

利用組織培養技術生產高氏柴胡優質種苗方法簡介

農試所生技組 陳威臣 夏奇銳

中興大學退休教授 葉茂生

朝陽科技大學講座教授 蔡新聲

一、前言

柴胡 (Chai-Hu, 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，廣泛利用於台灣、日本、韓國及中國等地區；中國藥典所列正品柴胡為柴胡屬 (*Bupleurum*) 之北柴胡 (*B. chinense*) 與南柴胡 (*B. scorzonerifolium*)，日本則以三島柴胡 (*B. falcatum*) 為正品。台灣特有高氏柴胡 (*B. kaoi Liu, Chao et Chuang*) 之柴胡皂苷含量及其保肝效果業經證實優於北柴胡與三島柴胡。近年來，許多團隊積極針對柴胡進行治病機制探討，證實具優異的保肝、抗B型肝炎病毒、抗氧化、消炎、促進腸蠕動與抑制癌細胞增生效果，在現代醫藥學的重要性與日俱增。高雄醫學大學研究團隊指出，高氏柴胡萃取物與BK-2成分具有預防與治療C型肝炎效果，且具有廣效性抗病毒功能，該研究

成果更獲得2013年國家新創獎肯定。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，因而造成繁殖上的困擾。本文將介紹利用組培技術生產高氏柴胡種苗之方法供讀者參考。

二、組織培養種苗大量繁殖

(一) 無菌培植體建立與芽體增殖

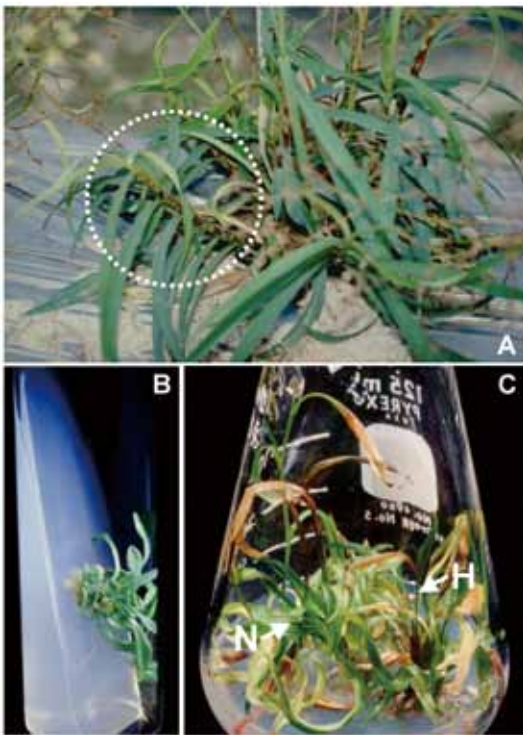
由田間植株採取新生腋芽 (圖一A) 經0.5% NaOCl進行15分鐘除菌處理後，培養於含1 mg/L 苯基腺嘌呤 (N6-benzyladenine, BA) 配合0.1 mg/L 萘乙酸 (α -naphthaleneacetic acid, NAA) 之1/2MS培養基，可建立高氏柴胡之無菌培養 (圖一B)。將此無菌苗培養於添加0.25 mg/L BA之1/2MS培養基可達大量繁殖的目的，然而卻導致玻璃質化苗 (H: hyperhydric plantlet) 形成 (圖一C)。若以化學方式解決玻璃質化問題，亦即將組培苗培養於含0-0.8 mg/L 激動素 (6-furfurylaminopurine, kinetin) 之1/2MS

作者：陳威臣助理研究員
連絡電話：04-23317326

培養基，雖然可以抑制玻璃質化苗產生，但其繁殖倍率較BA (0.25-2 mg/L) 處理為低，而且品質也不盡理想。

(二) 抑制玻璃質化組培苗產生之方法

組織培養技術已經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常造成嚴重成本負擔。前人研究結果顯示，瓶苗因培養於相對濕度極高的瓶內環境，葉片常出現缺乏表皮蠟質、外觀異常與較高氣孔密度等現象，同時存在著植物代謝及生理功能異常，而這些外觀與生理異常組培苗的出瓶存活率



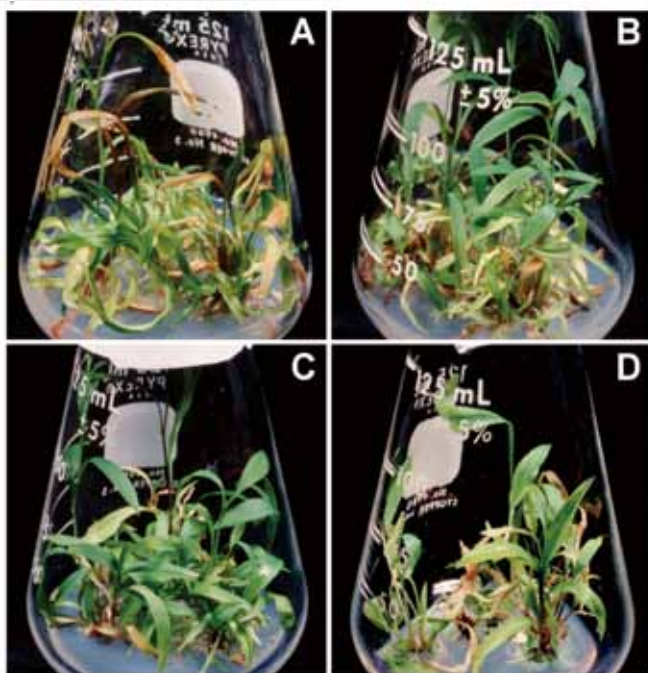
圖一、高氏柴胡組織培養微體繁殖之建立。A 田間植株新生側芽作為培植體；B 無菌組培苗初代培養；C 將芽體繼代培養於添加0.25 mg/L BA之1/2MS培養基可達大量繁殖的目的，但會產生玻璃質化苗 (N：Normal plantlet，正常苗；H：Hyperhydric plantlet，玻璃質化苗)。

也較低。利用透氣封口改善培養瓶內相對濕度，可明顯抑制瓶苗玻璃質化現象而提升高氏柴胡組培苗種苗品質，而透氣培養處理時間的長短則是控制組培苗品質的重點 (圖二)。

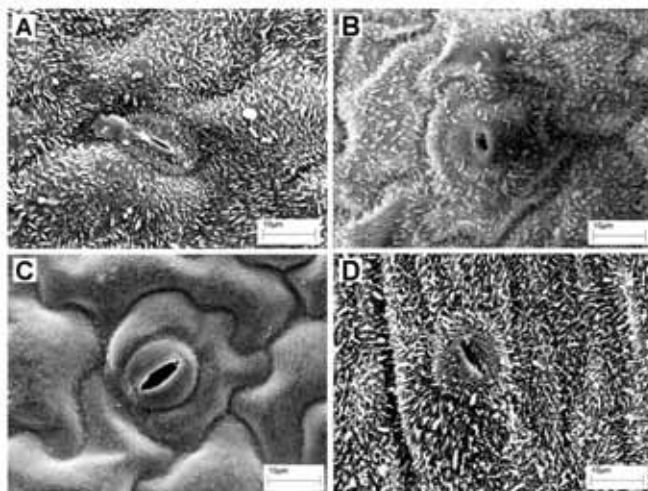
利用掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 觀察馴化成活植株 (圖三A)、氣密性較高的鋁箔紙封口處理6週 (圖三C) 與利用鋁箔紙封口處理2週後再以透氣性較高的藥包紙封口處理4週 (圖三B、三D) 等三種處理的葉片，結果顯示三種處理的葉表蠟質累積有著相當明顯差異；此外，溫室植株與藥包紙封口處理的組培苗葉片都可以觀察到氣孔關閉 (圖三A、三D) 的現象，而鋁箔紙封口處理的葉片並沒有觀察到關閉的氣孔 (圖三C)，因此推論鋁箔紙封口處理之葉片氣孔並不具有正常氣孔關閉的功能。由於溫室生長植株的葉片較類似於藥包紙封口處理的葉片，但卻有別於鋁箔紙封口處理的葉片，顯然利用透氣性較高的藥包紙置換處理，可以改善瓶內相對濕度環境而使得組培苗生長趨於正常。鋁箔紙封口處理的高氏柴胡組培苗之出瓶馴化存活率較低，其原因可能與其氣密性與瓶內相對濕度較高，導致組培苗葉片缺乏表皮蠟質與氣孔喪失功能有關。

(三) 組培苗發根、出瓶馴化與組培苗田間栽培

利用透氣性較高之藥包紙做為培養容器封口，雖然可以有效提升高氏柴胡組培苗的品質，但是其出瓶移植存活率



圖二、培養容器封口及其培養時間對高氏柴胡組培苗生長與增殖之影響。A 氣密性較高的鋁箔紙封口培養6週；B 鋁箔紙封口培養4週後換成透氣性較高的藥包紙封口再培養2週；C 鋁箔紙封口培養2週後換成透氣性較高的藥包紙封口再培養4週；D 藥包紙封口培養6週。



圖三、高氏柴胡瓶苗與植株葉片氣孔的掃描式電子顯微鏡觀察結果。A. 溫室生長植株葉片之表皮蠟質累積與氣孔關閉之情形；B、D. 鋁箔紙封口培養2週後換成透氣性較高的藥包紙封口再培養4週之組培苗葉片之表皮蠟質累積與氣孔開啟與關閉之情形，B與D分別為葉片切離後5分鐘與30分鐘之觀察結果；C. 氣密性較高的鋁箔紙封口培養組培苗葉片之無表皮蠟質累積與氣孔開啟之情形。

仍然偏低，進一步利用植物生長調節劑組合促進發根，用以提昇高氏柴胡組培苗移植存活率。組織培養研究常以單一生長素 (auxin) 促進組培苗發根，前人研究指出兩種auxins合併使用對於某些作物的組培苗發根更具有優異效果，其中利用NAA配合吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA) 的組合可獲得最佳發根效果。高氏柴胡的研究結果顯示，添加NAA具有增粗根徑的效果，但濃度過高也會造成發根率降低與基部癒合組織化 (basal callusing) 的現象，而添加適量IBA則是可以增加根數與提高移植存活率。

將高氏柴胡組培苗培養於含有適量IBA與NAA之1/2MS培養基，培養期間將鋁箔紙換成藥包紙封口後再進行培養一段時間，如此處理後可形成根徑較粗之優質組培苗。將出瓶苗除去部分葉片後呈現長約3~4 cm的組培苗，種植於泥炭土、蛭石及珍珠石之等體積混合的無菌介質，育苗盤放入有蓋透明塑膠盒後，培養於日夜溫為22°C(10h)/18°C(14h)、光照(約60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)的生長箱內進行馴化處理，結果顯示0.5mg/L IBA添加0.1~0.2mg/L NAA的處理可以提昇高氏柴胡組培苗發根與移植存活率；然而，瓶苗

於移植4週後存活率雖達92%，而8週後卻降至60%，顯然高氏柴胡組培苗馴化處理方式仍具有改進空間。

利用更換培養容器封口而改善瓶內相對濕度所生產的優質組培苗（圖四A），配合組培苗出瓶後利用有蓋透明塑膠盒與生長箱培養的馴化處理（圖四B），有助於促進組培苗的移植存活率；成活小苗再經過假植於較大盆器栽培3個月後（圖四C），即可移至田間栽培（圖四D、四E）。

(四) 柴胡皂苷含量分析比較

將細、粗不同等級之柴胡市場品（北柴胡根部）（圖五A、五B）、高氏柴胡種子實生苗與組織培養苗於田間栽培達18個月之根部樣品（圖五E、五F），利用高效液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 的方法，進行各個樣品之柴胡皂苷 (saikosaponin) 含量分析，結果

顯示高氏柴胡組培苗來源植株之柴胡皂苷單位含量16mg/g dry wt為最高，次高



圖四、高氏柴胡組培苗之馴化與田間栽培過程。A. 發根組培苗 (bar = 2 cm)；B. 組培苗於有蓋透明塑膠盒之馴化處理情形 (bar = 5 cm)；C. 假植達3個月之植株生長情形 (bar = 10 cm)；D、E. 田間栽培1個月與12個月之植株生長情形 (bar = 20 cm)。

表一、柴胡市場品藥材、高氏柴胡種子苗及組培苗田間栽培植株柴胡皂苷含量分析

樣品 ^z	柴胡皂苷含量 (mg/g dry wt) ^y			
	SSa	SSc	SSd	SSa+SSc+SSd
市售柴胡藥材-北柴胡乾燥根部				
1.較粗的柴胡藥材	3.19 ± 0.255 b ^y	1.00 ± 0.176 a	3.75 ± 0.158 c	7.94
2.較細的柴胡藥材	4.99 ± 0.432 a	0.92 ± 0.042 a	4.32 ± 0.505 c	10.23
高氏柴胡乾燥根部				
3.植株來自種子苗	3.37 ± 0.137 b	0.28 ± 0.013 b	10.06 ± 1.351 b	13.71
4.植株來自組培苗	3.39 ± 0.286 a	0.30 ± 0.032 b	12.32 ± 0.475 a	16.01

^z 1, 2: 柴胡藥材市售品 (北柴胡乾燥根部)。3, 4: 高氏柴胡實生苗與組培苗經過田間栽培18個月之植株樣品。

^y 每一樣品進樣3次 (每次10 ml)，平均值 (Mean ± SE) 經最小顯著差異檢定 (LSD test) 未達5%差異者，在同一欄位標示相同字母，兩樣品被視為沒有顯著差異。

者為實生苗來源植株的13.7mg/g dry wt，最低者為柴胡市場品，其柴胡皂苷單位含量分別約為7.9與10.2mg/g dry wt（表一）。

三、結語

柴胡不僅為重要之傳統中藥，且在現代醫藥學的重要性與日俱增，近年來食品安全問題層出不窮，植物藥材也常

常被檢驗出重金屬污染、農藥殘毒與細菌感染等問題，其品質的不穩定常造成消費者很大困擾；各國政府為了維護其民眾使用植物性藥物的安全性，均實行層層把關以確保無污染藥材。

在建構優質藥材生產體系中，原物料栽培之優良農業規範 (Good Agricultural Practice ; GAP) 建立非常重要，就組織培養種苗生產而言，除了可於短期內獲得生長均一種苗，更可方便日後之栽培

管理與採收。就柴胡皂苷含量而言，高氏柴胡較高於北柴胡與三島柴胡已由前人研究結果證實；本研究檢測各檢品柴胡皂苷單位含量結果顯示，組培品田間栽培植株較高於原植物，且分別約為粗、細柴胡市場品的2倍及1.6倍，顯示高氏柴胡組培種苗極具發展與推廣之潛力。

台灣之柴胡藥材多仰賴自中國進口，其品質優劣無法控制，且柴胡為中藥材，目前並無法以農產品或食品進行販售，農民應考慮與藥廠契作為主。利用組培量產高氏柴胡種苗技術是優良栽培制度建立的基礎，若能配合後續成分萃取技術與活性成分開發，未來將可進一步推動高氏柴胡之藥用與保健產品商業化生產及行銷。



圖五、高壓液相層析皂苷含量分析之柴胡檢品。A、B. 等級不同之柴胡市場品，A與B分別為細與粗之北柴胡根部市場品；C、E. 高氏柴胡實生苗經過18個月栽培之植株與根部；D、F. 組織培養出瓶苗經過18個月栽培之植株與根部。bar = 5 cm。