

# 臺灣原生藥用植物—高氏柴胡腋芽培養之 大量繁殖研究<sup>1</sup>

陳威臣<sup>2</sup> 葉茂生<sup>3</sup> 蔡新聲<sup>4,5</sup>

## 摘 要

陳威臣、葉茂生、蔡新聲。2004。臺灣原生藥用植物—高氏柴胡腋芽培養之大量繁殖研究。中華農業研究 53:27-38。

本研究目的在探討臺灣原生藥用植物-高氏柴胡(*Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang)經由組織培養大量繁殖種苗的可行性。試驗結果顯示,將腋芽培養於含有 1 mg/l Benzyladenine (BA)配合 0.1 mg/l  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA)之 1/2MS 基本鹽類培養基,可建立高氏柴胡之無菌培養。將此無菌苗培養於添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 基本鹽類培養基可達到大量繁殖的目的,然而部份芽體卻形成玻璃質化現象;組織培養苗培養於含有 0-0.8 mg/l kinetin 之 1/2MS 培養基則可避免玻璃質化苗產生,但繁殖倍率較 BA (0.25-2 mg/l)處理低。基本鹽類濃度以 1/2MS 培養基對於高氏柴胡芽體增值較佳;蔗糖則以 3%最適合。液態培養下正常苗繁殖率低於固態培養,且培養 6 週後產生嚴重的玻璃質化問題;以液態培養基預培養 2-14 天後再移至固態培養基,繁殖倍率仍無法高於固態培養,因此液態培養方式並不利於高氏柴胡組培苗之增殖。

**關鍵詞：**高氏柴胡、藥用植物、大量繁殖、玻璃質化。

## 前 言

柴胡(Chai-Hu)列為神農本草經、草部上品,具有去腸胃中結氣、寒熱邪氣,更有推陳致新、久服輕身、明目益精等功能,廣泛應用於中國大陸、日本、韓國及台灣等地區;中國藥典正品柴胡為繖形科(Umbelliferae)、柴胡屬(*Bupleurum* L.)植物之北柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)的乾燥根(甘 1985; Hiraoka 1989; Tang & Eisenbrand 1992)。本省特有之原生種藥用植物-高氏柴胡(*Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang)之保肝效果優於日本三島柴胡(*Bupleurum falcatum* L. var. *komarowi* Koso-Polj)及中國

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2182 號。接受日期: 92 年 12 月 9 日。
2. 本所農藝組助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。(中興大學農藝學系博士班研究生)
3. 中興大學農藝學系教授。臺灣省 臺中市。
4. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
5. 通訊作者, 電子郵件: htsay@mail.cyut.edu.tw; 傳真機: (04) 23742371。

大陸北柴胡，發展並推廣高氏柴胡有其必要性(甘 1985；林 & 顏 1999；Yen *et al.* 1991)。柴胡栽培歷史不長，屬常異交植物，並無經過長時間的人為選拔，栽培品種間遺傳變異相當大，且柴胡種子具有低溫需求性，其種子發芽率低且發芽勢不佳，造成栽培上的困擾(黃 & 郭 1995)。組織培養技術係利用植物體細胞具有分化全能性(totipotency)，在人為的環境中培養植物體之器官、組織或細胞，得到大量個體以進行栽培、育種或生理學等領域之研究(蔡 1999)；因此，利用組織培養技術生產柴胡種苗遂成為最佳的途徑。藥用植物已有不少被大量繁殖成功的例子，如：人參、川芎、半夏、白朮、附子、貝母、百合、黃耆、地黃、柴胡、紫草、大黃、山藥、毛地黃、防風、當歸、金線連等重要的藥用植物(蔡 1999；Nishioka 1988；Sagare *et al.* 2000)。台灣常用之三島柴胡可利用組織培養技術大量生產組培苗(許等 1993；Kohda *et al.* 1990)；然而台灣本土特有種高氏柴胡之大量繁殖研究則未見報導。因此利用組織培養大量繁殖技術，生產品質均一的高氏柴胡種苗，乃成為最佳的育苗與推廣之途徑。本研究嘗試建立高氏柴胡組織培養大量繁殖種苗之方法，期能提供優良種苗供農民種植，如此應有助於省產藥用保健植物之產業發展。

## 材料與方法

### 供試高氏柴胡與培植體來源

本研究材料係由農委會農業試驗所特作研究室提供之高氏柴胡(*Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang)植株，依據黃 & 郭(1995)所指之育種選拔性狀指標於田間選取優良植株。切取田間栽培之高氏柴胡基部新生分枝上(圖 1a)的腋芽作為培植體，每新生分枝取 10 個腋芽，並區分為上部位與下部位各 5 個腋芽，進行腋芽誘導生長與增殖試驗，所得無菌組培苗可作為後續大量繁殖試驗之培植體來源。

### 培養基配製、培養環境與處理方法

本研究主要以 MS (Murashige & Skoog 1962)無機鹽類及有機成分為基本配方且內含 3%蔗糖及 0.9%洋菜(Difco Bacto-agar)，並添加各類植物生長調節劑，培養基加入洋菜前先用 1N NaOH 或配合 HCl 將 pH 值調至 5.7±0.1，然後以 121°C、1.05 kg/cm<sup>2</sup> (15 lb/in<sup>2</sup>)高壓滅菌 15 分鐘後，放冷備用。液態培養基則不加洋菜，且 pH 值調至 5.2±0.1。固態培養是以試管或 125ml 三角瓶為培養容器，分別注入 10 與 25ml 培養基進行試驗，而液態培養則利用含有 10ml 液態培養基之 125ml 三角瓶進行振盪培養。培植體於接種後，置於 25±1°C 之恆溫與照光 16 小時(約 2,800 lux)條件下進行固態培養，液態培養則在相同溫度與光照條件，置於水平迴轉式振盪器以 100 rpm 速度進行振盪培養。

高氏柴胡腋芽誘導無菌培養之建立：切取田間獲選高氏柴胡植株分枝(圖 1a)，將除去葉片之不同部位的莖段以 0.5% NaOCl (每 100ml 溶液含有 2-3 滴 Tween 20)進行 15 分鐘殺菌處理，經無菌水清洗 3-4 次後，切取莖段上之腋芽培養於含有 1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 之 1/2MS 基本鹽類培養基，測試不同部位腋芽對誘導組培苗之差異。經培養 2 週後腋芽即逐漸發育形成小苗(圖 1b)，將生長達 6 週(圖 1c)之 1.5cm 無菌苗繼代培養於相同配方之新鮮培養基，可建立高氏柴胡瓶苗無菌培養(圖 1d)，待繁殖足量瓶苗後進行後續試驗。

BA 與 kinetin 對高氏柴胡組培苗增殖之影響：利用除去部分葉片且高約 1.5cm 的高氏柴胡無菌苗作為培植體，培養於添加不同濃度 BA (0.25、0.5、1.0 及 2.0 mg/l)與 kinetin (0.1、0.2、0.4 及 0.8 mg/l)之 1/2MS 基本鹽類固態培養基，經培養 6 及 8 週後，調查組培苗總數及玻璃質化苗數，探討 BA 與 kinetin 對高氏柴胡組培苗增殖之影響。

MS 鹽類濃度對高氏柴胡組培苗增殖之影響：利用除去部分葉片且高約 1.5cm 的高氏柴胡無菌苗作為培植體，培養於含有 0.25 mg/l BA 之不同 MS 基本鹽類(1/4MS、1/2MS、MS 與 2MS)固態培養基，經培養 6 週後，調查正常苗及玻璃質化苗數，探討 MS 鹽類對高氏柴胡組培苗增殖之影響。

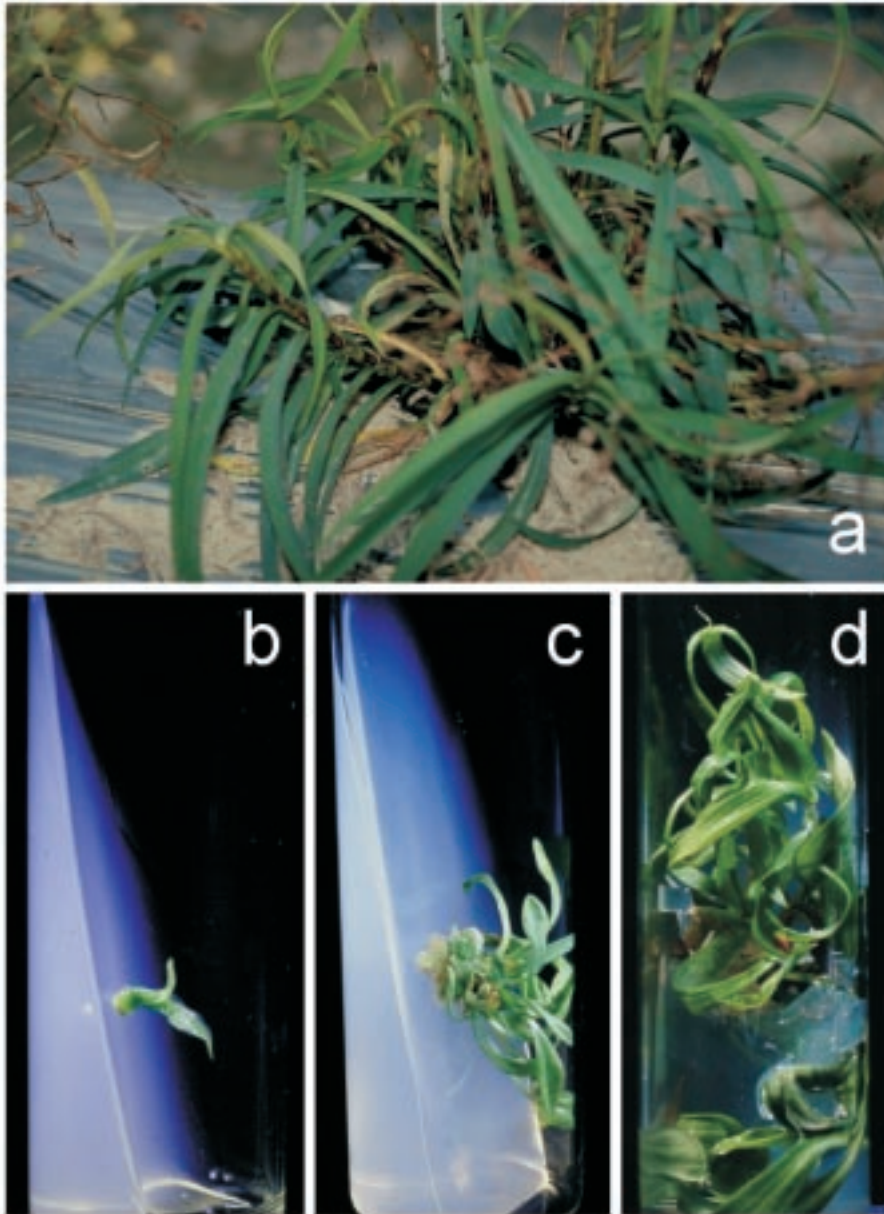


圖 1. 高氏柴胡培植體來源與無菌組培苗培養之建立

農業試驗所農場栽種達一年之高氏柴胡獲選植株基部的新生分枝(a); 腋芽培養於含有 1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 之 1/2MS 基本鹽類培養基, 經培養 2 週(b)與 6 週(c)後之組培苗生長情形; 無菌苗(1.5cm)繼代培養於相同配方之新鮮培養基達 6 週(d)之組培苗增殖情形。

Fig. 1. Plant material and establishment of shoot cultures of *Bupleurum kaoi*. Growth of new shoots in one-year-old *Bupleurum kaoi* plant maintained at Agricultural Research Institute's farm in Taichung (a); Sprouted shoot in the axillary bud after two weeks (b) and proliferated shoots after six weeks (c) of culture on half-strength MS basal medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA; Established shoot culture using axenic explant (*in vitro* grown shoot, 1.5cm in length) on the same medium after 6 weeks of culture (d).

蔗糖濃度對高氏柴胡組培苗增殖之影響：利用除去部分葉片且高約 1.5cm 的高氏柴胡無菌苗作為培植體，培養於含有 0.25 mg/l BA 與不同蔗糖濃度(1.5、3、6 與 12%)之 1/2MS 基本鹽類固態培養基，經培養 6 週後，調查正常苗及玻璃質化苗數，探討蔗糖對高氏柴胡組培苗增殖之影響。

固態與液態培養對高氏柴胡組培苗增殖之影響：利用除去部分葉片且高約 1.5cm 的高氏柴胡無菌苗作為培植體，培養於內含 25ml 固態或 10ml 液態培養基之 125ml 三角瓶，培養基配方為添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 基本鹽類培養基，經培養 2、4 與 6 週後，調查正常苗及玻璃質化苗數，探討固態與液態培養對高氏柴胡組培苗增殖之影響。

液態預處理時間對高氏柴胡組培苗增殖之影響：利用除去部分葉片且高約 1.5cm 的高氏柴胡無菌苗作為培植體，培養於內含 10ml 液態培養基之 125ml 三角瓶，培養基配方為添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 基本鹽類液態培養基，經 100 rpm 振盪速度液態預培養 2、6、10 與 14 天後，移植於內含 10ml 固態培養基之 125ml 三角瓶，培養基配方與液態培養基相同，經培養達 6 週後(包括預處理時間)，調查正常苗及玻璃質化苗數，探討液態預處理時間對高氏柴胡組培苗增殖之影響。

### 資料分析

本研究除腋芽誘導無菌培養試驗中，每處理培養 25 個培植體(每處理含 5 個重複，每重複含 5 個培植體)外，其餘試驗每處理均培養 20 個培植體(每處理含 4 個重複，每重複含 5 個培植體)；試驗所得資料經 SAS 8.02 (SAS Institute Inc. 2001)套裝統計分析軟體進行變方分析，若處理間差異顯著，則利用 Student's *t* test 或 Least significant difference test 比較各處理平均值間之差異；或以 Sigplot 8.0 軟體繪圖表現其差異。

## 結 果

### 高氏柴胡腋芽誘導無菌培養之建立

高氏柴胡上部位與下部位腋芽經培養於誘導培養基後之結果如表 1 所示，上部位與下部位之污染率分別為 64%與 56%；無菌苗形成率分別為 80%與 66.7%；上部位之每個有效培植體平均可形成 3.3 苗，而下部位平均僅 2.6 苗；然而上述試驗資料經 Student's *t* test 分析結果均顯示，上部位與下部位腋芽處理對於污染率、芽體誘導率與誘導芽體數之差異均未達顯著水準。

表 1. 腋芽位置對高氏柴胡組培苗誘導之影響

Table 1. Influence of axillary bud explant position on shoot induction of *Bupleurum koi*<sup>z</sup>

Explant position <sup>y</sup>	No. of explants cultured	Percentage of explants contaminated	Percentage of explants responded	Average no. of shoots per responding explant
Upper	25	64	80.0	3.3
Lower	25	56	66.7	2.6
<i>t</i> value		0.49	0.43	0.58
Pr >   <i>t</i>		0.64	0.68	0.59

<sup>z</sup> Explants were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 1 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, and 3% sucrose for 4 weeks. Each treatment contained 5 replications with 5 explants in each replication.

<sup>y</sup> Explants were collected from new shoots from the field grown plants. Each new shoot had approximately 10 axillary buds. The axillary bud explants were categorized as upper (near to apical meristem) and lower position.

### BA 與 kinetin 對高氏柴胡組培苗增殖之影響

試驗結果如表 2 所示，0.25 mg/l BA 處理於培養 6 與 8 週後，每個培植體分別可產生 6 及 7.3 苗，其次為 0.5 mg/l BA，分別為 5 與 6.2 苗，再其次為 1 mg/l BA，分別為 4.1 與 6 苗，而 2 mg/l BA 效

果最差，分別僅 3 與 3.9 苗。kinetin 處理對於組培苗增殖效果較低，培養 6 與 8 週後，每個培植體約形成 2.5-4.1 苗，不含生長調節劑之對照組組培苗增殖效果最低，僅 1.3 與 1.9 苗。此外，不含生長調節劑之對照組與 kinetin 處理均無玻璃質化苗產生，而 0.25 mg/l BA 處理於培養 6 與 8 週後分別形成 0.6 及 1.2 個玻璃質化苗(各約 10 與 16.4%)，0.5 與 1 mg/l BA 處理在培養 8 週後，其玻璃質化苗比率已高達 46.8%，雖然 2 mg/l BA 處理在培養 8 週後之玻璃質化苗比率較低(41%)，但每個培植體僅增殖成 3.9 苗。

表 2. BA 與 kinetin 對高氏柴胡組培苗增殖之影響

Table 2. Influence of BA and kinetin on shoots multiplication of *Bupleurum kaoi*<sup>z</sup>

Plant growth regulators		No. of shoots produced per explant <sup>y</sup>		No. of hyperhydric shoots developed per explant		Percentage of hyperhydric shoots	
Kinetin(mg/l)	BA(mg/l)	6 weeks	8 weeks	6 weeks	8 weeks	6 weeks	8 weeks
0	0	1.3 g <sup>x</sup>	1.9 e	0 c	0 c	0	0
0.1	0	2.5 f	2.6 de	0 c	0 c	0	0
0.2	0	2.6 ef	3.0 d	0 c	0 c	0	0
0.4	0	2.9 de	4.1 c	0 c	0 c	0	0
0.8	0	2.7 def	2.7 d	0 c	0 c	0	0
0	0.25	6.0 a	7.3 a	0.6 b	1.2 c	10.0	16.4
0	0.5	5.0 b	6.2 b	1.1 a	2.9 a	22.0	46.8
0	1.0	4.1 c	6.0 b	1.1 a	2.8 a	26.8	46.7
0	2.0	3.0 d	3.9 c	1.0 a	1.6 b	33.3	41.0

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with various concentration of BA and kinetin.

<sup>y</sup> Shoots smaller than 2 cm in length were not scored.

<sup>x</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 and 8 weeks of culture. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

### MS 鹽類濃度對高氏柴胡組培苗增殖之影響

試驗結果如表 3 所示，1/2MS 處理增殖效果最佳，每個培植體可產生 3.8 個正常苗，其次為 MS 處理之 3.2 個正常苗，而 1/4MS 與 2MS 處理之結果較低，每個培植體分別產生 2 與 1.3 個正常苗。同時，1/4MS 處理並無玻璃質化苗形成，其餘處理均產生玻璃質化苗，分別為 1/2MS、MS 與 2 MS 處理之 3.8、8.6 及 3.7%之玻璃質化苗，雖然 2 MS 處理之玻璃質化苗比率較低，但是每個培植體僅形成 1.3 個正常苗。

表 3. MS 鹽類濃度對高氏柴胡組培苗增殖之影響

Table 3. Influence of MS basal salts on shoots multiplication of *Bupleurum kaoi*<sup>z</sup>

Strength of MS basal medium	Avg. no. of normal shoots produced per explant <sup>y</sup>	Avg. no. of hyperhydric shoots produced per explant <sup>y</sup>	Percentage of hyperhydric shoots
1/4x	2.0 c <sup>x</sup>	0 b	0
1/2x	3.8 a	0.15 ab	3.8
1x	3.2 b	0.30 a	8.6
2x	1.3 d	0.05 b	3.7

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA and 3% sucrose.

<sup>y</sup> Shoots smaller than 2 cm in length were not scored.

<sup>x</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

### 蔗糖對高氏柴胡組培苗增殖之影響

試驗結果如表 4 顯示，3%蔗糖處理下的每個培植體可產生 3.1 個正常苗，組培苗增殖效果最佳，其次為 1.5%與 6%蔗糖處理，分別為 2.5 與 2.4 個正常苗，而 12%蔗糖處理之結果最低，每個培植體僅形成 1.8 個正常苗。此外，1.5%蔗糖處理並無玻璃質化苗形成，而其餘處理均產生玻璃質化苗，其比率在 3、6 與 12%蔗糖處理下分別為 13.9、5.9 及 2.7%。

表 4. 蔗糖對高氏柴胡組培苗增殖之影響

Table 4. Influence of sucrose on shoots multiplication of *Bupleurum kaoi*<sup>z</sup>

Sucrose conc. in the medium (%)	Avg. no. of normal shoots produced per explant <sup>y</sup>	Avg. no of hyperhydric shoots produced per explant <sup>y</sup>	Percentage of hyperhydric shoots
1.5	2.5 b <sup>x</sup>	0 b	0
3.0	3.1 a	0.50 a	13.9
6.0	2.4 b	0.15 ab	5.9
12.0	1.8 c	0.05 b	2.7

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA and various sucrose concentration for 6 weeks.

<sup>y</sup> Shoots smaller than 2cm in length were not scored.

<sup>x</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

### 固態與液態培養對高氏柴胡組培苗增殖之影響

固態與液態培養 2 週後的結果如圖 2 與圖 3 顯示，每個培植體約可產生 1.6 個正常苗，兩個處理間並無顯著差異，而後於培養 4 週時則固態顯然較液態處理佳，每個培植體分別產生 2.7 及 1.9 個正常苗，而培養達 6 週時的差異更為明顯，每個培植體分別形成 4.2 與 1.3 個正常苗。若以玻璃質化苗而言，固態培養在培養 2 週後並無玻璃質化苗產生，而後於培養 4 與 6 週時亦僅產生 0.6 與 0.9 個玻璃質化苗；反觀液態培養下，培養 2、4 與 6 週後均可發現玻璃質化苗，分別為 0.1、1.7 與 2.7 個玻璃質化苗，約各佔 6、47 及 68%。

### 液態預處理時間對高氏柴胡組培苗增殖之影響

試驗結果如表 5 所示，液態預培養 2 天處理之組培苗增殖效果最佳，每個培植體可產生 3.6 個正常苗，其次為液態預培養 6 天處理之 3.2 個正常苗，而液態預培養 10 天與 14 天處理之結果較低，每個培植體所形成之苗數均未達 3 個正常苗。若以玻璃質化苗而言，液態預培養 2 天與 6 天的處理僅產生 0.3 及 0.4 個玻璃質化苗，液態預培養 10 天處理則形成較多玻璃質化苗，比率已達 29.9%，而液態預培養 14 天處理之玻璃質化苗比率更高達 60%。

表 5. 液態培養基預處理方式對高氏柴胡組培苗增殖之影響

Table 5. Influence of liquid medium pretreatment on shoots multiplication of *Bupleurum kaoi*<sup>z</sup>

Liquid pre-treatment (days)	Avg. no. of normal shoots produced per explant <sup>y</sup>	Avg. no of hyperhydric shoots produced per explant <sup>y</sup>	Percentage of hyperhydric shoots
2	3.6 a <sup>x</sup>	0.30 c	7.7
6	3.2 b	0.40 c	11.1
10	2.7 c	1.15 b	29.9
14	1.6 d	2.40 a	60.0

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5cm in length cultured on liquid half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA for 2, 6, 10 and 14 days and then transfer to solid medium of similar composition in 125ml Erlenmeyer flask.

<sup>y</sup> Shoots smaller than 2cm in length were not scored.

<sup>x</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

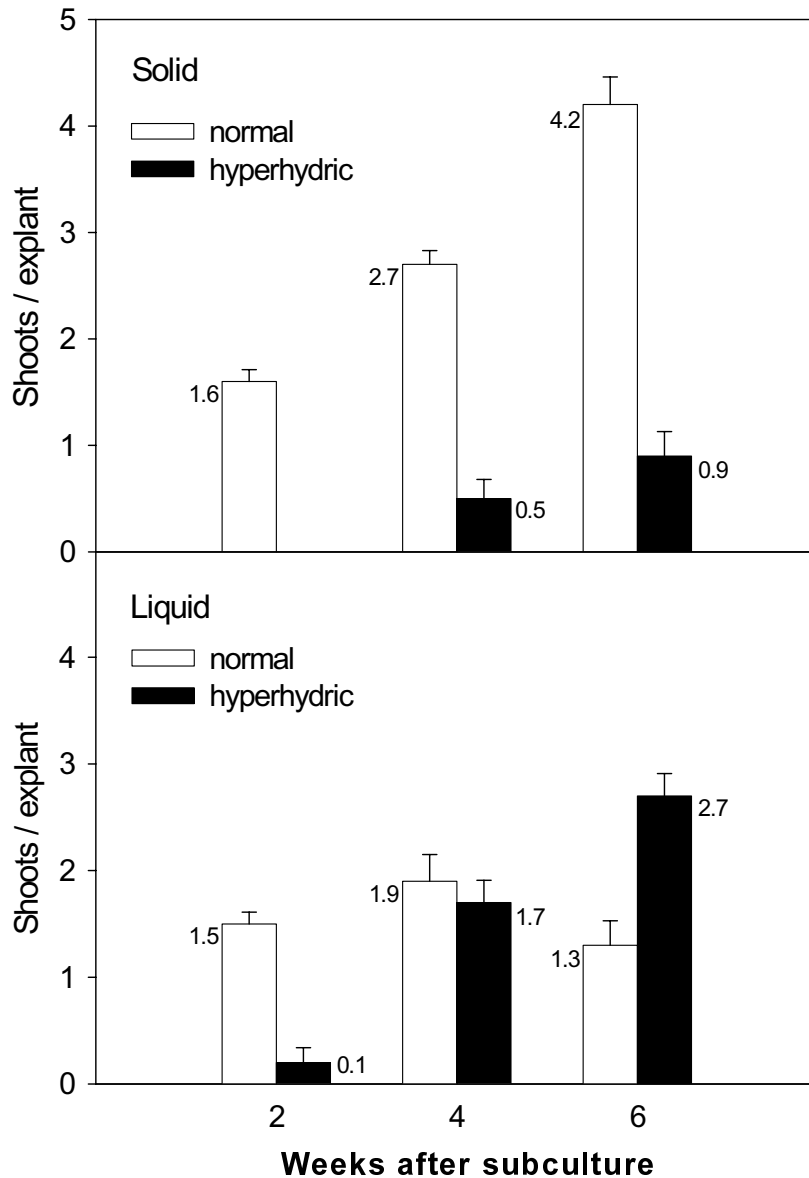


圖 2. 固態(Solid)與液態(Liquid)培養對高氏柴胡組培苗增殖之影響  
高氏柴胡組培苗培養於添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 基本鹽類固態(Solid)或液態(Liquid)培養基，經培養 2、4 與 6 週後所形成之正常苗(normal；□)與玻璃質化苗(hyperhydric；■)數。

Fig. 2. Effect of solid or liquid medium on *in vitro* shoot multiplication of *Bupleurum kaoi*. Normal (□) and hyperhydric (■) shoots of *Bupleurum kaoi* produced, when explants cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA, and with (Solid) or without (Liquid) 0.9% Difco Bacto-agar for 2, 4 and 6 weeks.

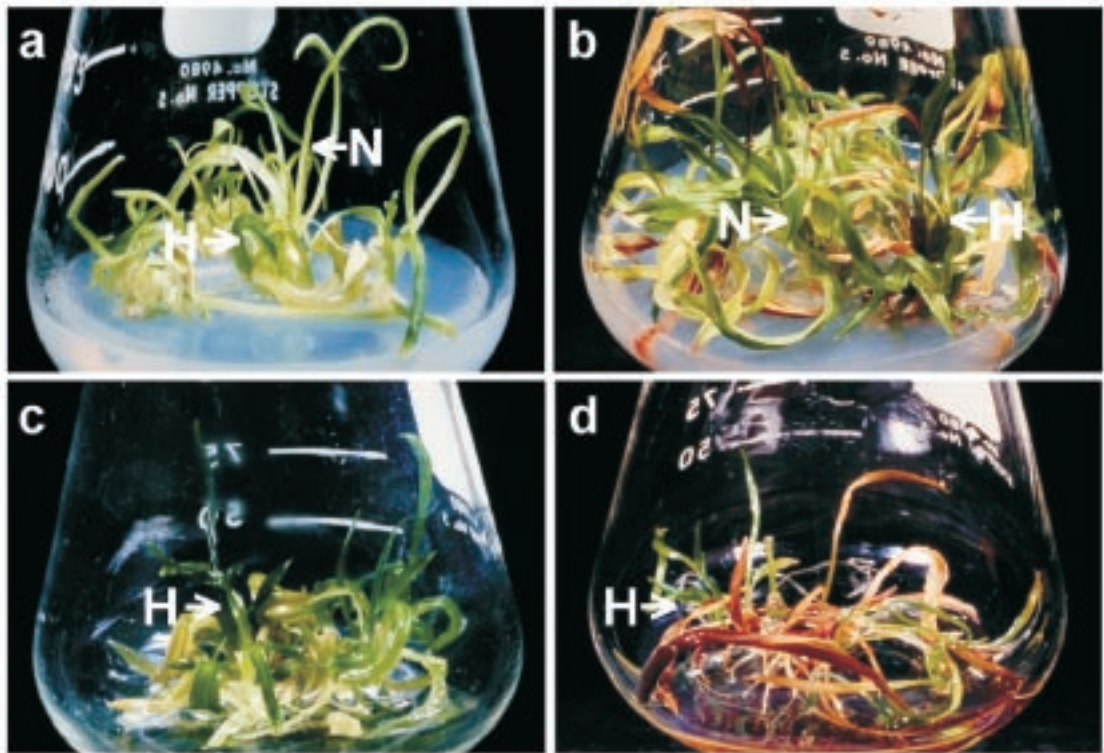


圖 3. 高氏柴胡組培苗於固態與液態培養基增殖之情形  
高氏柴胡組培苗培養於添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 基本鹽類之固態(a, b)或液態(c, d)培養基，經培養 4 週(a, c)與 6 週(b, d)後之正常苗(N)及玻璃質化苗(H)形成之情形。

Fig. 3. Effect of solid or liquid medium on *in vitro* shoot multiplication of *Bupleurum kaoi*. Normal (N) and hyperhydric (H) shoots produced on half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA and 0.9% Difco agar and cultured for 4 weeks (a) and 6 weeks (b). Hyperhydric (H) shoots produced in liquid half-strength MS basal medium supplemented with 0.25 mg/l BA and cultured for 4 weeks (c) and 6 weeks (d).

## 討 論

自 1902 年 Haberlandt 首次提出植物單細胞具有分化全能性(totipotency)理論後，組織培養技術廣泛應用於農藝、園藝及森林等領域；此外，利用組織培養技術亦可於短期內大量繁殖人參、半夏、黃耆、柴胡、紫草、山藥、毛地黃、當歸、紅豆杉、銀杏、白芷、金線連等重要的藥用植物的報告不勝枚舉(蔡 1999；Nishioka 1988；Sagare *et al.* 2000)。許多研究結果顯示，同一品種不同部位之反應不盡相同，此因不同部位培植體具有不同之分化能力所致，故選擇適當培植體乃組織培養成功之重要關鍵(Chueh *et al.* 2000；Huang *et al.* 2000；Kohda *et al.* 1990；Komalavalli & Rao 2000；Miller *et al.* 1991；Shoyama *et al.* 1986, 1987；Tang & Eisenbrand 1992)。Hiraoka (1989)於三島柴胡(*B. falcatum*)大量繁殖研究指出，利用近頂芽之嫩葉作為培植體，較近主軸莖部葉片之效果為佳。Alen & Jain (1997)則認為側芽為長春花(*Catharanthus roseus*)組織培養大量繁殖之最佳培植體。由臺灣龍膽(*Gentiana davidii* var. *formosana*)微體大量繁殖的研究顯示，以葉片、莖段、莖節與根部作為培植體，其中以莖節之芽體誘導能力最強，全部培植體均可形成芽體，且平均每個培植體可產生 6.3 個組培苗，反觀其他培植體，在相同培養條件下則完全無法誘導芽體形成(Chueh *et al.* 2000)。本研究利用臺灣特有之高

氏柴胡腋芽作為培植體，培養於添加 1 mg/l BA 配合 0.1 mg/l NAA 之 1/2MS 基本培養基，可誘導腋芽生長而建立無菌苗培養方式，而後利用含有 0.25mg/l BA 之 1/2MS 培養基可進行組培苗大量增殖(圖 1)；此外，表 1 之結果則顯示，上半部與下半部腋芽之組培苗誘導率並無顯著差異。

Cytokinin 類植物生長調節劑具有促進細胞分裂、分化與生長之生理作用，亦有促進癒合組織生長及幼芽誘導與生長之功效，對於打破頂芽優勢而促進側芽生長則具有絕佳的效果，但過量會抑制側根與不定根之形成；常用之 cytokinins 有 BA、kinetin、zeatin 和 2ip 等四種，其中以 BA 的生理作用較強(Gaspar *et al.* 1996)。Cytokinins 濃度愈高則株高愈矮，且不定芽的誘導能力愈強，但其玻璃質苗比率亦較高，常常造成組培苗的大量損失(Paques 1991)。Tsay (1998)於康乃馨(*D. caryophyllus*)莖頂培養時，發現 BA 易使芽體產生玻璃質化，且濃度愈高情形愈嚴重。三島柴胡(*B. falcatum*)頂芽培養於含有 1~2 mg/l BA 與 0.1 mg/l NAA 之 1/4MS 基本鹽類培養基，可建立三導柴胡臺農 1 號之無菌培養(許等 1993)。本研究結果則顯示，利用含有 1 mg/l BA 與 0.1 mg/l NAA 之 1/2MS 基本鹽類培養基，可誘導腋芽生長而建立高氏柴胡無菌培養，添加 0.25 mg/l BA 之 1/2MS 培養基雖可大量繁殖高氏柴胡組培苗，然部份組培苗卻形成玻璃質化現象；組織培養苗培養於含有 0-0.8 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本鹽類培養基雖完全無玻璃質化苗形成，但其繁殖倍率則較 BA (0.25-2 mg/l)處理低(表 2)。因此，如何控制玻璃質化現象且又不影響增殖效率，則是另一個值得研究的重點；此外，有關高氏柴胡組培苗玻璃質化現象的檢討，將於後續報導中進行討論。

海芙蓉(*Limonium wrightii*)芽體大量繁殖結果顯示，其芽體較適宜培養於 MS 或 2MS 之高鹽類濃度培養基，約 80 與 87.5%培植體均可形成芽體，且平均每個培植體可產生 7.4 及 8.2 個組培苗(Huang *et al.* 2000)。此外，適合於金線連(*Anoectochilus formosanus*)芽體增殖的是 1/4MS (何等 1987)、當歸(*Angelica sinensis*)體胚增殖適用 MS 與 1/2MS (陳等 1998)，三島柴胡芽體增殖適用 1/4MS (許等 1993)，這些研究顯示因作物或培養目的之不同，而有其適當的基本鹽類濃度。醣類是組織培養上另一個重要的因子，是為培養基中含量最多之有機物質，主要功能為提供植物生長所需碳源、供給能量及調節滲透壓，依其培養目的差異而分別扮演不同的角色。張等(2000)研究結果顯示，0-5%的蔗糖濃度均可誘導甘薯(sweet potato)組培苗的形成，但以 2-3%蔗糖濃度具有最佳的效果，而且在參試的四個品種間的誘導效率並不相同。本試驗結果則顯示，以 1/2MS 鹽類濃度與 3%蔗糖處理較有利於高氏柴胡組培苗之增殖(表 3、表 4)。

許多研究結果顯示，液態培養對於組培苗增殖是一個相當有效率的培養方式。Shoyama *et al.* (1986)利用浙貝母(*Fritillaria verticillata*)鱗莖培養於 1 mg/l BA 與 0.5 mg/l NAA 之 MS 液體培養基，9 週後可得到 26 個小鱗莖，而固態培養 13 週只獲得 8.2 個鱗莖。三島柴胡頂芽培養研究結果顯示，液態培養之組培苗繁殖率高於固態培養，添加 1 mg/l BA 之液態培養基在震盪條件下培養頂芽一個月，可有 13 倍的繁殖效果(許等 1993)。此外，利用液態培養方式進行金線連芽體或莖段培養，不但可縮短芽體成苗之時間，且老化之培植體於液態震盪培養下有逐漸恢復生機之趨勢，其誘導側芽生長的效果最佳(何等 1987)。湖北貝母(*Fritillaria hupehensis*)研究結果亦指出，液態培養效果優於固態培養，芽球相似體與小鱗片經 30 天培養後，分別增重可達 19.6 及 23.7 倍(楊等 2001)。Shoyama *et al.* (1983)於半夏(*Pinellia ternata*)液體培養研究結果則顯示，培養一個珠芽之組織團塊，理論上一年後可繁殖出  $4 \times 10^{23}$  以上之植株，但此液體培養方式的強盛繁殖力往往僅能維持數代。Chen *et al.* (2001)於輪葉沙參(*Adenophora triphylla*)研究亦顯示，液態培養對於芽體增殖的效率遠高於固態培養，但卻發現許多玻璃質化苗形成。因此，液態培養增殖效率的確較固態培養高，然而卻使得玻璃質化苗比率也相對提高，此結果對於組培苗大量繁殖造成相當大的困擾(Paques 1991)。本研究結果則顯示，固態培養達 4 與 6 週時僅產生少數玻璃質化苗，分別約為 18.5%與 21.4%；反觀液態培養達 2、4 與 6 週時均可發現玻璃質化苗，甚至於培養達 6 週時形成高達 2.7 個玻璃質化芽體，約佔組培苗總數的 67.5% (圖 2、圖 3)。

由上述結果得知，液態培養方式非但無法增進高氏柴胡組培苗增殖效率，而且造成相當嚴重的玻璃質化問題，顯然液態培養方式並不適合於高氏柴胡組培苗之增殖。

Tsay *et al.* (1989)與 Nishioka (1988)有效利用固態與液態交替培養的方式，使得半夏(*P. ternata*)培植體維持旺盛的繁殖力，獲得不錯的微體大量繁殖效果，一個珠芽經一年之培養繁殖，估計可獲得  $2 \times 10^{27}$  株幼苗。若將百合屬植物 *Lilium japonicum* 先於固體培養基誘導鱗片形成，再移至液體培養基中，亦可得到令人驚訝的生長速率(Shoyama *et al.* 1987)。因此，利用固態與液態交互培養是否有利於高氏柴胡組培苗的大量繁殖，同時也可減輕玻璃質化苗的問題呢？然而本試驗結果卻顯示，即使利用液態預培養方式，對於高氏柴胡組培苗增殖或玻璃質化的控制仍無法獲得令人滿意的結果(表 5)，顯然液態培養基預培養方式也不適合於高氏柴胡組培苗之增殖。由上述高氏柴胡組培苗增殖試驗結果發現，其正常苗繁殖倍率似乎隨著繼代培養的次數而有下降的趨勢(資料未列)。康乃馨微體繁殖研究指出，繼代培養次數過多造成玻璃質化苗的原因之一(Tsay 1998)。因此，高氏柴胡正常苗繁殖倍率的逐漸下降，是受到玻璃質化現象日趨嚴重的影響，抑或是因繼代培養次數過多而造成組培苗生長弱勢所導致，值得進一步深入探討。

## 誌 謝

本研究承國科會經費補助(計畫編號：NSC 90-2317-B055-011 及 NSC 91-2317-B055-008)，試驗材料承農業試驗所農藝組特作研究室劉新裕博士提供，特此申謝。

## 引用文獻

- 甘偉松。1985。柴胡、高氏柴胡(擬)。p.650-651。臺灣藥用植物誌，卷上。國立中國醫藥研究所出版。臺北。
- 何政坤、張淑華、陳振榮。1987。金線連之組織培養與馴化栽植。林業試驗所研究報告季刊 2:83-105。
- 林俊清、顏銘宏。1999。高氏柴胡的資源開發與藥效評估。p.51-55。1999 藥用植物資源之開發與利用學術研討會論文集。林俊義、盧煌勝、劉新裕、陳忠川、張成國 編。臺灣省農業試驗所。臺中。
- 張華、郭小丁、唐君、張允剛。2000。培養基中蔗糖濃度對甘薯莖尖誘導成苗的影響。安徽農業科學 28:564-576。
- 許家言、劉新裕、蔡新聲。1993。三島柴胡台農一號之組織培養。中華農業研究 42:245-252。
- 陳威臣、黃漢龍、陳忠川、蔡新聲。1998。當歸組織培養之研究 (III) MS 鹽類及蔗糖濃度、培養基形態及 pH 值對懸浮細胞形成體胚及體胚苗之影響。中華農學會報 183:79-87。
- 黃秋蘭、郭能成。1995。三島柴胡育種指標性狀之篩選與利用。p.69-84。臺灣地區藥用植物資源之開發與利用學術研討會專刊。杜金池、盧煌勝、劉新裕 編。臺灣省農業試驗所。臺中。
- 楊淑如、戴宗德、陳忠川、蔡新聲。2001。湖北貝母組織培養之研究 I. 不同培植體來源誘導鱗片及胚狀癒合組織之形成。中華農學會報 2:414-422。
- 蔡新聲。1999。藥用植物之組織培養技術。p.113-124。1999 藥用植物之開發與利用研討會論文集。林俊義、盧煌勝、劉新裕、陳忠川、張成國 編。臺灣省農業試驗所。台中。
- Alen, K. H. and S. M. Jain. 1997. *In vitro* multiplication of *Catharanthus roseus*. Acta Hort. 447:167-169.
- Chen, C. C., S. J. Chen, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2001. Adventitious shoot regeneration from stem internode explants of *Adenophora triphylla* (Thunb.) A. DC. (Campanulaceae) – an important medical herb. Bot. Bull. Acad. Sin. 42:1-7.

- Chueh, F. S., C. C. Chen, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. *Planta Med.* 66:1-4.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32:272-289.
- Hiraoka, N. 1989. *Bupleurum falcatum* L.: Embryogenesis and the production of saikosaponins. p.69-81. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 7 Medicinal and Aromatic Plants II.* (Bajaj, Y. P. S. ed.) Springer-Verlag, Berlin.
- Huang, C. L., M. T. Hsieh, W. C. Hsieh, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an thnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf- and inflorescence-node explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36:220-224.
- Kohda, H., A. Namera, and Y. Hamamoto. 1990. Propagation of *Bupleurum falcatum* by shoot tip culture. *Shoyakugaku Zasshi* 44:38-41. (in Japanese with English Abstract)
- Komalavalli, N. and M. V. Rao. 2000. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* – A multipurpose medical plant. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 61:97-105.
- Miller, R. M., V. Kaul, J. F. Hutchinson, and D. Richards. 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*) from axillary bud explants. *Ann. Bot.* 67:35-42.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nishioka, I. 1988. Clonal multiplication of medicinal plant by tissue culture. *Shoyakugaku Zasshi* 42:1-11. (in Japanese with English Abstract)
- Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Hort.* 289: 283-290.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, and H. S. Tsay. 2000. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medicinal plant genetic resource. p.171-187. *in: Agriculture of the New Century: Managing Bio-research and Bio-diversity.* (Wu, W. S., S. T. Chang, and B. T. Guan, eds.) College of Agriculture, National Taiwan University, Taipei.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 943 pp.
- Shoyama, Y., N. Hasegawa, and I. Nishioka. 1986. Studies on propagation of *Flitillaria verticillata* tissue (1). *Shoyakugaku Zasshi* 40:198-202.
- Shoyama, Y., N. Hasegawa, and I. Nishioka. 1987. *In vitro* propagation of *Lilium japonicum* by culture of bulblet. *Jpn. J. Pharmacol.* 41:352-355.
- Shoyama, Y., K. Hatano, and I. Nishioka. 1983. Clonal multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture. *Planta Med.* 49:14-16.
- Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. *Bupleurum* spp. p.223-232. *in: Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine.* Springer-Verlag, Berlin.
- Tsay, H. S., T. G. Gau, and C. C. Chen. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 8:450-454.
- Tsay, H. S. 1998. Effects of medium composition at different precultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in *in vitro* shoot proliferation. *Acta Hort.* 461:243-249.
- Yen, M. H., C. C. Lin, C. H. Chung, and S. Y. Liu. 1991. Evaluation of root quality of *Bupleurum* species by TLC scanner and the liver protective effects of "Xiao-chai-hu-tang" prepared using three different *Bupleurum* species. *J. Ethnopharm.* 34:155-165.

# Studies on *in vitro* Shoot Multiplication of Native Medicinal Herbs - *Bupleurum kaoi* by Axillary Bud Culture<sup>1</sup>

Uei - Chin Chen<sup>2</sup>, Mau-Shing Yeh<sup>3</sup> and Hsin-Sheng Tsay<sup>4,5</sup>

## Summary

Chen, U. C., M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004. Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal herbs - *Bupleurum kaoi* by axillary bud culture. *J. Agri. Res. China* 53: 27-38.

An efficient method for *in vitro* shoot multiplication of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang using the axillary bud explants has been developed. The axillary buds dissected from nodal segments of the field grown plants induced shoots after culturing for 4 weeks on half-strength MS medium supplemented with 1 mg/l benzyladenine (BA) in combination with 0.1 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA). Among the various concentrations of BA (0 - 2 mg/l) or kinetin (0 - 0.8 mg/l) tested, maximum shoot multiplication (7.3 shoots per explant) was achieved in the *in vitro* grown shoots by culturing on half-strength MS medium supplemented with 0.25 mg/l BA for 8 weeks. Although BA was more effective than kinetin in shoot multiplication, BA stimulated hyperhydric shoots (10 - 33%) after 6 weeks of culture. Prolonged culture period from 6 weeks to 8 weeks resulted in higher number of hyperhydric shoots (16 - 47%). Half-strength of MS basal medium and 3% sucrose as carbohydrate source was found optimum for shoot multiplication. Pretreatment of the explants by culturing them on liquid half-strength MS basal medium containing 0.25 mg/l BA for 2-14 days did not support shoot multiplication.

**Key words:** *Bupleurum kaoi*, Medicinal plant, Shoot multiplication, Hyperhydricity.

- 
1. Contribution No.2182 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 9, 2003.
  2. Assistant Researcher, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC. (Ph. D. Graduate student, Department of Agronomy, National ChungHsing University)
  3. Professor, Department of Agronomy, National ChungHsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
  4. Professor, Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  5. Corresponding author, e-mail: hstsay@mail.cyut.edu.tw ; Fax: (04) 23742371.