

植物生長調節劑與光照處理對延胡索癒合組織增生與小塊莖形成之影響¹

陳威臣² 蕭翌柱² 蔡新聲³ 夏奇鈺^{2,4}

摘 要

陳威臣、蕭翌柱、蔡新聲、夏奇鈺。2007。植物生長調節劑與光照處理對延胡索癒合組織增生與小塊莖形成之影響。台灣農業研究 56:53-64。

本研究藉由植物生長調節劑與光照處理促進重要中藥植物-延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 癒合組織與小塊莖之大量增殖。試驗結果顯示，塊莖來源癒合組織培養於添加 1 mg/L 奈乙酸 (α -naphthaleneacetic acid, NAA) 與 1 mg/L 塞苯隆 (thidiazuron, TDZ) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本培養基，於黑暗環境培養 4 週增重可達 11 倍。癒合組織於光照培養下之增生效率較暗培養差，但光照可促進小塊莖形成與體胚分化。癒合組織培養於含有 0.5-2 mg/L 吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid, IBA) 或不含生長調節劑之 MS 基本培養基，於光照環境下小塊莖的形成率最佳，每 0.2 g 癒合組織培養 4 週後小塊莖形成數在 23-28 個之間。綜合以上結果顯示，延胡索種苗大量繁殖可利用兩階段培養策略，先藉由 NAA 配合 TDZ 組合之處理促進癒合組織大量增生，而後再於光照培養條件下，以不含植物生長調節劑或低劑量 (0.5 mg/L) 之 IBA 誘導小塊莖種苗大量形成。

關鍵詞：延胡索、藥用植物、微體繁殖、塞本隆。

前 言

延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 為紫堇科 (Fumariaceae)、紫堇屬 (*Corydalis*) 之多年生草本植物，其乾燥塊莖為重要中藥材，具有活血化瘀、鎮痙、鎮痛等功效；延胡索塊莖含延胡索甲素 (d-corydaline)、延胡索乙素 (dl-tetrahydropalmatine) 與小蘗鹼 (berberine) 等生物鹼類藥用成分，具有鎮靜止痛、抗菌、擴張支氣管及治療冠心病等藥理作用 (Stuart 1987; Sagare *et al.* 2000a, 2000b; Tang & Eisenbrand 1992; Xu *et al.* 2004; Yen 1997)。近年來，由於生態環境變化與大量採摘已造成野生延胡索瀕臨枯竭，目前之生產逐漸以人工栽培為主，但各地野生與栽培藥材之品質不一；傳統栽培因種子具休眠性導致發芽狀況不佳，而塊莖繁殖體又易受土生真菌病害侵襲等缺點，為確保中藥材基原正確安全無虞，且其健壯種苗不致匱乏，開發延胡索組織培養大量繁殖種苗技術遂成為重要之課題 (Geo *et al.* 1991; Hu 1998; Hu & Liang 1996; Sagare *et al.* 2000b; Xu *et al.* 2004)。

Sagare *et al.* (2000a) 研究中指出可利用延胡索塊莖誘導體胚形成，並藉由施用離層酸 (abscisic acid; ABA) 等生長抑制劑可獲得小塊莖，且更進一步將體胚苗移植馴化得到外觀形態正常

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2281 號。接受日期：2007 年 2 月 28 日。

2. 本所生技組助理研究員、助理研究員及副研究員。台灣省 台中縣 霧峰鄉。

3. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。台灣省 台中縣 霧峰鄉。

4. 通訊作者，電子郵件：hsia@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04) 23302806。

之延胡索小植株。Kuo *et al.* (2002) 利用掃描式電子顯微鏡與組織切片研究指出，延胡索二次胚係發生於胚軸表皮細胞層，且後續體胚培養試驗中亦觀察到小塊莖形成之情形。然而，有關延胡索癒合組織增生與小塊莖形成效率等問題則少有研究報導 (Zhang 2003；Hiraoka *et al.* 2001；Nanawada *et al.* 2003)。本研究藉由生長素 (auxin) 與細胞分裂素 (cytokinin) 的單獨或組合使用，並配合黑暗與光照環境培養處理，分別促進延胡索癒合組織增生與調控小塊莖形成，希望藉由快速之癒合組織形成小塊莖繁殖途徑，大量供應延胡索種苗與產業二次代謝物原物料之所需。

材料與方法

本研究依據 Sagare *et al.* (2000a) 之方法，利用延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 塊莖切片 (25 mm²，厚約 1-2 mm) 為培養體，接種於添加 2 mg/L N⁶-benzyladenine (BA) 及 0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類培養基中誘導癒合組織形成，癒合組織每 4 週繼代培養於相同組成之新鮮培養基使其增生，並供做為下述試驗材料之用。

本研究處理之培養基皆以 MS 無機鹽類及維生素，並添加 3% 蔗糖及 1% Difco Bacto-agar 為基本配方。培養基於加入凝膠物質 (1% Difco Bacto-agar) 前，先以 0.5 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調至 5.7±0.1，而後以 121°C 及 1.05 kg/cm² 之條件滅菌 20 分鐘後冷卻備用。在單一植物生長調節劑處理試驗中，利用添加 0、0.5、1、2 及 4 mg/L 之不同生長素 (auxin)，包括 NAA、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、indoleacetic acid (IAA) 及 indolebutyric acid (IBA)，或細胞分裂素 (cytokinin)，包括 BA、thidiazuron (TDZ)、6-furfurylamino purine (kinetin) 及 zeatin 之 MS 基本培養基，進行癒合組織之增生試驗。在植物生長調節劑組合處理試驗中，則以濃度為 0.5、1 及 2 mg/L 之 NAA 配合相同濃度之上述四種細胞分裂素組合之 MS 基本培養基，測試癒合組織增生之效果。取鮮重約 1 g (0.2 g/團，5 團/培養皿) 之癒合組織接種於含有 25 mL 培養基之塑膠培養皿，置於恆溫 25±2°C 之黑暗環境中培養 4 週後，調查各試驗所得之癒合組織鮮重；或於光照強度 38 $\mu\text{m}^2/\text{s}^2$ (2,500-3,000 Lux)、光週期 16 hr 的環境下培養 8 週後，調查各試驗所得之癒合組織鮮重與小塊莖數量。

試驗所得資料經 SAS 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析後，若處理間差異顯著，則利用 Least Signification Difference (LSD) test 比較各處理平均值間之差異。

結 果

生長素或細胞分裂素處理於暗培養下對延胡索癒合組織增生之影響

延胡索癒合組織培養於含有 0 - 4 mg/L 之不同生長素培養基中，暗培養 4 週之結果如表 1 所示。就生長素種類而言，以添加 2,4-D 或 NAA 之處理對癒合組織之增生促進效果較佳，其中以 1 mg/L NAA 處理增生達 1.51 g，是不含生長調節劑對照組的 2.4 倍。IAA 與 IBA 處理對於癒合組織增生均不具明顯促進作用。延胡索癒合組織於含有 0 - 4 mg/L 之不同細胞分裂素培養基中，經暗培養 4 週後結果如表 2 所示。四種細胞分裂素類型中，以 TDZ 處理對癒合組織增生之效果較佳，1 mg/L TDZ 處理之癒合組織鮮重達 2.08 g，是對照組癒合組織鮮重的 3.3 倍。相反的在 0.5-1 mg/L 濃度處理下，kinetin 與 zeatin 兩種細胞分裂素對癒合組織增生無促進的效果；在 BA 處理濃度中則僅有低濃度 (0.5 mg/L) 有利於延胡索癒合組織的增生。

表 1. 生長素類型及濃度處理於暗培養下對延胡索癒合組織增生之影響^zTable 1. Effects of different auxin types and concentration on callus proliferation of *Corydalis yanhusuo* in darkness^z

Auxin concentration (mg/L)	Callus fresh weight (g) ^y			
	IAA	IBA	2,4-D	NAA
0	0.64 a	0.64 a	0.63 b	0.63 c
0.5	0.33 c	0.63 a	1.11 a	1.10 b
1	0.40 bc	0.62 a	1.11 a	1.51 a
2	0.43 abc	0.50 ab	0.97 a	1.31 a
4	0.55 ab	0.42 b	0.85 a	1.00 b

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various types and concentration of auxin.

^y Fresh weight was collected from the proliferated callus after 4 weeks of culture. Means of 20 samples in column with the same letters are not significantly different at 5% by LSD test.

表 2. 細胞分裂素類型及濃度處理於暗培養下對延胡索癒合組織增生之影響^zTable 2. Effects of different cytokinin types and concentration on callus proliferation of *Corydalis yanhusuo* in darkness^z

Cytokinin concentration (mg/L)	Callus fresh weight (g) ^y			
	Kinetin	Zeatin	BA	TDZ
0	0.63 a	0.64 a	0.63 b	0.64 c
0.5	0.59 a	0.60 a	1.10 a	1.44 b
1	0.63 a	0.70 a	0.78 ab	2.08 a
2	0.53 a	0.63 a	0.75 ab	1.94 ab
4	0.55 a	0.66 a	0.52 b	1.21 bc

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various types and concentration of cytokinin.

^y Same as Table 1.

生長素 NAA 與細胞分裂素濃度組合處理於暗培養下對延胡索癒合組織增生之影響

利用 NAA 組合四種細胞分裂素- TDZ、BA、kinetin 與 zeatin 進行癒合組織暗培養試驗，使用之濃度則分別為 0.5、1 及 2 mg/L。試驗結果如表 3 所示，就 NAA 組合不同細胞分裂素種類而言，以 TDZ 及 BA 之組合處理對癒合組織增生的促進效果較佳；其中 1 mg/L NAA 組合 1 mg/L TDZ 處理之癒合組織最重可達 2.19 g，是對照組處理的 3.5 倍，增重效果最高；其餘 NAA+TDZ 之組合處理均有增重之效果，其鮮重分別約為對照組處理之 1.7-3.5 倍。在 NAA 結合 BA 之處理組合中，以 1 mg/L NAA+2 mg/L BA 處理所得鮮重達 1.95 g 較重，其他 0.5 mg/L NAA+1 或 2 mg/L BA 兩處理間亦佳。

表 3. 生長素 NAA 與細胞分裂素類型及濃度組合處理於暗培養下對延胡索癒合組織增生之影響

Table 3. Effects of NAA in combination with different cytokinin types and concentration on callus proliferation of *Corydalis yanhusuo* in darkness^z

Concentration (mg/L)		Callus fresh weight (g) ^y			
NAA	Cytokinin	TDZ	BA	Kinetin	Zeatin
0	0	0.62 b	0.64 d	0.65 b	0.64 bc
0.5	0.5	1.58 ab	1.04 cd	0.97 b	0.56 bc
0.5	1	2.09 a	1.69 a	1.03 ab	0.38 c
0.5	2	2.06 a	1.55 ab	1.09 ab	0.49 c
1	0.5	1.88 a	1.01 cd	0.89 bc	0.86 bc
1	1	2.19 a	1.23 bc	1.04 ab	0.72 bc
1	2	1.06 bc	1.95 a	1.19 a	1.03 b
2	0.5	2.13 a	1.17 c	1.04 ab	1.56 a
2	1	1.15 ab	1.26 bc	1.16 a	0.84 bc
2	2	2.07 a	1.09 c	1.09 ab	0.69 bc

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various plant growth regulator combinations.

^y Same as Table 1.

此外，NAA+kinetin 試驗之處理所得之癒合組織鮮重介於 0.89-1.19 g 之間，除低濃度 0.5 mg/L kinetin 與低濃度 NAA (0.5₁ mg/L) 之處理組合及對照組較差外，其餘各處理間差異並不顯著。而 NAA+zeatin 試驗處理組合中，除 2 mg/L NAA+0.5 mg/L zeatin 處理所得癒合組織鮮重為 1.56 g 較高外，其餘處理組合所得癒合組織鮮重僅介於 0.38-1.03 g 之間，與對照組間並無顯著差異存在。

生長素與細胞分裂素於光照培養下對延胡索小塊莖形成之影響

光照環境下培養之癒合組織，在所有試驗處理組合下均呈現鮮明的鵝黃色 (圖 1A)，培養過程中可觀察到小塊莖 (圖 1B) 及體胚與體胚苗形成 (圖 1C、1D)，且於後續繼代培養中體胚可繼續發育成為體胚苗 (圖 1E)。延胡索癒合組織在不同濃度之生長素處理，於光照環境下培養 8 週後所得小塊莖之結果如表 4 所示，在四種生長素處理中，2,4-D 處理嚴重抑制小塊莖形成，其他三種生長素之濃度處理中，除了 IAA 與 NAA 在較高濃度處理下 (4 mg/L) 之小塊莖形成數較少外 (分別為 12.2 及 15.1 個)，其餘處理所得小塊莖數與對照組相較下並無顯著差異。光照培養下之細胞分裂素試驗結果如表 5 所示，其中 0-2 mg/L kinetin 處理與 0-1 mg/L zeatin 處理與其各別對照組之間並無顯著差異，但隨著處理濃度增加則小塊莖形成數有減少的趨勢。然而 BA 與 TDZ 之所有濃度處理下均不利於小塊莖形成，其中含有 BA 之處理的小塊莖形成數約為 1.7-10.1 個，與對照組織 25.1 個小塊莖形成的結果呈顯著差異。而含有 TDZ 之處理僅獲得約 1.5-3.6 個小塊莖，與對照組織 18.5 個小塊莖形成的結果亦呈顯著差異，對於延胡索小塊莖形成之抑制最為嚴重。

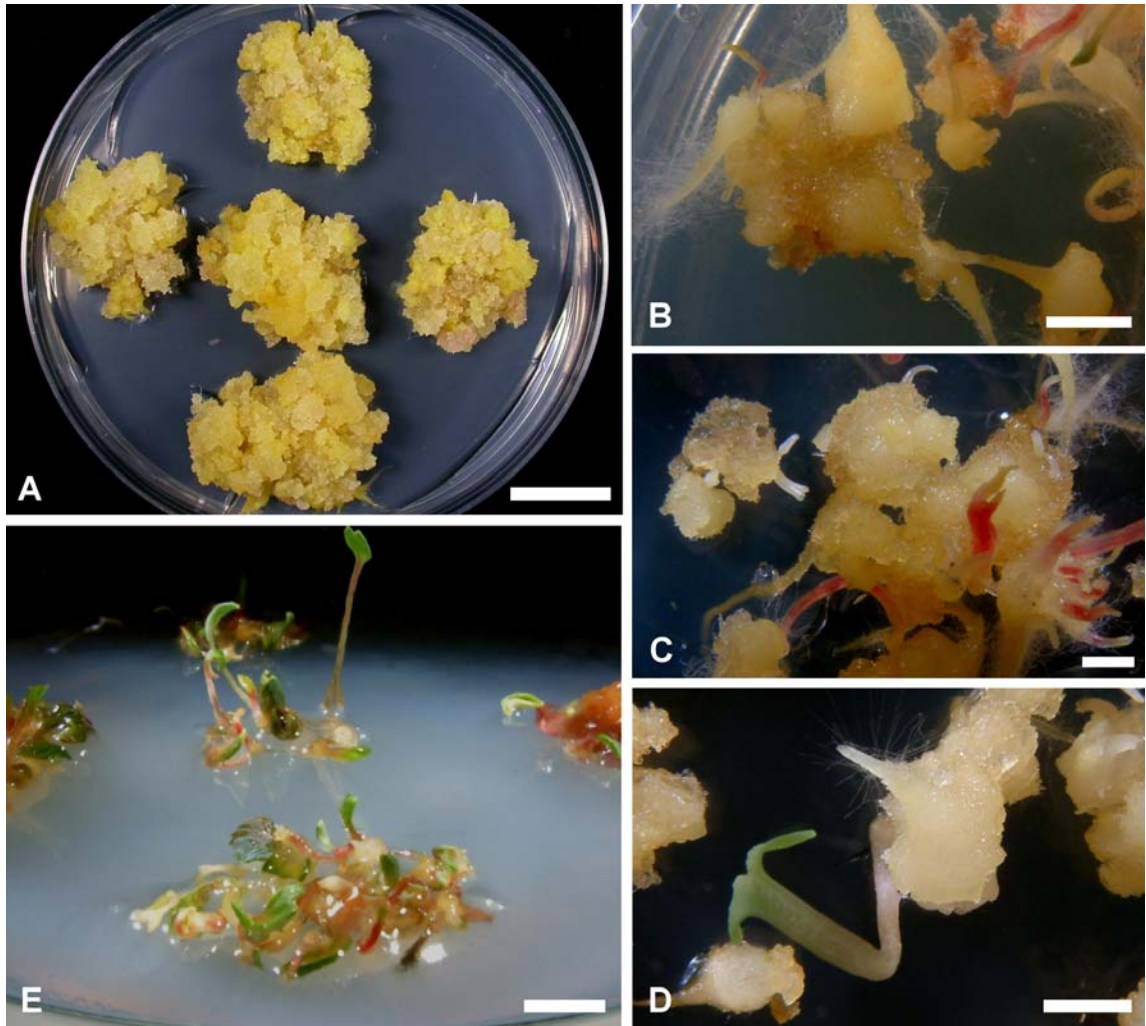


圖 1. 延胡索癒合組織增生與小塊莖形成之情形。癒合組織培養於含有 1 mg/L NAA、1 mg/L TDZ、3%蔗糖及 1% Difco Bacto-agar 之 MS 基本培養基，暗培養 4 週後之癒合組織大量增生情形，Bar = 15 mm (A)；癒合組織培養於含有 0.5 mg/L IBA、3%蔗糖及 1% Difco Bacto-agar 之 MS 基本培養基，光照培養 8 週後之小塊莖，Bar = 5 mm (B)；體胚與體胚苗，Bar = 2.5 mm (C, D) 形成情形；而後將體胚苗移植培養於不含植物生長調節劑之 1/2MS 基本培養基，光照培養 4 週後之體胚苗生長情形，Bar = 5 mm (E)。

Fig. 1. *In vitro* callus proliferation and mini-tuber formation of *Corydalis yanhusuo*. Callus proliferated on MS basal salts medium containing 1 mg/L NAA, 1 mg/L TDZ, 3% sucrose, and 1% Difco Bacto-agar in darkness for 4 weeks of culture, Bar = 15 mm (A), and mini-tubers, Bar = 5 mm (B); somatic embryo (SE) and somatic seedling formatted on MS basal salts medium containing 0.5 mg/L IBA 3% sucrose, and 1% Difco Bacto-agar under light condition for 8 weeks of culture, Bar = 2.5 mm (C, D); Somatic seedling grew-up on half-strength MS basal medium without phytohormone for 4 weeks of culture, Bar = 5 mm (E).

表 4. 生長素類型及濃度處理於光照培養下對延胡索小塊莖形成之影響^zTable 4. Effects of auxin types and concentration on mini-tuber formation of *Corydalis yanhusuo* callus under light culture conduction^z

Auxin concentration (mg/L)	Mini-tuber formation (Number) ^y			
	IAA	IBA	2,4-D	NAA
0	24.2 a	24.0 a	20.0 a	24.4 a
0.5	25.1 a	28.4 a	7.2 b	20.0 a
1	26.1 a	25.2 a	3.1 b	19.5 a
2	23.4 a	25.7 a	3.3 b	21.2 a
4	12.2 b	23.7 a	2.5 b	15.1 b

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various types and concentration of auxin.^y Number of mini-tubers were collected from the proliferated callus after 8 weeks of culture. Means of 20 samples in column with the same letters are not significantly different at 5% by LSD test.表 5. 細胞分裂素類型及濃度於光照培養下對延胡索小塊莖形成之影響^zTable 5. Effects of cytokinins types and concentration on mini-tuber formation of *Corydalis yanhusuo* callus under light culture condition^z

Cytokinin concentration (m g/L)	Mini-tuber formation (Number) ^y			
	Kinetin	Zeatin	BA	TDZ
0	21.5 a	22.5 a	25.1 a	18.5 a
0.5	13.5 ab	21.6 a	10.1 b	1.9 b
1	14.5 ab	12.2 ab	6.3 bc	1.5 b
2	12.2 ab	9.9 b	2.1 c	3.1 b
4	6.9 b	7.8 b	1.7 c	3.6 b

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various types and concentration of cytokinin.^y Same as Table 4.

生長素 NAA 與不同細胞分裂素濃度組合處理於光照培養下對延胡索塊莖形成之影響

利用 NAA 組合四種細胞分裂素- TDZ、BA、kinetin 與 zeatin 進行癒合組織光照培養試驗，使用之濃度則分別為 0.5、1 及 2 mg/L。試驗結果顯示添加 NAA 與 TDZ 之組合處理僅形成約 0.5-4.3 個小塊莖，較對照處理的 18.3 個小塊莖為低，顯然嚴重抑制小塊莖形成（表 6）。在 NAA 結合 BA 之處理組合中，以 1 mg/L NAA + 1 mg/L BA 處理所得小塊莖數達 16.9 個最高，但與對照組處理之 16.5 個小塊莖形成並無顯著差異，而其餘組合之小塊莖形成數則約為 8.6-12.4 個，處理間均無顯著差異存在。在 NAA + kinetin 試驗處理組合中，以 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L kinetin 與 2 mg/L NAA + 1 mg/L kinetin 處理所得小塊莖數達 22.5 個與 16.8 個較佳，且與對照組處理間並無顯著差異外，其他處理

表 6. 生長素 NAA 與細胞分裂素濃度組合處理於光照培養下對延胡索小塊莖形成之影響^zTable 6. Effects of NAA in combination with different cytokinin types and concentration on mini-tuber formation of *Corydalis yanhusuo* under light culture condition^z

Concentration (mg/L)		Tuber formation ^y (Number)			
NAA	Cytokinins	TDZ	BA	Kinetin	Zeatin
0	0	18.3 a	16.5 a	19.9 a	17.6 a
0.5	0.5	1.2 b	11.0 b	22.5 a	10.4 ab
0.5	1	1.6 b	10.1 b	8.8 de	2.5 d
0.5	2	3.6 b	10.7 b	11.8 cd	9.2 ab
1	0.5	4.3 b	12.4 b	13.1 cd	0.8 d
1	1	1.9 b	16.9 a	11.3 cd	7.2 bc
1	2	1.1 b	8.6 b	6.6 de	5.4 cd
2	0.5	0.5 b	10.6 b	15.3 bc	3.0 d
2	1	1.1 b	9.8 b	16.8 ab	1.3 e
2	2	2.0 b	9.5 b	10.3 cde	2.6 d

^z Callus was cultured on MS basal medium supplemented with 3% sucrose, 1% Difco Bacto-agar and various cytokinin types and concentration combination.

^y Same as Table 4.

與對照組平均值間均存在顯著差異，小塊莖數則介於 6.6-15.3 個。而 NAA + zeatin 試驗處理組合中，除了 0.5 mg/L NAA + 0.5 及 2 mg/L zeatin 處理與對照組所得小塊莖數無顯著差異外，其他處理組合之小塊莖形成數則介於 0.8-7.2 個，均低於對照組處理的 17.6 個小塊莖。

討 論

Sagare *et al.* (2000a) 與 Kuo *et al.* (2002) 利用延胡索 (*C. yanhusuo*) 小塊莖誘導體胚與二次胚形成，本研究則進一步探討癒合組織增生及小塊莖形成效率之影響因子。癒合組織常添加生長素以促進其增生，在四種常用生長素 (IAA、IBA、NAA 及 2,4-D) 中，一般認為 2,4-D 對於癒合組織誘導之能力最強，在較低濃度時即可促進癒合組織之增生 (Gaspar *et al.* 1996；George 1993)。當歸 (*Angelica sinensis*) 的研究結果顯示，2,4-D 對誘導癒合組織之效果比 NAA 好，而利用較低的 2,4-D 濃度處理對於癒合組織增生之效果較佳 (Zhang & Cheng 1989)。同樣地，台灣白芷 (*Angelica dahurica* var. *formosana*) (Chang *et al.* 1993) 與高氏柴胡 (*Bupleurum kanoi*) (Chen *et al.* 2005) 的研究中亦有類似的結果。本研究結果顯示雖 0.5-1 mg/L 2,4-D 處理雖亦具有癒合組織增生之效果，但以 1-2 mg/L NAA 處理對於促進癒合組織增生之效果更佳，顯示癒合組織增生對生長素之反應可能因為植物不同而有所差異，而適當之生長素濃度方可有助於癒合組織增生。此外，本研究並未測試低於 0.5 mg/L 濃度之 2,4-D，對於更低濃度之 2,4-D 是否具有較佳的增生效果則有待進一步探討。

細胞分裂素具有促進細胞分裂與生長之生理作用，因此常用於促進癒合組織增生 (Gaspar *et al.* 1996；George 1993)。本研究單獨施用細胞分裂素的結果顯示，在四種參試細胞分裂素處理中，僅 TDZ 處理對延胡索癒合組織增生具有顯著效果；此外，綜合比較細胞分裂素及生長素處理對癒合組織增生之效果，則 TDZ 處理對延胡索癒合組織增生是所有參試植物生長調節劑中效果最佳者。Hiraoka *et al.* (2004) 在東北延胡索 (*C. ambigua*) 研究亦指出，TDZ 濃度提高具有促進癒合組織增生的效果。此外，在當歸 (*A. sinensis*) (Zhang & Cheng 1989) 與台灣白芷 (*A. dahurica* var. *formosana*) (Chang *et al.* 1993) 的研究皆指出，將細胞分裂素與生長素組合使用對於癒合組織增生之效果較單獨施用生長素之處理佳。本研究以細胞分裂素組合生長素施用的結果則顯示，在四種參試細胞分裂素處理中，除了低濃度 (0.5 mg/L) NAA 配合 1-2 mg/L zeatin 之組合對癒合組織增生顯示些微抑制效果外，其餘處理組合對延胡索癒合組織增生均具有顯著促進之效果，其中以 NAA 配合 TDZ 的處理組合對延胡索癒合組織之增重效果最佳。Zhang *et al.* (1991) 指出，單獨使用 kinetin 對於延胡索癒合組織生長並不佳，但若配合 0.1-0.2 mg/L NAA 則可有利於癒合組織增生。本研究結果亦顯示單獨施用細胞分裂素之處理的癒合組織增生相對於組合處理 (auxin + cytokinin) 之效果較低，與上述多數研究結果相似。在齒瓣延胡索 (*C. remota*) 癒合組織增生研究顯示，2,4-D 或 NAA 組合細胞分裂素 (BA 或 kinetin) 處理效果並未優於 2,4-D 與 NAA 單獨施用，顯示添加細胞分裂素的種類與濃度對癒合組織之增生具有不同的影響 (Zhang 2003)。

不同植物間的細胞分化對光照處理有著不同的反應，如 Nigra *et al.* (1989) 指出暗培養銀葉龍葵 (*Solanum eleagnifolium*) 的癒合組織生長良好；而 Zhang (2003) 於齒瓣延胡索 (*C. remota*) 之研究報導，光照處理有助於增加癒合組織之鮮重與乾重。本研究結果顯示光照培養並不利於癒合組織增生，主要原因是因為光照培養會影響癒合組織之形態發育，在光照處理下具有促進小塊莖形成與體胚分化的效果。就光照處理對小塊莖形成而言，光照有利於薯蓣屬 (*Dioscorea* sp.) 植物小塊莖形成，而馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 小塊莖形成則是以暗培養條件較佳 (George 1993)；本研究結果顯示光照培養有助於延胡索小塊莖形成。Sagare *et al.* (2000a) 指出，藉由離層酸 (abscisic acid; ABA)、多效唑 (paclobutrazol)、環丙嘧啶醇 (ancymidol) 等生長抑制劑處理可促進小塊莖形成。本研究結果中 2,4-D、NAA 與細胞分裂素等生長調節劑的施用對小塊莖形成有抑制效果。因此，是否具有促進細胞分裂生長能力之生長調節劑反而不利於小塊莖形成，則有待進一步查證。

綜合上述結果顯示，特定植物生長調節劑 (如生長素之 2,4-D 及 NAA 或細胞分裂素之 TDZ)，以及特定生長素與細胞分裂素的處理組合 (如 NAA + TDZ)，在暗培養下皆能有效促進延胡索癒合組織之增生，例如可藉由 1 mg/L NAA 配合 1 mg/L TDZ 之處理組合促進延胡索癒合組織之大量增生；而後於光照培養條件下，以不含植物生長調節劑之培養基或低濃度之 IBA 或 IAA，以及特定生長素與細胞分裂素的處理組合 (NAA + kinetin) 皆可誘導延胡索小塊莖大量形成。應用上述癒合組織增生及小塊莖誘導兩階段的組織培養操作策略，可大量增殖延胡索種苗，未來配合優良農業栽培規範 (good agricultural practice, GAP)，將有利於優質安全生藥之生產。

誌 謝

本研究試驗材料，由中國醫藥大學陳忠川教授與郭昭麟副教授提供，試驗為前農藝組楊淑如助理研究員 (現任職台中縣清水鎮公所農業技士) 所完成，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Zhang, Y. L., M. Zhou, and B. H. Zhao. 1991. Tissue culture of yanhusuo (*Corydalis yanhusuo*). Chinese Traditional Herbal Drugs 22: 463-465. (in Chinese with English abstract)
- Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1993. Study on tissue culture of *Angelica dahurica* var. *formosana* I. Callus induction and medium evaluation. J. Agric. Res. China 42:253-264. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., F. S. Chueh, C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2005. Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on leaf callus induction, proliferation and saikosaponin formation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. Crop Environ. Bioinformatics 2:39-49. (in Chinese with English abstract)
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32 (P):272-289.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1. The technology. Exegetics Ltd, England. 574 pp.
- Hiraoka, N., Y. Kato, Y. Kawaguchi, and J. I. Chang. 2001. Micropropagation of *Corydalis ambigua* through embryogenesis of tuber sections and chemical evaluation of the ramets. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67:243-249.
- Hiraoka, N., D. B. Indra, Y. Sakurai, and J. I. Chang. 2004. Alkaloid production by somatic embryo cultures of *Corydalis ambigua*. Plant Biotechnol. 21: 361-366.
- Hu, K. 1998. Studies on tuber and second age plants of yanhusuo (*Corydalis yanhusuo*). Chinese Traditional Herbal Drugs 29:410-412. (in Chinese with English abstract)
- Hu, K., and Y. Liang. 1996. Studies on tuber and first age plants of yanhusuo (*Corydalis yanhusuo*). Chinese Traditional Herbal Drugs 27:687-689. (in Chinese with English abstract)
- Kuo, C. L., A. P. Sagare, S. F. Lo, C. Y. Lee, C. C. Chen, and H. S. Tsay. 2002. Abscisic acid promotes development of somatic embryos on converted somatic embryos of *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae). J. Plant Physiol. 159: 423-427.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nalawada, 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.
- Nigra, H. M., M. A. Alvarez, and A. M. Giulietti. 1989. The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* cav. Calli. Plant Cell Rep. 8:230-233.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, T. C. Lin, C. C. Chen, and H. S. Tsay. 2000a. Cytokinin- induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae), - a medicinal plant. Plant Sci. 160:139-147.

- Sagare, A. P., Y. L. Lee, and H. S. Tsay. 2000b. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medicinal plant genetic resource. p.171-187 *in* Agriculture of the New Century: Managing Bio-research and Bio-diversity. (W. S. Wu, S. T. Chang and B. T. Guan. eds.). College of Agriculture, National Taiwan University. Taipei.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. USA: SAS Inst., 943 pp.
- Stuart, G. A. 1987. *Corydalis ambigua*, p.128-129. *in*: Chinese medicine series (1) Chinese material medica – vegetable kingdom, SMC publishing Inc. Taipei.
- Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. *Corydalis turtchaninovii* Bess. f. *yanhusuo* Y. H. Chou et C. C. Hsü, p.377-393 *in*: Chinese Drugs of Plant Origin, Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. (W. Tang and G. Eisenbrand. eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Xu, X. H., G. D. Yu, and Z. T. Wang. 2004. Resource investigation and quality evaluation on wild *Corydalis yanhusuo*. China J. Chinese Materia Medica 29:399-401. (in Chinese with English abstract)
- Yen, K. Y. 1997. *Corydalis* tuber. p.81 *in*: The illustrated Chinese Material Medica – Crude and Prepared. (translated by Nigel Wiseman). SMC publishing Inc. Taipei.
- Zhang, D. X. 2003. Effects of culture environment on callus growth and dl-tetrahydropalmatine content in cultures of *Corydalis remota*. Bul. Bot. Res. 23:86-90. (in Chinese with English abstract)
- Zhang S. and K. C. Cheng. 1989. *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.: *In vitro* culture, regeneration and the production of medicinal compounds. p.1-22 *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7 (Bajaj. Y. P. S. ed.). Springer-Verlag, Berlin.

Effects of Plant Growth Regulator and Light Treatment on Callus Proliferation and *In Vitro* Mini-tuber Formation of *Corydalis yanhusuo*¹

Uei-Chern Chen², Yih-Juh Shiau², Hsin-Sheng Tsay³ and Chi-Ni Hsia^{2,4}

Abstract

Chen, U. C., Y. J. Shiau, H. S. Tsay, and C. N. Hsia. 2007. Effects of plant growth regulator and light treatment on callus proliferation and *in vitro* mini-tuber formation of *Corydalis yanhusuo*. J. Taiwan Agric. Res. 56:53-63.

A two-stage micropropagation system for *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang, an important traditional Chinese medicinal plant, through callus proliferation followed by light treatment for tuber formation has been established in this study. The best callus proliferation was obtained under darkness on a Murashige and Skoog's (MS) basal medium supplemented with 1 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with 1 mg/L thidiazuron (TDZ). An 11-fold increasing of callus fresh weight was recorded after 4 weeks of culture. Although callus growth was inhibited in the same growth regulator treatments while cultured under the illumination, it was found that tuber formation increased along with some somatic embryogenesis. Among all auxin treatments, phytohormone-free, 0.5-2 mg/L indole-3-acetic acid (IAA) or indole-3-butyric acid (IBA) had the best mini-tuber formation under light culturing condition with tubers range from 23 to 28 mini-tubers per 0.2 g callus. Conclusion from our results, a two-step production protocol for *in vitro* micropropagation of *C. yanhusuo* was suggested. Callus would first proliferate on a MS basal medium containing NAA and TDZ in darkness, after subculturing into the MS basal medium only or containing lower concentration of IBA (0.5 mg/L) under light condition, a good number of mini-tubers would form from callus. Mini-tuber micropropagation with many advantages superior to seeds or *in vitro* seedling proliferation system, and by providing good quality tuber propagules for cultivation of *C. yanhusuo* may be beneficial for development and utilization of medicinal resource in Taiwan.

Key words: Yan-hu-suo, Medicinal plant, Callus, Micropropagation, Thidiazuron.

-
1. Contribution No. 2281 from Agricultural Research Institute (ARI), Council of Agriculture. Accepted: February 28 2007.
 2. Respectively, Assistant Agronomist, Assistant Agronomist, Associate Researcher, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806