sub>3</sub>促進植物發根的情形並非絕對，不同物種形成不定根的機制，亦有受GA抑制者(Mauriat et al. 2014, Wang and Yao 2020)，因此當討論GA可作為發根促進劑時，須意識到它可能有的負面效果。除發根率之外，本研究以GA<sub>3</sub>處理而形成之芽體，在發根時根的长度會受到抑制，這與Inada and Shimmen (2000)所觀察的結果相似，該研究確認浮萍(*Lemna minor* L.)的根段也會受到GA<sub>3</sub>的抑制作用而伸展受限。Wang et al. (2015)的研究則指出，施用GA<sub>3</sub>會使胡蘿蔔(*Daucus carotka* L.)根徑生長量減少，而施以paclobutrazol減少GA<sub>3</sub>的生合成時反而



有促進生長效果，說明GA<sub>3</sub>抑制根生長的作用亦存在於胡蘿蔔。異葉假繁縷(*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax.)的不定根受外加GA<sub>3</sub>處理時，直徑生長受阻但長度增加(Zhang et al. 2021)，這些都顯示GA<sub>3</sub>的存在會對植物根系生長造成不等之抑制作用。

在探討培養早期即使用生長素的效應時，Nakhooda et al. (2011)曾經報導，玫瑰桉(*Eucalyptus grandis* Hill.)芽體在增殖階段，施用kinetin並額外添加兩種生長素(NAA及IBA)，則後續誘導發根時在沒有生長素的情形下也能使發根率達100%。但若增殖階段沒有額外添加生長素，則發根率降低(31%)。所以先期使用生長素，是有促進發根的效果，亦與本研究所得相近。

芽體在最後馴化階段，源自CEF處理者存活率最低(僅49.1%)，搜尋文獻並沒有相關的研究可以說明這種現象的成因，但因為有這種缺點，本研究認為CEF不適合作為增殖階段促進芽體抽長的添加劑。

本研究針對GA<sub>3</sub>、IAA及CEF在促進檫櫟組織培養芽體抽長的效果，進行了初步篩選，雖然使用的植物材料為同一樹種，然其基因型、樹齡及生長條件等均與前人研究(Liao and Chuang 2014)所使用者不同，已知這些個體間之差異會使其培植體對植物生長調節劑的處理形成程度不等的反應，進而使其形態發生能力出現差距(Husen and Pal 2006, Cortizo et al. 2009, Baccarin et al. 2015)，因此直接將兩研究所獲之數據進行比較並不合宜。為克服此一障礙，本研究係將Liao and Chuang (2014)所獲研究結果中最佳之處理取為本研究各項試驗之對照組，再與添加了受測化合物的處理進行對比，如此在比較試驗數據時，還可獲得相對之優劣結果。雖然三種受測之添加物，在大芽比率或LSPR之數據中，都同時或至少有其中一項獲得優於對照組之結果(Tables 2, 3, and 4)，但是配合髓細胞在SAM鄰近處之抽長反應以及後續發根馴化等多項指標，本研究之結論是以GA<sub>3</sub>之施用，具有較大應用潛力可為後續研究參考。

## 謝誌

本研究植物材料之採集，承新竹縣政府農業處、關西鎮田野工作協會及國軍裝甲兵學校多方協助，另受本系森林植群生態學研究室支援人力完成，均於此致謝。

## 引用文獻

- Baccarin FJB, Brondani GE, de Almeida LV, Vieira IG, de Oliveira LS, de Almeida M. 2015.** Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. *New For* 46:465-83.
- Bennett LK, Davies Jr. FT. 1986.** *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. *HortScience* 21(4):1045-7.
- Bosela MJ. 2009.** Effects of  $\beta$ -lactam antibiotics, auxins, and cytokinins on shoot regeneration from callus cultures of two hybrid aspens, *Populus tremuloides*  $\times$  *P. tremula* and *P. xcanescens*  $\times$  *P. gradidentata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98:249-61.
- Brennan AN. 2016.** Bud-forcing and *in vitro* culture for conservation of oak (*Quercus* L.) [Master's thesis]. Newark, DE: Univ of Delaware. 90 p.
- Chao WC, Liao YK. 2018.** The case studies in Nanjenshan and *Quercus aliena* forests. In: Chen TY, Hsieh CF, Chao WC, Hsu YF, editors. A study on the resilience of biodiversity under long-term climate change. Taipei, Taiwan: Forestry Bureau, Council of Agriculture, Executive Yuan. p 201-81.
- Cortizo M, de Diego N, Moncalean P, Ordas RJ. 2009.** Micropropagation of adult stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees* 23:835-42.
- Dhaka N, Kothari S. 2002.** Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L. *Plant Cell Rep* 21:29-34.
- Editorial Committee of the Red List of**



- Taiwan Plants. 2017.** The red list of vascular plants of Taiwan, 2017. Chichi, Nantou, Taiwan: Endemic Species Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan. 194 p. [in Chinese with English summary].
- Eshed Y, Riov J. 1996.** Rooting oak cuttings from gibberellin-treated stock plants. *Hort-Science* 31(5):872-3.
- Ferguson BJ, Beveridge CA. 2009.** Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiol* 149:1929-44.
- Ford Y-Y, Taylor JM, Blake PS, Marks TR. 2002.** Gibberellin A<sub>3</sub> stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*). *Plant Growth Regul* 37:127-33.
- Fujiwara K, Harada A. 2015.** Character of warm-temperate *Quercus* forests in Asia. In: Box EO, Fujiwara K, editors. Warm-temperate deciduous forests around the Northern Hemisphere. Berlin: Springer. p 27-80.
- Goldsmith MHM, Cataldo DA, Karn J, Brenneman T, Trip P. 1974.** The rapid non-polar transport of auxin in the phloem of intact *Coleus* plants. *Planta* 116:301-17.
- Golegaonkar PG, Kantharajah AS. 2006.** High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cell Devel Biol (Plant)* 42:341-4.
- Gonbad RA, Sinniah UR, Aziz MA, Mohamad R. 2014.** Influence of cytokinins in combination with GA<sub>3</sub> on shoot multiplication and elongation of tea clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Sci World J (Article ID 943054)*. 9 p.
- Gresshoff PM, Doy CH. 1972.** Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust J Biol Sci* 25:259-64.
- Gubbuk H, Pekmezci M. 2004.** *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). *Turk J Agric For* 28:355-61.
- Heupel T, Kutschera U. 1996.** Effect of white light on meristematic activity in developing sunflower hypocotyls. *Protoplasma* 192:123-9.
- Holford P, Newbury HJ. 1992.** The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Rep* 11:93-6.
- Husen A, Pal M. 2006.** Variation in shoot anatomy and rooting behavior of stem cutting in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New For* 31:57-73.
- Inada S, Shimmen T. 2000.** Regulation of elongation growth by gibberellin in root segments of *Lemna minor*. *Plant Cell Physiol* 41(8):932-9.
- Ito A, Yaegaki H, Hayama H, Kusaba S, Yamaguchi I, Yoshioka H. 1999.** Bending shoots stimulates flowering and influences hormone levels in lateral buds of Japanese pear. *Hort-Science* 34:1224-8.
- Jan A, Yang G, Nakamura H, Ichikawa H, Kitano H, Matsuoka M, et al. 2004.** Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. *Plant Physiol* 136:3670-81.
- Jarret RL, Hasegawa PM, Bressan RA. 1981.** Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber discs of potato. *In Vitro Cell Devel Biol (Plant)* 17:825-30.
- Johnson KR, Walker RF. 1990.** Micropropagation of valley oak shoots. *Tree Plant Notes* 41(2):27-30.
- Kaminek M, Motyka V, Vankova R. 1997.** Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol Plant* 101:689-700.
- Kaur A, Gill MS, Ruma D, Gosal SS. 2008.** Enhanced *in vitro* shoot multiplication and elongation in sugarcane using cefotaxime. *Sugar Tech* 10:60-4.
- Kumar N, Anand KGV, Reddy MP. 2010.** Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol Plant* 32:917-24.

- Li Q, Gu M, Deng M. 2019.** *In vitro* propagation of oriental white oak *Quercus aliena* Blume. *Forests* 10:463(9 p).
- Liang Y-S, Wu S-C, Tzeng C-Y, Huang S-F. 2006.** Preliminary data of permanent plot of *Quercus aliena* at Nieuukuling, Hsinchu County. *J Natl Taiwan Mus* 59(1):55-74. [in Chinese with English summary].
- Liao YK, Chuang MC. 2014.** Micropropagation of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* from explants of mature trees. *Taiwan J For Sci* 29:117-31.
- Mathias RJ, Mukasa C. 1987.** The effect of cefotaxime on the growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep* 6:454-7.
- Mauriat M, Petterle A, Bellini C, Moritz T. 2014.** Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and *Arabidopsis* by affecting auxin transport. *Plant J* 78:372-84.
- Michniewicz M, Brewer PB, Friml J. 2007.** Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *Arabidopsis Book* 5:e0108 (28 p).
- Nakano M, Mii M. 1993.** Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several *Dianthus* cultivars. *J Plant Physiol* 141(6):721-5.
- Nakhoda M, Watt MP, Mycock D. 2011.** Auxin stability and accumulation during *in vitro* shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. *Plant Growth Regul* 65:263-71.
- Owens LD. 1979.** Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissues. *Plant Sci Lett* 16:225-30.
- Phengklae C. 2006.** A synoptic account of the Fagaceae of Thailand. *Thai For Bull* 34:53-175.
- Pius J, George L, Eapen S, Rao PS. 1993.** Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 32:91-6.
- Potter I, Fry SC. 1993.** Xyloglucan endo-transglycosylase activity in pea internodes: effects of applied gibberellic acid. *Plant Physiol* 103:235-41.
- Rao AM, Sree KP, Kishor PB. 1995.** Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. *Plant Cell Rep* 15:72-5.
- Reeves DW, Couvillon GA, Horton BD. 1985.** Effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on elongation and rooting of 'St. Julien A' rootstock *in vitro*. *Sci Hortic* 26:253-9.
- San-Jose MC, Ballester A, Vieitez AM. 1988.** Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. *Tree Physiol* 4:281-90.
- Shoyama Y, Sasaki Y, Nishioka I, Suzaki T. 1992.** Clonal propagation of oak (*Quercus acutissima* Carruth). In: Bajaj YPS, editor. High-tech and micropropagation II, Biotechnology in agriculture and forestry V. 18. Berlin: Springer-Verlag. p 179-92.
- Sommer HE, Wetzstein HY, Brown CL. 1999.** Shoot growth and histological response of dwarf sweetgum to gibberellin. *J Hortic Sci Biotech* 74(5):618-21.
- Tsai SH. 1975.** The guideline to plant tissue sectioning method. Taipei, Taiwan: Maw Chang Book. 72 p. [in Chinese].
- Vengadesan G, Pijut PM. 2009.** *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In Vitro Cell Devel Biol (Plant)* 45:474-82.
- Vieitez AM, Pintos F, San-Jose MC, Ballester A. 1993.** *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiol* 12:107-17.
- Volkaert H. 1990.** Influence of explant source on *in vitro* axillary shoot formation in oak (*Quercus robur* L.) seedlings. In: Rodriguez R, Tames RS, Durzan DJ, editors. Plant aging: basic and applied approaches. New York: Plenum Press. p 357-60.
- Wang G-L, Que F, Xu Z-S, Wang F, Xiong**

**A-S. 2015.** Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. *BMC Plant Biol* 15:290 (12 p).

**Wang Y, Yao R. 2020.** Increased endogenous gibberellin level inhibits root growth of *Pinus massoniana* Lamb. plantlets during long-term subculture. *In Vitro Cell Devel Biol (Plant)* 56:470-9.

**Wei T, Harris L, Newton RJ. 2003.** Influences of antibiotics on plantlet regeneration via organogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.).

*J For Res* 14(3):185-90.

**Yang Y, Chen P-H, Wang C-C, Yang S-Z. 2020.** An amazing encounter: new record of *Quercus aliena* Blume var. *aliena* distribution in Taiwan. *Nat Conserv Q* 111:40-9. [In Chinese].

**Zhang J, Zhou T, Zhang C, Zheng W, Li J, Jiang W, et al. 2021.** Gibberellin disturbs the balance of endogenesis hormones and inhibits adventitious root development of *Pseudostellaria heterophylla* through regulating gene expression related to hormone synthesis. *Saudi J Biol Sci* 28:135-47.

