

## 培植體、植物生長調節劑及光照處理 對丹參不定芽誘導之影響

陳威臣<sup>1</sup> 曹進義<sup>1</sup> 夏奇鈺<sup>2,\*</sup>

### 摘要

陳威臣、曹進義、夏奇鈺。2016。培植體、植物生長調節劑及光照處理對丹參不定芽誘導之影響。台灣農業研究 65(4):384–394。

本研究利用丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 組織培養苗之葉柄和葉片培植體進行不定芽的誘導試驗。葉柄培植體於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  苄腺嘌呤 ( $\text{N}^6$ -benzyladenine; BA) 與  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基中培養 6 wk 後不定芽形成率達 100%，平均每個培植體可形成 3.7 個不定芽。將葉柄和葉片培植體預培養於含有  $1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) 之 MS 培養基 2 或 3 wk 後，再分別繼代培養於不含植物生長調節劑之 MS 培養基中培養 4 或 3 wk，可誘導癒合組織和不定根形成。葉片癒合組織於含有  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  BA 與  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 之 MS 培養基於黑暗中培養 8 wk，顯示除了癒合組織增殖外，亦可形成少數不定芽。將癒合組織繼代培養於含有相同 2,4-D 濃度但不同 BA 濃度之培養基中，於光照或黑暗環境培養 8 wk 後，其中以  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合光照處理可產生最多不定芽，每接種  $0.2 \text{ g}$  癒合組織平均可形成 14.1 個不定芽。本研究利用丹參組織培養苗建立直接與間接不定芽再生大量繁殖體系，除可供生產丹參種苗所需外，亦可應用於誘變與轉基因之研究。

**關鍵詞：**直接器官形成、間接器官形成、癒合組織、大量繁殖。

### 前言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 為唇形科 (Labiatae)、鼠尾草屬 (*Salvia*) 多年生草本植物，其乾燥根部具有「活血化癥」之功效，是傳統中醫治療心血管疾病的重要中藥。藥材丹參 (danshen; *radix salvia miltiorrhiza*) 又名赤參、紫丹參或紅根，在神農本草經被列為上品，具有涼血清心、養血安神、調經止痛等功效。藥材丹參依其藥理作用有保護心肌缺血、改善腎功能、抑制血小板聚集、抗菌消炎及抗氧化等作用，可用於降血壓、降血脂及鎮痛等，對於冠心病與心絞痛具有良好療效，也被用於治療慢性肝炎與肝硬化，更有抑制肝癌細胞生長的功能，其臨床治療上之潛能不容忽

視 (Cai *et al.* 2002; Tiang & Wang 2003; Zhou *et al.* 2005; Xu *et al.* 2007; Xu & Sun 2008; Wang & Wu 2010)。

中藥丹參有 2,000 年的使用歷史，隨著現代社會心血管疾病的增加，丹參原料的需求量與日俱增，藥材主要生產國—中國亦積極進行丹參之人工栽培。然而目前藥材尚有品質參差不齊與偽劣品充斥市場的現象，甚至出現重金屬污染與農藥殘毒等問題 (Guo *et al.* 2002; Duan *et al.* 2003; Saper *et al.* 2004)。丹參栽培生產主要是使用根插繁殖種苗，但根部係藥用販售部分，利用根部繁殖不僅浪費藥材，並伴隨有成苗時間長、成苗率低、病原菌污染等問題 (Duan *et al.* 2003; Feng *et al.* 2004;

投稿日期：2015 年 11 月 5 日；接受日期：2016 年 2 月 17 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

Zhou *et al.* 2007; Xu & Sun 2008; Liang *et al.* 2009), 丹參種苗生產的各項環節需要進一步改善。

植物組織培養技術, 是藥用植物種苗繁殖相當重要一項技術 (Nalawade *et al.* 2003)。有關丹參的組織培養繁殖技術已有多篇報導 (Tiang & Wang 2003; Feng *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2007; Xu & Sun 2008), 主要提供大量生產種苗之用。例如 Chen *et al.* (2005) 的丹參研究以腋芽作為培植體, 可大量生產丹參組培種苗。此外, 利用不定芽繁殖亦為可行的方法。不定芽可直接從培植體原有之組織或細胞分化成為芽體, 或經由癒合組織誘導, 再從癒合組織分化形成不定芽, 亦即間接再生之方式獲得不定芽。

植株再生效率的影響因子很多, 例如培植體種類、植物生長調節劑種類、濃度及其組合, 以及培養條件等 (Martin 2002; Duan *et al.* 2003; Xu & Sun 2008; Liang *et al.* 2009)。然而, 丹參不定芽經由直接或間接方式再生效率的比較, 則尚未被研究報導。本研究擬利用丹參無菌苗之葉柄與葉片培植體, 探討不同生長調節劑的濃度組合對於不定芽誘導的影響, 比較直接與間接再生方式誘導不定芽之效率, 建立丹參再生芽體的最適誘導條件, 除作為後續丹參種苗生產之用外, 並可提供誘變育種或基因轉殖研究的應用參考。

## 材料與方法

### 培植體來源、培養基配製及培養條件

丹參之無菌瓶苗 (Chen *et al.* 2005) 培養於添加  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  激動素 (6-furfurylaminopurine; kinetin) 之  $1/2 \text{ MS}$  (Murashige & Skoog 1962) 培養基, 切取其葉柄 (1 cm) 與帶有中肋之葉片 ( $25 \text{ mm}^2$ ) 作為培植體進行不定芽誘導試驗。培植體培養於含有 3% 蔗糖與不同濃度之苄腺嘌呤 ( $\text{N}^6$ -benzyladenine; BA)、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) 及奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid; NAA) 組合的 MS 固態培養基, 培養基於加

入  $9 \text{ g L}^{-1}$  凝膠物質 (Difco Bacto-agar) 前先以  $0.1\text{--}1 \text{ N NaOH}$  或  $\text{HCl}$  將 pH 值調至  $5.7 \pm 0.1$ , 培養基以  $121^\circ\text{C}$ 、 $1.05 \text{ kg cm}^{-2}$  進行高溫高壓滅菌 15 min 後冷卻備用。培植體接種於內含 25 mL 培養基之無菌塑膠培養皿 ( $90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ ), 置於  $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、光照  $14 \text{ h}$  ( $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) 環境下進行不定芽誘導試驗; 此外並於黑暗環境進行癒合組織誘導與增殖試驗。

### 培植體種類與植物生長調節劑組合對不定芽形成之影響

葉柄與葉片培植體培養於含有 0、1 及  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合 0、0.5、1 及  $2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 之 MS 培養基中, 葉片培植體係以葉背 (abaxial surface) 接觸培養基的方式進行接種, 培養 6 wk 後調查生長達 2 mm 以上之不定芽數。試驗採用 3 重複, 每重複接種 6 個培植體。

### 培植體種類、接種方式、2,4-D 濃度與預培養時間對癒合組織誘導與不定根形成之影響

葉柄與葉片培植體分別培養於含有 1 及  $2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 之 MS 培養基, 葉片培植體分別以葉表 (adaxial surface) 和葉背接觸培養基的方式接種; 於培養 2 或 3 wk 後移至不含植物生長調節劑之 MS 培養基, 繼續再培養 3 或 4 wk, 所有處理之培養時間均達到 6 wk 時, 調查癒合組織與不定根之誘導情形。試驗採用 3 重複, 每重複接種 9 個培植體。

### 植物生長調節劑組合與光照處理對不定芽形成之影響

將葉片癒合組織培養於含有  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 配合  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  BA 之 MS 培養基, 在增殖足量之葉片癒合組織後作為間接芽體再生試驗之材料。後續就以  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 配合  $0.25\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 的組合, 測試在照光與黑暗環境下對於葉片癒合組織誘導不定芽再生的影響。稱取  $0.2 \text{ g}$  癒合組織培養於含 0.25、0.5、1 及  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 之 MS 培養基, 分別置於照光 ( $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 14 h) 與黑暗中培養, 8 wk 後調查生長達 2 mm 以上

之不定芽數。試驗採用 3 重複，每重複接種 6 個 0.2 g 癒合組織。

### 試驗設計和統計分析

本研究採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗，分別以 3 或 4 重複，每重複以 6 或 9 個培植體進行試驗。試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，百分比數據係經過角度值轉換後進行分析，若處理間差異顯著 ( $P < 0.05$ )，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

## 結果

### 培植體種類與植物生長調節劑組合對直接不定芽形成之影響

葉柄與葉片接種 2 wk 後在培植體切口邊緣可以觀察到芽體形成，這些芽體並非自癒合組織上形成，因而可稱之為直接不定芽形成，其形成位置多於切口處，少數可自培植體表面產生 (圖 1C、1D)；不定芽形成率以葉柄培植體較葉片培植體為高，但兩者皆於特定生長調節劑組合下才會直接形成不定芽 (圖 1、表 1)。表 1 的結果顯示，葉柄培植體培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 與  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 之 MS 培養基具有最高 100% 的誘導率，高於葉片培植體培養於相同組成培養基的 77.8%，但兩處理間並

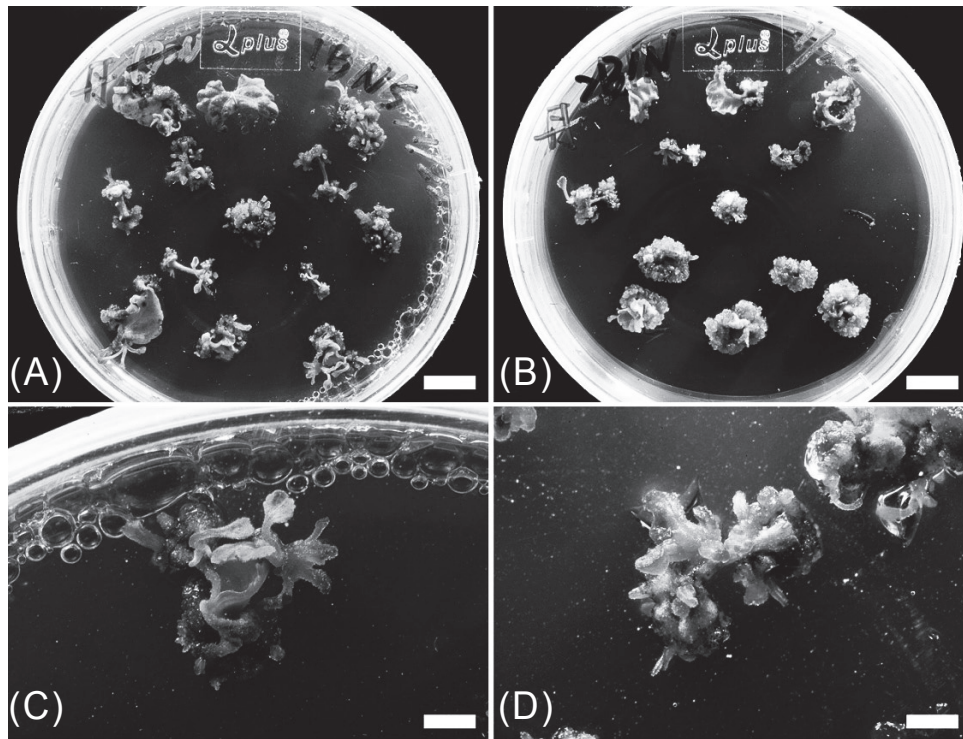


圖 1. 培植體在不同植物生長調節劑組合中不定芽形成之情形。葉柄與葉片培植體培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (A) 與  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (B) 之 MS 培養基，於光照環境下培養 6 wk 後，分別在葉片培植體 (C) 與葉柄培植體 (D) 直接不定芽形成之情形。

**Fig. 1.** Adventitious shoot induction of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza* using various explants cultured on medium containing with different plant growth regulators. Adventitious shoots were induced on petiole and leaf segments cultured on the MS medium supplemented with  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (A) or  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA and  $1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA (B) after 6 wk of culturing under light condition. Multiple adventitious shoots were developed directly on leaf explant (C) and petiole explant (D). Bar = 10 mm in (A) and (B); Bar = 30 mm in (C) and (D).

表 1. 培植體種類與植物生長調節劑組合對丹參不定芽形成之影響。

**Table 1.** Influence of explant type and plant growth regulator combination on adventitious shoot induction of *Salvia miltiorrhiza*<sup>z</sup>.

Explant	BA (mg L <sup>-1</sup> )	NAA (mg L <sup>-1</sup> )	Shoot-buds formation (%)	Shoot-buds/explant (no.)
Petiole	0	0	0.0 c <sup>y</sup>	0.0 c
	1	0.5	100.0 a	3.7 a
	1	1	0.0 c	0.0 c
	1	2	0.0 c	0.0 c
	2	0.5	0.0 c	0.0 c
	2	1	33.3 b	1.8 b
	2	2	0.0 c	0.0 c
	2	2	0.0 c	0.0 c
Leaf	0	0	0.0 c	0.0 c
	1	0.5	77.8 a	3.2 a
	1	1	0.0 c	0.0 c
	1	2	0.0 c	0.0 c
	2	0.5	0.0 c	0.0 c
	2	1	33.3 b	1.3 b
	2	2	0.0 c	0.0 c
	2	2	0.0 c	0.0 c

<sup>z</sup> Explants were cultured on MS medium containing various concentrations of BA and NAA for 6 wk of culture. Each treatment had 3 replications with 6 explants per replication. Shoot-buds longer than 2 mm were scored.

<sup>y</sup> Means in the column followed by different letter are significantly different at the 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square root transformed prior to statistical testing, but raw data is reported.

無顯著差異；平均每個葉柄或葉片培植體分別形成 3.7 與 3.2 個不定芽。而另一個具有不定芽誘導反應的培養基為 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之處理，葉柄與葉片培植體的不定芽誘導率均為 33.3%，平均每個培植體分別可形成 1.8 與 1.3 個不定芽 (表 1)。此外，在較高濃度 (1–2 mg L<sup>-1</sup>) NAA 處理可以觀察到癒合組織的形成 (資料未列)。

#### 培植體種類、接種方式、2,4-D 濃度及預培養時間對癒合組織誘導與不定根形成之影響

葉柄與葉片培植體在含有 2,4-D 培養基中預培養 2 或 3 wk 後，繼代培養於不含生長調節劑之 MS 培養基繼續培養約 1 wk 後均可形成癒合組織，同時也有不定根的形成，但是所有處理均未有不定芽形成 (表 2、圖 2A、2B)。

就培植體與接種方式對癒合組織誘導之效果而言，以葉背接觸培養基接種方式可達 92.6–96.3% 為最高，較高於葉柄培植體 (約

66.7–88.9%) 與葉表接觸培養基接種方式 (約 59.3–74.1%) (表 2)。若以 2,4-D 濃度與預培養時間對癒合組織誘導的影響來看，葉柄培植體在 1–2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 濃度之癒合組織誘導率均以預培養 2 wk 處理較高，顯示延長預培養時間並不有利於癒合組織之誘導。葉表 (adaxial surface) 接種方式結果顯示，1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 處理以預培養 3 wk 之誘導率較高，但 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 處理反而以預培養 2 wk 之誘導率較高。葉背 (abaxial surface) 接種方式之結果顯示，2,4-D 濃度與預培養時間對於癒合組織誘導並無明顯影響。

就培植體與接種方式對於誘導不定根形成而言，葉背接種方式的不定根形成率平均達 93.5% (88.9–96.3%) 為最高，高於葉柄培植體平均為 79.7% (74.1–92.6%) 與葉表接種方式平均之 63% (59.3–70.4%) (表 2)。就 2,4-D 濃度與預培養時間對於不定根形成的影響來看，葉柄培植體在 4 種組合處理下，不定根形成率以 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 預培養 3 wk 情況下的誘導率較高，但與預培養 2 wk 之處理間差異並不

表 2. 培植體種類、接種方式、2,4-D 濃度及其預培養時間對丹參癒合組織誘導與不定根誘導之影響。

**Table 2.** Influence of explants and its inoculation surface, as well as 2,4-D concentration and its culture period on callus and adventitious root induction of *Salvia miltiorrhiza*<sup>z</sup>.

Explant	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	Pre-culture period (wk)	Callus formation (%)	Adventitious root formation (%)
Petiole	1	2	74.1 bcd <sup>y</sup>	74.1 bcd
	1	3	66.7 d	74.1 bcd
	2	2	88.9 abc	77.8 abcd
	2	3	63.0 d	92.6 ab
Leaf (adaxial surface)	1	2	59.3 d	63.0 d
	1	3	74.1 bcd	70.4 cd
	2	2	70.4 cd	59.3 d
Leaf (abaxial surface)	2	3	66.7 d	59.3 d
	1	2	96.3 a	96.3 a
	1	3	96.3 a	92.6 ab
	2	2	92.6 ab	88.9 abc
	2	3	96.3 a	96.3 a

<sup>z</sup> Explants were cultured on MS medium containing 1 and 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D for 2 or 3 wk before transferring to a PGR-free MS medium for another 4 or 3 wk of culture. Each treatment had 3 replications with 9 explants per replication.

<sup>y</sup> Means in the column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square root transformed prior to statistical testing, but raw data is reported.

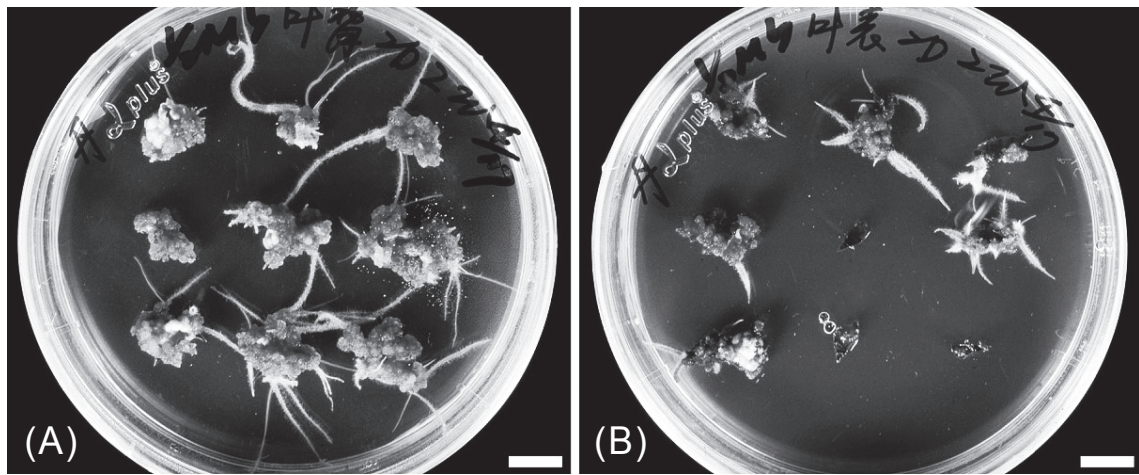


圖 2. 葉片培植體接種方式對癒合組織誘導不定芽形成之情形。葉片培植體於黑暗環境下，分別以葉背接種方式 (A) 與葉表接種方式 (B)，預培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之 MS 培養基 2 wk，再繼代培養與不含生長調節劑之 MS 培養基 4 wk 後，癒合組織與不定根形成之情形。

**Fig. 2.** Influence of inoculation surface of leaf explant on callogenesis of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza*. Explants were cultured under light and dark condition. Callus and adventitious roots formation of leaf explants inoculated with abaxial surface (A) and adaxial surface (B) contacting the medium, explants were first cultured on MS medium containing 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D for 2 wk before sub-culturing on a PGR-free MS medium for another 4 wk of culture in darkness condition. Bar = 10 mm.

顯著。1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 處理下之預培養時間的兩處理間並無顯著差異。就葉表接種方式而言，以 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 預培養 3 wk 情況下的

誘導率較高，但 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 處理下之預培養時間的兩處理間並無顯著差異。而葉背接種方式對於不定根形成之結果顯示，在 2,4-D 濃

度與預培養時間之 4 種組合處理間並無顯著差異。

### 植物生長調節劑組合與光照處理對間接不定芽形成之影響

葉片癒合組織培養於光照下培養 2 wk 後，癒合組織漸漸轉為淡綠色，且形成不定芽 (圖 3A)；其中添加 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 與 2 mg L<sup>-1</sup> BA 之處理顯示 100% 不定芽誘導率為最高，高於其他的處理 (66.7–89.0%)；且此處理的每個培植體平均可形成約 14.1 個不定芽，顯著高於其他處理之 3.0–8.7 不定芽/培植體 (表 3)。當葉片癒合組織培養於黑暗環境下，癒合組織之顏色雖未改變，但在癒合組織表面也會形成不定芽 (圖 3B)，其中以 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 配合 1 或 2 mg L<sup>-1</sup> BA 處理的不定芽誘導率皆達 88.7%，高於其他 2 種處理組合 (72.3–77.7%) (表 3)；此 2 種誘導率較高的生長調節劑處理，每個培植體平均可形成約 6.3–8.7 個不定芽，高於另 2 個較低 BA 濃度處理之 3.0–4.0 不定芽/培植體 (表 3)。

相同生長調節劑組合在不同光照處理下之結果顯示，其中添加 0.25–0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之處理，除 0.25 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2

mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之處理在光照處理下的誘導效率顯著較差外，其餘 3 種處理間並無顯著差異；另在含有 1–2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之處理，除 1 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之處理在光照處理下的誘導效率顯著較差外，其餘 3 種處理間並無顯著差異；在不定芽形成數方面，除 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之處理在照光處理顯著高於黑暗處理外，其餘各生長調節劑組合在照光與否的條件下並無顯著差異 (表 3)。

## 討論

對於利用組織培養繁殖種苗的系統而言，培植體種類是影響不定芽形成效率的重要因子；例如毒胡蘿蔔草 (*Thapsia garganica*) (Makunga *et al.* 2003)、貫葉連翹 (*Hypericum perforatum*) (Pretto & Santarém 2000)、南丹參 (*S. bowleyana*) (Duan *et al.* 2003)、楊波屬植物 (*Buddleia* spp.) (Dai & Castillo 2007)、烏芙蓉 (*Limonium wrightii*) (Huang *et al.* 2000) 及羅漢果 (*Siraitia grosvenorii*) (Lu *et al.* 2011) 等研究均指出，培植體種類影響不定芽形成效率。不定芽形成方式又可分為直接再生

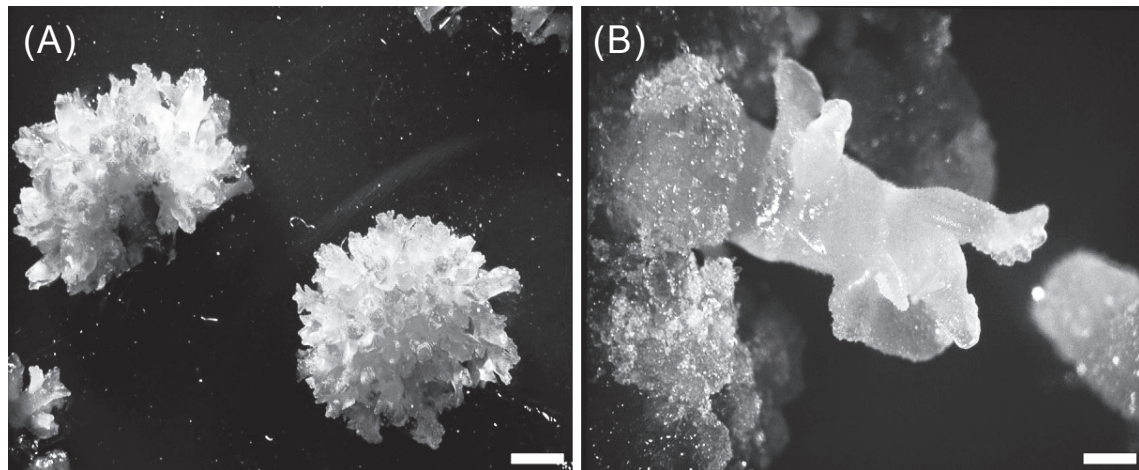


圖 3. 葉片癒合組織誘導於光照與黑暗環境下不定芽形成之情形。葉片癒合組織培養於 2 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之 MS 培養基 8 wk 後，分別在光照 (A) 與黑暗 (B) 環境下間接形成不定芽之情形。

Fig. 3. Influence of illumination on adventitious shoot induction of *in vitro* *Salvia miltiorrhiza*. Multiple adventitious shoots induction from the leaf-derived callus cultured on a MS medium containing 2 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D for 8 wk of culture under irradiation (Bar = 2.5 mm) (A) or under darkness condition (Bar = 0.5 mm) (B).

表 3. 植物生長調節劑組合與光照處理對丹參不定芽形成之影響。

**Table 3.** Influence of plant growth regulator combination and illumination condition on adventitious shoot induction of *Salvia miltiorrhiza*<sup>z</sup>.

Treatment	BA (mg L <sup>-1</sup> )	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	Shoot induction (%)	Shoots per 0.2 g callus
Light	0.25	0.2	66.7 c <sup>y</sup>	3.4 e
	0.5	0.2	89.0 ab	5.4 cde
	1	0.2	72.3 bc	7.0 bc
	2	0.2	100.0 a	14.1 a
Dark	0.25	0.2	72.3 bc	3.0 e
	0.5	0.2	77.7 bc	4.0 de
	1	0.2	88.7 ab	6.3 bcd
	2	0.2	88.7 ab	8.7 b

<sup>z</sup> Calli were cultured on MS medium containing various concentrations of BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D for 8 wk of culture. Each treatment had 3 replications with 6 explants (0.2 g callus) per replication. Shoot-buds longer than 2 mm were scored.

<sup>y</sup> Means in the column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square root transformed prior to statistical testing, but raw data is reported.

與間接器官形成 2 種途徑，例如烏芙蓉 (Huang *et al.* 2000) 及揚波屬植物 (Dai & Castillo 2007) 可分別自不同培植體直接形成不定芽，但貫葉連翹 (Pretto & Santarém 2000) 及鉸剪藤 (*Holostemma ada-kodien*) (Martin 2002) 之不定芽形成則是經由間接形成途徑。

葉柄和葉片因為取得容易且數量較多，被廣泛利用於不定芽形成之研究，許多報告均指出可利用葉柄或葉片培植體誘導形成不定芽 (Huang *et al.* 2000; Pretto & Santarém 2000; Makunga *et al.* 2003; Skała & Wysokińska 2004; Chen *et al.* 2006; Dai & Castillo 2007; Liang *et al.* 2009; Lu *et al.* 2011; Raad *et al.* 2012)。Duan *et al.* (2003) 以南丹參之葉柄與葉片作為培植體進行試驗，過程中經由癒合組織生成再誘導不定芽形成；此外，Tiang & Wang (2003) 與 Feng *et al.* (2004) 的丹參研究指出，葉片培植體的不定芽形成係藉由間接途徑而形成。Yan & Wang (2007) 與 Xu & Sun (2008) 於丹參的研究則指出，自葉片、葉柄或莖段培植體皆可直接形成叢生芽。本研究結果也顯示可經由不具生長點的葉柄與葉片培植體直接形成芽體，或經由癒合組織間接形成不定芽。

培植體的生長分化除了受到內生荷爾蒙的影響之外，培養基中含有之生長調節劑 (細胞分裂素與生長素) 的種類與濃度對於再生路徑

是主要影響因子。許多研究均以 BA 與 NAA 的組合誘導不定芽形成，例如丹參 (Tiang & Wang 2003; Yan & Wang 2007)、烏芙蓉 (Huang *et al.* 2000) 及楊波屬植物 (Dai & Castillo 2007) 等。本研究結果顯示，葉柄與葉片培植體培養於 BA 與 NAA 組合的 MS 培養基均可直接形成不定芽，顯然 BA 與 NAA 的組合對此 2 種培植體是有效的生長調節劑組合，但 6 種組合中僅其中 2 種具有誘導芽體直接形成的功效 (表 1)，可見直接芽體形成在生長素與細胞分裂素的組合上具有特殊性，這點是直接形成不定芽在篩選生長調節劑組合時較為困難的地方。

Chen *et al.* (2006) 於菊花 (*Dendranthema morifolium*) 研究指出，其器官形成與 cytokinin/auxin 濃度的平衡有關，顯示 cytokinin 與 auxin 之莫耳濃度比值為 0.8–13.4 時具有較佳的結果。此外，Yan & Wang (2007) 之丹參研究報告指出，誘導葉柄與葉片形成不定芽之最佳 BA/NAA 莫耳濃度比值分別為 8.8 與 17.6，且葉柄培植體優於葉片培植體。本研究測試 BA/NAA 莫耳濃度比值在 0.4–3.2 的情況下，但結果顯示只有在 BA/NAA 比值為 1.6 時才能誘導葉柄與葉片培植體直接形成不定芽，且同樣以葉柄培植體的誘導效果較佳。

此外，本研究之葉柄相較於葉片具有較高的不定芽誘導效率，分別可誘得最高為 3.7 與

3.2 個不定芽 (表 1)；亦相對高於利用莖節培養之 3 芽/節的增殖效率 (Chen *et al.* 2005)；Yan & Wang (2007) 在丹參的研究上比較葉柄與葉片培植體也有類似的結果，亦即以葉柄培植體具有較佳的不定芽誘導效率。然而，Xu & Sun (2008) 於丹參的研究結果顯示，丹參葉片培植體在含有 BA 但不含 NAA 的培養基中可誘導芽體形成，且葉片培植體之效率高於葉柄與莖段培植體；同樣地，Feng *et al.* (2004) 與 Tiang & Wang (2003) 也指出，丹參葉片培植體只需  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 即可獲得叢生芽的誘導效果，顯然不同培養基組成對誘導培植體形成不定芽的反應具有極大的差異。Tiang & Wang (2003) 的研究亦指出，丹參葉片培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 與  $0.5\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 之 MS 培養基時並無芽體形成，而在  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 處理下只會形成癒合組織。本研究結果也顯示，當培植體培養於高 NAA 濃度處理下僅會形成癒合組織但並未形成不定芽，推測較高濃度的 NAA 不利於丹參不定芽之形成。

Duan *et al.* (2003) 在南丹參研究結果指出，葉片培養於添加  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 之 MS 培養基，可誘導癒合組織形成並產生叢生芽，但並未形成不定根。另一個丹參研究指出，葉片培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 配合  $0.5\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 之 MS 培養基時具有類似結果，但形成少數不定根 (Tiang & Wang 2003)。本研究結果顯示，當葉柄和葉片培植體預培養於含有  $1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 的 MS 培養基 2–3 wk 時，培植體已明顯膨大且形成少量癒合組織，而後將葉片癒合組織轉移至不含生長調節劑之 MS 培養基後，癒合組織會繼續增殖。當培養達 6 wk 時已覆蓋整個培植體，此時並無不定芽形成，但在癒合組織表面可形成少數不定根。依上述研究結果推論，BA 對誘導不定芽形成應該具有促進之效果。

毒胡蘿蔔草 (Makunga *et al.* 2003) 與貫葉連翹 (Pretto & Santarém 2000) 之研究指出，葉柄與葉片培植體培養於含有 BA 與 NAA 的培養基可直接形成芽體，但葉片培植體必須以葉背接觸培養基的方式接種。本研究測試葉

表或葉背接觸培養基的接種方式結果顯示，誘導丹參癒合組織最佳方法為利用葉背接觸培養基的方式，癒合組織誘導率可達 96.3%，顯著高於葉柄培植體與另一種葉表接觸培養基的接種方式 (表 2)。然而，矮叢藍莓 (*Vaccinium angustifolium*) 則是利用葉表接觸培養基的方式誘導不定芽形成 (Debnath 2009)。推測葉表與葉背之差異在於氣孔之有無，因此影響培植體對於養分及生長調節劑的吸收而造成分化上的差異。

對於丹參癒合組織誘導而言，除了受到培植體種類、接種方式及 2,4-D 濃度的影響之外，2,4-D 預培養的時間的長短也是影響因子之一，葉柄培植體預培養 2 wk 的效率顯著高於 3 wk 的處理；但葉片培植體方面則是不同接種方式有著不同結果，就葉表接觸培養基而言，延長低濃度 2,4-D ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) 處理時間至 3 wk 有助於癒合組織的誘導。但濃度提高為  $2 \text{ mg L}^{-1}$  後，延長預處理時間反而不利癒合組織的形成。若就葉背接種方式而言，則不受到 2,4-D 預培養時間的影響，均可達到最高的癒合組織誘導效率。此外，對於誘導丹參不定根形成而言，提高 2,4-D 濃度與延長預處理時間有利於誘導葉柄形成不定根，但葉表接種方式在低濃度 2,4-D ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) 處理下，延長預處理時間有助於誘導不定根形成。若以葉背接種方式而言，則不受 2,4-D 濃度與預培養時間的影響，均有最高的不定根形成率 (表 2)。推測以葉背接種方式因培植體對養分與生長調節劑之吸收效率較佳，因此在較低 2,4-D 濃度處理即可達到誘導之效果，提高濃度之效應反而不明顯。

癒合組織是一群未分化的薄壁細胞團，可藉由繼代培養大量增生，也可分化成為各種組織、器官或植株，形成高效率的無性繁殖體系，此即分化全能性 (totipotency) 的概念。貫葉連翹研究結果顯示，當葉片培植體培養於含有 2,4-D 之培養基可誘導癒合組織形成，若添加 BA 則不利於癒合組織形成，當培養基中單獨存在 2,4-D 或 BA 與 2,4-D 的組合，則可增殖癒合組織，而且 BA 可促使不定芽形成 (Pretto & Santarém 2000)。Martin (2002) 在鉸

剪藤的研究指出，葉片培養於只含 BA 或不含生長調節劑的 MS 培養基即可誘得癒合組織。本研究室曾測試 0.25–2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的組合對癒合組織增殖的影響，結果顯示各種生長調節劑組合處理間並沒有顯著差異(資料未列)，顯示 BA 濃度並非影響癒合組織生成之主要因子。然而，在葉片癒合組織的表面卻形成少數不定芽；顯然 BA 對於癒合組織的增殖並無顯著影響，但卻具有誘導不定芽形成的效果。

Mundhara & Rashid (2002) 的研究報告指出，光照處理對於亞麻 (*Linum usitatissimum*) 組織培養之芽體分化而言，是一個必要的條件。火鶴花 (*Anthurium andraeanum*) 研究結果顯示，在黑暗條件可誘導癒合組織形成，但是需要在光照條件下誘導不定芽形成 (Raad *et al.* 2012)。然而，Dai & Castillo (2007) 於楊波屬植物研究指出，黑暗培養可增進芽體形成效率。本研究結果顯示，葉片癒合組織間接形成不定芽的最佳表現 (100% 誘導率；14.1 不定芽/培植體)，必須配合光照處理才能達成；但本研究結果也顯示，無論光照或黑暗條件之葉片癒合組織均能形成不定芽，因此光照處理對於不定芽誘導並非絕對必要，但卻具有提高不定芽形成效率的作用。

丹參 (Feng *et al.* 2004) 與南丹參 (Duan *et al.* 2003) 不定芽形成過程中，較高濃度 BA 處理所得之不定芽往往會成為玻璃質化苗 (hyperhydric plantlet)。Tiang & Wang (2003) 於丹參的研究指出，較高 BA 處理所誘得的不定芽數較多，但這些芽體往往呈現玻璃質化 (hyperhydricity) 現象，因此利用較低 BA 濃度誘導正常不定芽生長是較佳的方式，高誘導增殖率須考量芽體的品質是否能夠被接受。本研究同樣也有此問題，亦即不定芽中約 10% 玻璃質化苗的產生 (資料未列)；然而後續可利用透氣培養方式，解決玻璃質化組培苗的問題 (Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007)。

高效率的組織培養芽體形成系統除可應用於誘變及多倍體誘導外，亦為基因轉殖成功之基本要件，因為對誘變育種或基因轉殖系統而言，一個能夠產生大量不定芽形成的系統有其

必要性；本研究顯示利用癒合組織產生不定芽的效率較直接形成不定芽的方式來得高，但癒合組織可能伴隨有變異機率提高的可能性，必須加以注意 (Makunga *et al.* 2003; Yan & Wang 2007)。綜而言之，本研究已建立丹參直接與間接形成不定芽的繁殖系統；其一，葉柄與葉片培植體均可直接形成不定芽，而葉柄培植體的直接形成不定芽效率較葉片培植體高，培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基中 6 wk 後，即可獲得 100% 的誘導率，且每個培植體可產生 3.7 個不定芽；其二，透過葉片癒合組織可間接形成不定芽，並可利用光照培養提高芽體形成效率，0.2 g 癒合組織培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 之 MS 培養基中 8 wk 後，即可獲得 100% 的誘導率與 14.1 個不定芽。上述研究結果應可提供丹參種苗量產、誘變育種或基因轉殖等研究的參考依據。

## 誌謝

本試驗研究承農委會農業生物技術國家型計畫經費補助 (NSC 95-2317-B-055-003、NSC 96-2317-B-055-007)；本文承行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心蔡媧婷博士協助審閱，特此申謝。

## 引用文獻

- Cai, Z., F. S. C. Lee, X. R. Wang, and W. J. Yu. 2002. A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs. *J. Mass. Spectrom.* 37:1013–1024.
- Chen, U. C., J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2007. *In vitro* shoot acclimation and tanshinones analysis of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Agric. Res. Taiwan* 56:21–30. (in Chinese with English abstract)
- 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 miltiorrhiza* culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 54:93–102. (in Chinese with English abstract)
- Chen, W. C., J. H. Lin, C. S. Wang, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2006. Influences of cytokinins and antibiotics on shoot regeneration of chrysanthemum cultivars. *J. Taiwan Soc. Hort. Sci.* 53:119–126. (in Chinese with English abstract)

- Dai, W. and C. Castillo. 2007. Factors affecting plant regeneration from leaf tissue of *Buddleia* species. *HortScience* 42:1670–1673.
- Debnath, S. C. 2009. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45:122–128.
- Duan, Y. Z., Y. Z. Niu, Y. Z. Liu, S. X. Guo, and C. Z. Peng. 2003. *In vitro* rapid propagation and induction of polyploidy with colchicine in *Salvia bowleyana*. *Plant Physiol. Commun.* 39:201–205. (in Chinese with English abstract)
- Feng, L. L., S. J. Guo, S. Y. Zhou, M. H. Fan, and J. Y. Zhou. 2004. Research on propagative technique of *Salvia miltiorrhiza* Bunge *in vitro*. *J. Wuhan Bot. Res.* 22:463–468. (in Chinese with English abstract)
- Guo, B. L., Y. X. Feng, and Y. J. Zhao. 2002. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza*. *China J. Chin. Mate. Med.* 27:492–495. (in Chinese with English abstract)
- 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. Plant* 36:220–224.
- Liang, H. W., F. X. Wang, and S. W. Choi. 2009. Tissue culture and plant regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f.alba. *J. Anhui Agric. Sci.* 37:9876–9904. (in Chinese with English abstract)
- Lu, H., J. Liu, H. Zhang, and S. Gao. 2011. Regeneration of Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenori*) *in vitro* by direct organogenesis. *J. Northeast Agric. Univ.* 18:18–23.
- Makunga, N. P., A. K. Jäger, and J. van Staden. 2003. Micropropagation of *Thapsia garganica*- a medicinal plant. *Plant Cell Rep.* 21:967–973.
- Martin, K. P. 2002. Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. *Plant Cell Rep.* 21:112–117.
- Mundhara, R. and A. Rashid. 2002. Stimulation of shoot-bud regeneration on hypocotyl of *Linum* seedlings, on a transient withdrawal of calcium: Effect of calcium, cytokinin and thidiazuron. *Plant Sci.* 162:211–214.
- 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., 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.
- Pretto, F. R. and E. R. Santarém. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tiss. Org.* 62:107–113.
- Raad, M. K., S. B. Zanjani, M. Shoor, Y. Hamidoghli, A. R. Sayyad, A. Kharabian-Masouleh, and B. Kaviani. 2012. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andraeanum* Linden (Casino and Antadra). *Aust. J. Crop Sci.* 6:928–937.
- Saper, R. B., S. N. Kales, J. Paquin, M. J. Burns, D. M. Eisenberg, R. B. Davis, and R. S. Phillips. 2004. Heavy metal content of ayurvedic herbal medicine products. *JAMA* 292:2868–2873.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, Vol. 2. SAS Institute Inc. Cary, NC. 943 pp.
- Skala, E. and H. Wysokińska. 2004. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:592–602.
- Tiang, Y. H. and Z. Z. Wang. 2003. Tissue culture and plantlet regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *J. Shaanxi Normal Univ. (Nature Science Edition)* 31:99–102. (in Chinese with English abstract)
- Wang, J. W. and J. Y. Wu. 2010. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:437–449.
- Xu, M. Y. and Q. Z. Sun. 2008. Buds induction and high-frequency plant regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *J. Agric. Sci. Technol.* 10:76–80.
- Xu, Y. Y., R. Z. Wan, Y. P. Lin, L. Yang, Y. Chen, and C. X. Liu. 2007. Recent advance on research and application of *Salvia miltiorrhiza*. *Asian J. Pharmacodyn. Pharmacokinet.* 7:99–130.
- Yan, Y. P. and Z. Z. Wang. 2007. Genetic transformation of the medical plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. *Plant Cell Tiss. Org.* 88:175–184.
- Zhou, L., Z. Zuo, and M. S. S. Chow. 2005. Danshen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J. Clin. Pharmacol.* 45:1345–1359.
- Zhou, W., Y. F. Shen, J. F. Chen, L. M. Dai, G. Y. Kai, and G. Y. Zhou. 2007. Research and development of biotechnology of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *J. Biol.* 24:48–51. (in Chinese with English abstract)

## Influence of Explant, Plant Growth Regulator and Illumination on Adventitious Shoot Induction of *In Vitro* Cultured *Salvia miltiorrhiza*

Uei-Chern Chen<sup>1</sup>, Jhin-Yi Tsao<sup>1</sup>, and Chi-Ni Hsia<sup>2,\*</sup>

### Abstract

Chen, U. C., J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2016. Influence of explant, plant growth regulator and illumination on adventitious shoot induction of *in vitro* cultured *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 65(4):384–394.

Petiole and leaf explants derived from *in vitro* *Salvia miltiorrhiza* were used for shoot regeneration in this study. The highest adventitious shoot formation rate of 100% with 3.7 shoots/explant in average was obtained from petiole segments cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) and 0.5 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) for 6 wk of culture. Callus and adventitious roots were induced from petiole and leaf segments pre-cultured on the MS medium supplemented with 1–2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for 2–3 wk followed by transferring on a hormone-free MS basal medium for a total 6 wk of culture. Calli were proliferated on the MS basal medium containing 0.25 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D under darkness for 8 wk of culture along with few adventitious shoots were found. Proliferated calli were subcultured to the medium containing with same concentration of 2,4-D in combination with various BA concentration under light and dark condition for shoot regeneration. The highest induction number of adventitious shoots was 14.1 shoots 0.2 g<sup>-1</sup> callus from the medium containing 2 mg L<sup>-1</sup> BA under light condition. An efficient micropropagation system of *Salvia miltiorrhiza* by direct and indirect adventitious shoot regeneration systems were established in this study which would not only supply for plantlet production but also apply on mutation and genetic transformation studies.

**Key words:** Directly organogenesis, Indirectly organogenesis, Callus formation, Micropropagation.

---

Received: November 5, 2015; Accepted: February 17, 2016.

\* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.