

## 利用組織培養生產藥用植物種苗技術

夏奇鈺<sup>1</sup>、蕭翌柱<sup>2</sup>、楊淑如<sup>2</sup>、陳威臣<sup>2</sup>

<sup>1</sup>行政院農委會農業試驗所農藝組 副研究員及<sup>2</sup>助理研究員

關鍵詞：植物組織培養；中草藥植物；微體繁殖

Key words: Plant Tissue Culture；Medicinal Plant；Micropropagation

### 中文摘要

中草藥植物因原生地受破壞及人為過度採集等因素，面臨野生族群逐漸減少甚至消失之命運，嚴重影響中草藥產業之發展。傳統繁殖方法不但需時甚久且繁殖倍率偏低，不足以應付產業之需求。利用組織培養技術大量繁殖藥用植物種苗，將可達到保護自然珍貴種原及資源永續利用之目標。

農業試驗所農藝組之組織培養室，長期研究藥用蘭科植物—台灣金線連及石斛之開花習性、人工授粉適期、果莢成熟度與播種適期，對此類植物之生長和生理習性有充分瞭解；對後續無菌播種使用之培養基種類、植物生長調節劑濃度及有機添加物對種子發育及小苗生長等重要因子之探討，皆有優異成效；配合後期種苗大量快速繁殖技術，已建立完整之標準種苗生產模式，能在短期內獲得大量健康種苗，金線連並進一步回歸自然原生地栽種。重要傳統中藥—柴胡及丹蔘在建立種苗大量繁殖系統同時也克服瓶苗玻璃質化問題，對後續發根馴化比率之增進有益，為組培大量生產柴胡及丹蔘種苗產業栽培奠定良好基礎。目前亦將多年研究經驗與成果配合產業需要積極推動產學合作計畫，期望研究與產業實務能有密切合作之機會。

### 前言

中草藥產業技術開發是近年來政府有關單位努力推動的產業發展方向，業界亦普遍看好中草藥生物科技發展之前景，配合此一風潮，各學術單

位積極主動的將研究成果與實務結合，冀望對產業技術的提升有所幫助；目前也有愈來愈多的民眾，使用傳統中草藥及保健食品治療疾病或日常保健，這些主、客觀之因素，造成了現今中草藥生技產業蓬勃發展之榮景。中國人一向重視所謂的「道地藥材」，點出了在中草藥生技產業發展中一個很重要的基礎環節，即如何確保這些天然藥用植物資源的正確基原與不虞匱乏，否則將因原料短缺嚴重影響後續商業化生產之進行。中草藥既屬於自然資源，近年來無可避免的亦面臨在已開發國家中，因都市化、土地高度開發而逐漸消失之命運，而在發展中國家，則面臨民眾因追逐經濟利益，人為過度濫採而造成物種的瀕臨滅絕。藥用植物資源在自然界逐漸稀少、消失的問題如未能妥善解決，未來將成爲中草藥產業發展之隱憂。植物細胞具有分化全能性是植物組織培養的立論基礎，在許多不同種類的植物中都得到廣泛驗證，近年來配合生物技術突飛猛進，組織培養的應用更加多元化。種苗大量繁殖是植物組織培養最爲人熟悉的技術，目前蘭花產業及許多室內觀賞植物也大都依賴組織培養技術大量生產種苗。農業試驗所農藝組的組織培養研究室在十幾年前即開始投入重要中草藥植物之組織培養研究，建立大量繁殖系統包括：台灣龍膽、輪葉沙蔘、半夏、貝母、柴胡、山藥、延胡索、當歸、金線連及石斛等(蔡 1999；Sagare *et al.* 2000)。本篇僅以研究室近年來在台灣金線連、白芷、藥用石斛、柴胡及丹參等幾種重要中草藥之研究爲例，介紹其利用組織培養繁殖種苗之成果。

### 台灣金線連之標準種苗繁殖模式建立

台灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)爲珍貴的蘭科草本植物，曾廣泛分佈於海拔高約 500-1700 公尺冷涼原始林蔭處，其生育適溫約在 20-24℃，如北部的北插天山、宜蘭縣棲蘭山、南投縣水社大山、嘉義縣奮起湖以及南部的南仁山等地均可見其蹤跡。台灣金線連性味甘、平，入肝、脾、腎三經，故民間常用爲清涼解熱、祛風活血、止血、解鬱、強心、利尿，降血糖、降血壓，治肝亢、肝炎、肺病、肺癆、腫傷、胸腹痛、遺漏、遺精、牙痛、小兒發育不良、蛇類咬傷及肝脾諸臟器疾病之滋養強壯劑(甘偉松，1979；林哲民等，1991；李煥燊等，1976；梁文俐等，1991)。早期山地原住民常採摘鮮草混合豬肉、米酒等材料一同燉煮食用或嚼碎外敷，以治療胸腹痛或蛇類咬傷(李煥燊等，1976)。因相傳效用廣泛，故有藥王、藥虎、金蠶、烏蔘、石松、金石松、本山石松、虎頭蕉、金線屈腰、金線蕨龍、金線蓮、樹草蓮、雉雞草、金錢草和黃花糯米蘭等別名(甘偉松，1979；李煥燊等，1976；昭人出版社，1979)。據近年市場調查，設施栽培之鮮草零售價格，每台斤約

爲 2300-2500 元，而採自高山原始林區的野生金線連售價，每台斤更高達 5000 元以上；由於市場零售價格不菲，進入山區採擷者絡繹於途，復以原始林地久遭人爲濫墾破壞，目前已知野生族群正逐年銳減。農業試驗所經多年來有系統的探索金線連生態、生理及組織培養技術(圖 1)，目前已完成一套標準種苗繁殖模式並掌握數種優質培養基配方，另外，也在國內、外學術期刊發表數篇重要的試驗論文，研究項目包括花期調節、授粉適期、果莢成熟度(表 1)並探討種原保存技術(蕭翌柱等，1995；蕭翌柱等，1996；蕭翌柱等，1998；Shiau *et al.*, 2002)，現階段正在棲蘭山、埔里山區及奮起湖林區，進行組織培養苗原生地移植和抗、耐病選拔試驗，且選擇埔里地區二處專業金線連栽培溫室做爲對照組，除定時採收樣本提供調查外，未來更將進一步檢測其氨基酸含量、微量元素和保肝指標成分。上述各研究成果有部分項目已藉由開辦農村青年短期訓練班，將技術傳授及轉移給農民參考使用，協助金線連栽培產業逐步發展。

### 中藥白芷健康種苗生產

白芷始載於神農本草經，列爲草部中品(三國吳普等，1982 重刊)，歷代諸家本草自此皆有著錄。本品爲繖形花科(Umbelliferae)獨活屬植物、唐白芷 *Angelica dahurica* Benth. et Hook. var. *pai-chi* Kimura, Hayata et Yen 的乾燥根。近緣植物有興安白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. ex Franch. et Sav.及台灣(杭)白芷 *A. dahurica* Benth. et Hook. var. *formosana* (Bioss.) Yen 等品系(中藥典範編輯委員會，1985b；陳存仁，1986)。產地主要分布於中國四川、河南、江蘇、浙江寧波、杭州、雲南、山東、黑龍江、興安、湖北、湖南等地；其餘如台灣、日本、韓國、西伯利亞一帶也有分布。現代別名有獨活、大活、香大活、走馬芹和大本山芹菜(許鴻源，1980)。其性味辛溫，芳香通竅而表汗(明李時珍，1977 重刊)。主治女人漏下赤白、血閉陰腫、寒熱、頭風侵目淚出、長肌膚、潤澤顏色、可作面脂、葉可作浴湯(三國吳普等，1982 重刊)。另治鼻淵、齒痛、眉稜骨痛、大腸風秘、小便去血、婦人血風眩暈、翻胃吐食、解砒毒蛇傷、刀箭金瘡；葉浴可治丹毒及癩疹(明李時珍，1977 重刊；渣汪訥庵，1994 重刊)。白芷爲 2 年或多年生草本植物，地上部抽苔開花時，全株高度可達 1~2 公尺；主根粗大垂直生長，呈圓錐形；莖近圓柱形，基部隨不同品種呈黃綠色或紫紅色；葉互生，具有長柄，爲 2~3 回羽狀深裂；複繖形花序頂生或腋生，花萼不明顯，花瓣五片白色或黃綠色，雄蕊五個，子房下位具有二室；爲雙懸果且橢圓形分果具五稜；花期 5~7 月，果期 7~9(甘偉松，1970；中藥典範編輯委員會主編，1985b)。品質鑑別以色

白、身乾、獨支、根條粗大、表皮黃或淡棕色、皮細、質堅實，粉性足、氣味馨香為上品(中藥典範編輯委員會主編，1985a；顏昆熒，1980)。藥效成分含呋喃香豆素衍生物 Furocoumarin Derivatives (例如白芷素、白芷酸、白當歸素、氧化前胡素、歐芹屬植物根素乙、異歐芹屬植物根素乙)；此外，另含白芷毒素、繖形花內酯、香檸檬油素等成分(中藥典範編輯委員會，1985b；顏正華，1994)。現代藥理證明白芷根為中樞興奮藥及鎮痛、治風要藥，用於流行性感冒及產前產後之頭痛有卓效；對於齒痛、顏面神經痛、眉稜骨痛及便血等症狀有緩解功效；亦可作為分娩時陣縮催進劑，近來研究發現白當歸素有擴張冠狀動脈血管之作用；歐芹屬植物根素乙等成分具有抗菌作用，治療白癜風與銀屑病效果良好(周繼民，1980；顏正華，1994)。此外，少量白芷毒素，可興奮延腦呼吸中樞，故呼吸增強、血壓上升及反射亢進，過量則發生強直性和間代性驚厥，終致全身麻痺(甘偉松，1970)。由於白芷為我國重要的傳統藥材之一，多取乾燥根入藥，其能驅風散濕、生肌止痛、消炎殺菌及解毒排膿，也可製造高價美白化妝品，並對一般的感冒頭痛均具療效，應用範圍相當廣泛，但本種植物授粉方式屬於常異交，以種子繁殖往往不能保存母株優良特性；且其具有之縮短莖也不利於採用傳統扦插方式營養繁殖。利用組織培養技術大量繁殖優良母株則可克服上述各項缺點，既可避免因種苗短缺或生長勢不均一，徒增田間種植與管理的困擾，也可以確保原、物料之產品品質。雖然，台灣白芷細胞懸浮培養已見報導(張文德等，1993)，但要應用於商業生產仍有努力空間。農業試驗所自西元 2003 年起即與藥之鄉生技公司以大量繁殖中藥白芷健康種苗為題，進行兩年的產學合作研究，藉由組織培養苗之量產技術(圖 2)，配合廠商科學化栽培管理制度，開發出高品質且產量穩定之白芷藥材，並建立自有的原、物料供需體系，現階段執行進度和成效皆符合原先預期的目標，不但掌握分生組織增殖芽體之誘導技術，且已提撥近千棵健康苗株運送至該公司的古坑農場，進行田間移植栽培等後續試驗。

### 藥用石斛播種及莖節培養繁殖技術

石斛屬 (*Dendrobium*) 許於蘭科第二大屬，原產於中國、日本、菲律賓、泰國、印度、馬來西亞、澳大利亞及紐西蘭等國，台灣亦有其蹤跡，全球有 1500 種以上之石斛，為多年生草本植物，多生於數皮或岩石上，開花多，但結果少，每個果莢可含 100 萬粒種子以上，種子細如粉絲，每粒種子重約 0.3~0.4 $\mu$ g，由於缺乏胚乳組織，須與真菌共生 (symbiotical) 才能萌發，自然條件下萌芽率不及 5%，故以無性分株為其主要繁殖方式 (張等，2000)。

石斛屬植物中有不少為名貴中藥，在本草綱目中石斛被列為上品，如著名的金釵石斛 (*D. nobile*)、鐵皮石斛 (*D. candidum*) 或是霍山石斛 (*D. huosannense*) 等，具有強陽益精、補腎益力、輕生延年等作用，其應用範圍正迅速擴大中。藥用石斛除具藥用功效外，美麗之花朵亦可供觀賞，近年野生石斛因過度的採集，加上在自然環境下繁殖率低，其族群分布正快速銳減中，故對於高經濟價值之藥用石斛，實有必要以組織培養大量繁殖種苗做為保存天然種原及供應市場之所需。以鐵皮石斛為例，將花朵授粉 120 天後採收的果莢種子，先播種於含有 1/2 Murashige 和 Skoog's (MS) 基本鹽類及 30g/l 蔗糖之固體培養基培養四個月，再繼代培養於含有 1/2 MS 基本鹽類、80 g/l 馬鈴薯泥、2 g/l 活性碳粉及 30g/l 蔗糖之培養基，可使幼苗生長良好。切取株齡九個月且發育強健的實生苗莖節，置於含有 1/2 MS 基本鹽類並添加 1.0 ml/l HYPONeX (液態, N:P:K=6:3:3)、2 mg/l BA、0.1 mg/l NAA 及 30g/l 蔗糖之液體培養基振盪培養 75 天，可使 73.2% 的莖節萌生新芽。新生芽體扦插培養於內含 1/2 MS 基本鹽類並添加 1.0 ml/l HYPONeX (液態, N:P:K=6:3:3)、80 g/l 馬鈴薯泥、0.2 mg/l NAA、2 g/l 活性碳粉、30g/l 蔗糖及 8.5 g/l Difco Bacto 洋菜膠之培養基，可以迅速促進種苗發根，苗株經馴化後移植栽培於高海拔山區自然環境下，仍能適應良好且正常成長 (圖 3)。目前研究室針對藥用鐵皮及銅皮石斛之開花習性、人工授粉適期、果莢成熟度與播種適期、無菌播種培養基種類、植物生長調節劑種類及有機添加物對小苗生長之影響，皆已獲得初步成果，據此所建立之種苗繁殖系統，可以提供基原可靠且品質穩定之自有藥材供應，為保護自然資源及商業大量生產兩者間提供了解決之道。

### 高氏柴胡組織培養大量繁殖之研究

柴胡為神農本草經之草部上品，廣泛應用於中國、日本、韓國及台灣等地；中國藥典正品柴胡為北柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 的乾燥根；高氏柴胡 (*B. kaoi* Liu, Chao et Chuang) 則為本省特有之原生藥用植物，其保肝效果優於日本常用之三島柴胡 (*B. falcatum* L. var. *komarowii* Koso-Polj) 及北柴胡，極具發展推廣之潛力 (甘，1985；林與顏，1999；Yen *et al.* 1991)。柴胡栽培歷史不長，屬常異交植物，並無經過長時間的人為選拔，栽培品種間遺傳變異相當大，且柴胡種子具有低溫需求性，其種子發芽率低且發芽勢不佳，造成栽培上的困擾 (黃與郭 1995)。三島柴胡利用組織培養技術繁殖種苗研究已見發表 (許等 1993；Kohda *et al.*, 1990)，高氏柴胡之組織培養研究則尚待建立。本研究利用腋芽培養於含 1mg/l BA 及 0.1mg/l NAA 之 1/2MS 培養基，已建立高氏柴胡之初代培養 (圖 4)；將此無菌苗繼代培養於添加 0.25mg/l BA 之 1/2MS 培養基，經培養 8 週後之繁殖倍率為 7.3 倍，可達到大量繁殖的目的 (表

2) (陳等, 2004b)。液態培養增殖效率較固態培養高, 然卻使得玻璃質化苗比率也隨之提高, 此結果對於組培苗大量繁殖造成相當大的困擾(Dillen and Buysens, 1989; Paques 1991)。柴胡液態培養下, 正常苗繁殖率低於固態培養, 且培養 6 週後產生嚴重玻璃質化問題, 因此液態培養方式不利於高氏柴胡組培苗之增殖(陳等, 2004b), 但可利用高透氣性材質之物做為培養容器覆蓋物, 可有效抑制組培苗玻璃質化現象, 亦可增進其品質(陳等, 1998)。高氏柴胡組培苗培養可於含有 0.5 mg/l IBA 之 1/2MS 培養基誘導優良根系形成(圖 5); 若能配合利用置換培養容器覆蓋物適當時間之處理, 不僅降低玻璃質化組培苗比率, 更可提升組培苗品質(表 3 及圖 6); 瓶苗出瓶後於生長箱培養 4 週後, 其馴化成活率達約 92% (表 3 及圖 7)。

### 丹蔘組織培養大量繁殖之研究

丹蔘(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)為唇形科(Labiatae)多年生草本植物, 具有活血化癥之功效, 是治療心血管疾病的重要中藥(那等, 1989; 陳與凌, 1999; Wu *et al.*, 1998)。利用丹蔘幼嫩葉片可誘導不定芽與癒合組織形成以建立其初代培養, 葉片癒合組織更可進一步產生大量不定芽, 平均每 0.2g 癒合組織可產生約 20 個不定芽, 可達到大量繁殖的目的(圖 8)。丹蔘組培苗可於含有 0.25mg/l kinetin 之 MS 培養基生長良好, 經培養 6 週後之繁殖倍率為 6.7 倍; 然而, 組培苗培養於添加 0.05-0.1mg/l BA 或 0.25-0.5mg/l kinetin 之 MS 培養基, 其瓶苗均呈現玻璃質化現象。傳統微體繁殖為防止污染與增高繁殖率, 利用低透氣性封口、高 cytokinins 濃度與液態培養等培養方式, 往往導致玻璃質化現象, 亦即造成培養基與培養環境之各種化學與物理因子, 均可能是影響玻璃質化現象形成的因子(陳等, 2004a)。本研究降低 MS 鹽類濃度與 kinetin 濃度之處理, 並無法有效降低玻璃質化組培苗形成率; 利用透氣性較佳之藥包紙做為培養容器覆蓋物之處理, 可有效抑制玻璃質化組培苗形成(表 4)。藉由改善影響因子條件、控制相對濕度或水分有效性, 以及添加抗玻璃質化劑等處理, 雖可有效地降低玻璃質化組培苗的比率, 然部分措施往往造成組培苗繁殖率及品質的降低, 應用上宜多加比較以免顧此失彼(陳等 2004a)。Tsay *et al.*(1998)利用高透氣性的培養容器覆蓋物, 不只能有效抑制康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)玻璃質化現象, 亦可增進組培苗品質。因此, 若能同時配合藥包紙進行培養容器覆蓋物置換處理, 不僅抑制丹蔘組培苗的玻璃質化現象更能增進其品質(圖 9) (陳等, 2004b)。將苗長約 2cm 之組培苗培養於含有 0.5mg/l IBA 之 1/2MS 培養基可誘使健壯根系形成(表 5)。丹蔘瓶苗出瓶後於生長箱培養 8 週後, 所形成之健壯植株可移植田間盆栽栽培(圖 10)。

## 結 語

台灣位居亞熱帶地區，因境內多高山丘陵，地理位置特殊具有多種型態之風土氣候，植物資源豐富而獨特，孕育有許多重要珍貴藥材，國人應對珍貴種原善加保護，更應在兼顧自然生態保育的前提下，達到資源永續利用的目標。因此利用組織培養技術以人工大量培養方式，繁殖珍稀藥用植物之健康種苗以供市場所需是我們努力之方向。

農業試驗所組織培養室長期研究台灣金線連、石斛之開花習性、人工授粉適期、果莢成熟度與播種適期等特性，探討無菌播種培養基種類、植物生長調節劑使用及有機添加物對種子發育及小苗生長之影響，配合後期種苗大量快速繁殖技術，已建立完整之標準種苗生產模式，能在短期內獲得大量之健康種苗；金線連並進一步研究回歸自然原生地栽種之可行性。柴胡及丹蔘除建立其種苗大量繁殖系統外，同時克服瓶苗玻璃質化之問題，對後續發根馴化率之增進有很大之幫助，奠定大量生產柴胡及丹蔘組培種苗之基礎。目前組織培養研究室亦經由產學合作計畫將多年研究之經驗與成果與產業需要結合，期望研究與產業實務間有更密切之合作。植物組織培養除用以生產大量種苗外，尚有多方面的應用可以提供育種者、種苗業者克服現存之問題，以加速作物開發速度及開拓產品更寬廣之應用，農業試驗所的組織培養研究室多年來在農業育種、種苗大量繁殖及生物技術研究中累積了一些成果，希望藉由我們的經驗協助更多中草藥生技及種苗業者可以更有效率的達成目標，

## 參考文獻

1. 三國吳普等述。清孫星衍、孫馮翼同輯。1982 重刊。神農本草經。第 148-149 頁。文光圖書有限公司印行。台北市。
2. 甘偉松。1970。臺灣藥用植物誌。第 644-645 頁。國立中國醫藥研究所。台北市。
3. 甘偉松。1979。藥用植物學。第 646-647 頁。國立中國醫藥研究所。台北市。
4. 甘偉松。1985。柴胡、高氏柴胡(擬)。臺灣藥用植物誌，卷上，pp. 650-651。國立中國醫藥研究所，臺北。
5. 行政院衛生署中藥典範編輯委員會。1985a。中華民國中藥典範。第一輯第

- 一冊第 327-330 頁。行政院衛生署中醫藥委員會印行。台北市。
6. 行政院衛生署中藥典範編輯委員會。1985b。中華民國中藥典範。第一輯第三冊第 384-386 頁。行政院衛生署中醫藥委員會印行。台北市。
  7. 那琦、謝文全、李一宏。1989。重輯嘉祐補註神農本草 第 78 頁。私立中國醫藥學院藥學研究所，臺中。
  8. 李煥燊、劉國柱、周正仁。1976。臺灣藥用植物之探討。第 279-280 頁。國立中國醫藥研究所。台北市。
  9. 明李時珍撰。1977 重刊。本草綱目(中冊)。卷十四第 11-14 頁。宏業書局有限公司印行。台北市。
  10. 周繼民。1980。白芷治療銀屑病有效成分研究。中成藥研究 vol. 4 : 33。
  11. 林哲民、林俊清、吳佩珊、邱慧芬、李興進。1991。臺灣產生藥金線蓮、靈芝、絞股藍之抗炎症及保肝作用研究。刊載於「藥用及保健植物研討會專輯」。第 89-98 頁。台東區農業改良場編印。台東市。
  12. 昭人出版社。1979。中藥大辭典。第 2021-2022 頁。台中市。
  13. 林俊清、顏銘宏。1999。高氏柴胡的資源開發與藥效評估。1999 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)，pp. 51-55。臺灣省農業試驗所，臺中。
  14. 梁文俐、陳榮進、江育人、蘇慶華、楊玲玲、顏焜熒。1991。臺灣產金線蓮之研究 I. 金線蓮之生理活性研究。刊載於「藥用及保健植物研討會專輯」。第 89-98 頁。台東區農業改良場編印。台東市。
  15. 許鴻源。1980。中藥材之研究。第 13-16 頁。新醫藥出版社。台北市。
  16. 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。
  17. 黃秋蘭、郭能成。1995。三島柴胡育種指標性狀之篩選與利用。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)，pp. 69-84。臺灣省農業試驗所，臺中。
  18. 清汪訥庵撰。1994 重刊。本草備要。第 85-88 頁。文光圖書有限公司印行。台北市。
  19. 陳存仁。1986。中國藥學大辭典上冊。第 396-400 頁。旋風出版社印行。台北市。
  20. 陳威臣、夏奇鋌、葉茂生、蔡新聲。2004a。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
  21. 陳威臣、葉茂生、蔡新聲。2004b。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 (印刷中)
  22. 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。



23. 陳堅、凌昌全。1999。丹參與肝癌防治。中草藥 30：226-228。
24. 張文德、陳忠川、張永勳、蔡新聲。1993。臺灣白芷組織培養之研究 I. 癒合組織之誘導及培養基成分之探討。中華農業研究 42(3)：253-264。
25. 張明、夏鴻西、朱利泉、張玉進。2000。石斛組織培養研究進展。中國中藥雜誌 25(6):323~326。
26. 蔡新聲。1999。藥用植物之組織培養技術。1999 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)，pp. 113-124。台灣省農業試驗所，台中。
27. 顏昆熒。1980。原色常用中藥圖鑑。第 25-26 頁。南天書局。台北市。
28. 顏正華主編。1994。中藥學(上)。第 78-80 頁。知音出版社。台北市。
29. 蕭翌柱、陳威臣、呂佳宜、蔡新聲。1995。臺灣金線連之組織培養 I. 改進種子萌芽率之研究。中華農業研究 44(3)：279-286。
30. 蕭翌柱、陳威臣、林弘敏、蔡文芷、蔡新聲。1996。台灣金線連花期調節與授粉之研究。中華農業研究 45(3)：250-259。
31. 蕭翌柱、陳威臣、蔡新聲。1998。臺灣金線連之組織培養 III. 種子成熟度及前處理對萌芽與幼苗發育之影響。中華農學會報 183：69-78。
32. Dillen, W. and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L.. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 19: 181-188.
33. Kohda, H., A. Namera and Y. Hamamoto. 1990. Propagation of *Bupleurum falcatum* by shoot tip culture. Shoyakugaku Zasshi 44: 38-41. (in Japanese with English Abstract)
34. Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation : causes, remedies and prospects. Acta Hort. 289: 283-290.
35. Sagare, A. P., Y. L. Lee and H. S. Tsay. 2000. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medicinal plant genetic resource. pp. 171-187. in: 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.
36. Shiau Y.-J., A. P. Sagare, U.-C. Chen, S.-R. Yang, H.-S. Tsay. 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:123-130.
37. Tsay, H. S. 1998. Effects of medium composition at different precultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in *in vitro* shoot proliferation. Acta Hort. 461: 243-249.
38. Wu, Y. J., C. Y. Hong, S. J. Lin, and M. S. Shiao. 1998. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 481-486.
39. 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. Ethnopharm. 34: 155-165.

## **In vitro micropropagation of medicinal plants**

Chi-Ni Hsia<sup>1</sup>, Yih-Juh Shiau<sup>2</sup>, Shu-Ru Yang<sup>2</sup>, Wei-Chin Chen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Associate Agronomist, <sup>2</sup>Assistant Agronomist, Agronomy Division of Agricultural Research Institute, Council of Agricultural Executive Yuan, Wufeng, Taichung, Taiwan 41301, ROC.

### **Abstract**

Medicinal plants are getting important to human health in many ways however since their natural habitats destroyed rapidly and the over-collection by human beings, the natural population of medicinal plants disappeared significantly. Many of these plants when propagated by conventional methods take long times or along with a low rate for multiplication. Those endangered medicinal herb germplasms not only need to be conserved but also need to produce substantially for the using of herbal medicine industry. The rapid multiplication of medicinal herbs by tissue culture techniques can help to solve these problems.

During the last decade, our team has studied two major medicinal orchids an endangered Taiwanese species *Anoectochilus formosanus* Hayata and another important Chinese herb *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl. After several years of work, the proper timing for pollination, maturity of pod for sawing, the media for seed germination and seedling growing and the fast seedling multiplication techniques were all investigated. Standard operation

processings for production *in vitro* seedling of *A. formosanusand* and *D. candidum* seedlings have been established. Moreover, tissue culture training classes held annually introduced relevant techniques to farmers and a project for returning *A. formosanusand* back to their natural habitats is ongoing.

An efficient protocol to produce high quality rooted planted which are easy to acclimatize for field establishment is very important for large-scale production of *in vitro* seedlings. The seedling production of *Bupleurum kaio* Liu, Chao et Chuang and *Salvia miltiorrhiza* Bunge, two important Chinese medicinal plants, by using ventilated container closure to overcome the problems of vitrification (hyperhydricity ) on fast multiplication seedling of *in vitro*, has become more practical.

In these two years we start to produce *Angelica dahurica* *in vitro* seedling for the herb medicine company through a cooperation project which may open another window for us to bring our research studies to a level of industry scale.

表 1. 金線連果莢成熟度對種子萌芽之影響<sup>Z</sup>Table 1. Influence of seed maturity on germination of *Anoectochilus formosanus* Hayata<sup>Z</sup>

Seed maturity (%)	Germination rate after culture for			
	15 days	30 days	45 days	60 days
50	0.0	0.0	0.0	0.0 c <sup>Y</sup>
62.5	0.0	0.0	0.0	0.0 c
75	0.0	0.0	0.0	0.0 c
87.5	45.2	47.6	50.1	50.8 a
100	35.9	36.7	36.8	36.8 b

<sup>Z</sup> Basal medium : 1/2 MS basic salts with 3% sucrose and 0.9% agar.

<sup>Y</sup> Means followed by the same letter within each column are not significantly different at 5% by the t- test.

表 2. BA 與 kinetin 對高氏柴胡組培苗增殖之影響

Table 2. Influence of BA and kinetin on shoots multiplication of *Bupleurum kaoi*<sup>Z</sup>

Phytohormones (mg/l)		No. of shoots produced per explant <sup>Y</sup>		No. of hyperhydric shoots developed per explant		Percentage of hyperhydric shoots	
Kinetin	BA	6 weeks	8 weeks	6 weeks	8 weeks	6 weeks	8 weeks
0	0	1.3 g <sup>X</sup>	1.9 e	0 c	0 c	0	0
0.1	0	2.5 f	2.6 de	0 c	0 c	0	0
0.2	0	2.6 ef	3.0 d	0 c	0 c	0	0
0.4	0	2.9 de	4.1 c	0 c	0 c	0	0
0.8	0	2.7 def	2.7 d	0 c	0 c	0	0
0	0.25	6.0 a	7.3 a	0.6 b	1.2 c	10.0	16.4
0	0.5	5.0 b	6.2 b	1.1 a	2.9 a	22.0	46.8
0	1.0	4.1 c	6.0 b	1.1 a	2.8 a	26.8	46.7
0	2.0	3.0 d	3.9 c	1.0 a	1.6 b	33.3	41.0

<sup>Z</sup> *In vitro* grown shoots about 1.5cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with various concentration of BA and kinetin.

<sup>Y</sup> Shoots smaller than 2cm in length were not scored.

<sup>X</sup> Twenty explants were tested per treatment and the data was collected after 6 and 8 weeks of 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.

表 3. 藥包紙置換時間對高氏柴胡組培苗根系誘導、芽體增殖與移植存活率之影響

Table 3. Influence of dispense paper as container closure on root formation, shoot proliferation and seedling acclimatization of *Bupleurum kaoi* *in vitro* shoots<sup>z</sup>

Container closure	Percentage of rooted explant <sup>y</sup>	Avg. root length of per rooted explant	Survival rate	
			4 W	8W
Aluminum foil (6 weeks)	77.8 ± 5.89 a	1.69 ± 0.09 a	33.3 ± 6.42 d	11.1 ± 6.42 d
Aluminum foil (1 weeks) + Dispense paper (5 weeks)	58.9 ± 1.78 c	1.19 ± 0.10 c	55.6 ± 6.42 c	44.4 ± 6.42 b
Aluminum foil (2 weeks) + Dispense paper (4 weeks)	72.2 ± 5.44 b	1.59 ± 0.09 b	77.8 ± 6.42 a	48.1 ± 7.41 a
Aluminum foil (3 weeks) + Dispense paper (3 weeks)	71.1 ± 12.1 b	1.51 ± 0.10 b	74.1 ± 3.70 a	44.4 a
Aluminum foil (4 weeks) + Dispense paper (2 weeks)	73.3 ± 8.67 b	1.59 ± 0.10 b	74.1 ± 7.41 a	37.0 ± 3.70 c

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots about 1-1.5cm in length were cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0.5 mg/l IBA for 6 weeks.

<sup>y, x</sup> Same as Table 2.

表 4. 培養容器覆蓋物與處理時間對丹蔘組培苗生長的影响

Table 4. Influences of container closure and culture duration on proliferation of *Salvia miltiorrhiza* in *in vitro* culture<sup>z</sup>

Treatment	Shoots per explant			Length of normal shoots (cm)
	Number	Normal (%)	hyperhydric (%)	
Aluminum foil (6 weeks)	7.2 ± 2.1 a	0	100	---
Dispense paper (6 weeks)	4.5 ± 0.8 c	100	0	3.25 ± 1.78 a
Aluminum foil (2 weeks) + Dispense paper (4 weeks)	6.4 ± 1.1 b	100	0	3.12 ± 1.12 a
Aluminum foil (4 weeks) + Dispense paper (2 weeks)	4.1 ± 0.9 c	100	0	1.87 ± 0.38 b

<sup>z, y, x</sup> Same as Table 2.

表 5. IBA 濃度對丹蔘組培苗生長與不定根誘導之影响

Table 4. Influence of IBA on roots formation of *Salvia miltiorrhiza* *in vitro* shoots<sup>z</sup>

IBA (mg/l)	Percentage of rooted explant <sup>y</sup>	Avg. no of roots per explant <sup>y</sup>	Avg. length of roots per rooted explant
0	37.5 ± 6.29 d	2.4 ± 0.78 c	3.4 ± 0.59 c
0.25	52.5 ± 11.9 c	4.1 ± 1.25 b	4.2 ± 0.98 b
0.5	75.0 ± 5.00 a	5.2 ± 1.98 a	4.8 ± 1.12 a
1	65.0 ± 2.89 b	4.5 ± 2.18 b	4.3 ± 0.78 b

<sup>z, y, x</sup> Same as Table 2.

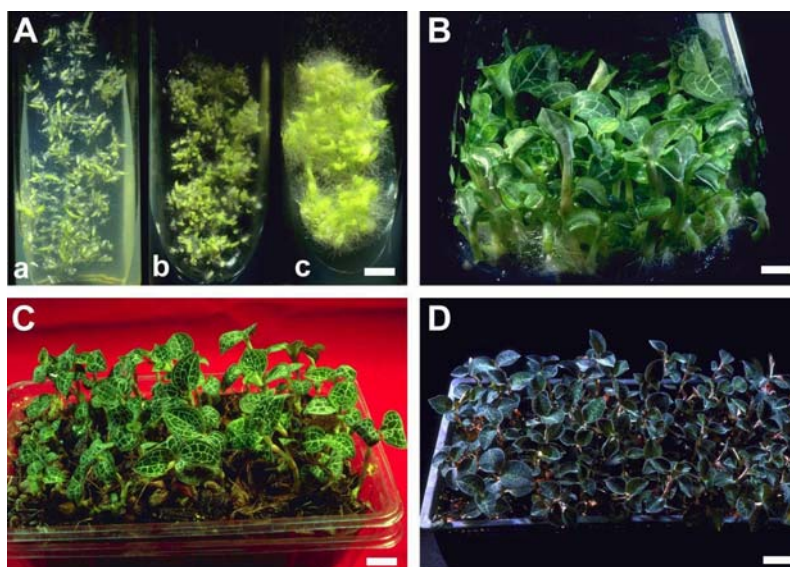


圖 1.台灣金線連無菌播種及種苗馴化移植。(A) 不同播種培養基配方之比較；(B) 種苗繼代培養；(C) 苗株經馴化後出瓶培育；(D) 已達商品化階段之金線連成株。

Fig.1. (A-D). Asymbiotic seed culture and *ex vitro* establishment of seedlings of *Anoectochilus formosanus*.



圖 2. 中藥白芷組織培養苗瓶內大量繁殖。

Fig. 2. Masspropagation of *Angelica dahurica* cultured *in vitro*.

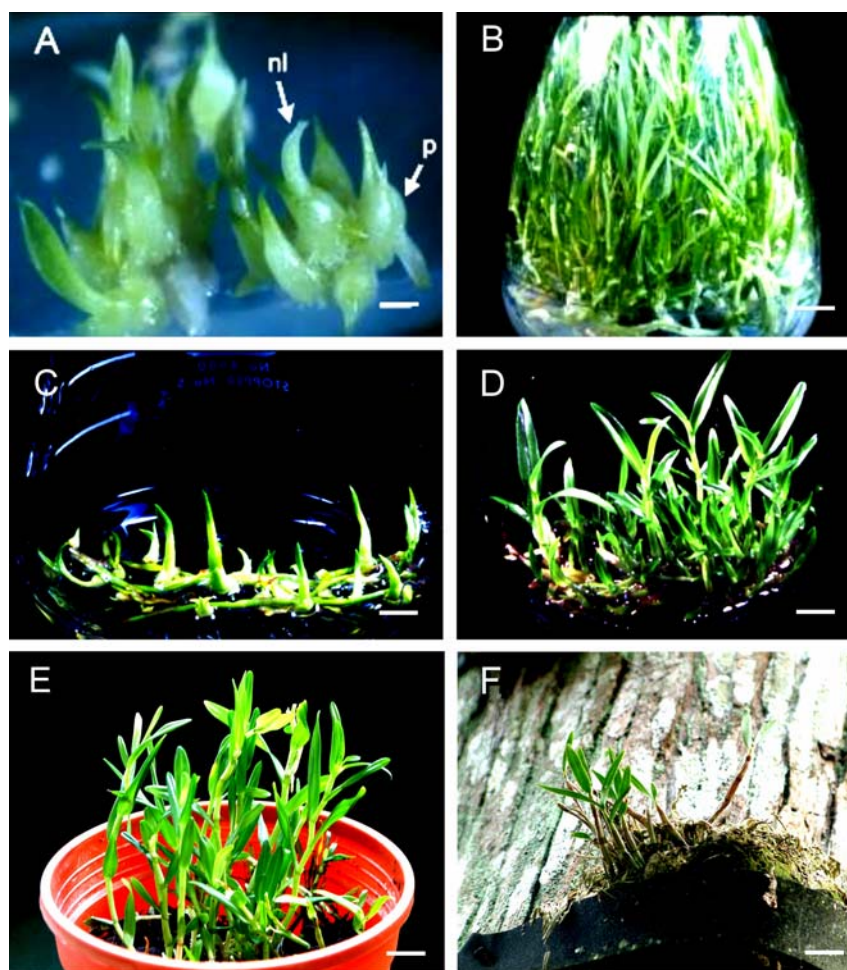


圖 3. 鐵皮石斛播種及莖節培養繁殖技術 (A) 播種後 2 個月於 1/2MS 鹽類添加 30g/l 蔗糖培養基中生長情形 (B) 小苗於 1/2MS 鹽類添加 80g/l 馬鈴薯泥、8.5 g/l 洋菜、2g/l 活性碳及 30g/l 蔗糖培養基中生長 4 個月之情形 (C)(D) 節芽於 1/2MS 鹽類添加 1 ml/l 液體花寶、2 mg/l BA、0.1 mg/l NAA 及 30g/l 蔗糖培養基中生長 30 天及 75 天之情形 (E) 瓶苗於高溼生長箱中馴化 2 個月之情形 (F) 組培苗移種於高山戶外生長之情形。

Fig3. (A-E) *In vitro* propagation of *Dendrobium candidum* using axenic nodal segments. (A) Germination of seeds, two months after sowing on half-strength MS basal medium supplemented with 3 % sucrose, new leaves (nl) protocorm (p). Bar 1.20 mm; (B) Seedling growth after four months of culture on half-strength MS basal medium supplemented with 80 g/l potato homogenate, 2.0 g/l activated charcoal, 30 g/l sucrose and 8.5 g/l Difco Bacto agar. Bar 1.22 cm; (C-D) Sprouting and elongation in the



axenic nodal segments on half-strength MS basal medium supplemented with 1.0 ml/l HYPONeX (liquid, N:P:K=6:3:3), 2 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA and 30.0 g/l sucrose after 30 days (C), Bar: 0.82 cm; and after 75 days (D), Bar: 0.97 cm; (E) Two months old tissue culture raised plantlets after transferred on tree bark and incubating in growth chambers with high humidity. Bar 1.30 cm; (F) Established tissue cultured raised plants in growing in the natural conditions in the A Li mountain, Taiwan. Bar 2.60 cm.

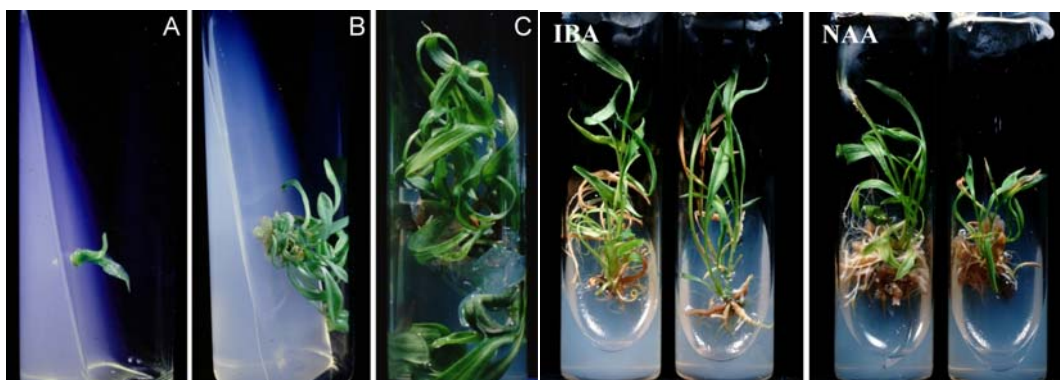


圖 4. 高氏柴胡腋芽培養於含有 1mg/l BA 及 0.1mg/l NAA 之 1/2MS 培養基，經 2 週(A)、6 週(B)與 12 週(C)之組培苗生長情形。

Fig4. Sprouted shoot of *Bupleurum kaoi* in the axillary bud after two weeks (A), six weeks (B) and 12 weeks (C) of culture on half-strength MS basal medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA.

圖 5. 高氏柴胡組培苗培養於添加 0.5mg/l IBA (IBA)與 0.5mg/l NAA (NAA)之 1/2MS 培養基達 6 週之發根情形。

Fig5. Influence of IBA and NAA on root formation and growth of *Bupleurum kaoi* plantlets when cultured on 1/2MS basal salts medium supplemented with 0.5mg/l IBA (IBA) and 0.5mg/l NAA (NAA) for 6 weeks.

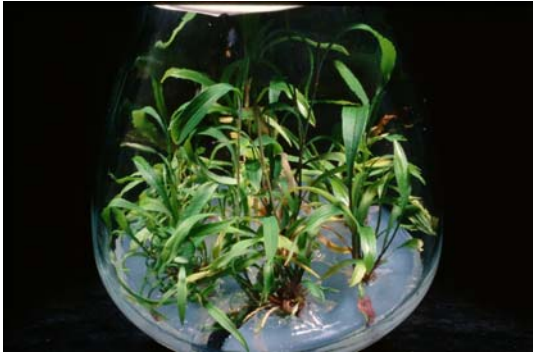


圖 6. 高氏柴胡利用藥包紙置換處理之組培苗生長與根系誘導情形  
Fig.6. Healthy rooted plantlets of *Bupleurum kaoi* after cultured with dispense paper as container closure for 6 weeks.

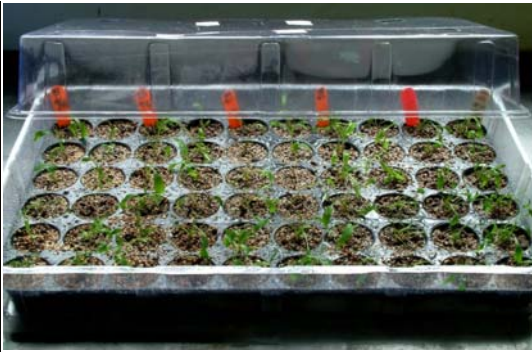


圖 7. 高氏柴胡組培苗瓶外移植馴化達 4 週之植株生長情形  
Fig.7. Survived acclimatized plants of *Bupleurum kaoi* after *in vitro* plantlets transferred outside for 4 weeks.

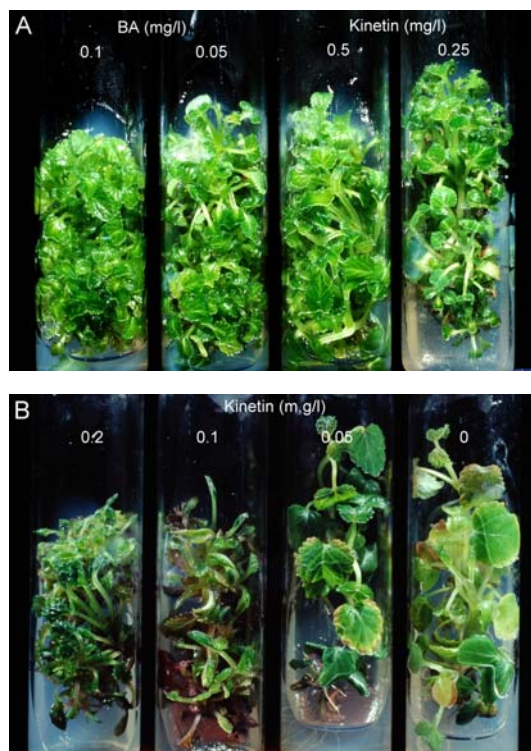


圖 8. BA 與 kinetin 對丹蔘組培苗增殖之影響

丹蔘組培苗培養於添加 BA (0.1 與 0.05 mg/l) 及 kinetin (0.5 與 0.25 mg/l) 之 MS 基本鹽類培養基(A)；以及添加 kinetin (0.2、0.1、0.05 與 0 mg/l) 之 1/2MS 基本鹽類培養基(B)，經培養 6 週後組培苗增殖之情形。

Fig.8. Effect of BA and kinetin on *in vitro* shoot multiplication of *Salvia miltiorrhiza*.

Micropropagation of *Salvia miltiorrhiza* cultured on half-strength MS basal medium supplemented with BA (0.05 與 0.1 mg/l) and kinetin (0.25 與 0.5 mg/l) (a), and cultured on half-strength MS basal medium supplemented with 0, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/l kinetin (b) for 6 weeks.



圖 9. 丹蔘組培苗培養於添加 0.5mg/l IBA 之 1/2MS 培養基達 6 週之發根情形  
圖 10. 丹蔘組培苗瓶外移植馴化達 6 個月後之植株生長情形

Fig9. Root formation of *Salvia miltiorrhiza* plantlets when cultured on 1/2MS basal salts medium supplemented w 0.5mg/l IBA for 6 weeks.

Fig10. Survived acclimatized plant of *Salvia miltiorrhiza* after *in vitro* plantlets transferred outside for 6 months.