

秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響 因子研究

夏奇鈺^{1*} 陳威臣² 曹進義³

摘要

夏奇鈺、陳威臣、曹進義。2019。秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響因子研究。台灣農業研究 68(3):215–225。

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 為重要之傳統中藥材，但因其種原單純，因此不易藉由雜交育種改進其遺傳特性，而利用秋水仙素誘導多倍體是創新種質的方法之一。本研究以無菌播種後不同發育階段之桔梗種子苗作為培植體，比較秋水仙素濃度、處理時間及秋水仙素在固態或液態培養基中施用對於多倍體化誘導之影響。成活植株以流式細胞儀檢測其染色體倍體數，建立以離體培養方式施用秋水仙素誘導多倍體桔梗之處理條件。研究結果顯示，培植體的存活率主要受到秋水仙素處理時間的影響，且處理時間與種子苗的發育階段具有顯著之交感效應。在多倍體誘導方面，以子葉期桔梗苗為培植體，在含有 1.25 mM 秋水仙素的液態培養基中震盪培養 6 d，或在含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中培養 3 d，可獲得高於 80% 之培植體存活率，且多倍體誘導率在 60% 以上。

關鍵詞：桔梗、多倍體、四倍體、秋水仙素、離體培養。

前言

中草藥產業為生物科技產業發展之重點項目，而優良中草藥品種的育成及其健康種苗的生產，將直接影響原物料的優劣，係為奠定中草藥產業發展之關鍵重點。桔梗 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 為桔梗科、桔梗屬多年生草本植物，在不同國家有不同的名稱，在韓國稱為道拉機 (Doraji)，在日本稱為奇京 (Kikyō)，在中國則稱為桔梗 (Jiegeng)。桔梗以根入藥，具有宣肺、祛痰、鎮咳、利咽、排膿等作用，屬大宗使用之傳統中藥材 (Nyakudya *et al.* 2014)。桔梗種原在全世界僅有 1 種及 1 變種，受限於種質單純，並不易藉由雜交育種來改進其遺傳特性，而誘變或多倍體化可創造遺傳種質的變化。藉由將這些遺傳變化的材料運

用於育種流程，選拔出具有高指標成分並適應當地風土氣候之新品系 (Xu *et al.* 2004)。多倍體植株一般具有生長勢強、生質產量高、花朵大、花色深、香氣濃郁等優良特性，具稔性之多倍體植株可作為雜交育種之親本，創造更多優良新品種 (Acquah 2007)。此外，對於中草藥植物而言，多倍體還具有營養器官變大、藥用成分提高及抗逆性較強的優點，對產業價值之提升更為有利 (Zhou *et al.* 2008)。桔梗在台灣並無商業栽培，且其種質單純因此較難經由選種或雜交進行改進，而創造遺傳多樣化之多倍體作為育種材料應為可行之策略。

秋水仙素 (colchicine) 是人工誘導多倍體化最常使用之藥劑，於田間施用時易受到外在環境的變化而減低其效用，並較易產生複合體 (mixoploidy)；另一方面，以試管內 (*in vi-*

投稿日期：2018 年 7 月 9 日；接受日期：2019 年 3 月 14 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

tro) 或稱為離體培養方式誘導多倍體，因環境因子與處理條件較易於掌控，多倍體誘導率遠高於田間處理 (Petersen *et al.* 2003; Dhooghe *et al.* 2011)。影響以離體培養方式進行秋水仙素誘導多倍體化的因子眾多，其中以施用濃度與處理時間最常被探討，而誘導多倍體所使用之培植體及秋水仙素施用之型態 (於固態或液態培養基中施用) 則較少被探討 (Petersen *et al.* 2002; de Carvalho *et al.* 2005; Hsia *et al.* 2009, 2010)。

本研究希望首先藉由人工誘導多倍體化，創造遺傳變化的桔梗育種材料，且為創造更多之遺傳變異。本研究採用無菌播種而來的桔梗種子苗作為培植體，測試秋水仙素濃度與時間之組合處理，並比較以不同發育階段種子苗於含有秋水仙素之固態或液態培養基中處理對多倍體誘導的影響。在創出遺傳多樣化的多倍體後，經由育種流程選拔藥用成分及產量增加之優良多倍體加以利用，則列為第二階段之目標。

材料與方法

建立桔梗瓶苗

桔梗 (*P. grandiflorum* A. DC.) 種子贈自行政院農委會農業試驗所育種人員，將種子以 70% 酒精表面消毒 1 min，再以 2% (v/v) 次氯酸鈉水 (稀釋自 Clorox Bleach, Clorox, Oakland, CA, USA) 消毒 30 min 後，以無菌水清洗 3 次。將消毒完成之種子，接種於含半量 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類配方並添加 30 g L⁻¹ 蔗糖及 8 g L⁻¹ 惠光洋菜之基本培養基中培養。培養基於滅菌前將 pH 調至 5.7 ± 0.1，接種後之培養皿置於 26°C ± 2°C、38 μmol m⁻² s⁻¹ 光強度、光照 16 h 環境中培養。

秋水仙素濃度與處理時間組合試驗

以無菌播種 1 wk 後具 2 片展開子葉之小苗 (子葉期苗)，以全株浸入方式接種於含有 1.25 mM 或 2.50 mM 秋水仙素 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 之液態再生培養基中，分別以水平震盪方式培養 3、6、9 及 12 d，

震盪速率為 70–80 rpm。再生培養基，為上述之基本培養基添加 2 mg L⁻¹ benzyladenine (BA) 與 0.5 mg L⁻¹ α-naphthaleneacetic acid (NAA)。培養容器為 125 mL 三角瓶內裝 10 mL 培養液，每瓶接種 10 株小苗，每處理共 5 瓶。震盪培養的環境溫度及光照條件，與上述瓶苗培養相同。

不同發育時期培植體於固態或液態培養基中施用秋水仙素不同時間之組合試驗

以播種 3 wk 後同時具 2 片子葉及 2 片真葉之小苗 (真葉期苗)，以及上述之子葉期苗作為培植體，接種於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態或液態再生培養基中進行處理，處理時間分別為液態培養的 1 d 或 3 d，震盪培養條件同上。固態培養為將小苗基部插入培養基中培養 3 d 或 6 d，其他培養條件同前所述。

多倍體檢測

秋水仙素處理後將小苗繼代至不含秋水仙素之固態基本培養基中培養，4 wk 後調查其存活率，並將存活芽體受傷之根部切除後，再次繼代於基本培養基中進行發根培養。發根後之瓶苗，取出種植於溫室。成活植株於瓶苗階段，切取其新長出之葉片，以流式細胞儀進行倍體數分析。流式細胞儀 (Partec, Nürnberg, Germany) 檢測方法，為切取 1 cm² 幼嫩葉片，加入 0.4 mL CyStain UV Precise P 萃取液，以刀片將葉片組織細切後以過濾膜過濾。在濾液中添加 0.8 mL CyStain UV Precise P 染色液，靜置 3 min 後進行檢測，每一樣品分析 5,000 個細胞。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，培植體存活率百分比以 sin⁻¹ 角度轉換後，再以 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行 analysis of variance (ANOVA) 變方分析。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用 least significant difference test (LSD) 比較各處理平均值間的差異。

結果

秋水仙素濃度與處理時間對子葉期種子苗多倍體化誘導之影響

以子葉期桔梗種子苗為培植體，接種於含有 1.25 mM 或 2.50 mM 秋水仙素之液態培養基中，震盪處理 3–12 d，並於繼代培養 4 wk 後調查小苗之存活率。試驗結果顯示，秋水仙素濃度與處理時間兩個因子中，僅處理時間對於小苗存活率與芽體增殖率具有顯著之影響 ($P < 0.01$)，且秋水仙素濃度與處理時間的交互效應對小苗存活率與芽體增殖率之影響皆不顯著 (表 1)。秋水仙素處理時間未超過 6 d 時，小苗存活率可維持在 88.0–92.0% 間，隨著處理天數增加至 9 d 及以上時，2 種濃度之小苗存活率皆下降至 62.0–70.0%。同樣的，芽體增殖率亦明顯受處理天數之影響 ($P < 0.01$)，且與小苗存活率具有相同之趨勢，亦即處理天數增至 9 d 及以上時，芽體增殖率會明顯下降。8 種處理中以 1.25 mM 濃度處理 3 d 之芽體增殖數為 1.72 芽/株最高，而以 9 d 及 12 d 處理之增殖芽數最低 (0.62–0.76 芽/株)。桔梗苗在秋水仙素處理後繼代至基本培養基中繼續培養

4 wk，各處理培植體生長與增殖之情形如圖 1 所示。秋水仙素處理後之成活植株，以流式細胞儀檢測其倍體數，植株之倍體表現比率如表 1 所示，其中 12 d 處理組因成活苗數太少因而未進行檢測。比較兩種濃度對多倍體 (總多倍體 = 3C + 4C + 6C) 誘導的影響，依處理天數 (3 d、6 d、9 d) 來看，分別為 1.25 mM 之 48.0、60.8 及 83.3%，以及 2.50 mM 之 23.6、38.1 及 66.7%。顯示 1.25 mM 較 2.50 mM 處理可獲得較高之多倍體比率，多倍體的比率會隨著處理天數增加而提高，且在兩種濃度皆有相同之趨勢；但秋水仙素處理時間延長至 9 d 時，雖然多倍體比率增加，但因成活株數減少，因此實際上兩種濃度皆以 6 d 處理可獲得最高之多倍體株數。

秋水仙素於液態培養基中施用不同時間對不同發育時期培植體多倍體化誘導之影響

利用不同發育階段之小苗 (子葉期或真葉期苗)，在含有 2.50 mM 秋水仙素之液態再生培養基中處理 1 d 或 3 d，並於繼代培養 4 wk 後調查小苗之存活率。結果顯示，秋水仙素處理天數及處理天數與小苗發育期的交互效應，對小苗存活率皆有顯著之影響 ($P < 0.01$)，

表 1. 離體培養子葉期桔梗種子苗以秋水仙素濃度配合天數於液態培養方式處理對多倍體誘導之影響。

Table 1. Effects of concentration and exposure duration of colchicine in liquid culture on polyploidy induction by using cotyledon stage seedlings of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

Colchicine (mM)	Duration (d)	Treated seedling	Survival rate (%) ^z	Shoots/explant	Examined plants	Ploidy (%)				
						2C	3C	4C	6C	Chimera
1.25	3	50	92.0 ± 8.4 a ^y	1.72 ± 0.22 a	23	52.0	24.0	12.0	12.0	0.0
	6	50	92.0 ± 8.4 a	1.26 ± 0.15 b	23	39.1	26.1	30.5	4.3	0.0
	9	50	62.0 ± 8.4 b	0.62 ± 0.08 c	6	16.7	33.3	50.0	0.0	0.0
	12	50	68.0 ± 16.4 b	0.76 ± 0.19 c	0	-	-	-	-	-
2.50	3	50	88.0 ± 4.5 ab	1.40 ± 0.16 b	17	70.6	11.8	11.8	0.0	5.8
	6	50	92.0 ± 8.4 a	1.20 ± 0.19 b	21	61.9	9.5	28.6	0.0	0.0
	9	50	70.0 ± 20.0 b	0.74 ± 0.25 c	6	33.3	0.0	66.7	0.0	0.0
	12	50	66.0 ± 16.7 b	0.66 ± 0.17 c	0	-	-	-	-	-
Concentration			NS ^x	NS						
Duration			**	**						
Concentration × Duration			NS	NS						

^z Percentage data was analyzed after arcsine transformation.

^y Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x NS: non-significant, ** significant at 1% level.

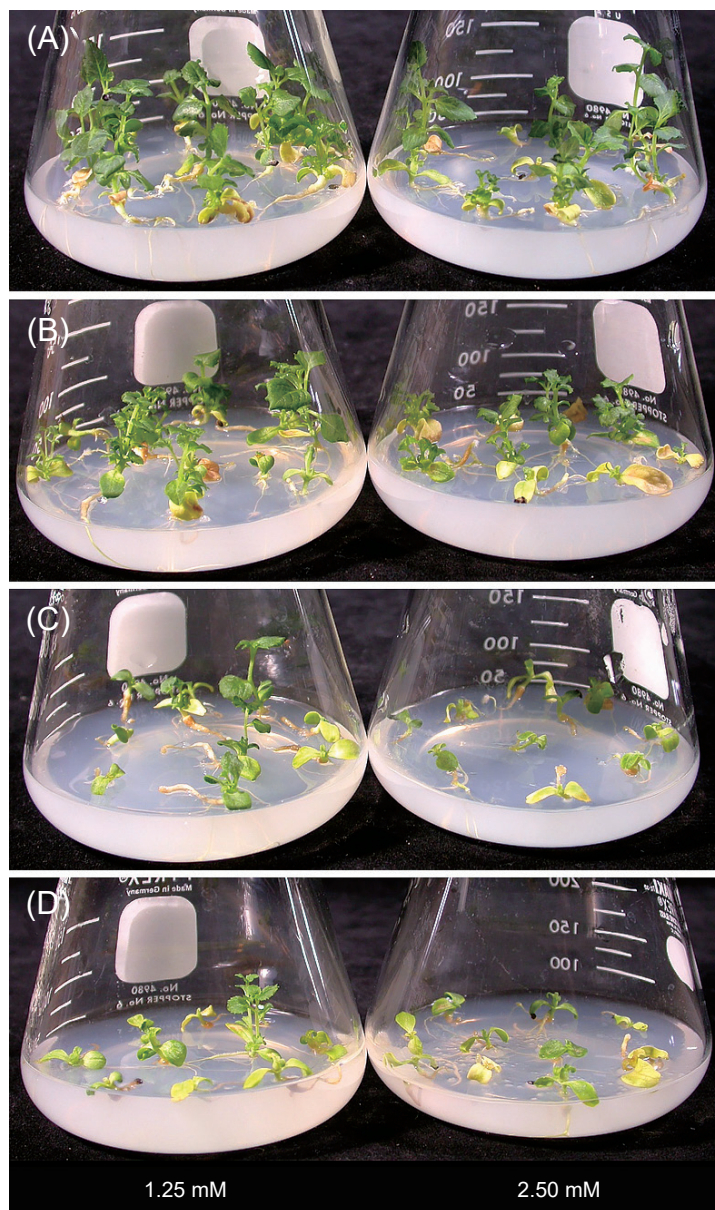


圖 1. 離體培養之子葉期桔梗種子苗以兩種秋水仙素濃度處理不同天數後，繼代於基本培養基中生長 4 wk 後之情形。照片左、右側之瓶苗分別源自 1.25 mM 及 2.50 mM 秋水仙素處理，(A)–(D) 依序為 3、6、9 及 12 d 處理時間。

Fig. 1. Growth of cotyledon stage seedling explants of *Platycodon grandiflorum* A. DC. after 4-wk-culture on the colchicine free medium. Explants were derived from various colchicine treatments. Left and right flasks in the same picture was from 1.25 mM and 2.50 mM colchicine, respectively. (A)–(D) explants derived from 3, 6, 9 and 12 d exposure of colchicine, respectively.

但小苗發育時期對存活率的影響並不顯著 (表 2)。4 種處理中以真葉期苗以秋水仙素處理 1 d 的存活率最高，達 100.0%，其次為子葉期

苗處理 1 d 或 3 d 的 87.5–91.5%，最低者為真葉期苗經 3 d 處理之 60.0%。以流式細胞儀檢測成活植株之倍體表現，顯示以子葉期苗經

表 2. 不同發育時期之離體培養桔梗種子苗於含有 2.50 mM 秋水仙素之液態培養基中處理不同天數對多倍體誘導之影響。

Table 2. Effects of two developmental stage seedling explants in the liquid medium containing 2.50 mM colchicine for various exposure days on polyploidy induction of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

Seedling stage	Treated day	Treated seedling	Survival rate (%) ^z	Examined plant	Ploidy (%)	
					2C	4C
Cotyledon	1	50	1.5 ± 5.0 b ^y	23	82.6	17.4
	3	50	87.5 ± 6.6 b	9	55.6	44.4
True leaves	1	50	100.0 ± 0.0 a	23	65.2	34.8
	3	50	60.0 ± 11.3 c	13	61.5	38.5
Seedling stage			NS ^x			
Duration			**			
Seedling stage × Duration			**			

^z Percentage data was analyzed after arcsine transformation.

^y Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x NS: non-significant; ** significant at 1% level.

秋水仙素處理 1 d 獲得之 4 倍體比率最低，僅 17.4% 外，其餘各處理的 4 倍體比率相近，在 34.8–44.4% 之間。

秋水仙素於固態培養基中施用不同時間對不同發育時期培植體多倍體化誘導之影響

同樣使用 2.50 mM 秋水仙素濃度，但於固態再生培養基中處理 3 d 或 6 d，進行多倍體化誘導。結果顯示，種子苗的發育時期、秋水仙素處理天數及兩者間的交感效應，皆對

小苗存活率具有顯著影響 ($P < 0.01$) (表 3)。真葉期苗經過秋水仙素處理 3 d 或 6 d 後，仍能保持較高之存活率，在 81.3–86.0% 之間；子葉期苗 3 d 處理組亦具有相似之高存活率，但 6 d 處理組之存活率則下降至 46.7%，是所有處理中最低者。以流式細胞儀檢測成活植株，各種倍體數之圖譜如圖 2 所示。多倍體表現以子葉期苗經 3 d 處理之 64.7% 最高 (58.8% ± 5.9%)，其次為子葉期苗經 6 d 處理之 42.9%，而以真葉期苗經 6 d 處理之 18.5% 最低，各處理組之多倍體比率差異較大。

表 3. 不同發育時期之離體培養桔梗種子苗於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中處理不同天數對多倍體誘導之影響。

Table 3. Effects of two developmental stage seedling explants in the solid medium containing 2.50 mM colchicine for various exposure days on polyploidy induction of *Platycodon grandiflorum* A. DC.

Seedling stage	Treated day	Treated seedling	Survival rate (%) ^z	Examined plant	Ploidy (%)		
					2C	4C	8C
Cotyledon	3	50	82.1 ± 16.4 a ^y	17	35.3	58.8	5.9
	6	50	46.7 ± 12.2 b	7	57.1	42.9	
True leaves	3	50	86.0 ± 2.8 a	21	66.7	33.3	
	6	50	81.3 ± 25.7 a	27	81.5	18.5	
Seedling stage			** ^x				
Duration			**				
Seedling stage × Duration			**				

^z Percentage data was analyzed after arcsine transformation.

^y Means in a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x** Significant at 1% level.

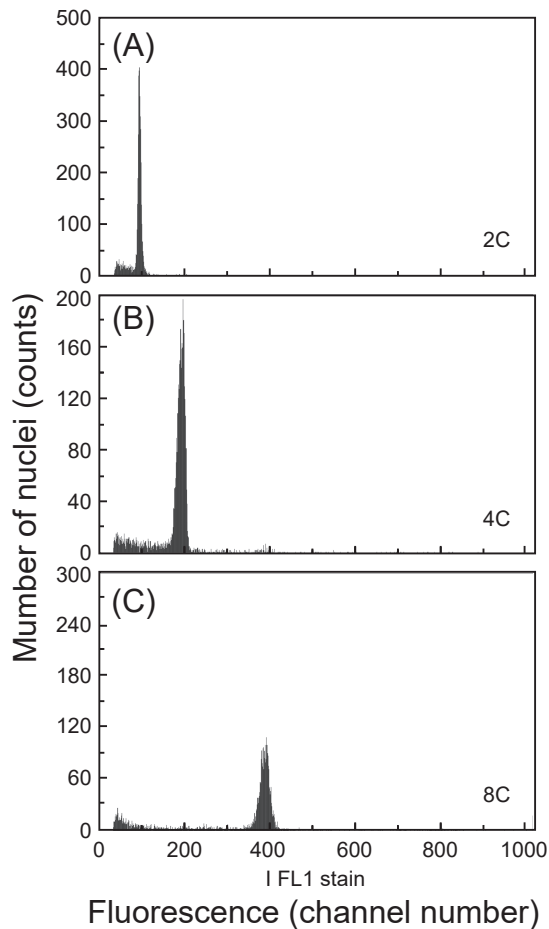


圖 2. 秋水仙素處理後之桔梗植株以流式細胞儀檢測之圖譜，每一植株分析 5,000 個細胞。(A) 未處理秋水仙素之對照組 2 倍體植株；(B) 4 倍體植株；(C) 8 倍體植株。

Fig. 2. Ploidy of *Platycodon grandiflorum* A. DC. Plants derived from colchicine treatments was analyzed by using flow cytometer. Histogram: Five thousand cells were analyzed for each sample. (A) Control diploid plant without colchicine treating; (B) tetraploid; and (C) octoploid plants.

討論

人工誘導多倍體是一種育種使用之工具，多倍體的目的在使植株的營養器官變大、藥用成分提高及抗逆性增強。在圖 3 中，可以看到同一時間播種之 4 倍體雜交桔梗種子於穴盤發芽之情形，大小不一的小苗說明多倍體桔梗的表現相當多樣化，亦說明人工誘導之多倍體桔梗在育種上之應用，仍須透過選拔優良單株與

測試雜交組合等傳統育種手段與流程來獲得新品種。因新品種(系)育種流程漫長，因此將多倍體桔梗於田間種植表現及選拔結果列為第二階段發表內容，本篇為多倍體桔梗研究之第一部分，主要內容為利用組織培養材料以秋水仙素誘導多倍體桔梗之結果。

影響離體培養方式誘導多倍體的因子眾多，包括使用之藥劑種類、藥劑濃度、處理時間、培植體種類及藥劑之施用方式等 (Dhooghe *et al.* 2011)。本研究中測試的因子，包括有秋水仙素濃度、處理時間、秋水仙素於固態或液態培養基施用，以及不同發育階段之培植體等，相當程度的檢視了以離體培養方式誘導多倍體的各项影響因子。在秋水仙素濃度對培植體存活率的影響方面，本研究比較 1.25 mM 與 2.50 mM 兩種濃度，結果顯示參試之兩種濃度對培植體存活率影響並不顯著(表 1)。其中，處理 3 d 之存活率兩種濃度依序為 92% 及 88%；但 Wang *et al.* (2006) 以相同濃度與時間處理桔梗莖節培植體，兩種濃度培植體之存活率依序為 30% 及 0%。本研究與 Wang *et al.* (2006) 雖然使用相同之秋水仙素濃度與處理時間，但兩研究之培植體存活率結果呈現相當大之差異，推測原因可能為培植體對秋水仙素的耐受性不同所致，亦即本研究中使用之種子苗培植體可能較莖節培植體對秋水仙素有較高之耐受性。這從本研究種子苗培植體之存活率普遍較高可以看出，且其存活率在秋水仙素濃度提高至 2.50 mM 後亦未呈現明顯下降(表 1)。在秋水仙素處理時間對培植體存活率的影響方面，可以看到本研究之 3 個試驗中，處理時間皆呈現極顯著之影響，且處理時間與培植體發育階段的交感效應亦極為顯著(表 1、表 2 及表 3)。在秋水仙素濃度與處理時間的複因子試驗中，處理時間從 3–12 d，結果顯示處理 3–6 d 間，培植體的存活率差異不大，但處理時間超過 6 d 時，存活率明顯下降(表 1)。而 Wang *et al.* (2006) 以相同濃度 (1.25 mM 與 2.50 mM) 秋水仙素處理桔梗莖節培植體 10–72 h，結果顯示處理時間在 10–40 h 之間時，兩濃度之存活率皆維持在 90% 以上；但處理時間超過 60 h 時，存活率明顯下降至 0–50% 之間。



圖 3. 由秋水仙素誘導所得之 4 倍體桔梗其雜交種子於穴盤發芽之情形。

Fig. 3. Germination and growth of hybrid seeds from colchicine derived tetraploid plants of *Platycodon grandiflorum* A. DC

比較上述兩研究均採用 1.25–2.50 mM 秋水仙素，但兩研究秋水仙素最佳處理時間則並不相同。一般而言，培植體的存活率，會隨秋水仙素濃度增加與處理時間延長而呈現下降的趨勢 (Yang *et al.* 2006)。比較過去以離體培養方式處理相同濃度 (1.25–2.50 mM) 秋水仙素之研究，發現各研究顯示的最佳處理時間相當分歧，從數小時、數天乃至於數週皆有之。雖然原因往往與培植體的種類及處理之方式有關，但此結果亦顯示，找到針對特定培植體最適合之秋水仙素處理時間，對提高多倍體的誘導效率而言尤為重要 (Tambong *et al.* 1998; Roy *et al.* 2001; Gao *et al.* 2002; Sajjad *et al.* 2013; Kwon *et al.* 2016)。此外，在本研究中除了調查培植體存活率外，亦同時調查了培植體的芽體增殖率，結果顯示濃度與處理時間對芽體增殖率的影響與對培植體存活率的影響，均呈現相同之趨勢。但從表 1 中可以看出，芽體增殖率較培植體存活率更能呈現出不同處理

間的差異性，因此建議芽體增殖率可以作為評估秋水仙素處理對培植體影響的指標。

培植體之存活率，主要反應出秋水仙素對培植體的致毒性。在本研究中，存活率調查是於秋水仙素處理完成並繼代至基本培養基中培養 4 wk 後進行，惟表 1、表 2 及表 3 中可以看到，各處理最後得到之成活株數遠低於培植體之存活率。也就是說，早期調查 (處理後 4 wk) 之培植體存活率，並未能正確傳達秋水仙素對培植體長期生長後產生的影響。Kadota & Niimi (2002) 以洋梨 (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui) 芽體培養於 0、0.25 及 2.50 mM 秋水仙素中 1、2、4 及 8 d，並追蹤處理後 2、3 及 4 mo 後之存活率，結果顯示以 0.25 mM 濃度處理 2 d，其 2、3 及 4 mo 後調查之存活率分別為 73.3、53.3 及 53.3%；但以 2.5 mM 濃度同樣處理 2 d，其 2、3 及 4 mo 後之存活率依序為 53.3、6.7 及 0%，且 0.25 mM 濃度處理 8 d 或 2.50 mM 濃度處理 2、4 及 8 d 者，最

後皆無成活植株。以上結果說明，秋水仙素施用濃度較高或施用低濃度但處理時間較長者，對培植體長期生長產生不利之影響。據此，建議早期調查之培植體存活率(如處理後 4 wk)不宜太低 (< 60%)，避免因此高估可獲得之植株數，否則在培養後期(處理後 8 wk 或 12 wk 後)，可能會面臨因培植體停滯生長或逐漸死亡，導致多倍體候選植株太少不利育種工作之進行。換言之，所謂最佳之秋水仙素處理，除具備有較高之多倍體誘導率外，必須同時兼顧培植體的存活率，才能成功獲得較多數量的多倍體候選植株。

Dhooghe *et al.* (2011) 指出影響離體培養誘導多倍體的諸多因子中，以秋水仙素濃度的高低與處理時間的長短，為影響多倍體誘導率的主要因子，且兩因子間具有交感效應。在秋水仙素濃度對於多倍體形成率的影響方面，根據 Dhooghe *et al.* (2011) 的評論報告指出，1.25–2.50 mM 是離體培養誘導多倍體較常使用之濃度。例如 Chakraborti *et al.* (1998) 以離體培養之桑椹 (*Morus alba* L.) 頂芽處理 1.25、2.50 及 5.00 mM 秋水仙素 24 h，其中以 1.25 mM 及 2.50 mM 有較高之 4 倍體誘導率；Hsia *et al.* (2010) 以 0.625–6.250 mM 秋水仙素處理離體培養金線連莖節 3 d，結果顯示以 1.25–2.50 mM 濃度皆可獲得較高之多倍體誘導率。本研究亦採用此一濃度範圍處理桔梗種子苗，各處理中以 2.50 mM 處理 9 d 獲得 66.7% 之 4 倍體比率最高；但若加總其他多倍體(如 3C 及 6C) 之總多倍體誘導率，則以 1.25 mM 處理 9 d 共獲得 83.3% 多倍體率最高(表 1)。Wang *et al.* (2006) 以 1.25 mM 與 2.50 mM 秋水仙素處理桔梗莖節培植體，結果以 2.50 mM 處理 40 h 獲得 50% 之 4 倍體為最高。比較上述兩桔梗研究之多倍體誘導比率，仍以本研究較高。

在秋水仙素處理時間對多倍體誘導率的影響方面，本研究顯示多倍體比率在液體培養時會隨著秋水仙素處理時間延長而提高(表 1、表 2)，在表 1 中顯示處理時間從 3 d 延長至 9 d 對多倍體誘導率有增進作用；但秋水仙素於在固態培養基中施用時，多倍體的比例隨著處

理時間從 3 d 延長 6 d 反而下降(表 3)。此外，在液態培養處理中觀察到除子葉期苗經秋水仙素處理 1 d 之 4 倍體比率較低外，其他各處理之 4 倍體比率差異不大(表 2)；但在固態培養中，不同發育階段小苗或不同處理天數之多倍體誘導率表現差異較大(表 3)，顯示秋水仙素於固態或液態培養基中施用之時間對多倍體誘導的影響不盡相同。Peterson *et al.* (2002) 以秋水仙素處理芒草 (*Miscanthus sinensis*) 離體培養有根或無根之芽體，結果顯示有根芽體對秋水仙素的耐受性較低，且嵌合體出現比率較高，推測原因可能為經由根部吸收之秋水仙素在未達成染色體倍加作用前，即已對培植體產生毒害作用。在本研究中以含有秋水仙素之固、液體培養基中處理種子苗，於固體培養基中培養之種子苗其秋水仙素必須完全經由根部吸收；反觀液體培養時，培植體全株浸於培養液中，其秋水仙素吸收途徑較為多元，不一定需經由根部吸收才能到達生長點。綜上推測，培植體在固態培養時，秋水仙素必須經由根部吸收，因此對培植體產生之毒害作用較大，隨著秋水仙素處理時間拉長，對於培植體細胞生長與複製產生的不良影響將更趨嚴重，本研究中秋水仙素於固態培養處理之結果亦顯示有相同現象。

以離體培養方式進行多倍體誘導建議採用分化能力較強的培植體，利用培植體細胞本身具有高度分裂及生長發育的特性來提高多倍體的誘導率(Peterson *et al.* 2002, 2003; de Carvalho *et al.* 2005; Zeng *et al.* 2006)；除此之外，亦可利用添加植物生長調節劑，活化生長靜止之體細胞後再進行秋水仙素處理，可以提高多倍體植株形成率(Wang *et al.* 2011)。種子苗具有數量多且生長力旺盛之優點，如 de Carvalho *et al.* (2005) 以胭脂樹 (*Bixa orellana* L.) 無菌播種萌發後 15 d 之種子苗，將其分為子葉培植體及下胚軸培植體進行多倍體誘導。此外，誘導多倍體之目標若是作為育種材料之用，則種子苗較其他離體培養材料更能提供遺傳之多樣性。在本研究中採用無菌播種而來之桔梗小苗作為誘導多倍體之材料，並依其發育階段分為子葉期苗以及真葉期苗加以比較(表

2、表 3)。從種子苗之發育階段對培植體存活率的影響來看，不同發育階段之種子苗在液態及固態培養中的表現並不相同，雖然兩試驗中使用之秋水仙素濃度相同，但因固態或液態培養基中處理秋水仙素的處理時間並不相同，可能是差異產生的原因之一。但整體來看，真葉期苗對秋水仙素處理具有較高之耐受性(培植體存活率高)，秋水仙素處理時間延長時，對子葉期苗的影響較大(固態培養 3 d vs. 6 d)。但其中亦有例外，即就是在液態培養 3 d 時，真葉期苗因葉片數較多，在液體震盪培養中會產生較多的摩擦，導致存活率降低，惟此缺點應可在秋水仙素處理前將葉片先切除而予以克服。以種子苗發育階段對多倍體的誘導效率的影響來看，在液態培養中除在子葉期苗處理 1 d 時較低外，其他各處理之多倍體誘導率差異不大，種子苗發育階段的影響並不顯著；但在固態培養因處理時間較長(3 d 或 6 d)，對不同發育階段的種子苗產生明顯之影響，其中以子葉期苗較真葉期苗具有較佳的多倍體誘導率，說明培植體材料的生理狀態對於多倍體誘導效率具有一定的影響力。比較不同發育階段之培植體對多倍體誘導影響的研究甚少，Hsia *et al.* (2009) 以台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 無菌播種不同週齡之根莖 (rhizome) 作為培植體進行多倍體誘導，發現從無菌播種而來之根莖具有很好的分化能力，且採用適當根齡之根莖作為培植體可提高多倍體誘導的比率，顯示選擇適當發育階段或生理狀態較佳之培植體可以提高多倍體誘導率。

綜合本研究之結果，顯示使用無菌播種之種子苗作為誘導多倍體之材料，培植體的生長發育階段、秋水仙素處理時間，以及秋水仙素以固態或液態方式處理等因子，不僅會影響培植體的存活率，同時亦影響多倍體的誘導率。建議以展開 2 片子葉之桔梗種子苗為培植體，在含有 1.25 mM 秋水仙素之液態培養基中處理 6 d，或於含有 2.50 mM 秋水仙素之固態培養基中處理 3 d，可獲得高於 80% 之培植體存活率，且多倍體誘導率在 60% 以上。

引用文獻

- Acquah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing, Malden, MA. 584 pp.
- de Carvalho, J. F. R. P., C. R. de Carvalho, and W. C. Otoni. 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 80:69–75.
- Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. N. Roy, and S. M. H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep. 17:799–803.
- Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:359–373.
- Gao, S. L., B. J. Chen, and D. N. Zhu. 2002. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70:289–293.
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract)
- Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2010. *In vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176. (in Chinese with English abstract)
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Rep. 21:282–286.
- Kwon, S. J., D. Y. Seo, G. Y. Cho, M. S. Lee, Y. J. Moon, H. O. Boo, S. H. Woo, and H. H. Kim. 2016. Effect of colchicine on chromosome doubling in *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Plant Res. 29:347–354.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.
- Nyakudya, E., J. H. Jeong, N. K. Lee, and Y. S. Jeong. 2014. Platycosides from the roots of *Platycodon grandiflorum* and their health benefits. Prev. Nutr. Food Sci. 19:59–68.
- Petersen, K. K., P. Hagberg, K. Kristiansen. 2002. *In vitro* chromosome doubling of *Miscanthus sinensis*. Plant Breed. 121:445–450.
- Petersen, K. K., P. Hagberg, and K. Kristiansen. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73:137–146.

- Roy, A., G. Leggett, and A. Koutoulis. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Rep.* 20:489–495.
- Sajjad, Y., M. J. Jaskani, A. Mehmood, I. Ahmad, and H. Abbas. 2013. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). *Pak. J. Bot.* 45:1255–1258.
- Tambong, J. T., V. T. Sapra, and S. Garton. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. *Euphytica* 10:191–197.
- Wang, X. H., X. Li, Y. H. Qu, J. Yang, and Z. J. Gu. 2006. The polyploid induction and identification of *Platycodon grandiflorus* (Campanulaceae) in China. *Acta Bot. Yunnanica.* 28:593–598. (in Chinese with English abstract)
- Wang, X. L., J. X. Zhou, M. D. Yu, Z. G. Li, X. Y. Jin, and Q. Y. Li. 2011. Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploidy induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 47:434–440.
- Xu, B. J., Y. N. Zheng, and C. K. Sung. 2004. Quality control and evaluation of *Platycodon grandiflorum*: Implications for future management. *Nat. Prod. Sci.* 10:141–151.
- Yang, X. M., Z. Y. Cao, L. Z. An, Y. M. Wang, and X. W. Fang. 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 152:217–224.
- Zeng, S. H., C. W. Chen, H. Liu, J. H. Liu, and X. X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87:85–93.
- Zhou, C. E., S. X. Lu, Y. Q. Zhou, and F. P. Gu. 2008. Research progress on the polyploid breeding of medicinal plants by artificial inducement. *J. Anhui Agri.* 33:14600–14601. (in Chinese with English abstract)

Factors of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction by Using *in Vitro* Seedlings of *Platycodon grandiflorum*

Chi-Ni Hsia^{1,*}, Uei-Chern Chen², and Chin-Yi Tsao³

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, and C. Y. Tsao. 2019. Factors of colchicine treatments on polyploidy induction by using *in vitro* seedlings of *Platycodon grandiflorum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(3):215–225.

Plants of *Platycodon grandiflorum* A. DC. are vastly used as traditional Chinese medicine. However, breeding of elite varieties by hybridization has been less effective because of lacking diverse genetic resources in this species. It is thought to produce polyploidy by using colchicine that could create novel genetic resources for breeding purposes. This study was conducted to investigate effects of colchicine concentration, exposure duration and colchicine used in the liquid or the solid medium on polyploidy induction by using *in vitro* seedlings of *P. grandiflorum* in different developmental stages. Ploidy of survival plantlets derived from colchicine treatments was analyzed by using a flow cytometer. Results showed that both exposure duration of colchicine and its interaction with developmental stage of seedlings had significant effects on the survival rate of explants. The best treatments with explant survival rate higher than 80% and polyploidy induction rate more than 60% were obtained either from 1.25 mM colchicine in liquid medium for 6 d exposure or from 2.50 mM colchicine in solid medium for 3 d exposure by using cotyledon stage seedlings as explants.

Key words: Jiegeng, Ploidy, Tetraploid, Colchicine, *In vitro*.

Received: July 9, 2018; Accepted: March 14, 2019.

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

¹ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

³ Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.