

細胞分裂素與透氣性容器封口對丹參組培苗增殖與玻璃質化之影響¹

陳威臣² 蕭翌柱² 蔡新聲³ 夏奇鈺^{4,5}

摘要

陳威臣、蕭翌柱、蔡新聲、夏奇鈺。2005。細胞分裂素與透氣性容器封口對丹參組培苗增殖與玻璃質化之影響。台灣農業研究 54:93-102。

本研究藉由改善細胞分裂素與培養容器透氣性，探討丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)組培苗大量繁殖及抑制玻璃質化苗形成之方法。將丹參莖節培養於含有 1 mg/l 苄氨基嘌呤(benzyladenine, BA)與 0.1 mg/l 奈乙酸(α -naphthaleneacetic acid, NAA)之全量 MS (Murashige & Skoog)無基鹽類基本培養基中，可成功地誘導芽體形成及建立初代無菌丹參培養苗。無菌苗培養於添加 0.25 mg/l N-糠基腺嘌呤(N-furfuryladenine, kinetin)之全量 MS 基本培養基中，經 6 週培養後每個培植體可獲得 6.5 個芽體，優於 0.5 mg/l kinetin 與 0.5-1 mg/l BA 之處理，但所有處理之芽體均呈現玻璃質化。降低 MS 鹽類與 kinetin 濃度可部分改善玻璃質化苗的形成，其中以含有 0.2 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本培養基處理下，每個培植體可獲得 5.6 苗較多，但仍有高達 46.6%玻璃質化苗形成。利用透氣性較高之藥包紙進行培養容器封口置換處理，可有效抑制丹參組培苗之玻璃質化，其中以雙層鋁箔紙封口培養 2 週，而後以三層藥包紙進行封口置換處理繼續培養 4 週，每個芽體可獲得 4.8 株正常苗之表現最佳，不僅能完全抑制玻璃質化苗形成，且苗長可達約 4.78 cm。綜合本研究結果，建議丹參組培苗可利用含有 0.2 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本培養基進行組培苗增殖，同時配合上述培養方式之藥包紙進行培養容器封口置換處理，不僅可建立丹參組培苗大量繁殖方式，更可完全抑制組培苗玻璃質化的產生。

關鍵詞：丹參、藥用植物、微體繁殖、玻璃質化。

前言

丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)為唇形科(Labiatae)、鼠尾草屬多年生植物，其乾燥根部為治療「活血化瘀」之重要傳統中藥(那等 1989; Wu *et al.* 1998)。現代藥理研究亦證實丹參具有治療心血管疾病、降膽固醇、抗氧化、預防動脈硬化與抗菌消炎等作用，尤其對冠心病與心絞痛具有良好療效，晚近也

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2228 號。接受日期：94 年 7 月 17 日。
2. 本所農藝組助理研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
3. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
4. 本所農藝組副研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。
5. 通訊作者，電子郵件：hsia@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04) 233302806。

被用於治療慢性肝炎與肝硬化(王等 1998; 姜 1994; Hu *et al.* 1999); 此外, 陳&凌(1999)與 Park *et al.* (1999)指出, 丹參可抑制肝癌細胞生長, 顯示丹參於臨床治療上的潛能不容忽視。

利用植物組織培養技術可於短期內繁殖大量種苗, 且種苗一致性亦較種子繁殖為高; 目前已成功利用組培技術大量繁殖不少藥用植物種苗, 如金線連、柴胡、貝母、當歸、輪葉沙參、龍膽、何首烏與延胡索(蔡 1999; Nalawade *et al.* 2003; Nalawade & Tsay 2004; Nishioka 1988)。傳統丹參係利用分根或蘆頭法進行繁殖, 無性繁殖種苗繁殖速率慢且極易感染病毒, 因而造成作物品質變劣及藥材產量下降; 加上藥材市場上常以偽藥或次級品混充, 造成藥材品質難以均一(宋等 1998; 郭等 2002; 張等 2003)。現今臺灣之丹參藥材皆仰賴進口, 其藥材正確與品質穩定是使用上的最大疑點, 為開發臺灣自有丹參生藥資源, 利用組織培養技術大量繁殖組培苗實為當務之急。

以往組織培養大量繁殖過程中, 常因培養基所含成份或培養容器內高相對濕度, 致使組培苗產生玻璃質化(hyperhydricity, vitrification)(陳等 1998; Paques 1991; Tsay 1998)。然而, 藉由透氣性容器封口以降低瓶內相對濕度, 不僅有效抑制康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)組培苗之玻璃質化(陳等 1998), 亦能夠提升高氏柴胡(*Bupleurum kanoi*)組培苗之出瓶成活率(陳等 2004b)。本研究為建立可行且實用之丹參組培苗生產體系, 首先建立丹參無菌組培苗培養, 而後針對影響微體大量繁殖之植物生長調節劑進行探討, 同時改善大量繁殖過程中組培苗所產生之玻璃質化問題, 以及提高組培苗之出瓶移植成活率, 若能夠配合將來之優良農業規範(good agricultural practice, GAP)生產制度, 期能有利於臺灣中草藥產業原物料品質的提昇。

材料與方法

丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)植株由中國醫藥大學中藥資源學系陳忠川教授提供, 栽培於行政院農委會農業試驗所生長箱。本研究使用之基本培養基含有 3%蔗糖、0.9% Difco Bacto-agar、全量 MS (Murashige & Skoog 1962)無機鹽類及維生素。培養基於加入凝膠物質前以 0.1~1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調至 5.7±0.1, 以 121°C、15 lb/in² (1.05 kg/cm²)進行高溫高壓滅菌 15 分鐘後冷卻備用。培植體接種後置於 25±1°C 恆溫、照光(約 38 μmol/m²/s) 14 小時環境下培養。無菌組培苗之建立與增殖試驗是以玻璃試管(20 mm x 120 mm, Pyrex, 日本)進行, 而封口置換處理試驗則利用 125 ml 三角瓶(Pyrex, 日本)作為培養容器。

丹參無菌組培苗之建立

切取帶有腋芽之丹參莖節(長約 0.7 cm)作為培植體, 以 0.5%次氯酸鈉溶液合併超音波震盪器消毒 10 分鐘, 經無菌水洗滌 3-4 次後, 培植體置於含有 1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 之 MS 基本培養基中培養。無菌丹參苗繼代培養於含有 0.25 mg/l kinetin 之 MS 基本培養基進行增殖作為後續試驗之材料。

BA 與 kinetin 對組培苗增殖與生長之影響

將長約 1.5 cm 的丹參組培苗除去部分葉片後, 培養於添加 BA (0.05 與 0.1 mg/l)或 kinetin (0.25 與 0.5 mg/l)之 MS 基本培養基, 培養 6 週後調查苗高、苗數及玻璃質化苗數。

Kinetin 對組培苗增殖與生長之影響

同上所述之丹參組培苗於含有 0、0.05、0.1 及 0.2 mg/l kinetin 之半量 MS 無基鹽類之基本培養基中培養, 培養 6 週後調查苗高、苗數及玻璃質化苗數。

培養容器覆蓋物置換處理對組培苗增殖與生長之影響

同上所述之丹參組培苗培養於含有 0.2 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本培養基, 培養容器分別以透氣性較低之鋁箔紙(aluminum foil, AF)雙層或以透氣性較高之藥包紙(dispense paper, DP) [9.5 x 9.5 x 0.046

cm，正隆，臺灣]三層作為封口，兩處理間透氣率差異依據賴等(1999)試驗結果顯示，每小時氣體交換率(changes/h)分別為 0.27 與 0.92，顯示兩處理透氣率存在相當大的差異。置換處理包括全程 6 週均以鋁箔紙(AF6)或藥包紙(DP6)作為封口，以及先利用鋁箔紙封口培養 2 或 4 週後，將鋁箔紙置換成藥包紙封口繼續分別培養 4 及 2 週，處理代號分別以 AF2+DP4 與 AF4+DP2 表示。培養 6 週後調查瓶苗高度、苗數及玻璃質化苗數。

上述各試驗所調查之苗數係指苗長大於 1 cm 之組培苗，玻璃質化苗則是以葉片外觀呈水浸狀為依據。增殖試驗採 4 重複，每重複培養 10 株組培苗；封口置換處理試驗則是 4 重複，每重複培養 9 株組培苗；瓶苗高度以 4 重複，每重複調查 15 株組培苗。試驗所得資料經 SAS 8.02 (SAS Institute Inc. 2001)套裝統計分析軟體進行 ANOVA 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 test, LSD test)比較各處理平均值間之差異。

結 果

無菌丹參組培苗之建立

丹參原植物(圖 1A)之莖節培養於含有 1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 之 MS 基本培養基中，經 8 週後可產生大量芽體(圖 1B)。將長約 1.5 cm 之無菌苗繼代培養於含有 0.25 mg/l kinetin 之 MS 基本培養基，作為丹參組培苗增殖試驗之用。

BA 與 kinetin 對丹參組培苗增殖之影響

添加不同濃度 BA 或 kinetin 之 MS 基本培養基處理對組培苗增殖之結果如表 1 與圖 1C 所示，以 0.25 mg/l kinetin 處理下每個培植體可獲得 6.5 苗的增殖效果最佳，其次為 0.5 mg/l kinetin 處理時每個培植體可獲得 5.8 苗，而 0.05 與 0.1 mg/l BA 處理之效果較差，每個培植體分別可獲得 5 及 4.3 苗。若以苗長大於 2 cm 之芽體數而言，仍以 0.25 mg/l kinetin 處理獲得 2.5 苗之結果最佳。然而觀察本試驗所有處理所得之組培苗均呈現不同程度之水浸狀葉片，亦即在此培養條件下，丹參組培苗有玻璃質化之現象。

Kinetin 對丹參組培苗增殖之影響

為改善上述試驗組培苗之玻璃質化，除降低培養基之鹽類濃度外，亦同時將 kinetin 濃度降低，期能達到抑制玻璃質化苗形成之效果。結果如表 2 與圖 1D 所示，在測試之三種濃度中，以 0.2 mg/l kinetin 處理於培養 6 週後，每個培植體分別可產生 3 株正常苗及 2.6 株玻璃質化苗表現最佳，但玻璃質化苗比例仍高達 46.6%；0.05 與 0.1 mg/l kinetin 處理之正常苗數分別為 2.2 與 2.3 苗，而不含 kinetin 之對照組效果最差，僅形成 1.7 正常苗，而 0、0.05 與 0.1 mg/l kinetin 三處理之玻璃質化苗比率則分別為 45.4、52.4 與 51.1%。此試驗結果顯示，降低培養基之鹽類濃度雖可部份改善玻璃質化，但 kinetin 濃度並非影響玻璃質化苗形成之因子，因此採用下列方式以減少玻璃質化苗之產生。

培養容器封口置換處理對丹參組培苗玻璃質化之影響

本試驗主要利用透氣較高之藥包紙替代一般培養所使用之密閉性較高的鋁箔紙作為培養容器封口，藉由封口物提高培養容器之通氣性以降低瓶內之相對濕度，期能降低玻璃質化苗之形成率。試驗結果如表 3 及圖 2 所示，瓶苗增殖總數以全程鋁箔紙封口培養(AF6)之 5.2 苗與 AF2+DP4 處理之 4.8 苗最佳，其次是形成 4.0 苗之 AF4+DP2 處理，但上述三處理間並無顯著差異存在；而全程以藥包紙封口培養之 DP6 處理的瓶苗增殖效率最差，僅獲得 3.4 苗。但就玻璃質化苗形成之比例而言，AF6 處理仍有 64%之玻璃質化苗產生，其餘配合藥包紙封口培養不同時間之 AF4+DP2、AF2+DP4 與 DP6 三

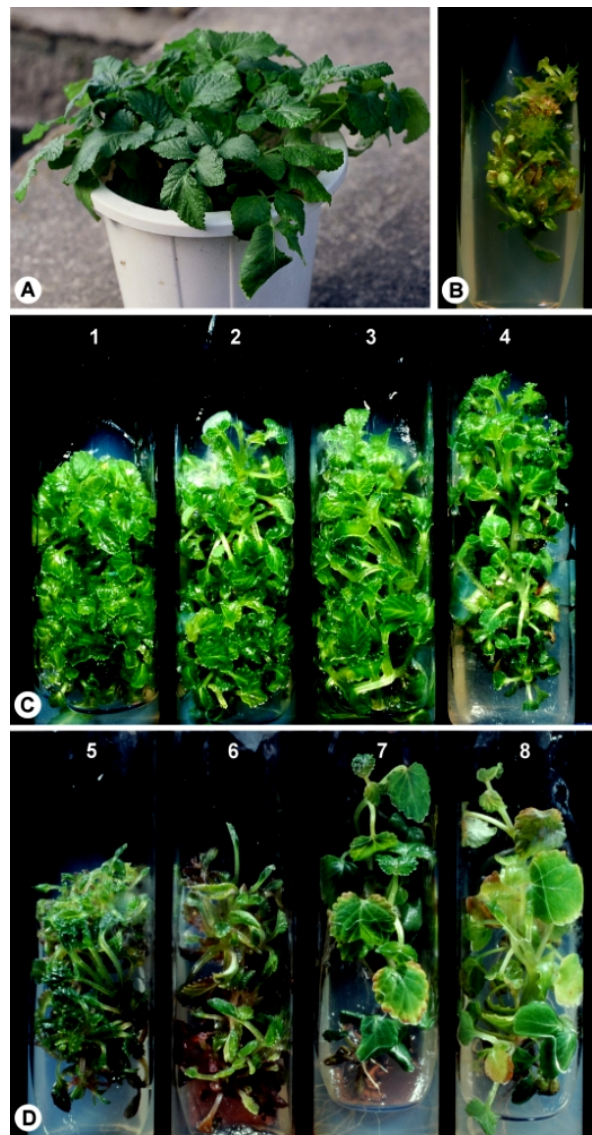


圖 1. 丹參培植體來源、無菌組培苗建立與組培苗增殖之情形。栽培於農業試驗所植物生長箱之丹參原植株(A)；莖節培養於含有 1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 之基本培養基，經培養 8 週後之生長情形(B)；丹參組培苗培養於添加 BA (0.1 與 0.05 mg/l) (1, 2) 及 kinetin (0.5 與 0.25 mg/l) (3, 4) 之 MS 培養基(C)；以及添加 kinetin (0.2、0.1、0.05 與 0 mg/l) (5, 6, 7, 8) 之 1/2 MS 培養基(D) 經培養 6 週後之組培苗增殖情形。

Fig. 1. Explant source, aseptic shoot culture establishment and shoot proliferation of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza* cultured for 6 weeks of culture. Growth of *S. miltiorrhiza* plant maintained at growth chamber in Agricultural Research Institute (ARI) (A); Adventitious buds derived from nodal segment on a full-strength MS basal medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA for 8 weeks culturing (B); Multiple shoots were obtained on a full-strength MS basal medium containing 0.1, 0.05 mg/l BA (1, 2) and 0.5, 0.25 mg/l kinetin (3, 4) (C), and on a half-strength MS basal medium containing 0.2, 0.1, 0.05 and 0 mg/l kinetin (5, 6, 7, 8), respectively (D).

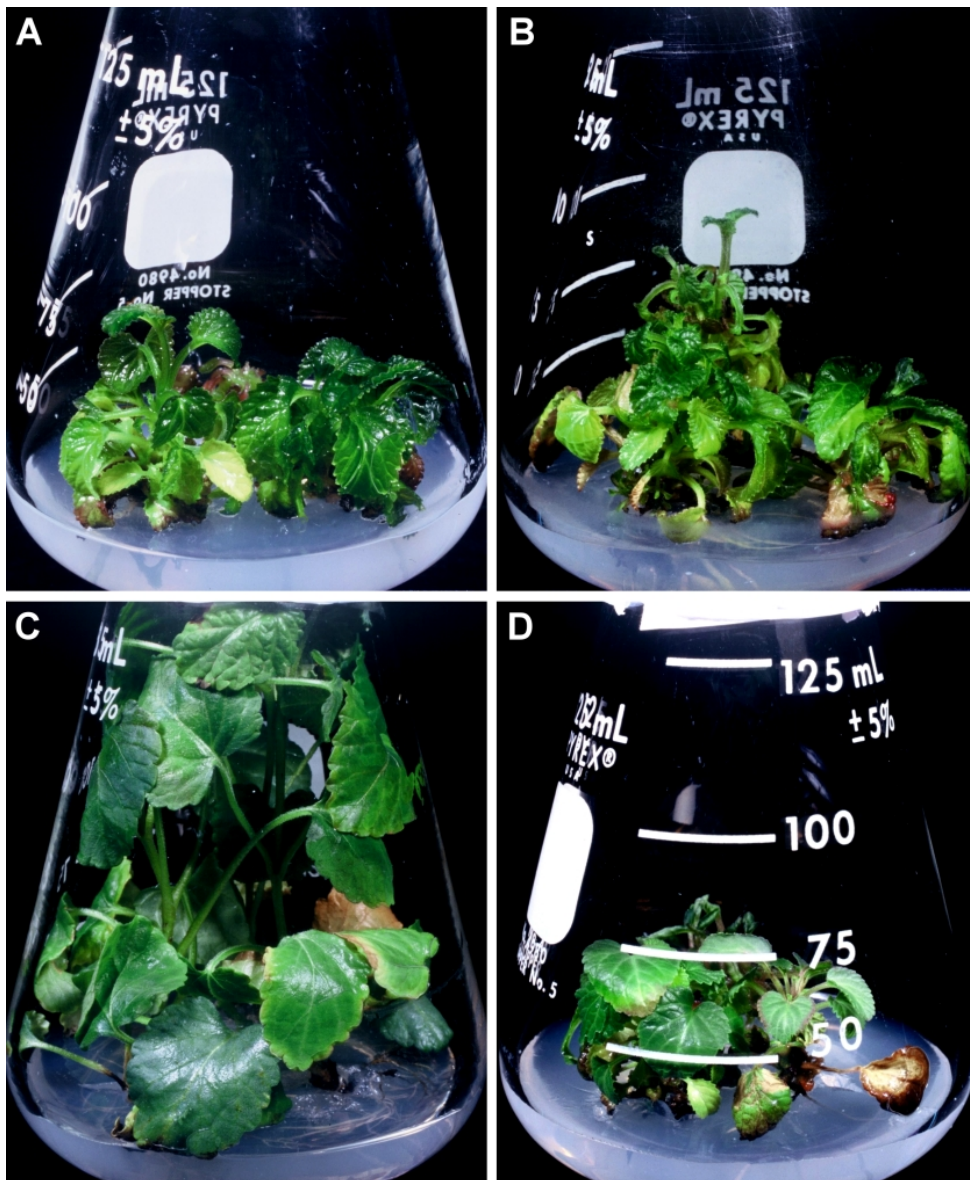


圖 2. 培養容器封口置換處理對丹參組培苗增殖與生長之影響。丹參組培苗培養於添加 0.2 mg/l kinetin 之 1/2 MS 基本培養基使用雙層鋁箔紙覆蓋培養 6 週(AF6) (A)；在使用雙層鋁箔紙覆蓋培養 4 週後，再以三層藥包紙覆蓋培養 2 週 (AF4+DP2) (B)；以雙層鋁箔紙封口培養 2 週後，再以三層藥包紙置換培養 4 週(AF2+DP4) (C)；以三層藥包紙覆蓋培養 6 週(DP6) (D)。

Fig. 2. Influence of container closure on *in vitro* shoot proliferation and growth of *Salvia miltiorrhiza*. Multiple shoots grew on a half-strength MS basal medium containing 0.2 mg/l kinetin by using 2 layers aluminum foil as container closure for 6 weeks of culture (AF6) (A); Using 2 layers of aluminum foil as container closure for 4 and 2 weeks, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for extending 2 and 4 weeks of culture, respectively (AF4+DP2, AF2+DP4) (B, C); Using 3 layers of dispense paper as container closure for 6 weeks of culture (DP6) (D).

表 1. 細胞分裂素對丹參組培苗增殖與生長之影響

Table 1. Influence of cytokinins on shoot proliferation and growth of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza*^z

Cytokinin (mg/l)		No. of shoots produced per explant ^y		
Kinetin	BA	Total shoots	Shoot length between 1 and 2 cm	Shoot length longer than 2 cm
0.25	0	6.5 ± 0.42 a	4.1 ± 0.34 a	2.4 ± 0.49 a
0.5	0	5.8 ± 0.61 ab	4.1 ± 0.69 a	1.7 ± 0.14 ab
0	0.05	5.0 ± 0.57 bc	3.6 ± 0.46 a	1.4 ± 0.27 bc
0	0.1	4.3 ± 0.44 c	3.3 ± 0.17 a	1.0 ± 0.27 c

^z *In vitro* shoots about 1.5 cm in length were cultured on full-strength MS basal medium containing various concentration of kinetin and BA.

^y Forty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 weeks of culture and shoots length smaller than 1 cm 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. Kinetin 對丹參組培苗增殖與生長之影響

Table 2. Influence of kinetin concentration on shoot proliferation and growth of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza*^z

Kinetin (mg/l)	No. of shoots produced per explant ^y			Percentage of hyperhydric shoots (%)
	Total shoots	Normal shoots	Hyperhydric shoots	
0	3.1 ± 0.27 c	1.7 ± 0.18 c	1.4 ± 0.16 b	45.4 ± 3.28 b
0.05	4.7 ± 0.30 b	2.2 ± 0.14 b	2.5 ± 0.17 a	52.4 ± 1.01 a
0.1	4.6 ± 0.25 b	2.2 ± 0.13 b	2.4 ± 0.13 a	51.1 ± 0.72 a
0.2	5.6 ± 0.28 a	3.0 ± 0.19 a	2.6 ± 0.21 a	46.6 ± 2.64 b

^z *In vitro* shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS basal medium containing various concentrations of kinetin for 6 weeks of culture.

^y Same as Table 1.

處理均無玻璃質化苗形成。若以苗長而言，則以 AF2+DP4 處理達 4.78 cm 之生長最佳，其餘 AF6、AF4+DP2 與 DP6 等三個處理之苗長介於 1.83-2.12 cm 之間。

討 論

前人研究指出，莖節與側芽是組培大量繁殖之最佳培植體，例如長春花(*Catharanthus roseus*) (Aien & Jain 1997)、臺灣龍膽(*Gentiana davidii* var. *formosana*) (Chueh *et al.* 2000)、高氏柴胡(*Bupleurum koai*) (陳等 2004c) 與海芙蓉(*Limonium wrightii*) (Huang *et al.* 2000)等重要藥用植物。本研究利用取得較為容易之丹參腋芽莖節作為培植體，培養於添加 1 mg/l BA 配合 0.1 mg/l NAA 之 MS 基本培養基，可直接誘導腋芽生長並增殖大量芽體，建立丹參無菌組培苗初代培養(圖 1B)。

種苗大量繁殖是組織培養商業生產上極為重要的一環，常利用高濃度細胞分裂素(cytokinins)或液態培養方式，以求達到芽體大量增殖與加速生長之目的，而為防止污染及水分喪失，培養容器則以低透氣性封口材質(如鋁箔紙)加以密封，在此高 cytokinins 濃度與高相對溼度的生長條件下，組培苗葉片常可觀察到如水浸狀的玻璃質化徵狀，此玻璃質化苗在出瓶移植後之成活率極低，是組織培養大量繁殖上亟待解決的問題(陳等 2004a；George 1993；Paques 1991；Tsay 1998)。Tsay (1998)於康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)莖頂培養時，發現使用 BA 易使芽體產生玻璃質化，且濃度愈高情形愈嚴重。

本研究結果顯示，添加 BA (0.05 與 0.1 mg/l) 或 kinetin (0.25 與 0.5 mg/l) 之 MS 基本培養基雖可大量繁殖丹參組培苗，然而全部組培苗均形成玻璃質化，其中又以 BA 處理較為嚴重，且苗長大於 1 cm 之芽數也較低，並不有利於後續組培苗之增殖(表 2、圖 1C)；此外，組培苗培養於含有 0.2 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本培養基雖可降低玻璃質化苗比率，但其繁殖率均較 BA (0.05 或 0.1 mg/l) 與 kinetin (0.25 或 0.5 mg/l) 處理為低，而本試驗之 0.2 mg/l kinetin 處理所得芽體總數與正常苗數則較其餘處理高(表 3、圖 1D)。綜合上述結果顯示，降低 MS 與 kinetin 濃度雖可部分抑制丹參玻璃質化組培苗形成，但仍有約 45-53% 組培苗形成玻璃質化，顯示仍須利用其他方法以改善此一嚴重問題。

改善瓶內相對濕度可利用於瓶內馴化的操作，提高組培苗之出瓶成活率，減少組培苗商業生產損失，因此結合組織培養與環控技術而進行瓶內馴化是頗值得研究的課題，而如何控制玻璃質化且又不影響增殖效率則是另一研究重點(陳等 2001)。利用高透氣性培養容器封口以降低瓶內環境的相對濕度，不僅能有效抑制玻璃質化苗產生，更可增加玄參(*Scrophularia yoshimurae*) (Lai *et al.* 2005) 與康乃馨(陳等 1998) 組培苗品質。利用通氣處理可抑制滿天星(*Gypsophila paniculata*) 玻璃質化組培苗發生，但瓶苗生長則同時受到抑制(Dillen & Buysens 1989)。顯然通氣處理有助於改善瓶苗之玻璃質化，但過度通氣則易對瓶苗生長造成負面的影響。此一瓶苗生長增殖受抑制之情形，可能與通氣處理改變瓶內環境，如 CO₂、O₂ 與乙烯(ethylene) 氣體組成及水分可利用性等重要因子，導致植體生長分化受阻有關(朱 1993；陳等 2001；Lai *et al.* 1998)。本研究也有相似結果指出，藉由透氣性較高的藥包紙作為培養容器封口，雖可完全抑制丹參組培苗玻璃質化，但如處理時間過長亦會造成組培苗增殖效率的降低(表 3)。因此利用藥包紙為培養容器封口，可有效改善瓶內高相對濕度以減少組培苗玻璃質化，如能配合適當處理時間更可兼顧組培苗之繁殖率與品質，尤其藥包紙之通氣量可藉由調整使用層數加以控制，應可提供其他易產生玻璃質化組培苗作物培養之參考。

綜合上述研究結果顯示，藉由莖節培養可建立無菌丹參組培苗初代培養，組培苗培養於含有 0.2 mg/l kinetin 之 1/2MS 基本培養基，並配合以藥包紙替代透氣性較差之鋁箔紙封口且培養適當時程，可維持相當繁殖率並提高優質丹參組培苗形成數。此外，有關丹參組培苗之發根與馴化相關生產體系建立的研究，將另為文述之。

表 3. 透氣性容器封口與其處理時間對丹參組培苗增殖與生長的影響

Table 3. Influences of ventilating container closure on shoot proliferation and growth of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza*^z

Treatment ^y	No. of shoots produced per explant ^x			Length of normal shoots ^x (cm)
	Total shoots	Normal (%)	Hyperhydric (%)	
AF6	5.2 ± 0.16 a	36 ± 1.0	64 ± 1.0	2.12 ± 0.08 b
AF4 + DP2	4.0 ± 0.29 ab	100 ± 0.0	0 ± 0.0	1.83 ± 0.03 c
AF2 + DP4	4.8 ± 0.21 a	100 ± 0.0	0 ± 0.0	4.78 ± 0.11 a
DP6	3.4 ± 0.03 c	100 ± 0.0	0 ± 0.0	2.05 ± 0.11 b

^z *In vitro* shoots about 1.5 cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0.2 mg/l kinetin for 6 weeks of culture.

^y AF6 and DP6: Using 2 layers of aluminum foil (AF) or 3 layers of dispense paper (DP) as container closure for 6 weeks of culture, respectively; AF4 + DP2 and AF2 + DP4: Using 2 layers of aluminum foil as container closure for 4 and 2 weeks of culture, then exchanging container closure with 3 layers of dispense paper for the rest 2 and 4 weeks of culture, respectively.

^x Thirty-six explants were tested for shoot production and length of sixty shoots were recorded per treatment and the data was collected after 6 weeks culturing. Means within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

引用文獻

- 王康才、羅慶雲、陳紅霞。1998。丹參癒傷組織中次生代謝產物形成的研究。中國中藥雜誌 23: 592-594。
- 朱建鏞。1993。花卉微體繁殖之馴化。p. 83-96。園藝作物生產與發展研討會專集。國立中興大學。臺中。
- 宋經元、張蔭麟、祁建軍。1998。丹參的生物技術。天然產物研究與開發 11: 86-89。
- 那琦、謝文全、李一宏。1989。重輯嘉祐補註神農本草。私立中國醫藥學院中國藥學研究所。臺中。197 pp。
- 姜廣奮。1994。丹參組織和細胞培養研究概況。中草藥 25: 156-157。
- 張躍非、雷家谷、代其林。2003。丹參的組織培養及快速繁殖。植物生理學通訊 39: 139。
- 郭寶林、馮毓秀、趙楊景。2002。丹參種質資源研究進展。中國中藥雜誌 27: 492-495。
- 陳威臣、夏奇鈺、葉茂生、蔡新聲。2004a。植物組織培養苗玻璃質化與低木質化作用關聯性之探討。科學農業 52: 90-96。
- 陳威臣、夏奇鈺、葉茂生、蔡新聲。2004b。鹽類濃度、蔗糖、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。
- 陳威臣、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、葉茂生、蔡新聲。2004c。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、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。
- 陳堅、凌昌全。1999。丹參與肝癌防治。中草藥 30: 226-228。
- 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)。台灣省農業試驗所。台中。
- 賴建洲、楊智凱、蔡新聲、陳威臣。1999。組織培養瓶不同封口材質透氣率之研究。p. 185-186。農業機械論文發表會摘要集。中華農業機械學會。臺北。
- Alen, K. H. and S. M. Jain. 1997. *In vitro* multiplication of *Catharanthus roseus*. Acta Hort. 447: 167-169.
- 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.
- Dillen, W. and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L.. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19: 181-188.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture, Part 1. The technology. England: Exegetics Ltd. 574 pp.
- Hu, Z. B., D. Liu, and A. W. Alfermann. 1999. Genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*. p.249-260. in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 45, Transgenic Medical Plants (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 ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf- and inflorescence-node explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36(P): 220-224.

- Lai, C. C., T. A. Yu, S. D. Yeh, and J. S. Yang. 1998. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 53: 221-225.
- Lai, C. C., H. M. Lin, S. M. Nalawade, W. Fang, and H. S. Tsay. 2005. Hyperhydricity in shoot culture of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *J. Plant Physiol.* 162: 355-361.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nalawade, S. M. and H. S. Tsay. 2004. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 40(P): 143-154.
- Nalawade, S. M., A. P. Sagare, C. Y. Lee, C. L. Kao, and H. S. Tsay. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 79-98.
- 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 Hortic.* 289: 283-290.
- Park, S., J. S. Song, D. K. Lee, and C. H. Yang. 1999. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth inhibition. *Bull. Korean Chem. Soc.* 20: 925-928.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Inst., Cary, NC, USA. 943 pp.
- 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.

Influence of Cytokinin and Ventilating Container Closure on Shoot Proliferation and Hyperhydricity of *In Vitro Salvia miltiorriza* Culture¹

Uei-Chern Chen², Yih-Juh Shiau², Hsin-Sheng Tsay³ and Chi-Ni Hsia^{4,5}

Summary

Chen, U. C., Y. J. Shiau, H. S. Tsay, and C. N. Hsia. 2005. Influence of cytokinin and ventilating container closure on shoot proliferation and hyperhydricity of *in vitro Salvia miltiorriza* culture. J. Taiwan Agric. Res. 54:93-102.

In vitro shoot multiplication of *Salvia miltiorriza* Bunge using nodal segment explants has been investigated in this study. Aseptic shoots were established on a full-strength MS medium containing 1 mg/l benzyladenine (BA) and 0.1 mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA) for shoot multiplication. In the cytokinin for shoot multiplication experiment, among the concentrations of BA (0.05, 0.1 mg/l) and kinetin (0.25, 0.5 mg/l) tested, the highest shoot multiplication (6.5 shoots per explant) was achieved in the medium containing 0.25 mg/l kinetin after 6 weeks of culture. Nevertheless, hyperhydric shoots were found for all cytokinin treatments. In order to improve the hyperhydricity disorder for *in vitro* shoot proliferation of *S. miltiorriza*, a medium with half-strength MS basal salts and lower concentration of kinetin was used for subsequent experiment. The highest normal shoots (3.0 per explant) were obtained from the 0.25 mg/l kinetin treatment along with a 46.6% hyperhydricity. Using the dispense paper instead of aluminum foil as container closure improved ventilation and reduced hyperhydricity in shoot cultures. Both the highest normal shoots (4.8 per explant) and the longest shoot length (4.78 cm) were obtained in the treatment using aluminum foil as container closure for the first 2 weeks of culture, then exchanging with dispense paper for the rest 4 weeks of culture. In conclusion, an *in vitro* shoot proliferation system for *S. miltiorriza* was established by culturing shoots in the medium containing half-strength MS basal salts and 0.2 mg/l kinetin. However, using ventilating dispense paper as container closure for certain culturing period was beneficial to overcome the hyperhydric disorder in shoot cultures.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*, Medicinal herbs, Micropropagation, Hyperhydricity, Ventilating container closure.

-
1. Contribution No.2228 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 17, 2005.
 2. Assistant Agronomist, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Associate Researcher, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 5. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04) 23302806.