

6-Benzyladenine 與 α -Naphthaleneacetic acid 對迷迭香癒合組織誘導與再生之影響

黃柄龍¹

摘 要

本研究目的為探討不同濃度 BA 與 NAA 對迷迭香癒合組織誘導、增殖與再生之影響。結果顯示，添加 10 μ M BA + 10 μ M NAA 之培養基對葉、節及節間培植體之癒合組織誘導率分別為 27%、98%及 94%；且可大量增殖淡綠色及白色間雜的顆粒狀器官分化性癒合組織，約 5-6 週繼代培養一次。癒合組織培養於 BA:NAA 為 1:1 之再生培養基可成功再生芽體(5%)，其他 BA:NAA 為 10:1 及 2:1 之再生培養基，僅形成癒合組織增殖而已。再生芽體移植至添加 5 μ M BA + 5 μ M NAA 或 10 μ M BA + 10 μ M NAA 之培養基，80% 癒合組織可增殖大量的芽體。

關鍵語：迷迭香、癒合組織、再生

前 言

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 英文名為 rosemary，為唇形科 (Lamiaceae)，迷迭屬之多年生常綠亞灌木，原產於地中海沿岸，植株外型分為直立型、半匍匐型及匍匐型等三種。迷迭香喜歡生長於冷涼地區，通風、日照良好及排水性佳的環境最適宜；生性強健，耐旱性和抗病性強，為典型的地中海型植物。

植株中所含的迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)具有抗菌、抗氧化、抗病毒及抗發炎等生理活性，為重要的次級代謝產物⁽²²⁾，通常可由花、枝與葉片等部分以蒸餾法得到具揮發性的精油^(4, 26)。不過，迷迭香酸合成不易，優良的迷迭香栽培品種的成分含量主要決定於季節、環境因子及其個別的遺傳組成⁽⁸⁾。

迷迭香可於春季至初夏開花，但種子成熟率低，天然發芽不良，一般是採用扦插方式進行無性繁殖，可於春、秋二季，剪取莖部頂端或新長出的枝條，斜插於排水良好的砂質壤土中，約 20 天左右發根，待根系發育完全後移盆定植；半匍匐型及匍匐型迷迭香，亦可用壓條方式繁殖。然而，臺灣南

¹高雄區農業改良場副研究員

部夏季高溫多雨，迷迭香越夏生長不易，因此可利用組織培養方法進行大量繁殖，或利用癒合組織之細胞培養方式以獲取迷迭香酸⁽¹²⁾。

國內外於迷迭香組織培養方面的相關研究不多，因此，本研究將以迷迭香之莖段扦插苗為材料，探討不同濃度 BA 與 NAA 對葉片、節及節間等部分培植體之癒合組織誘導、增殖與再生之影響，以建立一套誘導系統，供後續相關研究及香精產業發展之參考。

材料與方法

一、植物材料與滅菌處理

本研究所使用之材料係購自農友種苗公司之直立型迷迭香，為臺灣目前主要種植品種。首先，將植株移植至室內淨化培養數週，剪取 8-10 cm 新長出之幼嫩枝條，利用 70% 酒精浸泡 1 分鐘後，並以 1% NaOCl (Clorox; Clorox Co, Oakland, CA) 溶液，每 100 ml 並加入 2 滴展著劑 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)，以超音波振盪 20 分鐘進行表面消毒，再以無菌水沖洗 3 次，每次 3 分鐘。於無菌操作臺內，修整受滅菌劑傷害的組織以作為培植體。

二、培養基與培養條件

基礎培養基組成以大量鹽類濃度減半之 MS 培養基⁽²³⁾為主，其他添加有機物包括 1.0 mg l⁻¹ thiamine HCl、1.0 mg l⁻¹ pyridoxine HCl、10.0 mg l⁻¹ nicotinic acid 及 100 mg l⁻¹ myo-inositol，另添加 3% sucrose，並以 0.8% agar 作為固體凝膠劑，滅菌前 pH 值調至 5.7 ± 0.1，並經高溫高壓滅菌釜以 121℃，加熱 20 分鐘。培養環境溫度 25 ± 2℃。照光培養採 16 小時光週明期(光強度 2800 Lux，日光燈管 FL-30 D/29, 40W，東亞，中國電器股份有限公司)，暗期為 8 小時。

三、不同濃度 BA 與 NAA 組合對癒合組織誘導之影響

將滅菌後的枝條區分為葉片、節及節間等部分，並切成約 3-5 mm 之長度，培養於添加不同濃度 6-Benzyladenine (BA) 與 α -Naphthaleneacetic acid (NAA) 組合(0 + 0、2.5 + 2.5、5 + 5 及 10 + 10 μ M)之基礎培養基，每單位容器內之培養基定量成 10 ml。每一處理 5 個重複，每重複分別培養 15 個葉片、節或節間培植體。培養 40 天後，調查癒合組織之誘導率。癒合組織誘導率(%)，為計算能產生癒合組織之培植體數占總培植體數之比率。

四、不同濃度 BA 與 NAA 組合對癒合組織增殖之影響

上述癒合組織分切成直徑各約 3.0 mm，並逢機接種於含有不同濃度 BA 與 NAA 組合(2.5 + 2.5、5 + 5、10 + 10 及 20 + 20 μ M)之基礎培養基。每一

處理 20 個培養管，每管培養 1 個癒合組織團。於培養後，每週測量參試癒合組織之直徑，連續調查 7 週，探討不同濃度 BA 與 NAA 對癒合組織增殖之影響。

五、不同濃度 BA 與 NAA 組合對再生芽體增殖之影響

將直徑約 3.0 mm 之癒合組織，培養於 BA : NAA 為 10 : 1、2 : 1 及 1 : 1 之不同濃度組合的再生培養基，每一處理 10 個培養管，每管培養 2 個癒合組織團，以探討癒合組織之再生情形。再生芽體並分別培養於添加不同濃度 BA 與 NAA 組合(0 + 0、2.5 + 2.5、5 + 5、10 + 10 及 20 + 20 μM)之基礎培養基，每一處理 20 個培植體，培養 10 週後，調查對芽體增殖之影響。

六、統計分析

測得各處理所得數值後，計算重複平均值並算出標準差，並以 SigmaPlot 軟體(SPSS Institute, Chicago)繪製統計圖。

結果與討論

一、不同濃度 BA 與 NAA 組合對癒合組織誘導之影響

植物組織培養時，培植體的大小、成熟度與來源部位，均會影響植株再生，通常是選擇細胞分裂旺盛的部位^(5, 7, 16, 19)。本研究，迷迭香成熟枝條會因木質化而使再生能力減弱；宜選擇枝條上端新長出之幼嫩部分約 8-10 cm，可使癒合組織的誘導效果高於老化組織⁽¹⁰⁾。而植物生長調節劑的使用，會隨不同植物品種、不同細胞、組織或器官等而有不同⁽²⁴⁾，圖 1 結果顯示，葉、節及節間培植體之癒合組織誘導率均隨植物生長調節劑濃度的增加而提高，均以添加 10 μM BA + 10 μM NAA 之培養基的誘導效果最佳，分別為 27%、98% 及 94%；但未添加 BA 與 NAA 的對照處理，培植體均褐化，均無癒合組織的形成(誘導率 0%)。周(2002)也認為⁽¹⁾，培養基中同時添加 cytokinin 及 auxin，可提高癒合組織誘導率或體胚發生效果。高濃度的植物生長調節劑雖具有較佳的誘導效果，但高濃度的 cytokinin 則易造成芽體玻璃質化現象⁽¹⁴⁾，須特別注意。

植物體不同部位的培植體對荷爾蒙的感受性不同，甚至在不同發育時期的同一組織對荷爾蒙的反應亦有差異⁽²⁹⁾。本研究，莖節培植體的癒合組織平均誘導率最高，其次為節間，而葉的誘導效果最差，推測其原因可能是與莖節部位含有細胞分裂及細胞分化能力旺盛的分生組織細胞有關。

二、不同濃度 BA 與 NAA 組合對癒合組織增殖之影響

細胞生長週期細胞數的增加成 S 型曲線，即為緩慢生長期(lag phase)、快速生長期(log phase)及生長靜止期(stationary phase)⁽⁶⁾，植物種類與培養

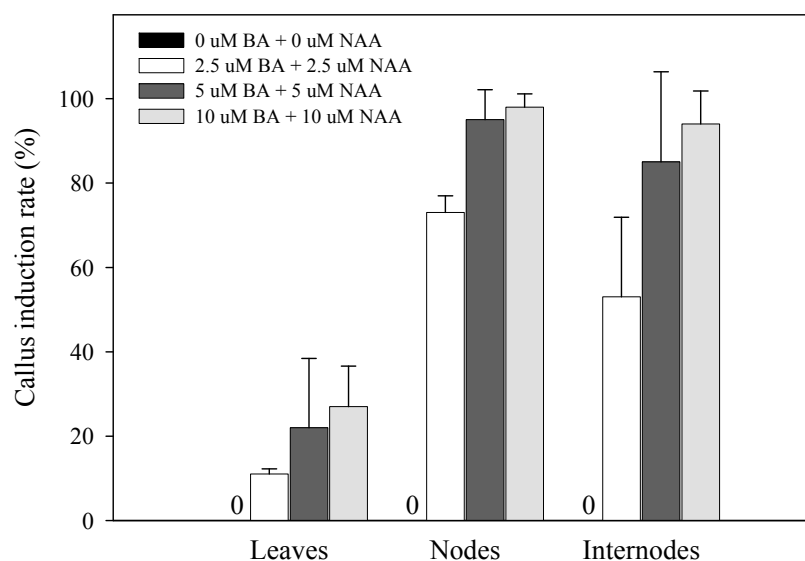


圖 1. 不同濃度之 BA 及 NAA 組合對迷迭香癒合組織誘導之影響

Fig. 1. Effect of different combinations of BA and NAA supplemented to 1/2-strength (1/2) MS basal medium on callus induction of *R. officinalis* explants.

基組成均會影響生長曲線及生長期長短⁽²⁾。繼代培養時間宜選擇log phase，此時期細胞數目正迅速增加，細胞分裂旺盛；若當細胞增加速度減緩時，常是因為培養基養分供應減少或有害代謝物質如酚類化合物的累積所致，致使細胞分裂停止、褐化，甚至死亡。圖 2 結果顯示，迷迭香癒合組織團培養於添加BA與NAA之增殖培養基，各處理均可誘導癒合組織之增殖，產生直徑及體積增大之淡綠色及白色間雜的顆粒狀癒合組織。其中，以添加 10 μ M BA + 10 μ M NAA之培養基的增殖效果最佳，其lag phase時間短，而log phase維持時間長，且產生的顆粒狀癒合組織之褐化程度低，可保持較長時間之器官分化性誘導狀態；雖然添加 5 μ M BA + 5 μ M NAA之培養基也可快速進入log phase，但log phase維持時間短，第 4 週即進入stationary phase；而添加 20 μ M BA + 20 μ M NAA之培養基，lag phase時間較長，雖然最後log phase維持時間長，可增殖大量的癒合組織，但其癒合組織中的綠色器官分化性顆粒顏色及顆粒大小等均較添加 10 μ M BA + 10 μ M NAA之增殖培養基差，其增殖性的癒合組織(proliferation callus)比例較高，器官分化性癒合組織(organogenic callus)則較少，推測其原因可能是因為高濃度的cytokinin會抑制IAA轉變為IAA結合體(IAA conjugates)，使得游離IAA濃度升高⁽¹³⁾，若培養基中含有較多的auxin，則會造成胚性或器官分化性組織逆分化為增殖性的癒

合組織⁽²⁸⁾所致，所以，添加高濃度BA是導致癒合組織增殖的主要原因⁽³⁾。因此，癒合組織之增殖應以 10 μ M BA + 10 μ M NAA作為植物生長調節劑之組合，並於 5-6 週繼代培養一次最為適宜。

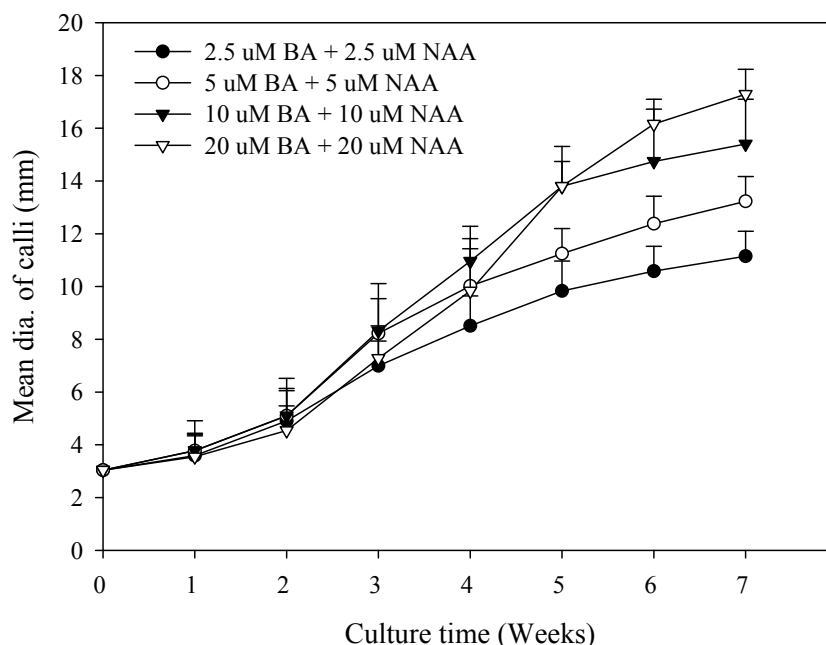


圖 2. 迷迭香癒合組織增殖之生長曲線

Fig 2. The growth curve of callus of *R. officinalis* in proliferation culture.

三、不同濃度 BA 與 NAA 組合對再生芽體增殖之影響

器官分化與培養基內的cytokinin及auxin間的含量比值有關，比值高時，可促進芽的分化與側芽的增殖^(5, 6, 30)。然而本研究中，只有培養於BA:NAA為 1:1 之再生培養基可成功再生芽體(5%)，其他BA:NAA為 10:1 及 2:1 之再生培養基，僅形成癒合組織增殖而已，均無法再生植株。雖然此結果與Lu等人(1991)於red spruce的再生試驗結果類似⁽¹⁷⁾，不過，器官再生頻率主要還是與品種基因型有關⁽¹⁵⁾。

圖 3 及圖 4 顯示，再生芽體培養於添加不同濃度BA與NAA組合之培養基中，只有 2.5-10 μ M BA與 2.5-10 μ M NAA組合之培養基具有增殖芽體之能力，其增殖率約隨植物生長調節劑濃度的增加而增加，其中，又以含 10 μ M BA + 10 μ M NAA之培養效果較佳，80%培植體逆分化形成器官分化性癒合組織，並於表面再生大量的芽體，僅 20%為增殖性的癒合組織，且全部培植體亦均無褐化現象發生。而培養於不添加BA及NAA之培養基，褐化率達 100%；培養於添加 20 μ M BA + 20 μ M NAA之培植體，除褐化率達 20%外，

80%均為增殖性的癒合組織，均未形成芽體之增殖。文獻指出，雖然auxin在胚發育的引發及正常形態發育的過程中扮演重要的角色^(20, 21, 27)，可促進細胞分裂，使胚性細胞團增加⁽⁹⁾，且auxin和cytokinin一起調節細胞分裂⁽¹⁸⁾，然而，若auxin含量高，亦可能影響cytokinin對有絲分裂的調控⁽²⁵⁾，進而影響芽體萌發，間接影響芽體之誘導⁽³¹⁾，且高濃度的auxin會促進ACC合成酶的活性，進而刺激乙烯的產生⁽¹¹⁾，使得植物的生長受到抑制。本研究，再生芽體培養於高濃度植物生長調節劑組合(20 μ M BA + 20 μ M NAA)之培養基均無芽體增殖及生長，顯示誘導迷迭香芽體增殖之BA與NAA組合濃度不宜過高，但亦不能完全去除之。

本研究中，添加 10 μ M BA + 10 μ M NAA 之培養基對癒合組織的誘導及增殖效果最佳，可保持較長時間之不定芽分化及增殖之能力，並能於 BA : NAA 為 1 : 1 之培養基中再生芽體。利用組織培養方法培養迷迭香，不僅可於短時間內達到大量繁殖的目的，並可降低商業生產上的成本及人力支出，提升最大的產量收益，可作為未來發展迷迭香種苗及相關產業之參考。

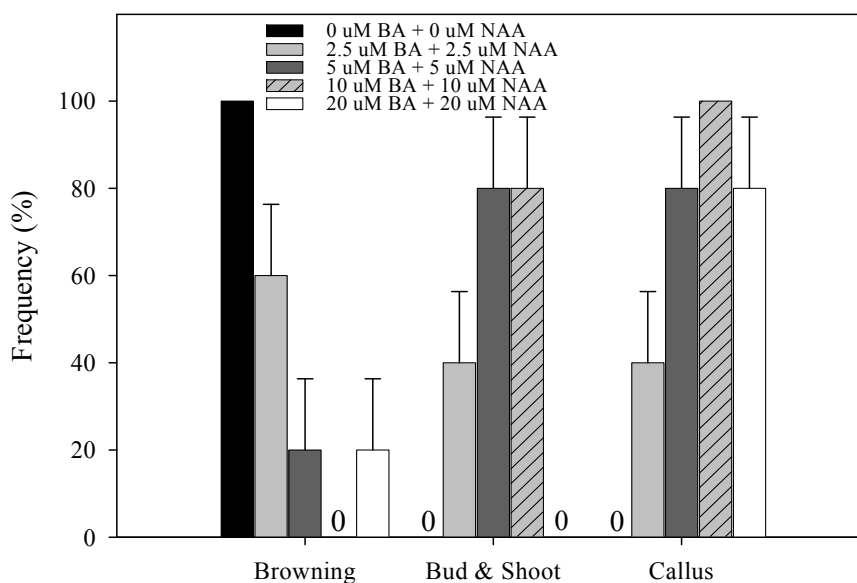


圖 3. 不同濃度之 BA 及 NAA 組合對迷迭香再生芽體增殖之影響

Fig. 3. Effect of different combinations of BA and NAA supplemented to 1/2-strength (1/2) MS basal medium on adventitious bud regeneration of *R. officinalis*.

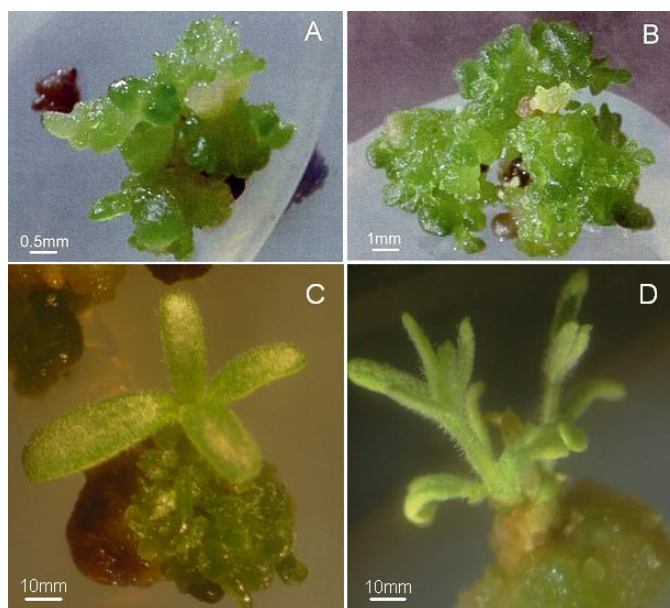


圖 4. BA 及 NAA 處理對迷迭香癒合組織形成及再生芽體增殖之影響 (A) 2.5 μM BA + 2.5 μM NAA 形成之癒合組織 (B) 5 μM BA + 5 μM NAA 形成之癒合組織 (C, D)癒合組織之不定芽再生

Fig. 4. Effect of BA and NAA supplemented to 1/2-strength (1/2) MS basal medium on callus formation and adventitious bud regeneration of *R. officinalis*. (A) Callus obtained on medium containing the combination of 2.5 μM BA + 2.5 μM NAA. (B) Callus obtained on medium containing the combination of 5 μM BA + 5 μM NAA. (C, D) Adventitious buds regenerated from the surface of calli.

參考文獻

1. 周思潔. 2002. 唐菖蒲花藥培養增殖之研究. 國立中興大學園藝研究所碩士論文.
2. 趙玉真. 1999. 聖誕紅之莖頂培養及體胚形成. 國立中興大學園藝研究所碩士論文.
3. 盧美君. 2003. 長果桑芽體組織培養之研究. 中國園藝 49(3): 251-258.
4. Basile, A., M. M. Jimenez-Carmona, and A. A. Clifford. 1998. Extraction of rosemary by superheated water. J. Agr. Food Chem. 46: 5205-5209.
5. Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.

6. Chawla, H. S. 2002. Introduction to plant biotechnology, 2nd edn. Science Publishers, Enfield, pp. 57-73.
7. Chen, J. and M. Ziv. 2005. The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescences stem explants of *Narcissus tazetta*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41: 816-821.
8. Elamrani, A., S. Zrira, B. Benjilali, and M. Berrada. 2000. A study of Moroccan Rosemary Oils. J. Essential Oil Res. 12: 487-496.
9. Gray, D. J. 1996. Nonzygotic embryogenesis. In: Trigiano, R. N. and D. J. Gray (Eds.), Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press, New York, pp. 133-147.
10. Inger, B. H. and K. K. Petersen. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 45: 43-52.
11. Kieber, J. 2006. Ethylene, In: Taiz, L. and E. Zeiger (Eds.), Plant physiology, 4th edn. Sinauer, Sunderland, pp. 543-591.
12. Komali, A. S. and K. Shetty. 1998. Comparison of the growth pattern and rosmarinic acid production in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) shoots and genetically transformed callus cultures. Food Biotechnol. 12: 27-41.
13. Lau, O. and S. F. Yang. 1973. Mechanism of a synergistic effect of kinetin on auxin-induced ethylene production. Plant Physiol. 51: 1011-1014.
14. Leshem, B., D. P. Shaley, and S. Izhar. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. Ann. Bot. 61: 255-260.
15. Loh, C. S. and A. N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Sci. Hortic. 39: 31-39.
16. Lowe, K. C., M. R. Davey, and J. B. Power. 1996. Plant tissue culture: past, present and future. Plant Tissue Cult. Biotechnol. 2: 175-186.
17. Lu, C-Y., I. S. Harry, M. R. Thompson, and T. A. Thorpe. 1991. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). Bot. Gaz. 152: 42-50.
18. Machakova, I., E. Zazimalova, and E. F. George. 2008. Plant growth

19. Margarita, C. and M. Margarita. 1991. Morphogenesis in leaf, hypocotyls and explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 25: 117-123.
20. Michalczuk, L., T. J. Cooke, and J. D. Cohen. 1992a. Auxin levels at different stage of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31: 1097-1103.
21. Michalczuk, L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke, and J. D. Cohen. 1992b. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. Plant Physiol. 100: 1346-1353.
22. Munne-Bosch, S. and L. Alegre. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. Plant Physiol. 125: 1094-1102.
23. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
24. Narayana, S. S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Reinert, J. and Y. Bajaj (Eds.), Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer, New York, pp. 178-248.
25. Pasternak, T., P. Miskolczi, F. Ayaydin, T. Mészáros, D. Dudits, and A. Fehér. 2000. Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant Growth Regul. 32: 129-141.
26. Rezzoug, S. A., N. Louka, and K. Allaf. 2000. Effect of the main processing parameters of the instantaneous controlled pressure drop process on oil isolation from rosemary leaves. J. Essential Oil Res. 12: 336-344.
27. Schiavone, F. M. and T. J. Cooke. 1987. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Differ. 21: 53-62.
28. Sharp, W.R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas, and S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2: 268-310.

29. Trewavas, A. J. 1982. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiol. Plant.* 55: 60-72.
30. Van Staden, J., E. Zazimalova, and E. F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E. F., M. A. Hall, and G. J. De Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background.* Springer, New York, pp. 205-226.
31. Yam, T. W., E. L. Webb, and J. Arditti. 1990. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro. *Planta* 180: 458-460.