

# 丹參組織培養苗馴化處理及其植株丹參酮含量分析<sup>1</sup>

陳威臣<sup>2</sup> 曹進義<sup>2</sup> 夏奇鈺<sup>2,3</sup>

## 摘 要

陳威臣、曹進義、夏奇鈺。2007。丹參組織培養苗馴化處理及其植株丹參酮含量分析。台灣農業研究 56:21-30。

本研究探討吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid; IBA) 對丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 組培芽體 (*in vitro* shoot) 發根之影響, 以及培養容器封口透氣資材與馴化條件對組培苗移植存活率關係, 並分析成株丹參酮之含量。組培芽體於添加 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA 之半量 Murashige and Skoog 基本鹽類 (1/2MS) 培養基, 利用鋁箔紙封口培養 2 週後, 再以三層藥包紙進行封口置換處理 (AF2+DP4), 其發根率可達 90%。將組培苗 (plantlet) 移植於已滅菌之 BioMix 培養土: 蛭石: 珍珠石 = 1: 1: 1 (v/v) 混合介質, 再以透明塑膠袋覆蓋植株培養於日夜溫為 22°C, 10h / 18°C, 14h、光照強度約 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 之生長箱進行馴化處理, 透氣預處理組培苗存活率可達 80.1%, 較持續以鋁箔紙封口培養前處理組培苗存活率則只有 27.8%。此外, 經由高效率液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析丹參各檢品之丹參酮類 (tanshinones): tanshinone-I (Tan-I), tanshinone-IIA (Tan-IIA), cryptotanshinone (Crypto) 含量結果顯示, 組培苗經田間栽植 9 個月後植株根部 (紅根) 之 Tan-I + Tan-IIA + Crypto 總含量約 1.85 mg g<sup>-1</sup> dw, 為市售丹參藥材的 1.5 倍。

**關鍵詞**：丹參、藥用植物、微體繁殖、高壓液相層析、二次代謝物。

## 前 言

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科 (Labiatae) 鼠尾草屬 (*Salvia*) 多年生草本植物, 根為磚紅色圓柱形, 其乾燥根具有活血化瘀之功效, 是治療心血管疾病的之重要中藥, 被列為神農本草經上品。丹參主要成分包括脂溶性二萜類丹參酮 I (tanshinone-I; Tan-I)、丹參酮 II A (tanshinone-IIA; Tan-IIA) 及隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto); 現代藥理研究證實丹參具有保護心肌缺血及缺氧、改善微循環、抑制血小板聚集和血栓形成及抗菌消炎等作用, 尤其對於冠心病與心絞痛具有良好的療效, 同時也被用於治療慢性肝炎與肝硬化等肝病變, 更具有抑制肝癌細胞生長的功效 (Hu *et al.* 1999; Park *et al.* 1999)。此外, Wu *et al.* (1998) 亦指出丹參具有抗氧化、降膽固醇和預防動脈硬化效果, 其臨床治療上的潛能不容忽視。近來植物藥材在美國、印度與巴西均被檢驗出有重金屬污染與農藥殘毒等問題 (Saper *et al.* 2004; Caldas & Machado 2004), 各國政府因而紛紛針對中藥實施層層把關, 包括檢驗重金屬污染、農藥殘毒與細菌感染等, 以維護大眾使用中藥的安全性。目前丹

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2277 號。接受日期：2007 年 1 月 25 日。
2. 本所生技組助理研究員、聘用人員與副研究員。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者, 電子郵件：hsia@wufeng.tari.gov.tw; 傳真機：(04)23302806。

參市場所需藥材皆仰賴中國進口，近年來其野生資源逐漸減少，雖可利用種子，分根、蘆頭或扦插等方法進行丹參種苗繁殖栽培，然各地藥材品質多參差不齊，更有偽劣品充斥市場的現象 (Guo *et al.* 2002)。利用植物組織培養技術不僅可縮短繁殖與栽培時間，生產之種苗更具有一致性的優點，而且組織培養技術於人為環境的控制下，可進一步運用科學方法提高代謝物之品質和產量 (Song *et al.* 1998)。Chen *et al.* (2005) 已成功利用組織培養技術大量繁殖丹參組培芽體；但組培芽體發根及組培苗馴化的方法則未見報導。本研究利用吡哆丁酸與改善培養容器封口以促進丹參組培芽體發根與組培苗馴化存活率，並藉由 HPLC 方法檢測及比較組培苗田間栽種植株與市售丹參藥材之丹參酮含量，評估臺灣利用組培技術生產大量種苗用以自產丹參藥材的可行性。

## 材料與方法

### 供試材料與培養基

本研究採用之丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 植株由中國醫藥大學陳忠川教授提供、鑑定，栽培於行政院農委會農業試驗所。依據 Chen *et al.* (2005) 方法，利用丹參莖節腋芽作為培植體，培養於含有適量苄氨基嘌呤 (6-benzyladenine; BA) 與奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthileneacetic acid; NAA) 之 MS 培養基中，可成功地誘導叢生芽體形成及建立初代無菌組培芽體以作為下列試驗之用。本研究主要利用半量 MS (Murashige & Skoog 1962) 無機鹽類及其全量有機成分為基本配方 (1/2MS)，分別添加不同濃度植物生長調節劑，加入凝膠物質 (Difco Bacto-agar) 前先以 0.1~1 N NaOH 及 HCl 將 pH 值調至 5.7±0.1，再以 121°C、15 lb in<sup>-2</sup> (1.05kg cm<sup>-2</sup>) 進行高溫高壓滅菌 15 min 後冷卻備用。

### IBA 對丹參組培芽體發根之影響

利用高約 1.5-2 cm 之丹參組培芽體於添加不同濃度 IBA (0、0.25、0.5 及 1 mg L<sup>-1</sup>) 之 1/2 MS 固態培養基，置於 25±1°C 恆溫、照光 (約 38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16 小時之環境，經培養 4 週後調查組培苗發根率與根數。

### 培養容器透氣性封口對丹參組培芽體發根之影響

利用高約 1.5-2 cm 之丹參組培芽體於內含 25 mL 培養基之 125 mL 三角瓶 (Pyrex, 日本) 中，培養基為 1/2MS 基本配方添加 0.5 mg L<sup>-1</sup> IBA，三角瓶分別以兩層鋁箔紙 (aluminum foil; AF) 或 3 層藥包紙 (9.5 × 9.5 × 0.046 cm，氣體流速 0.5 mL s<sup>-1</sup>，正隆，臺灣) (dispense paper; DP) 作為封口之用。對照組全程 6 週均以兩層鋁箔紙作為容器封口 (AF6)，處理組則是於鋁箔紙封口培養 2 週後，以三層藥包紙置換，再經 4 週培養 (AF2+ DP4)。在接種培養 6 週後調查芽體數、組培苗發根率與根數。

### 丹參組培苗之移植馴化處理

將上述試驗已發根之丹參組培苗 (高約 5-6 cm) 出瓶，利用自來水洗淨根部附著之培養基，並用稀釋 1000 倍免賴得 (Benomyl, 50% WP, Du Pont Co.) 消毒浸泡 30 分鐘後，除去部分葉片後移植於直徑 9 cm 黑色塑膠盆，盆內為已滅菌且充分濕潤之 BioMix 培養土：蛭石：珍珠石 = 1 : 1 : 1 (v/v) 混合介質。將種有組培苗之塑膠盆以透明塑膠袋覆蓋保持濕度，置入日、夜溫為 22°C，10h / 18°C，14 h，與光強度約 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  之生長箱進行馴化，四星期後移出至室溫下培養並調查存活率。每處理 4 重複，每重複移植 6 株組培苗。成活植株於室外環境盆栽 3 個月後移至農試所田間栽培，丹參植株於田間生長達 6 個月後，收穫地上部與根部，供做後續丹參酮含量分析之用。

## 丹參酮之含量測定

丹參酮類 (tanshinones) 含量測定係利用高效液相層析 (HPLC) 法，採用沃特斯公司相關儀器設備 (Waters, 美國)；層析管柱 A：RP-18, Inertsil ODS-3 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  33 mm) (GL Sciences Inc., 日本)；層析管柱 B：RP-18, Inertsil ODS-3 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) (GL Sciences Inc., 日本)。分析方法修改自 Chen *et al.* (1997)，在 30°C 控溫條件下，以 Methanol：Tetrahydrofuran：Glacial Acetic Acid：H<sub>2</sub>O = 21.5：37.5：1：40 (v/v) 為移動相 (mobile phase)，流速 1 mL min<sup>-1</sup>，檢測波長為 254 nm。標準品丹參酮 I (Tan-I)、丹參酮 II A (Tan-IIA) 與隱丹參酮 (Crypto) 購自九鼎生物科技公司，標準溶液配製濃度為 100、80、60、40 及 20 mg L<sup>-1</sup>，並以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾備用。在上述的層析條件下每次注射 10  $\mu\text{l}$  進行測定，每個濃度重複 3 次，再以成分濃度為橫座標，峰面積為縱座標，求得線性迴歸方程式及決定係數 (coefficient of determination; R<sup>2</sup>)。丹參檢品包括市售藥材 (購自彰化縣員林鎮) 與組培苗移植栽培於農業試驗所田間 6 個月之植株地上部與根部，其中根部並依其外觀顏色分為紅根及白根分別檢測。丹參檢品先以 50°C 烘箱烘乾 48 hr，乾燥檢品取出研碎後以適量 methanol 為溶媒浸漬過夜，經超音波洗淨器震盪 20-30 min，過濾並收集濾液，殘渣再加溶媒重複萃取三次。將濾液混合以真空減壓濃縮機濃縮至完全乾燥，而後再以甲醇 (methanol; MeOH) 將其成分溶出且定量，再以 0.45  $\mu\text{m}$  濾膜過濾以供 HPLC 分析之用。各種丹參檢品注射 10  $\mu\text{l}$  檢品濾液、重複注射 3 次，依所得線性迴歸方程式推算檢品中 Tan-I、Tan-IIA 及 Crypto 的含量。

## 資料分析

本研究發根試驗之每處理為 40 個組培芽體 (每處理含 4 個重複，每重複含 10 個組培芽體)。培養容器封口試驗之每處理為 60 個組培芽體 (每處理含 4 個重複，每重複含 15 個組培芽體)。馴化試驗每處理均為 36 株組培組培苗 (每處理含 4 個重複，每重複含 9 株組培苗)；試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著，則利用 Least significant difference (LSD) test 比較各處理平均值間差異。

# 結 果

## IBA 對丹參組培芽體發根之影響

利用丹參組培芽體進行發根試驗結果如表 1 所示，添加 IBA 顯著促進丹參組培芽體不定根發生率及增加不定根數目。其中以添加 0.5 mgL<sup>-1</sup> IBA 處理可達較高發根率 (75%) 及較多根數 (4.8 條/組培苗)，且其根系發育也較為粗壯 (圖 1A)。雖然 1 mgL<sup>-1</sup> IBA 處理之根數亦達 4.5 條/組培苗，但其發根率下降至 65%。因此後續均以添加 0.5 mgL<sup>-1</sup> IBA 之 1/2MS 培養基進行組培芽體發根培養。

## 培養容器封口資材對丹參組培芽體生長、不定根形成及組培苗移植成活率之影響

利用藥包紙置換鋁箔紙作為培養容器封口試驗結果顯示，容器封口置換對組培苗數之增減並無顯著差異 (表 2)，但可提高組培芽體發根率 (90%)，對照組 (AF6) 之發根率僅 76.7%；就根數而言，AF2+DP4 處理之 4.4 條/組培苗亦較 AF6 處理之 3.1 條/培植體為高，兩種發根指標均達顯著差異 (表 2)。觀察植株外觀結果顯示，藉由透氣性封口處理 (AF2+DP4) 組培苗具有較大葉片且健壯之生長勢 (圖 1B)。

表 1. 吲哚丁酸 (IBA) 濃度對丹參組培芽體發根之影響

Table 1. Influence of indole-3-butyric acid (IBA) on root formation in *in vitro* shoot of *Salvia miltiorrhiza*<sup>z</sup>

IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Rooting (%) <sup>x</sup>	Roots per shoot <sup>y</sup>
0	37.5± 6.3 d	2.9 ± 0.36 c
0.25	52.5±11.1 c	3.8 ± 0.48 b
0.5	75.0± 5.0 a	4.8 ± 0.35 a
1	65.0± 2.9 b	4.5 ± 0.24 a

<sup>z</sup> Twenty shoots per treatment were tested and the data was collected after 4 wks of culture. Means ± SE within a column followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by LSD test.

表 2. 培養容器封口對丹參組培芽體發根與組培苗移植存活率之影響

Table 2. Influence of container closure on root formation in *in vitro* shoots and survival rate in plantlets of *Salvia miltiorrhiza*<sup>z</sup>

Treatment <sup>y</sup>	Shoots production	Rooting (%) <sup>x</sup>	Roots per shoot <sup>x</sup>	Survival rate (%) <sup>w</sup>
AF6	3.6 ± 0.4 a	76.7 ± 5.77 b	3.1 ± 0.25 b	27.8 ± 7.2 b
AF2+DP4	3.5 ± 0.2 a	90.0 ± 4.30 a	4.4 ± 0.33 a	80.1 ± 5.3 a

<sup>z</sup> *In vitro* grown shoots (about 1.5 cm long) were cultured on half-strength MS medium containing 0.5 mgL<sup>-1</sup> IBA and 3% sucrose for 6 wks. Means ± SE within a column followed by the same letters are not significantly different at the 5% level by LSD test.

<sup>y</sup> AF6: using 2 layers of aluminum foil as container closure for 6 weeks; AF2+DP4: Using 2 layers of aluminum foil as container closure for 2 wks, replacing with 3 layers of dispense papers for another 4 wks.

<sup>x</sup> Thirty-six shoots were tested per treatment and the data was collected after 4 wks of culture. Roots shorter than 0.5 cm in length were not scored.

<sup>w</sup> Survival rate was recorded 4 wks after transferring into potting mixed substance in growth chamber for acclimation.

將上述處理所得丹參組培苗出瓶上盆後，移入生長箱培養 4 週後調查存活率，結果顯示 AF2+DP4 處理之組培苗具有較高移植存活率 (80.1%)，而對照組 (AF6) 僅為 27.8% (表 2)，且 AF6 處理組培苗外觀上顯得較為瘦弱。圖 1C 與 1D 分別顯示丹參組培苗出瓶種植 4 週與 12 週後植株之生長情形。而後將馴化成活且生長良好之丹參苗種植田間，植株於田間生長達 6 個月後，採收作為後續丹參酮類含量分析之用 (圖 1E-F)。

### 丹參檢品之丹參酮含量分析

利用丹參酮類 (Tan-I、Tan-IIA 與 Crypto) 標準品溶液，進行 HPLC 定性與定量分析，結果顯示三種成分之檢量線性方程式決定係數 ( $R^2$ ) 均達 0.95 以上，三者滯留時間 (retention time; RT) 分別約於 13.6、22.5 與 11.4 min (表 3)。在丹參各檢品中以組培苗於田間栽培後植株之紅根所含 Tan-I+Tan-IIA+Crypto 較高，可達 1.85 mg g<sup>-1</sup> dw，是丹參市場品含量的 1.5 倍。此外，在白根中 Tan-I+Tan-IIA+Crypto 含量亦可達 0.92 mg g<sup>-1</sup> dw。而組培苗於田間栽培後植株地上部僅測得 Tan-IIA，含量為 0.02 mg g<sup>-1</sup> dw (表 4)。

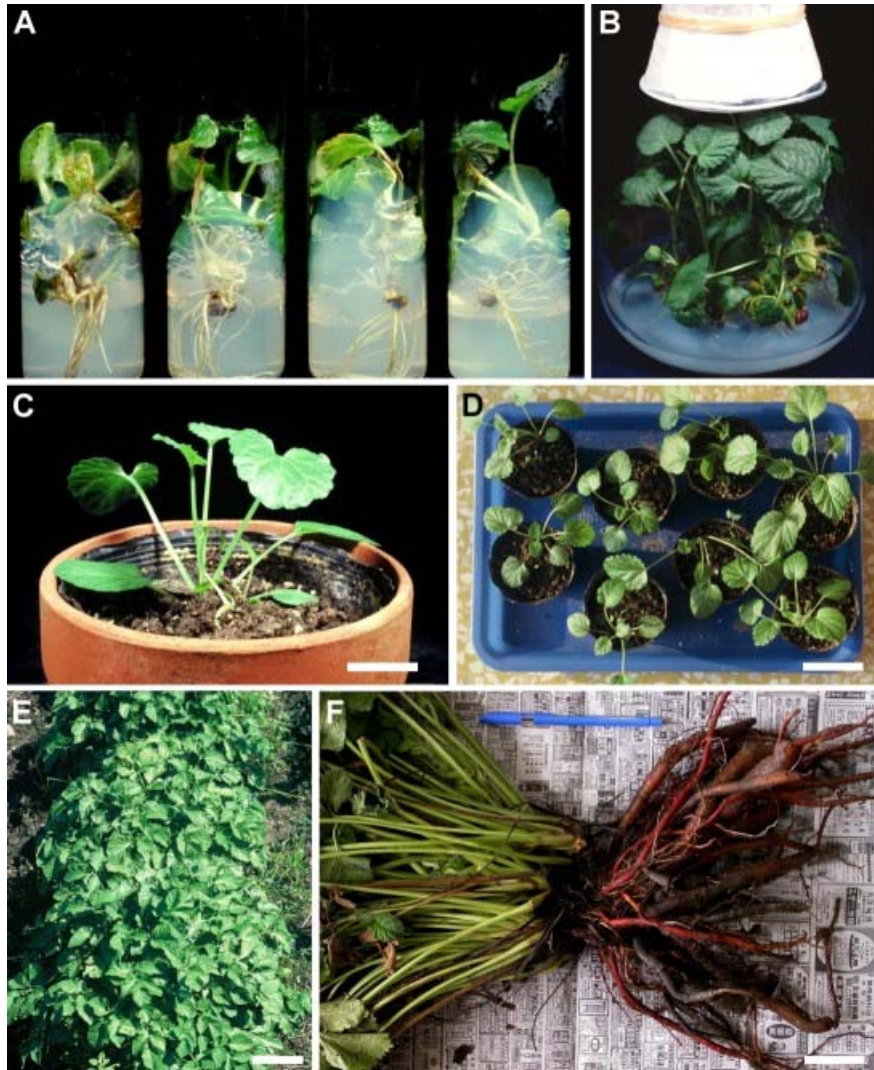


圖 1. 丹參組培芽體發根與組培苗移植馴化過程中之植株生長情形。丹參組培芽體於添加  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  與  $1 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 之  $1/2\text{MS}$  基本培養基 4 週後之發根情形 (A)；組培芽體培養於添加  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 之  $1/2\text{MS}$  基本培養基，配合培養容器封口置換處理 (AF2+DP4) 達 6 週後，生長良好之發根組培苗 (B)；移植馴化處理 4 週，Bar = 2 cm (C) 與 12 週，Bar = 5 cm (D) 後之丹參植株生長情形；丹參植株於農業試驗所田間達 6 個月之生長情形，Bar = 10 cm (E)；與採收時植株之地上部與根部，Bar = 5 cm (F)。

Fig. 1. *In vitro* shoots rooting and *ex vitro* plantlets acclimation of *Salvia miltiorrhiza* plantlets in field. Rooting of *in vitro* shoots of *Salvia miltiorrhiza* after culture on half-strength MS medium containing 1 or  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA for 6 wks (A); Plantlets, on half-strength MS medium containing  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA, containers capped with 2 layers of aluminum foil for 2 wks (AF2) then replaced by 3 layers of dispense paper for 4 wks (DP4) (total 6 wks incubation) (B); then acclimatized for 4 wks (C), Bar = 2 cm and 12 wks (D), Bar = 5 cm. Micropropagated plants of *Salvia miltiorrhiza* growing at the Institute farm for six months (E), Bar = 10 cm; and the aerial and root parts of harvested plants (F), Bar = 5 cm.

表 3. 丹參酮類標準品迴歸檢量方程式、決定係數與其滯留時間

Table 3. The linear equation, coefficient of determination ( $R^2$ ), and retention time of tanshinones analysis by RP-HPLC method <sup>z</sup>

Tanshinones	Liner equation	$R^2$	Retention time (min)
Tanshinone I	$y = 3.00 \times 10^7 x + 1.99 \times 10^5$	0.949	$13.63 \pm 0.009$
Tanshinone IIA	$y = 3.73 \times 10^7 x - 2.10 \times 10^4$	0.995	$22.47 \pm 0.022$
Cryptotanshinone	$y = 3.17 \times 10^7 x - 1.58 \times 10^3$	0.996	$11.38 \pm 0.006$

<sup>z</sup> Samples were separated by C18 column with methanol: tetrahydrofuran: glacial acetic acid: H<sub>2</sub>O = 21.5: 37.5: 1: 40 (v/v) as mobile phase.

表 4. 丹參組培苗田間栽培植株地上部與根部及丹參市場品之丹參酮類含量分析

Table 4. Tanshinones content of aerial parts and roots derived from field-grew *in vitro* micropropagated plant of *Salvia miltiorrhiza* and Radix *Salvia* (market product, roots of *Salvia miltiorrhiza*) <sup>z</sup>

Samples	Tanshinones content (mg g <sup>-1</sup> dry wt) <sup>z</sup>			
	Tan I	Tan IIA	Crypto	Sum
Field grown plant				
Aerial part	<i>nd</i>	$0.02 \pm 0.002$	<i>nd</i>	0.02
White roots	$0.45 \pm 0.025$	$0.18 \pm 0.012$	$0.29 \pm 0.115$	0.92
Red roots	$1.45 \pm 0.020$	$0.27 \pm 0.001$	$0.13 \pm 0.021$	1.85
Radix <i>Salvia</i>	$0.39 \pm 0.017$	$0.44 \pm 0.017$	$0.37 \pm 0.017$	1.20

<sup>z</sup> Field-grew *in vitro* micropropagated plant of *Salvia miltiorrhiza* which had grown in pot for 3 months and following 6 months of culture in field.

<sup>y</sup> Three injections (10  $\mu$ l each) were tested for each sample. Means (Mean  $\pm$  SE) within a column followed by the same letters were not significantly different at the 5% level by LSD test. *nd* = not detected.

## 討 論

近年來，利用組織培養技術已成功大量繁殖許多重要藥用植物組培苗，例如人參、黃耆、柴胡、當歸、紅豆杉、白芷、金線連等 (Nalawade *et al.* 2003; Nalawade & Tsay 2004; Sagare *et al.* 2000)。Chen *et al.* (2005) 利用丹參莖節腋芽部位已建立丹參大量繁殖組培芽體，且利用改善封口透氣性解決芽體玻璃質化問題，惟組培苗往往由於移植存活率低，造成實際應用的諸多限制。本研究藉由調整培養基之 IBA 濃度以促進組培芽體發根，並在芽體發根階段利用透氣性封口降低瓶內相對溼度以提高組培苗品質及移植存活率，成功地建立適合於丹參組培芽體發根與組培苗移植馴化之方法；此外，利用 HPLC 分析組培苗田間栽植植株與市售丹參藥材之丹參酮含量，證明組培苗作為生產丹參藥材之可行性。

組織培養繁殖研究常以 IAA、NAA 或 IBA 作為促進組培芽體發根之植物生長調節劑，其中又以 IBA 與 NAA 之效果較佳 (Gaspar *et al.* 1996; George 1993; Moncousin 1991)。在甜菊 (*Stevia*

*rebaudiana*) (Sivaram & Mukundan 2003) 組培芽體發根研究中顯示出, IBA 具有促進芽體發根的效果, 且濃度愈高效果愈佳。Sahoo & Chand (1998) 報導  $1 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 對黃荊 (*Vitex negundo*) 組培芽體發根效果較佳, 較高 ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) 與較低 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) 濃度均不利其發根。此外, 高氏柴胡 (*Bupleurum kanoi*) 組培芽體發根研究也顯示,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 處理之組培芽體基部並無癒合組織形成, 且具有高發根率與根數 (Chen *et al.* 2004a; Chen *et al.* 2006b)。本研究結果顯示,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 處理對於丹參組培芽體發根之效果較佳 (表 1), 此結果與上述其他學者之研究結果相似, 顯示適當 IBA 濃度有利於提高組培芽體的發根率與發根數。

組織培養大量繁殖技術已廣泛應用於種苗生產事業, 但因部分玻璃質化組培苗馴化存活率的低下往往造成嚴重的成本負擔, 雖然藉由一些化學與物理方法可抑制玻璃質苗形成或增進組培苗品質, 但也可能導致組培苗繁殖倍率的降低 (Chen *et al.* 2004b; Pâques 1991; Tsay 1998)。其中利用高透氣性材質做為培養容器封口, 係改善瓶苗品質之簡單且有效的方法, 並已成功地應用於抑制康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) (Chen *et al.* 1998) 與玄參 (*Scrophularia yoshimurae*) (Lai *et al.* 2005) 組培芽體玻璃質化現象。此外, 高氏柴胡 (Chen *et al.* 2004a; Chen *et al.* 2006b) 與玄參 (Chen *et al.* 2006a) 組培芽體利用透氣性培養容器封口之研究亦有相似的結果, 不僅不影響組培芽體繁殖倍率且可提高其組培苗移植存活率; 藉由掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope; SEM) 觀察組培芽體與組培苗葉片結果顯示, 氣孔功能正常與否與表皮蠟質累積多寡是影響移植存活率高低的主要因子之一。本研究結果同樣指出, 丹參組培芽體經培養於含  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 之 1/2MS 培養基, 在芽體發根培養階段藉由藥包紙進行 4 週透氣處理後並不影響芽體繁殖倍率, 處理後之組培苗生長健壯且根系形成良好 (圖 1B), 具有較高之移植存活率 (表 3)。

當組培苗於盆栽馴化 3 個月後, 再將其移植田間栽培達 6 個月時, 即可顯示丹參植株生長相當茂盛 (圖 1E), 採收後可發現其植株呈現特有的紅色根部 (圖 1F), 最大根部直徑達約 3.5 cm; 經 HPLC 分析結果顯示其紅根之總丹參酮含量高於丹參市售藥材 (表 4)。綜合以上結果顯示, 田間栽培丹參組培苗可於較短栽培時間內達到相當含量丹參酮的藥材, 若能配合優良農業操作生產體系 (good agricultural practice; GAP) 規範栽培生產, 則可獲得優質的丹參原物料, 有利於臺灣藥用植物產業之發展。

## 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 (91 農科-3.1.3-農-C1、92 農科-4.2.3-農-C1、93 農科-4.2.1-糧-Z1), 以及朝陽科技大學博士後研究 Dinesh Chandra Agrawal 博士於文稿英文部分之潤飾, 特此申謝。

## 引用文獻 (Literature cited)

Caldas, E. D., and L. L. Machado. 2004. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. *Food Chem. Toxicol.* 42:599-603.

- Chen, H., J. P. Yuan, F. Chen, Y. L. Zhang, and J. Y. Song. 1997. Tanshinone production in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *J. Biotech.* 58:147-156.
- Chen, U. C., C. N. Hsia, D. C. Agrawal, and H. S. Tsay. 2006a. Influence of ventilation closures on plant growth parameters, acclimation and anatomy of leaf surface in *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki - a medicinal plant native to Taiwan. *Bot. Studies* 47:259-266.
- Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004a. Influence of salts strength, sucrose, auxins and container closure on root formation and acclimation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* plantlets. *J. Agric. Res. China* 53:249-260. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2006b. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi*- a native endangered medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 42:128-133.
- Chen, U. C., Y. J. Shiau, C. C. Lai, and H. S. Tsay. 1998. Effects of medium composition and vessel closure on the hyperhydricity and rooting of carnation *in vitro* culture. *J. Agric. Res. China* 47:346-376. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004b. Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal herbs- *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang by axillary bud culture. *J. Agric. Res. China* 53:27-38. (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. Agric. Res. China* 54:93-102. (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. England: Exegetics Ltd. 574 pp.
- Guo, B. L., Y. X. Feng, and Y. J. Zhao. 2002. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza*. *China J. Chinese Materia Medica* 27:492-495. (in Chinese with English abstract)
- Hu, Z. B., D. Liu, and A. W. Alfermann. 1999. Genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*. p.249-260. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry* 45, Transgenic Medical Plants (Bajaj, Y. P. S. ed.). Springer-Verlag, Berlin.
- Lai, C. C., H. M. Lin, S. M. Nalawade, W. Fang, and H. S. Tsay. 2005. Hyperhydricity in shoot culture of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *J. Plant Physiol.* 162:355-361.
- Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings: general aspects. *Acta Hort.* 289:301-310.
- 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.



- Nalawade, S. M., and H. S. Tsay. 2004. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 40(P):143-154.
- Pâques, M. 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Hortic.* 289: 283-290.
- Park, S., J. S. Song, D. K. Lee, and C. H. Yang. 1999. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth inhibition. *Bull. Korean Chem. Soc.* 20: 925-928.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, and H. S. Tsay. 2000. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medical plant genetic resource. p.171-187. *in: Proceedings 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, Taiwan.
- Sahoo, Y. and P. K. Chand. 1998. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. *Plant Cell Rep.* 18:301-307.
- 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. *Journal American Medical Association (JAMA)* 292:2868-2873.
- SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Inst., Cary, NC, USA. 943 pp.
- Sivaram, L., and U. Mukundan. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 39(P):520-523.
- Song, J. Y., Y. J. Zhang, and J. J. Qi. 1998. Biotechnology of *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Research development* 11:86-89. (in Chinese with English abstract)
- Tsay, H. S. 1998. Effects of medium composition at different precultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in *in vitro* shoot proliferation. *Acta Hortic.* 461: 243-249.
- 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.

# *In Vitro* Plantlets Acclimation and Tanshinones Analysis of *Salvia Miltiorrhiza*<sup>1</sup>

Uei-Chern Chen<sup>2</sup>, Chin-Yi Tsao<sup>2</sup> and Chi-Ni Hsia<sup>2,3</sup>

## Abstract

Chen, U. C., C. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2007. *In vitro* plantlets acclimation and tanshinones analysis of *Salvia miltiorrhiza*. J.Taiwan Agric. Res. 56:21-30.

An efficient micropropagation protocol for producing high quality plantlets that are easy to acclimatize in field was developed for *Salvia miltiorrhiza*. *In vitro* grown shoots induced rooting (90%) after culturing on half-strength Murashige and Skoog's basal medium (1/2MS) supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> indole-3-butyric acid (IBA). Culture vessels were capped with aluminum foil for 2 weeks, and thereafter replaced with 3 layers of dispense paper for 4 weeks (AF2+DP4) were better than controls capped with aluminum foil for 6 weeks (AF6). Rooted shoots were transplanted into plastic pot containing a mixture of BioMix: vermiculite: perlite (1: 1: 1 ratio) (v/v). For acclimation, these pots were covered with transparent plastic bags and kept in a growth chamber under 14 h light at 22°C and 10 h dark at 18°C for 4 weeks. At 4 weeks of observation, these conditions resulted in the highest survival rate of 80.1% compared to AF6 treatment (27.8%). To compare, tanshinones contents (tanshinone-I, tanshinone-IIA and cryptotanshinone), the bioactive compounds in *Salvia miltiorrhiza* were estimated in the aerial parts and roots between *in vitro* micropropagated plants and market crude drug of *S. miltiorrhiza* by high performance liquid chromatography (HPLC). The quantity of tanshinones in red roots of *in vitro* micropropagated plants was measured as 1.85 mg g<sup>-1</sup> dw about 1.5-fold higher than market crude drug.

**Key Words:** Danshen, Medicinal plant, Micropropagation, High performance liquid chromatography (HPLC), Secondary metabolite.

- 
1. Contribution No. 2277 from Agricultural Research Institute (ARI), Council of Agriculture. Accepted January 25, 2007.
  2. Assistant Agronomist, Contract Employees and Associate Researcher, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
  3. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.