

# 鹽類濃度、蔗糖、植物生長素及培養容器瓶口覆蓋物對高氏柴胡組培苗發根與馴化之影響<sup>1</sup>

陳威臣<sup>2</sup> 夏奇銳<sup>3</sup> 葉茂生<sup>4</sup> 蔡新聲<sup>5,6</sup>

## 摘 要

陳威臣、夏奇銳、葉茂生、蔡新聲。2004。鹽類濃度、蔗糖、植物生長素及培養容器瓶口覆蓋物對高氏柴胡組培苗發根與馴化之影響。中華農業研究 53:249-260。

本研究探討培養基組成中之 MS (Murashige & Skoog) 鹽類濃度、蔗糖濃度與植物生長素，對高氏柴胡(*Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang) 組培苗發根之影響，並藉由瓶口覆蓋物處理降低瓶內溼度，以提高瓶苗移植存活率之方法，建立高氏柴胡組織培養之大量繁殖種苗體系。結果顯示，低 MS 鹽類濃度(1/4MS 與 1/2MS)及 3%蔗糖培養基之組培苗根系形成較佳且存活率較高。組培苗培養於含有 0.5 mg/l 吲哚丁酸(indole-3-butyric acid; IBA)之 1/2MS 培養基，發根率可達 100%，且組培苗不會產生基部癒合組織化現象。利用鋁箔紙覆蓋培養 2-3 週後，再以三層藥包紙進行覆蓋物置換處理之瓶苗與根系均生長良好，瓶苗移植存活率約為 76%，較高於鋁箔紙覆蓋培養 6 週之處理(約 33%)。將組培苗培養於含 0.5 mg/l IBA 與 0.1-0.2 mg/l 萘乙酸( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid; NAA)之 1/2MS 培養基，於培養 2 週後再進行藥包紙置換處理，可形成具有較粗根徑之組培苗，將出瓶組培苗除去部分葉片後剩餘長約 3-4 cm 之瓶苗，移植於已滅菌之培養土(BioMix)：蛭石：珍珠石 = 1：1：1 (v/v)混合介質，育苗盤放入有蓋透明塑膠盒後置於日夜溫為 22°C (10 h) / 18°C (14 h)、光照(約 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )之生長箱進行馴化處理，4 週後之存活率高達 92%，顯示添加少量 NAA 有利於高氏柴胡組培苗之發根與移植存活率的提昇。本研究利用組培苗瓶內處理(改善培養基組成與培養容器瓶口覆蓋物)及出瓶後馴化處理(有蓋透明塑膠盒)之結果，將有助於高氏柴胡組培苗產業化生產系統之建立。

**關鍵詞：**高氏柴胡、藥用植物、發根、馴化、培養容器瓶口覆蓋物。

## 前 言

柴胡(*Radix Bupleuri*)為神農本草經之草部上品，具有去腸胃結氣與寒熱邪氣之效，更有推陳致新、久服輕身及明目益精等功能，其產品廣泛應用於中國、日本、韓國及台灣等地區；中國藥典之正品柴胡為繖形科(Umbelliferae)、柴胡屬(*Bupleurum* L.)之北柴胡(*B. chinense* DC.)的乾燥根(甘 1985；Hiraoka 1989)；高氏柴胡(*B. kaoi* Liu, Chao et Chuang)為臺灣特有之原生柴胡，其保肝效果已被證明優

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2209 號。接受日期：93 年 12 月 13 日。
2. 本所農藝組助理研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。(國立中興大學農藝學系博士候選人)
3. 本所農藝組副研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
4. 國立中興大學農藝學系教授。臺灣 臺中市。
5. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
6. 通訊作者，電子郵件：hstsay@mail.cyut.edu.tw；傳真機：(04) 23742371。

於日本三島柴胡(*B. falcatum* L. var. *komarowi* Koso-Polj)與中國北柴胡，深具發展推廣之潛力(甘 1985；林&顏 1999；Yen *et al.* 1991)。此外，柴胡屬於常異交植物，長久以來鮮少進行人為選拔工作，植株間具有相當大的遺傳變異，且因其種子具有低溫需求性，發芽率低且發芽勢不佳，因而造成繁殖栽培上的困擾(黃&郭 1995)。利用組織培養技術大量繁殖珍稀藥用植物已有許多成功的例子，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、當歸與金線連等(蔡 1999；Nishioka 1988；Sagare *et al.* 2000)。許等(1993)報導利用組織培養技術已成功大量繁殖三島柴胡組培苗；高氏柴胡利用組織培養之大量繁殖技術於近年亦已初步建立(陳等 2004a)；然而，高氏柴胡組培苗大量繁殖過程發生之玻璃質化現象與後續發根與移植馴化等問題則仍有待解決。

前人研究指出，藉由一些化學與物理方法可抑制組織培養玻璃質化苗形成，並可增進瓶苗品質而提高其移植存活率，例如改善培養基鹽類組成或濃度，調整植物生長調節劑與凝膠物質種類與濃度，或是降低培養瓶內相對溼度等處理，均可達到促進瓶苗品質之效果(陳等 2001、2004b；Paques 1991)。陳等(2004a)於高氏柴胡組織培養大量繁殖過程中，嘗試藉由降低 MS 基本鹽類與 BA 濃度以改善組培苗品質，但卻未能有效抑制玻璃質化組培苗產生。作者於過去研究發現，利用高透氣性的培養容器瓶口覆蓋物進行瓶苗培養，不僅能夠有效抑制康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)組培苗玻璃質化現象之形成，亦可增進瓶苗品質(陳等 1998)。一般而言，組培苗發根良好將可提昇瓶苗的馴化存活率，而在促進組培苗之發根研究中，慣用的生長調節劑有 IAA、NAA 與 IBA，其中人工合成之 NAA 與 IBA 效果較天然形成之 IAA 佳，更有研究指出合併使用兩種 auxins，對部分作物組培苗之發根效果較單一 auxin 處理者為佳(George & Sherrington 1984；Gaspar *et al.* 1996；Moncousin 1991)。

本研究乃嘗試利用改變培養基之 MS 鹽類濃度、蔗糖濃度、發根植物生長調節劑與培養容器瓶口覆蓋物等因子，藉以提高組培苗發根階段之瓶苗發根品質，建立適合於高氏柴胡組培苗發根與移植馴化之方法，期能生產品質均一且優良的高氏柴胡種苗供農民種植，此將有助於藥用保健植物產業之發展及提昇。

## 材料與方法

高氏柴胡(*Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang)植株係由農業試驗所特作研究室提供。高氏柴胡組培苗之大量繁殖係依據陳等(2004a)之方法進行，並選取高約 1.5-2 cm 之組培芽體進行發根試驗，待根系誘導完成後，將除去部分葉片後剩餘長約 3-4 cm 之發根組培苗繼續進行移植馴化之研究。根系誘導培養基以含有半量 MS (Murashige & Skoog 1962)鹽類與全量 MS 維生素，並添加 3%蔗糖及 0.9%洋菜(Difco Bacto-agar)為培養基(以下稱為基本培養基)。培植體於接種後，置於 25±1℃之恆溫與照光 16 小時(約 38 μmol/m<sup>2</sup>/s)條件下進行培養。

### MS 鹽類濃度與蔗糖濃度對高氏柴胡組培苗生長、增殖與發根之影響

高氏柴胡組培苗培養於含有 0.5 mg/l IBA 之不同 MS 鹽類濃度(1/4、1/2、1 及 2 倍)或不同蔗糖濃度(1.5、3、6 與 12%，w/v)之基本培養基，經接種於內含 10 ml 培養基之玻璃試管(25 mm x 120 mm，Pyrex，日本)培養 6 週後，調查組培苗存活率、芽體數、發根率與根數。每處理 4 重複，每重複培養 5 株組培苗。

### NAA 與 IBA 對高氏柴胡組培苗生長與發根之影響

高氏柴胡組培苗培養於添加 NAA (0.5、1 mg/l)或 IBA (0.5、1 mg/l)之基本培養基，經接種於內含 10 ml 培養基之玻璃試管(25 mm x 120 mm，Pyrex，日本)培養 6 週後，調查組培苗存活率、發根率、根數與基部癒合組織化比率。每處理 4 重複，每重複培養 5 株組培苗。

### 培養容器瓶口覆蓋物種類與置換處理對高氏柴胡組培苗發根與移植存活率之影響

高氏柴胡組培苗培養於含有 0.5 mg/l IBA 之基本培養基，接種於內含 25 ml 培養基之 125 ml 三角瓶(Pyrex, 日本)中，培養容器分別以兩層鋁箔紙(一般培養用，透氣性較低) (aluminum foil; AF)或三層藥包紙(透氣性較高，9.5 x 9.5 x 0.046 cm, 臺灣) (dispense paper; DP)覆蓋瓶口。對照組全程 6 週均以兩層鋁箔紙覆蓋(AF6)，而處理組則是於鋁箔紙覆蓋培養 1、2、3 與 4 週後，將兩層鋁箔紙置換成三層藥包紙，各處理分別以 AF1+DP5、AF2+DP4、AF3+DP3 與 AF4+DP2 表示，例如 AF1+DP5 處理即是以鋁箔紙覆蓋培養 1 週後，再利用藥包紙覆蓋培養 5 週，其餘處理依此類推，培養達 6 週後調查組培苗發根率、根數與根長。每處理 4 重複，每重複培養 9 株組培苗。發根組培苗並繼續進行馴化處理，並於馴化 4 週與 8 週後調查存活率。每處理 3 重複，每重複移植 9 株組培苗。

### IBA 與 NAA 組合並配合培養容器瓶口覆蓋物置換處理對高氏柴胡組培苗發根與移植存活率之影響

高氏柴胡組培苗培養於添加 0.5 mg/l IBA 配合不同濃度 NAA (0.1、0.2、0.4 及 0.8 mg/l)之基本培養基，接種於內含 25 ml 培養基之 125 ml 三角瓶(Pyrex, 日本)中，培養容器先以兩層鋁箔紙覆蓋瓶口，在培養 2 週後將鋁箔紙置換成三層藥包紙(藥包紙置換處理)，再經 4 週培養後(全程共 6 週)，調查發根率、根數、根長、根徑與基部癒合組織化比率。每處理 4 重複，每重複培養 12 株組培苗。而後發根組培苗繼續進行馴化處理，分別於馴化 4 週與 8 週後調查存活率。每處理 3 重複，每重複移植 12 株組培苗。

組培苗馴化處理方法如下：取出發根瓶苗洗淨附著於根部之洋菜，以 1,000X 之 50% 免賴得可濕性粉劑(杜邦, 美國)消毒 30 分鐘，除去部分葉片後移植於含有滅菌之混合介質(培養土(BioMix)：蛭石：珍珠石=1：1：1；v/v)的黑色穴植盤(50x30x5cm, 60孔)，並放入有蓋之透明 PC 塑膠培養盒(50 x 30 x 20 cm, 臺灣)中，置於日夜溫為 22°C (10 h)/18°C (14 h)與光照約 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  條件之生長箱(和德科儀, Model 624 HD, 臺灣)進行馴化，4 週後調查存活率，而後將培養盒移出生長箱並除去上蓋，於室內環境再馴化 4 週後調查存活率。

資料統計與分析：試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001)統計程式軟體進行變方分析，若處理間差異顯著，則利用最小顯著差異法(Least significant difference; LSD)比較各處理平均值間之差異；或以 Sigmaplot 8.0 軟體繪圖表現其差異。

## 結 果

### MS 鹽類與蔗糖濃度對高氏柴胡組培苗生長與發根之影響

表 1 結果顯示，除 2MS 處理因組培苗褐化死亡較為嚴重外，其餘處理(1/4MS、1/2MS 與 MS)對高氏柴胡組培苗存活率並無顯著影響；此外，四個處理間組培苗增殖則無顯著差異。低鹽類濃度處理(1/4MS 與 1/2MS)具有較佳的發根效果，其發根率分別達 60%及 70%，平均根數則分別為 3.2 與 2.9 根/培植體；而較高鹽類濃度(MS 與 2MS)則不利於組培苗之發根，發根率及平均根數均較低。表 2 蔗糖濃度試驗之結果顯示，組培苗存活率在參試四個處理(1.5-12%)間並無顯著差異；但組培苗之增殖效果則以 3%處理較佳(1.8 芽/株)，其餘處理間並無顯著差異。此外，低蔗糖濃度處理(1.5%與 3%)具有較佳的發根效果，發根率分別可達 90 及 96%，平均根數分別為 3.8 與 3.1 根/培植體，兩濃度間無顯著差異；而較高蔗糖濃度(6%與 12%)則較不利於組培苗之發根。

### NAA 與 IBA 對高氏柴胡組培苗生長與發根之影響

表 3 之結果顯示，相較於未含 auxin 之對照組(基本培養基)，添加 NAA 與 IBA 均有助於高氏柴胡組培苗之增殖率。培養基中添加 NAA (0.5-1 mg/l)雖有助於提高發根培植體之平均根數，但易造成

培植體基部形成嚴重的癒合組織化現象(basal callusing) (分別達到 70%與 100%)，因而導致其發根率的降低(分別為 50%與 60%)；組培苗於 0.5 mg/l IBA 處理下培養，其發根率與平均根數均最佳，且無基部癒合組織化現象；而 1 mg/l IBA 處理對於組培苗發根之效果則介於 0.5 mg/l IBA 處理與 NAA 處理(0.5-1 mg/l)之間(表 3、圖 1)。

#### 培養容器瓶口覆蓋物種類與置換處理對高氏柴胡組培苗發根與移植存活率之影響

利用藥包紙置換鋁箔紙為培養容器瓶口覆蓋物試驗結果顯示，組培苗發根率以對照組(AF6)之 77.8% 為最高；其次是 AF4+DP2、AF3+DP3 與 AF2+DP4 處理，約為 72-73%，而以 AF1+DP5 處理之發根

表 1. MS 鹽類濃度對高氏柴胡組培苗生長、增殖與發根之影響

**Table 1.** Influence of MS salt strength on shoot growth, proliferation and root formation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets<sup>z</sup>

Strength of MS salt	Percentage of survival explants (%) <sup>y</sup>	No. of shoots per survival explant <sup>y</sup>	Percentage of rooted explant (%) <sup>y</sup>	No. of roots per explant <sup>y</sup>
1/4×	86 ± 5.0 a	1.1 ± 0.06 a	60 ± 11.6 a	3.2 ± 0.19 a
1/2×	90 ± 5.0 a	1.2 ± 0.12 a	70 ± 5.8 a	2.9 ± 0.26 a
1×	80 ± 11.6 ab	1.1 ± 0.06 a	40 ± 8.2 b	1.8 ± 0.43 b
2×	70 ± 13.0 b	1.1 ± 0.05 a	45 ± 9.6 b	1.6 ± 0.32 b

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on the medium containing various MS salt strength, 0.5 mg/l IBA and 3% sucrose for 6 weeks. The medium was 10 ml each in 25 x 120 mm test-tube for culture.

<sup>y</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture. Shoots smaller than 2 cm in length were not scored. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

表 2. 蔗糖濃度對高氏柴胡組培苗生長、增殖與發根之影響

**Table 2.** Influence of sucrose concentration on shoot growth, proliferation and root formation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets<sup>z</sup>

Sucrose (%)	Percentage of survival explants (%) <sup>y</sup>	No. of shoots per survival explant <sup>y</sup>	Percentage of rooted explant (%) <sup>y</sup>	No. of roots per explant <sup>y</sup>
1.5	96 ± 5.0 a	1.4 ± 0.13 b	90 ± 5.8 a	3.8 ± 0.66 a
3.0	100 ± 0 a	1.8 ± 0.17 a	96 ± 5.0 a	3.1 ± 0.62 a
6.0	100 ± 0 a	1.2 ± 0.14 b	40 ± 11.6 b	1.1 ± 0.37 b
12.0	96 ± 5.0 a	1.1 ± 0.05 b	6 ± 5.0 c	0.1 ± 0.05 c

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l IBA and various sucrose concentration for 6 weeks. The medium was 10 ml each in 25 x 120 mm test-tube for culture.

<sup>y</sup> Same as Table 1.

表 3. NAA 及 IBA 對高氏柴胡組培苗生長、發根與基部癒合組織化之影響

**Table 3.** Influence of NAA and IBA on shoot growth, root formation and basal callusing of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets<sup>z</sup>

Auxins (mg/l)		Number of shoots per survival explant <sup>y</sup>	Percentage of rooted explant (%) <sup>y</sup>	Number of roots per explant <sup>y</sup>	Percentage of basal callusing (%) <sup>y</sup>
NAA	IBA				
0	0	1.3 ± 0.06 c	75 ± 5.0 b	2.2 ± 0.20 d	0 ± 0 d
0.5	0	1.9 ± 0.13 a	50 ± 5.8 c	3.0 ± 0.86 c	70 ± 12.9 b
1	0	1.7 ± 0.10 b	60 ± 8.2 c	5.3 ± 0.34 a	100 ± 0 a
0	0.5	2.3 ± 0.06 a	100 ± 0 a	5.9 ± 0.68 a	0 ± 0 d
0	1	2.1 ± 0.34 a	85 ± 9.6 b	4.3 ± 0.52 b	25 ± 9.6 c

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS medium containing various concentration of NAA and IBA and 3% sucrose for 6 weeks. The medium was 10 ml each in 25 x 120 mm test-tube for culture.

<sup>y</sup> Same as Table 1.

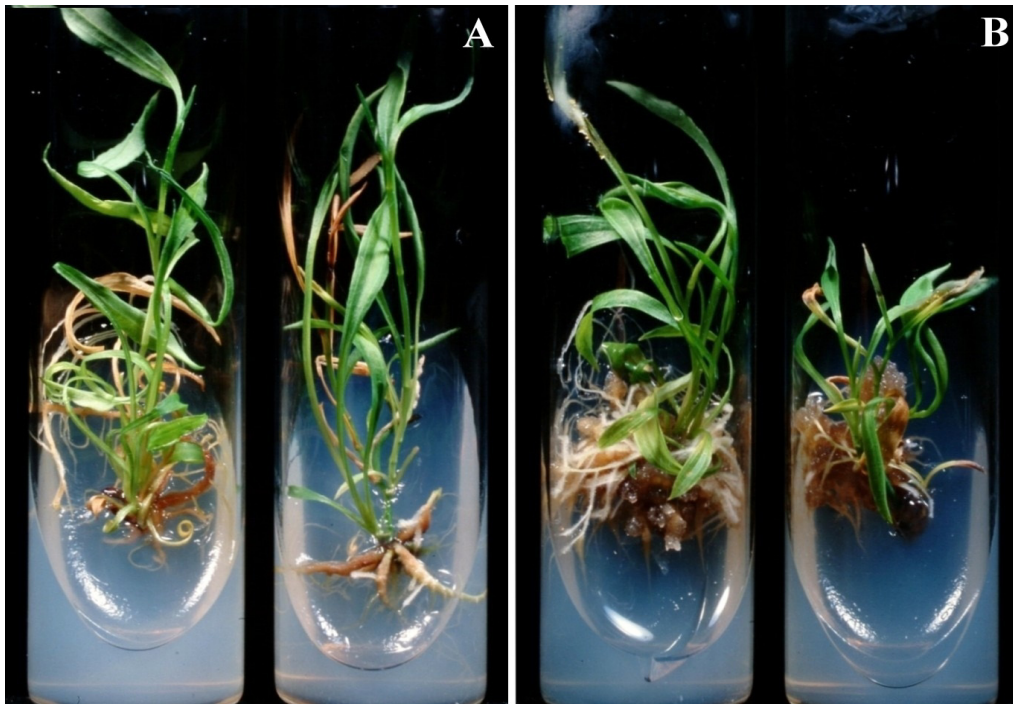


圖 1. 高氏柴胡組培苗於添加 0.5 mg/l IBA (A)與 0.5 mg/l NAA (B)之 1/2MS 基本培養基 6 週後之發根情形。

Fig. 1. Influence of IBA and NAA on root formation and growth of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l IBA (A) and 0.5 mg/l NAA (B) for 6 weeks.

率結果最差。就平均根數與平均根長之結果而言，除 AF1+DP5 處理較低外，其餘處理(AF6、AF4+DP2、AF3+DP3 與 AF2+DP4)間並無顯著差異(表 4)。此外，移植於生長箱 4 週後調查存活率顯示，AF4+DP2、AF3+DP3 與 AF2+DP4 等處理具有較高移植存活率(74.1-77.8%)，三處理間並無顯著差異，而 AF1+DP5 處理之移植存活率較低(55.6%)，但仍較對照組(AF6)為高(33.3%)；移植 8 週後的結果顯示，四組置換處理間並無顯著差異(37.0-48.1%)，但皆較對照組(AF6)為高(11.1%) (表 4)。

#### IBA 與 NAA 組合並配合培養容器瓶口覆蓋物置換處理對高氏柴胡組培苗發根與移植存活率之影響

利用上述試驗所得結果中之 AF2+DP4 處理配合 auxin 組合處理，亦即以 0.5 mg/l IBA 配合不同 NAA 濃度(0.1-0.8 mg/l)進行組培苗之發根試驗結果顯示，0.5 mg/l IBA 配合較低濃度(0.1-0.2 mg/l) NAA 之處理具有較高之發根率，分別達 92.2%與 94.4%，平均根數與平均根長則顯示 0.5 mg/l IBA 配合 0.2 mg/l NAA 處理最佳，分別可達 15.4 根/培植體及 1.78 cm；平均根徑的結果顯示，NAA 濃度愈高則平均根徑愈粗，但同時也伴隨著基部癒合組織化現象(表 5)。移植馴化處理結果如圖 2 所示，0.5 mg/l IBA 配合 0.1-0.2 mg/l NAA 處理，於移植 4 週與 8 週後分別可達約 91.7%與 61.1-55.6 %之移植存活率最佳；若以移植 8 週後之存活率結果而言，則 0.5 mg/l IBA 配合 0.1、0.2 與 0.4 mg/l NAA 等三個處理間並無顯著差異。圖 3 顯示高氏柴胡組培苗移植馴化過程之結果，將已形成根系之組培苗(圖 3A)進行移植馴化處理，於移植 4 週與 8 週後植株生長良好(圖 3B, 3C)，而後將其移植於 9 吋圓形塑膠盆置於田間，經 4 週後即可獲得生長健壯之高氏柴胡植株(圖 3D)。

表 4. 培養容器覆蓋物與置換時間對高氏柴胡組培苗發根與移植存活率之影響

Table 4. Influence of container closure and exchanging time on root formation and survival rate during acclimation process of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets<sup>z</sup>

Treatment <sup>y</sup>	Percentage of rooted explant (%) <sup>x</sup>	Number of roots per explant <sup>x</sup>	Root length of per rooted explant <sup>w</sup>	Survival rate (%) <sup>y</sup>	
				4 Weeks	8 Weeks
AF6	77.8 ± 5.89 a	7.0 ± 0.53 a	1.69 ± 0.09 a	33.3 ± 6.42 c	11.1 ± 6.42 b
AF4+DP2	73.3 ± 8.67 b	6.6 ± 0.78 a	1.59 ± 0.10 a	74.1 ± 7.41 a	37.0 ± 3.70 a
AF3+DP3	71.7 ± 12.10 b	6.4 ± 1.09 a	1.51 ± 0.10 a	74.1 ± 3.70 a	44.4 ± 0 a
AF2+DP4	72.2 ± 5.44 b	6.5 ± 0.49 a	1.59 ± 0.09 a	77.8 ± 6.42 a	48.1 ± 7.41 a
AF1+DP5	58.9 ± 1.78 c	5.3 ± 0.16 b	1.19 ± 0.10 b	55.6 ± 6.42 b	44.4 ± 6.42 a

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l IBA and 3% sucrose for 6 weeks. The medium was 25 ml each in 125 ml Erlenmeyer flask for culture. Shoots smaller than 2 cm in length were not scored. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

<sup>y</sup> AF6: Using 2 layers of aluminum foil as container closure for 6 weeks; AF4+DP2, AF3+DP3, AF2+DP4, and AF1+DP5: Using 2 layers of aluminum foil as container closure for 4, 3, 2, and 1 week, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for extending 2, 3, 4, and 5 weeks, respectively.

<sup>x</sup> Twenty-seven plantlets were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture.

<sup>w</sup> Forty-five roots were recorded per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture.

<sup>y</sup> Survival rate was recorded while rooted plantlets acclimated in growth chamber for 4 weeks and under room temperature for extending 4 weeks.

表 5. IBA 與 NAA 組合對高氏柴胡組培苗發根與基部癒合組織化之影響

Table 5. Influence of IBA combined with NAA on roots formation and basal callusing of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets<sup>z</sup>

Auxin (mg/l)	Percentage of rooted explant (%) <sup>y</sup>	Number of roots per explant <sup>y</sup>	Root length per rooted explant (cm) <sup>x</sup>	Root diameter per rooted explant (mm) <sup>x</sup>	Percentage of basal callusing (%) <sup>y</sup>
IBA+NAA					
0.5+0.1	92.2 ± 5.3 a	8.6 ± 1.42 c	1.54 ± 0.226 b	0.62 ± 0.030 c	16.7 ± 3.2 c
0.5+0.2	94.4 ± 3.2 a	15.4 ± 0.38 a	1.78 ± 0.050 a	0.65 ± 0.044 c	19.4 ± 5.3 c
0.5+0.4	72.2 ± 10.7 b	10.6 ± 2.16 b	1.66 ± 0.138 ab	0.77 ± 0.046 b	52.8 ± 2.8 b
0.5+0.8	66.7 ± 10.1 b	11.2 ± 2.61 b	1.27 ± 0.067 c	1.13 ± 0.087 a	75.0 ± 5.3 a

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS medium containing various concentration of NAA in combination with 0.5 mg/l IBA and 3% sucrose, by using 2 layers of aluminum foil as container closure for 2 weeks, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for extending 4 weeks. The medium was 25 ml each in 125 ml Erlenmeyer flask for 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.

<sup>y</sup> Twenty-seven plantlets were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture.

<sup>x</sup> Forty-five roots were recorded per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture.

## 討 論

組織培養大量繁殖之瓶苗往往由於移植存活率低，而造成實際應用的諸多限制。本研究乃藉由調整培養基之 auxins 組成以促進組培苗發根，並利用透氣性瓶口覆蓋物降低瓶內相對溼度以提高瓶苗品質及移植存活率，期能建立適合於高氏柴胡組培苗發根與移植馴化之方法。

前人研究結果指出，高濃度鹽類不利於培植體根系之分化，而降低鹽類濃度(1/2 MS、1/4 MS 或更低)則有利於組培苗發根(George & Sherrington 1984; Moncousin 1991)。赤桉(*Eucalyptus camadulensis*)之研究結果顯示，組培苗根系之誘導以 1/2MS 較 MS 培養基效果為佳(張等 2000)；在中草藥植物中之甜菊(*Stevia rebaudiana*) (Sivaram & Mukundan 2003)、半夏(*Pinellia ternata*) (Tsay *et al.* 1989)、輪葉沙參(*Adenophora triphylla*) (Chen *et al.* 2001)與湖北貝母(*Fritillaria hupehensis*) (陳等 2000)組培苗發根亦得到相類似的結果。然而 Chueh *et al.* (2001)之臺灣龍膽(*Gentiana davidii* var. *formosana*)研究顯示，雖然 1/2MS 基本鹽類較適合組培苗發根，但就根數及組培苗健壯程度而言，仍以全量 MS 為佳。本研究結果亦顯示，低鹽類濃度(1/4MS 與 1/2MS)對高氏柴胡組培苗發根效果較佳，高鹽類濃度(MS 與 2MS)雖不影響組培苗增殖，但對於發根率與平均根數均有不利的影響(表 1)。醣類是培養基中含量最多的有機物質，主要為提供碳源供培植體生長所需，並有調節培養基滲透壓(osmotic potential)之功能(George & Sherrington 1984; Moncousin 1991)。陳等(2000)於湖北貝母研究中發現，3%蔗糖對小鱗莖之根形成效果最佳。然而臺灣龍膽組培苗根系誘導與生長則是較高蔗糖濃度(5%)具有最佳的效果(Chueh *et al.* 2001)；Kumar *et al.* (1999)亦指出較高蔗糖濃度(0.232 M；約 8%)較有利唐菖蒲(*Gladiolus*

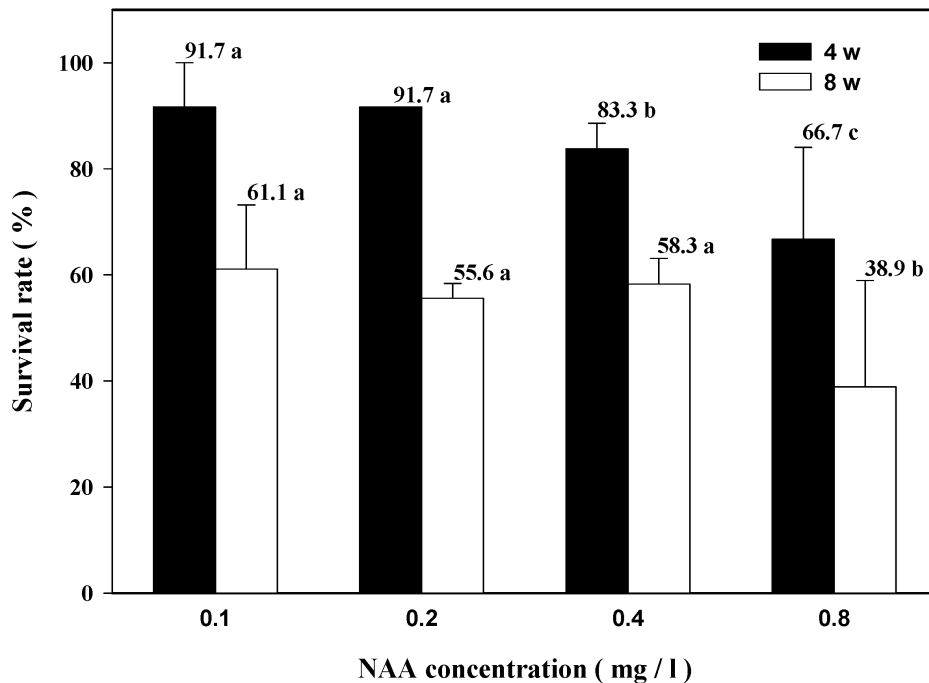


圖 2. 高氏柴胡組培苗利用瓶口覆蓋物置換處理，培養於添加 0.5 mg/l IBA 配合 0.1-0.8 mg/l NAA 之 1/2MS 基本培養基，於移植馴化處理 4 週(■)與 8 週(□)後之植株存活率。

Fig. 2. Influence of IBA in combination with NAA and container closure exchanging treatment on survival rate of *Bupleurum kaoi* plantlets when cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l IBA and 0.1 - 0.8 mg/l NAA by using 2 layers of aluminum foil as container closure for 2 weeks, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for 4 weeks, then acclimated in growth chamber for 4 weeks (■) and under room temperature condition for extending 4 weeks, equally acclimated for 8 weeks (□). Means above columns with same symbol followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

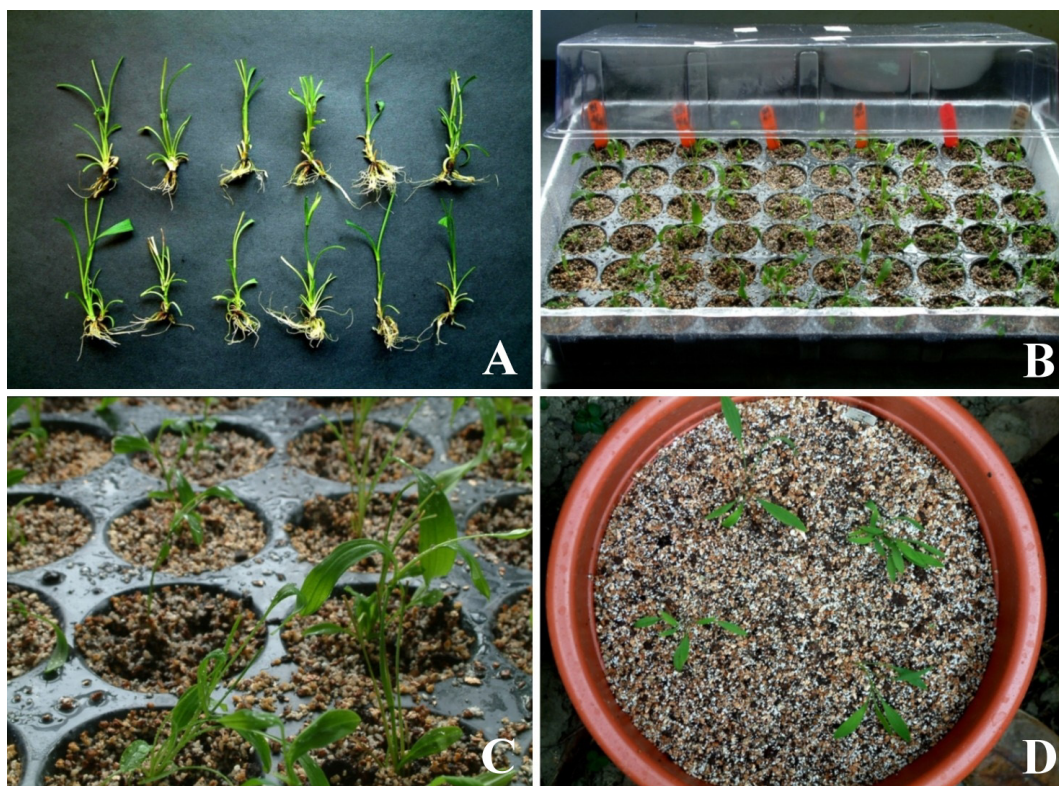


圖 3. 高氏柴胡組培苗移植馴化過程中之植株生長情形

高氏柴胡組培苗培養於添加 0.5 mg/l IBA 與 0.2 mg/l NAA 之基本培養基，配合瓶口覆蓋物置換處理達 6 週後，發根良好之組培苗(A)；移植馴化處理 4 週(B)、8 週(C)與 12 週(D)後之高氏柴胡植株生長情形。

Fig. 3. The acclimatization process of *Bupleurum kaoi* plantlets.

Rooted plantlets of *Bupleurum kaoi* derived from *in vitro* shoots cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l IBA and 0.2 mg/l NAA by using 2 layers of aluminum foil as container closure for 2 weeks, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for 4 weeks (A), then acclimatized for 4 weeks (B), 8 weeks (C) and 12 weeks (D).

*hybridus*)組培苗發根。本研究結果顯示較低蔗糖濃度(1.5%與 3%)有利於高氏柴胡組培苗發根，而較高濃度(12%)處理雖然不影響組培苗之存活率，但卻嚴重抑制組培苗發根(表 2)。

組織培養大量繁殖種苗研究常以 IAA、NAA 或 IBA 作為促進組培苗發根之植物生長調節劑，其中又以 NAA 與 IBA 之效果較佳(Gaspar *et al.* 1996；George & Sherrington 1984；Moncousin 1991)。甜菊(Sivaram & Mukundan 2003)與大吉嶺茶(Darjeeling) (Jha & Sen 1992)的研究均指出，IBA 具有較佳的發根效果，且濃度愈高效果愈佳。張等(2000)於赤按的研究指出，IBA 雖具有較佳發根效果，惟較高濃度(0.5 mg/l)不僅芽體發根率降低，且造成基部癒合組織化現象(basal callusing)，因而不利於後續的移植馴化成苗。Sahoo & Chand (1998)報導 1 mg/l IBA 對黃荊(*Vitex negundo*)組培苗發根效果最佳，較高(2 mg/l)與較低(0.5 mg/l)均不利其發根，而 NAA 處理則易造成基部癒合組織化現象。Kooi *et al.* (1999)於 Sentage (*Azadirachta excelsa*)組培苗發根研究上也獲得類似結果。此外，臺灣龍膽(Chueh *et al.* 2001)、葡萄(*Vitis labrusca*) (Lewandowski 1991)與大葉羊蹄甲(*Bauhinia vahlii*) (Upreti & Dhar 1996)組

培苗發根研究均顯示，NAA 處理易使不定芽基部形成癒合組織，且 NAA 濃度愈高其發根率與根數愈低。本研究結果則顯示 IBA 對於高氏柴胡組培苗根系之誘導效果優於 NAA，且 NAA 處理較易形成基部癒合組織化現象，但高濃度 IBA 處理(1 mg/l)亦有 25%組培苗基部產生癒合組織(表 3)，此結果與上述其他學者之研究結果相似；此外，本研究結果亦顯示添加適量 auxins 對芽體增殖具有促進效果(表 3)。綜合上述 MS 鹽類濃度、蔗糖濃度與 auxins 試驗結果，高氏柴胡組培苗之發根以含有 0.5 mg/l IBA 與 3%蔗糖之 1/2MS 培養基較為合適，不僅存活組培苗數較多、發根率與平均根數均優於其他處理，且不會產生基部癒合組織化現象。

組織培養大量繁殖技術已廣泛應用於種苗生產事業，但由於組培苗馴化存活率的低下往往造成嚴重的成本負擔，雖然藉由化學與物理方法可抑制玻璃質苗形成或增進組培苗品質，但也可能導致組培苗繁殖倍率的降低(陳等 2001, 2004b; Dillen & Buysens 1989; Paques 1991; Tsay 1998)。利用高透氣性材質做為培養容器覆蓋物，不只有效抑制康乃馨組培苗玻璃質化現象，且增進組培苗品質(陳等 1998)。關於高氏柴胡玻璃質化組培苗特性與解決方法之研究結果，將於後續報導中討論。由於本研究結果指出高氏柴胡組培苗培養於含有 0.5 mg/l IBA 之 1/2MS 培養基的發根效果最佳，且陳等(1998)亦指出利用透氣性培養容器覆蓋物可增進組培苗品質，因此本研究將組培苗培養於含有 0.5 mg/l IBA 之基本培養基進行透氣性封口材質比較試驗，結果顯示利用一般常用之鋁箔紙封口培養的組培苗移植存活率最低，而利用三層藥包紙做為容器覆蓋物則可增進移植存活率；就藥包紙置換處理時間而言，藥包紙處理時間較短(AF4+DP2)或過長(AF1+DP5)均不利於組培苗之發根與移植存活率，結果顯示接種 2 或 3 週後進行藥包紙置換處理(AF2+DP4 或 AF3+DP3)之效果較佳(表 4)。然而在此試驗之對照組組培苗雖培養於適合發根之培養基(含有 0.5 mg/l IBA 之基本培養基)，其發根率卻由 100%(表 3)降為 77.8% (表 4)，推測可能是由於兩個試驗中培養容器與培養基體積的差異而導致發根率降低。由上述結果得知，藉由藥包紙置換處理雖可提高其移植存活率，但移植 4 與 8 週後之存活率仍屬偏低，分別約為 78 與 48% (表 4)，於是後續試驗擬改變促進發根之植物生長節劑的組合，以提昇高氏柴胡組培苗之移植存活率。

組織培養大量繁殖研究常以單一 auxin 作為組培苗發根之用，但也有利用兩種 auxins 合併使用的方式，對於部分作物組培苗發根具有相對優異的效果(George & Sherrington 1984; Moncousin 1991)。南非醉茄(*Withania somnifera*)之研究顯示，IBA (2-4 mg/l)或 2 mg/l IBA 配合 2 mg/l IAA 之處理具有較佳的組培苗發根效果，其他如 4-6 mg/l IBA 配合 2 mg/l IAA 之處理易產生基部癒合組織化現象，而 IBA 配合 NAA 之處理的發根效果雖差，但可獲得根徑較粗之組培苗(Rani & Grover 1999)。Khosh-Khui & Sink (1982)於玫瑰(*Rosa hybrida*)研究指出，兩種 auxins 搭配使用之發根效果優於單一 auxin 處理的結果，其中利用 NAA 配合 IBA 的組合可獲致最佳的發根效果。油栗(*Jobba*, *Simmondsia chinensis*) (Roussos *et al.* 1999)、葡萄(Lewandowski 1991)與 Sentage (Kooi *et al.* 1999)組培苗之瓶內發根也得到相類似的結果。然而 Kumar *et al.* (1999)卻指出，IBA 配合 NAA 對於劍蘭組培苗發根產生不利的影響，且降低移植存活率。本研究亦利用 IBA 配合 NAA 進行組培苗發根試驗，結果顯示依 NAA 添加濃度的不同而有增粗根徑的效果，但也容易造成發根率降低與產生基部癒合組織化現象，且 NAA 濃度愈高愈為嚴重(表 5)；添加適當濃度之 NAA (0.2 mg/l)，則具有較高的平均根數與移植存活率(表 5、圖 2)；此外，圖 2 結果亦顯示，高氏柴胡組培苗經培養於含有 0.5 mg/l IBA 與 0.1-0.2 mg/l NAA 之基本培養基，且於接種兩週後進行藥包紙置換處理，此條件下之組培苗於移植 4 週後之移植存活率可達 92%，移植 8 週後仍有 60%存活率，顯示添加低濃度 NAA 有助於組培苗之移植存活率，惟就大量繁殖之觀點而言，高氏柴胡組培苗移植馴化之處理方式仍具有很大的改進空間。

## 誌 謝

本研究承國科會經費補助(NSC 91-2317-B055-008 及 NSC 92-2317-B037-001)，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。
- 林俊清、顏銘宏。1999。高氏柴胡的資源開發與藥效評估。p.51-55。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)。臺灣省農業試驗所編印，臺中。
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩、陳振榮。2000。Thidiazuron 促進赤桉優良營養系葉片癒合組織之植株再生。台灣林業科學 15:81-90。
- 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、葉茂生、蔡新聲。2004a。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。
- 陳威臣、夏奇鈺、葉茂生、蔡新聲。2004b。植物組織培養苗玻璃質化現象與低木質化作用關聯性之探討。科學農業 52:90-96。
- 陳威臣、蕭翌柱、楊淑如、葉茂生、蔡新聲。2001。瓶內馴化處理對組織培養苗生長之影響。科學農業 49:276-280。
- 陳威臣、蕭翌柱、賴建洲、蔡新聲。1998。培養基組成與培養容器覆蓋物對康乃馨組織培養苗玻璃質化與發根的影響。中華農業研究 47:364-376。
- 陳威臣、戴宗德、陳忠川、蔡新聲。2000。湖北貝母組織培養之研究 III. 培養基組成分及光照處理對誘導小鱗莖發根之影響。中華農業研究 49:39-47。
- 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。
- 蔡新聲。1999。藥用植物之組織培養技術。p.113-124。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，臺中。
- 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. 2001. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. Planta Med. 67:70-73.
- Dillen, W. and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19:181-188.
- 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(P):272-289.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture – handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, England. 548 pp.

- 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. (Y. P. S. Bajaj ed.) Springer-Verlag, New York.
- Jha, T. and S. K. Sen. 1992. Micropropagation of an elite Darjeeling tea clone. Plant Cell Rep. 11:101-104.
- Khosh-Khui. M. and K. C. Sink. 1982. Rooting enhancement of *Rosa Hybrida* for tissue culture propagation. Sci. Hortic. 17:371-376.
- Kooi, L. T., C. L. Keng, and C. T. K. Hoe. 1999. *In vitro* rooting of sentage shoots (*Azadirachta excelisa* L.) and acclimatization of the plantlets. In Vitro Cell. Dev. Biol. 35(P):396-400.
- Kumar, A., A. Sood, L. M. S. Polni, and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: synergistic effect of heat-shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 57:105-112.
- Lewandowski, V. T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* (Delaware). Hortscience 26:586-589.
- Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings: general aspects. Acta Hortic. 289: 301-310.
- 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)
- Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation : causes, remedies and prospects. Acta Hortic. 289:283-290.
- Rani, G. and I. S. Grover. 1999. *In vitro* callus induction and regeneration studies in *Withania somnifera*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 57:23-27.
- Roussos, P. A., A. Tolia-Marioli, C. A. Pontikis, and D. Kotsias. 1999. Rapid multiplication of Jojoba seedlings by *in vitro* culture. Plant Cell Tissue Organ Cult. 57:133-137.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, and H. S. Tsay. 2000. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medical plant genetic resource. p.171-187. in: Proceedings 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, Taiwan.
- Sahoo, Y. and P. K. Chand. 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. Plant Cell Rep. 18:301-307.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Inst., Cary, NC, USA. 943 pp.
- Sivaram, L. and U. Mukundan. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 39(P):520-523.
- Tsay, H. S. 1998. Effects of medium composition at different precultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in *in vitro* shoot proliferation. Acta Hortic. 461:243-249.
- 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.
- Upreti, J. and U. Dhar. 1996. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott — a leguminous liana. Plant Cell Rep. 16:250-254.
- 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. Ethnopharmacol. 34:155-165.

# Influence of Salt Strength, Sucrose, Auxins and Container Closure on Root Formation and Acclimation of *In Vitro Bupleurum kaoi* Plantlets<sup>1</sup>

Uei-Chern Chen<sup>2</sup>, Chi-Ni Hsia<sup>3</sup>, Mau-Shing Yeh<sup>4</sup> and Hsin-Sheng Tsay<sup>5,6</sup>

## Summary

Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004. Influence of salt strength, sucrose, auxins and container closure on root formation and acclimation of *in vitro Bupleurum kaoi* plantlets. *J. Agric. Res. China* 53:249-260.

An efficient protocol for producing high quality rooted plantlets which are easy to acclimatize for field growth was established for micropropagation of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. In this study, the medium containing half- and quarter- strength of MS basal salts (1/2MS and 1/4MS) and 3% (w/v) sucrose was found suitable for shoot survival and root formation of *in vitro B. kaoi* plantlets. A 100% root formation rate was obtained from *in vitro* shoots cultured on the medium containing half-strength MS salt, 0.5 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) without basal callus further induced. An increased survival rate for *in vitro* plantlets acclimation by using ventilative container closure of dispense paper to exchange the normal used aluminum foil after 2-3 weeks culturing in a total 6 weeks incubation span was achieved. Leaves of *in vitro* rooted plantlets were partial trimmed (3-4 cm remnant in length) and transplanted into BioMix: vermiculite: perlite = 1: 1: 1 (v/v) mixed substrate inside a transparent plastic box with cover. Boxes were put into a growth chamber under 22°C (14 h in light) / 18°C (10 h in darkness) environmental condition for 4 weeks acclimation. The best survival rate was 92% after 4 weeks of acclimation from plantlets previously cultured on half-strength MS medium containing with 0.5 mg/l IBA and 0.1-0.2 mg/l  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), in combination with changing aluminum foil with 3 layers of dispense paper as container closure after 2 weeks culturing. These results including *in vitro* treatment by modifying medium components and exchanging container closure for root formation and plantlets quality; *ex vitro* treatment by planting plantlets inside a transparent plastic box with cover for reducing transpiration would be useful for industrial production of *in vitro Bupleurum kaoi* plantlets.

**Key words:** *Bupleurum kaoi*, Medicinal plant, Rooting, Acclimation, Container closure.

1. Contribution No.2209 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 13, 2004.
2. Assistant Agronomist, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC. (PhD Candidate, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University.)
3. Associate Researcher, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
6. Corresponding author, e-mail: htsay@mail.cyut.edu.tw ; Fax: (04) 23742371.