2,4-D 對高氏柴胡葉片癒合組織誘導、增殖與柴胡皂苷含量之影響

陳威臣[1]、闕甫伦[2]、夏奇鈱[1]、葉茂生[3]、蔡新聲[4*]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所農藝組

[2] 臺中健康暨管理學院生活應用科學學系

[3] 國立中興大學農藝學系

[4] 朝陽科技大學生物技術研究所

摘要

本研究利用臺灣原生藥用植物-高氏柴胡(*Bupleurum kaoi*)組培苗葉片片段，培養於添加 0.5-4 mg L^{-1} 2,4- dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D)之 1/2 Murashige and Skoog (MS)培養基均可誘導癒合組織形成，其中以 4 mg L^{-1} 2,4-D 處理之誘導率達 75%最佳。選擇生長快速、淡黃色且質地綿細之癒合組織進行試驗後發現，較低濃度 2,4-D (0.1-0.2 mg L^{-1})較適於癒合組織之生長與增殖，提高 2,4-D 濃度(0.4-0.8 mg L^{-1} 2,4-D)則降低癒合組織之鮮重與乾重。葉片癒合組織培養於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2 MS 培養基，結果顯示其鮮重在培養後第 1 至第 10 週呈直線上升，而後鮮重增加減緩，此時已達最大乾重，且外觀部分呈現褐化現象，因此繼代時間應早於培養後 10 週為宜。高壓液相層析(high performance liquid chromatography；HPLC)分析結果顯示，柴胡皂苷a、c、d (saikosaponin a, c, d; SSa, SSc, SSd)的累積與癒合組織生長週期有密切關係，培養中期(第 4 週與第 6 週)隨著癒合組織大量增殖，三種柴胡皂苷總合含量(SSa+SSc+SSd)濃度較低，培養 8 至 10 週之細胞成熟時 SSa+SSc+SSd 累積達最大量。惟培養後期(第 12 週)細胞老化時，其 SSa+SSc+SSd 又再度下降。高氏柴胡葉片癒合組織經培養於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2 MS 培養基 8 週後，其 SSa+SSc+SSd 為 1.12 mg g^{-1} dry wt，單位產量雖然較柴胡市場品、田間高氏柴胡植株地上部與根部之含量低，但由於癒合組織具有生長週期短且週年生產不受環境影響之諸多優點，未來更可藉由調整各項因子以提高細胞生長與柴胡皂苷含量，達到產業化應用之目標。

關鍵詞：高氏柴胡、藥用植物、癒合組織、柴胡皂苷。

Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Leaf Callus Induction, Proliferation and Saikosaponin Formation of *in vitro Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang

Uei-Chern Chen[1], Fu-Shin Chueh[2], Chi-Ni Hsia[1], Mau-Shing Yeh[3] and Hsin-Sheng Tsay[4*]

[1] Agronomy Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 413, Taiwan (ROC)

* 通信作者, hstsay@mail.cyut.edu.tw

投稿日期：2004 年 9 月 16 日

接受日期：2005 年 1 月 5 日

作物、環境與生物資訊 2:39-49 (2005)

Crop, Environment & Bioinformatics 2:39-49 (2005)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan (ROC)

[2] Department of Applied Life Science, Taichung Healthcare and Management University, Wufeng, Taichung Hsien 413, Taiwan (ROC)
[3] Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung 402, Taiwan (ROC)
[4] Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung Hsien 413, Taiwan.

ABSTRACT

Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on leaf callus induction, proliferation and formation of saikosaponin along with callus culturing of *Bupleurum kaoi*, a native medicinal herb of Taiwan, have been investigated. A seventy-five percent primary callus induction rate was obtained from the explants cultured on half-strength Murashige and Skoog (MS) medium containing 4 mg L^{-1} 2,4-D for 8 weeks in darkness. Among the varied 2,4-D concentrations (0 to 0.8 mg L^{-1}) tested for callus proliferation, the highest callus weight was observed on half-strength MS medium containing lower concentration (0.1 to 0.2 mg L^{-1}) of 2,4-D and increasing of 2,4-D concentration did not further improve callus proliferation. In addition, time course of callus growth and saikosaponins content were also established. There was linearly increasing in callus fresh weight from week 1 to 10 before a slowly growth occurred from week 10 to 12. The highest biomass of callus was obtained at week 10, where callus browning started. Therefore, the period for a proper growth of callus on a proliferation medium should be no longer than 10-week-incubation. Saikosaponin a, c and d (SSa, SSc, SSd) contents of callus were analyzed at two-week intervals in a total of 12 weeks span using a high performance liquid chromatography (HPLC). The total amount of SSa, SSc, and SSd (SSa+SSc+SSd), 1.12 mg g^{-1} dry wt, was founded reaching the peak at interval from week 8 to week 10 and diminished hereafter. The contents of SSa, SSc, and SSd in various sources of plant materials including the aerial parts and roots of eighteen-month-old field-grown plants of *B. kaoi* and market crude drug (*Radix Bupleuri* - roots of *B. Chinense*), were also determined by HPLC. Although the total amount of SSa, SSc, and SSd of the cultured callus was lower than other sources of tested samples, it is thought that by modifying several important factors for callus culture of *B. kaoi* could make this system more efficient. Cell suspension culture in a long run has a great potential and advantage to produce secondary metabolites stably year round comparing with the field-growth plants for pharmaceutical utilization.

Key words: *Bupleurum kaoi*, Medicinal plant, Callus proliferation, Saikosaponin.

前言

柴胡(*Radix Bupleuri*)為傳統重要中藥之一，據載具有去腸胃中結氣、寒熱邪氣效能，更有推陳致新、久服輕身、明目益精等功能，在臺灣、日本、韓國及中國等地區都廣泛使用(Hiroaoka 1989, Kan 1985)。柴胡藥用部位為其根部，其中所含柴胡皂苷a、c、d (saikosaponin a, c, d; SSa, SSc, SSd)為具有藥理生物活性的主要物質，現代藥理學的研究證實 SSa 與 SSd 具有相當優異的保肝效果(Hiroaoka 1989, Lin and Yen 1999, Tang and Eisenbrand 1992, Yen *et al*. 1991)；此外，更發現 SSd 具有抑制肝癌細胞生長增殖的功效(Yano *et al*. 1994)。傳統中藥典籍記載之柴胡正品為北柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)，而日本藥典則以三島柴胡(*B. falcatum* L.)為標準品。近年之研究結果顯示，臺灣原生種高氏柴胡(*B. kaoi* Liu, Chao et Chuang)之保肝效果優於三島柴胡(*B. falcatum* L. var. *komarowi* Koso-Polj)與北柴胡(Lin and Yen 1999, Yen *et al*. 1991)。因此，臺灣特有之藥用植物種原-高氏柴胡，值得吾人加強研究與廣為利用。

近年來，由於自然環境逐漸遭受破壞，部分重要藥用植物種類已面臨嚴重生存威脅。植物細胞培養技術可有效於人為環境下，運用科學方法以提高其代謝物產量，對

於重要藥用成分生產具有相當的貢獻(Bourgaud *et al*. 2001, Mulabagal *et al*. 2004, Tsay 1992, 1999)。自 1983 年日本成功地利用細胞懸浮培養方式，商業化生產紫草中有效成份-shikonin，細胞懸浮培養技術即成為生產有用二次代謝物的新途徑；紅豆杉(*Taxus brevifolia*)、長春花(*Catharanthus roseus*)、丹參(*Salvia miltiorrhiza*)、山藥(*Dioscorea* sp.)、柴胡(*B. falcatum*)、紅花(*Carthamus tinctorius*)、龍葵(*Solanum nigrum*)、人參(*Panax sp.*)等重要高貴藥用植物，均有利用懸浮細胞生產二次代謝物的成功報告(Berlin 1988, Tsay 1999)。然而，如何建立及維持一個生長良好，且有效成分含量高的細胞懸浮培養系統，牽涉許多重要的因子，例如適當培植體的選擇、癒合組織之誘導、適當培養基組成之確立，乃至於篩選高產與高成分含量之細胞系以應用於工業化大量生產，這些重要因素之影響程度均必須一一探討。對於柴胡癒合組織誘導與增殖的報導並不多，如三島柴胡(Hiraoka *et al*. 1986, Noboru *et al*. 1982, Wang and Huang 1982)；而高氏柴胡相關研究資料的建立則有待加強。

本研究乃利用高氏柴胡組培苗葉片誘導癒合組織，選擇生長快速且質地優良之癒合組織建立其大量增殖系統，做為後續建立高氏柴胡細胞懸浮培養之基礎；同時配合高效液相層析法(high performance liquid chromatography；HPLC)分析 SSa, SSc 與 SSd 含量，藉以瞭解癒合組織生長與培養週期中其柴胡皂苷含量的變化，並比較不同材料間柴胡皂苷含量之差異。

材料與方法

一、供試材料、培養基配製與培養條件

利用高氏柴胡組培苗(Chen *et al*. 2004)葉片片段進行癒合組織誘導，所得葉片癒合組織經多次繼代培養(約 6 個月)於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2 Murashige and Skoog (MS; Murashige and Skoog 1962)基本培養基，選取生長均一且質地細密之癒合組織，進行增殖與柴胡皂苷含量測定之研究。培養基主要以 1/2 MS 無機鹽類與 MS 維生素，並添加 3%蔗糖及 0.9%洋菜(以下簡稱為基本培養基)。以內含 25 ml 培養基之塑膠培養皿(90mm x 15mm, α plus, Taiwan)進行癒合組織之誘導，其餘試驗則採用內含 10 ml 培養基之玻璃試管(25mm x 120 mm, Pyrex, Japan)進行試驗。上述試驗均於 25±1℃恆溫、黑暗環境下進行。

二、試驗方法

1. 2,4-D 對癒合組織誘導之影響

切取約 7×7 mm^2 大小之高氏柴胡組培苗葉片片段，接種於含有不同 2,4-D 濃度(0、0.5、1、2 及 4 mg L^{-1})之基本培養基，試驗採 4 重複，每重複接種 9 個培植體，培養 8 週後調查癒合組織誘導率與褐化率。

2. 2,4-D 對癒合組織增殖之影響

取約 0.2 g 癒合組織接種於含有 0、0.1、0.2、0.4、0.8 mg L^{-1} 2,4-D 之基本培養基，培養 8 週後調查癒合組織之鮮重，而後將癒合組織置入烘箱(Model OV-452, CHANNEL Corp., Taiwan)，以 45℃烘乾 2 天後，稱取其乾重。

3. 癒合組織生長週期與其柴胡皂苷含量

取約 0.2 g 癒合組織培養於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之基本培養基，經培養 1-12 週後調查癒合組織之鮮重與乾重，所得不同培養時期之癒合組織則進一步測定其柴胡皂苷含量。

4. 柴胡檢品之柴胡皂苷含量分析

柴胡皂苷含量測定係利用高效液相層析法，採用美商沃特斯公司相關儀器設備(Waters Controller 600 C Pump；Waters Photodiode Array Detector 996；Waters Autosampler 717plus；Waters Temperature Control Module II；Waters In-Line Degasser AF；Waters Millennium32 program)。

採用 Park *et al*. (2000)之方法，在 35℃下以氰化甲烷(acetonitrile, ACN)：水(40：60；50：50；40：60, v/v)為流動相進行梯度洗提分析(Table 1)，流速 1 ml min^{-1}，紫外線檢定波長為 203 nm。取標準品 SSa、SSc 及 SSd 各 1 mg 以甲醇(CH_3OH)溶解並定量至 1 ml，利用甲醇稀釋為標準品原液的 1/2、1/4 及 1/8 倍，連同原液共製得 4 種不同濃度的標準品溶液，並以 0.22 μm濾膜(Millipore, Japan)過濾備用。在上述的層析條件下分別注射 10 μl進行測定，每個處理重複 3 次，再以成分濃度為橫座標，鋒面積為縱座標，求得線性迴歸方程式及決定係數(coefficient of determination; R^2)。

Table 1. The period of gradient elution in saikosaponins analysis by RP-HPLC method z.

Time (min)	2	10	40	45
Acetonitrile	40	50	40	40
H_2O	60	50	60	60

z Samples were separated by C18 column with acetonitrile-water as mobile phase.

柴胡檢品包括柴胡皂苷標準品-saikosaponin a (SSa)與 saikosaponin c (SSc) (購自日本米山藥品工業株式會社)與 saikosaponin d (SSd) (購自日本和光純藥工業株式會社)；柴胡市場品-北柴胡根部；栽培於田間達 18 個月之高氏柴胡植株地上部與根部；以及培養 2、4、6、8、10 與 12 週後之癒合組織。將柴胡檢品置於 45±2℃之恆溫烘箱中乾燥後磨碎，而後以甲醇為溶劑經超音波洗淨器(Model UC-150, ENSHINE Corp., Taiwan)震盪 30 分鐘後以濾紙過濾並收集濾液，殘渣再加入等量甲醇，重複萃取三次，合併三次濾液後以真空減壓濃縮機(EYELA Model A-3S, Japan)濃縮至完全乾燥，而後再以適量甲醇將成分溶出，後以 0.22 μm濾膜過濾。各種柴胡檢品注射 10 μl檢品濾液、重複注射 3 次，依上述線性迴歸方程式推算檢品中 SSa、SSc 及 SSd 的含量。

5. 資料分析

試驗資料經 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之差異；或以 SigmaPlot 8.0 軟體(SPSS Science)繪圖表現其差異。

結果

一、2,4-D 對葉片癒合組織誘導之影響

利用高氏柴胡組培苗完全展開之葉片，切取 7x7 mm^2 之培植體培養於添加 0-4 mg L^{-1} 2,4-D 之基本培養基，結果顯示 0.5-4 mg L^{-1} 2,4-D 處理均可誘導葉片癒合組織形成(Fig. 1a, Fig. 1b)，其中以 4 mg L^{-1} 2,4-D 處理對癒合組織之誘導效果最佳，而後依序為 2、1、0.5 mg L^{-1} 2,4-D 處理，未添加 2,4-D 之基本培養基並無法誘導癒合組織形成；然而所有處理下所誘導形成之部分癒合組織有褐化的現象，其中以較高濃度 2,4-D (1-4 mg L^{-1})處理之褐化比率較高(Table 2)。在誘得的癒合組織中選擇生長快速、呈現淡黃白色且質地綿細之癒合組織，繼續培養於添加 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2

MS 培養基，可獲得質地細密且生長穩定之黃白色癒合組織(Fig. 1c)，作為後續之用。

Table 2. Influence of 2,4-D concentration on callus induction of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang [z].

2,4-D (mg L^{-1})	Percentage of callus formation [y]	Percentage of callus browning [y]
0	0 ± 0 [e]	0 ± 0 [c]
0.5	36.1 ± 5.3 [d]	2.8 ± 2.8 [b]
1	50.0 ± 3.2 [c]	16.7 ± 3.2 [a]
2	61.1 ± 3.2 [b]	13.9 ± 5.3 [a]
4	75.0 ± 2.8 [a]	16.7 ± 3.2 [a]

[z] Explants were cultured on half-strength MS medium supplemented with various concentration of 2,4-D and 3% sucrose for 8 weeks. Each treatment contained 4 replications with 9 explants in each replication.

[y] Means (Mean ± SE) within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

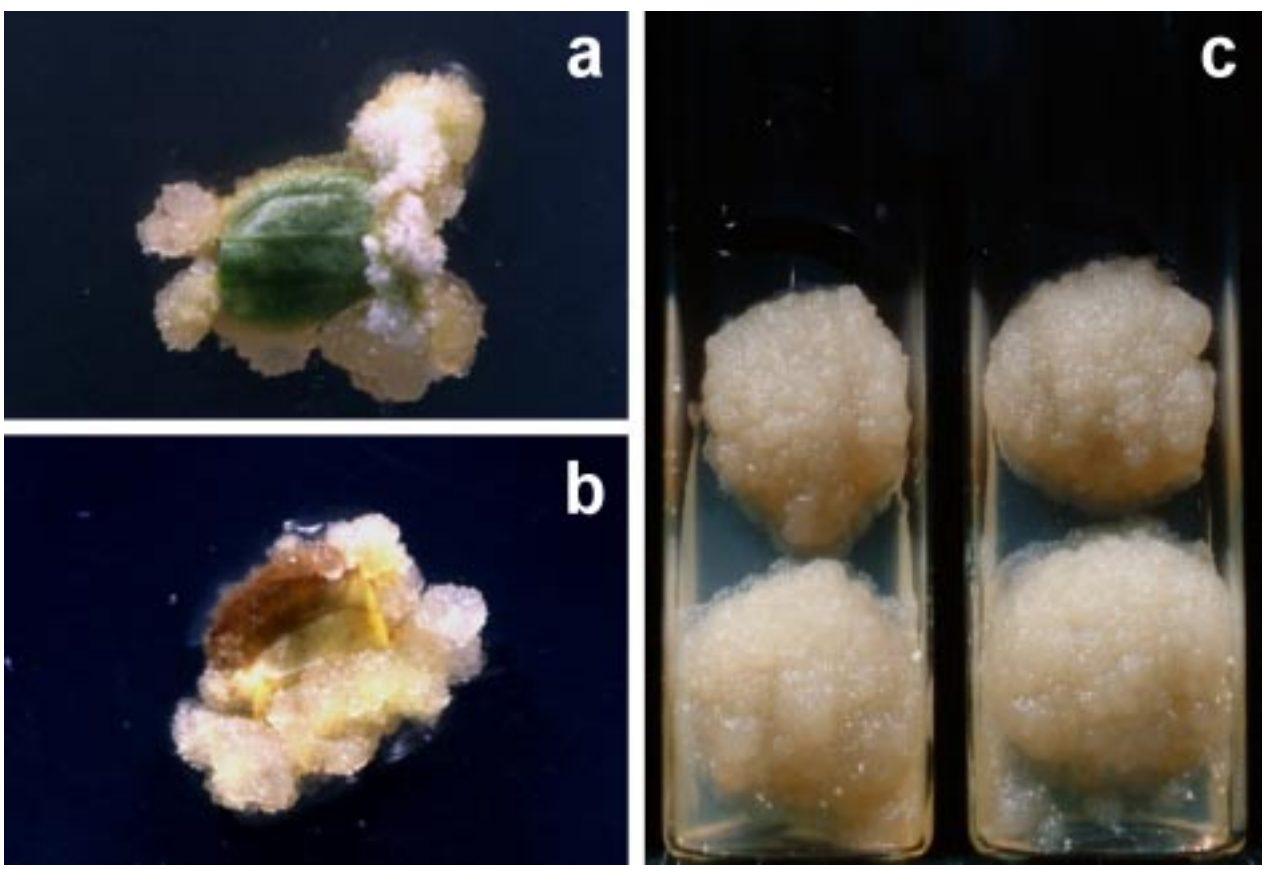


Fig. 1. Callus of *B. kaoi* derived from leaves cultured on half-strength MS medium supplemented with 0.5 mg L^{-1} (a) and 4 mg L^{-1} 2,4-D (b) for 8 weeks, and subcultured on half-strength MS medium containing 0.2 mg L^{-1} 2,4-D for 8 weeks (c).

二、2,4-D 對葉片癒合組織增殖之影響

Table 3 顯示葉片癒合組織培養於 0.1 與 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 處理下生長較佳，無論鮮重或乾重均較高，但兩處理間並無顯著差異；其餘兩個 2,4-D 處理(0.4 與 0.8 mg L^{-1})之癒合組織鮮重或乾重則較低，且兩處理間亦無顯著差異；顯示在低濃度 2,4-D (0.1-0.2 mg L^{-1})條件下，較有利於高氏柴胡癒合組織之生長與增殖。

三、柴胡檢品之柴胡皂苷含量分析

利用 1、0.5、0.25 與 0.125 mg ml^{-1} 等 4 種濃度之柴胡皂苷a、c、d (SSa、SSc 與 SSd)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 0.99 以上，且三者滯留時間(retention time; RT)分別約於 7.54、13.99 與 21.98 min，於是可利用此三個方程式分別偵測柴胡檢品之 SSa、SSc 與 SSd 含量(Table 4)。在柴胡各種檢品中以田間高氏柴胡植株根部之 SSa+SSc+SSd 含量最高，可達 35.32 mg g^{-1} dry wt，是北柴胡根部(柴胡市場品)含量的 5.9 倍。田間高氏柴胡植株地上部之 SSa+SSc+SSd 含量則約為柴胡市場品含量的 76%，而葉片癒合組織經 8 週培養後之 SSa、SSc 與 SSd 三者的含量均較低，其 SSa、SSc 與 SSd 三者總含量為 1.12 mg g^{-1} dry wt (Table 5)。

Table 3. Influence of 2,4-D concentration on callus proliferation of *Bupleurum kaoi* Liu, *Chao et Chuang* [z].

2,4-D concentration (mg L^{-1})	Fresh weight of callus (g $explant^{-1}$) [y]	Dry weight of callus (g $explant^{-1}$) [y]
0.1	1.70 ± 0.012 [a]	0.063 ± 0.002 [a]
0.2	1.73 ± 0.026 [a]	0.065 ± 0.001 [a]
0.4	1.64 ± 0.029 [b]	0.058 ± 0.001 [b]
0.8	1.63 ± 0.021 [b]	0.060 ± 0.002 [b]

[z] Forty calli (0.2g callus pre explant) were tested for each treatment and the data were collected after 8 weeks of culture. Each treatment contained 4 replications with 10 explants in each replication.
[y] Same as Table 2.

Table 4. The liner equation, coefficient of determination (R^2), and retention time of saikosaponins analysis by RP-HPLC method [z].

Saikosaponins	Liner equation	R^2	Retention time (min)
SSa	Y = 1305537 X + 112739	0.986	7.54 ± 0.16
SSc	Y = 742174 X + 186458	0.999	13.99 ± 0.17
SSd	Y = 734992 X − 22255	0.999	21.98 ± 0.30

[z] Same as Table 1.

Table 5. Saikosaponins content analysis from market product of *Radix Bupleuri* (roots of *Bupleurum chinense*) and from aerial parts, roots and leaf derived callus of *Bupleurum kaoi*.

Samples [z]	Saikosaponins content (mg g^{-1} dry wt) [y]			
	SSa	SSc	SSd	SSa + SSc + SSd
1 *B. chinense* (roots)	1.07 ± 0.03 [b]	1.67 ± 0.20 [b]	3.22 ± 1.46 [b]	5.96
2 *B. kaoi* (aerial part)	0.75 ± 0.08 [c]	0.71 ± 0.09 [c]	3.07 ± 1.45 [b]	4.53
3 *B. kaoi* (roots)	9.99 ± 0.42 [a]	7.63 ± 0.45 [a]	17.70 ± 0.71 [a]	35.32
4 *B. kaoi* (callus)	0.25 ± 0.02 [d]	0.73 ± 0.10 [c]	0.14 ± 0.01 [c]	1.12

[z] 1: Market products of *Radix Bupleuri* (roots of *B. chinense*). 2, 3: Aerial parts and roots of *Bupleurum kaoi* had grown in field for 18 months. 4: Leaf derived callus of *Bupleurum kaoi* was cultured on half-strength MS medium containing 0.2 mg L^{-1} 2,4-D for 8 weeks.
[y] Three injections (10 µl per injection) were tested per sample, and the means (Mean ± SE) within a column followed by the same letter/s are not significantly different from each other at the 5% level by LSD test.

四、癒合組織生長週期與其柴胡皂苷含量

葉片癒合組織於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之基本培養基中生長，培養後第 1 週至第 10 週之鮮重均呈現直線增加，而在培養 11 週後已有增重減緩的趨勢。若以癒合組織乾重而言，則培養後第 10 週之乾重可達到最大值(Fig. 2)，而此時已有部分癒合組織外觀呈現褐化的現象(資料未列)。此外，Fig. 3 顯示不同培養時期之癒合組織經 HPLC 分析結果，以培養後第 8 與第 10 週之柴胡皂苷含量(SSa+SSc+SSd)約為 1.1 mg g^{-1} dry wt 最高，其次為培養後第 2 週與第 12 週之癒合組織，而培養 4 至 6 週癒合組織之 SSa+SSc+SSd 最低。

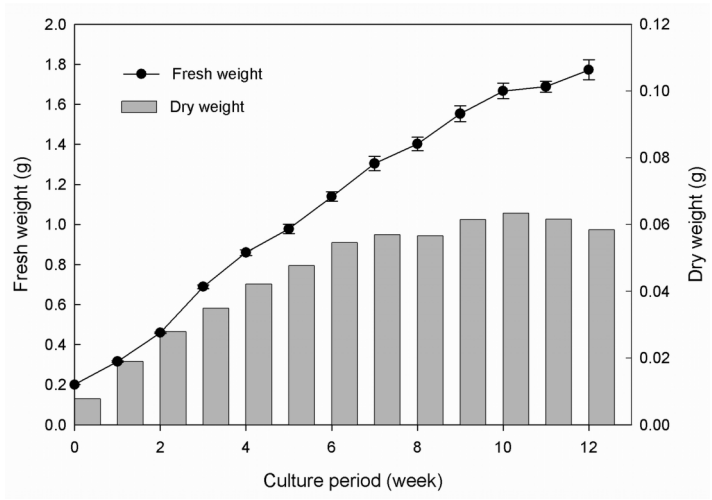


Fig. 2. Time course of growth of *Bupleurum kaoi* callus cultured on half-strength MS medium supplemented with 0.2 mg L^{-1} 2,4-D for a span of 12 weeks.

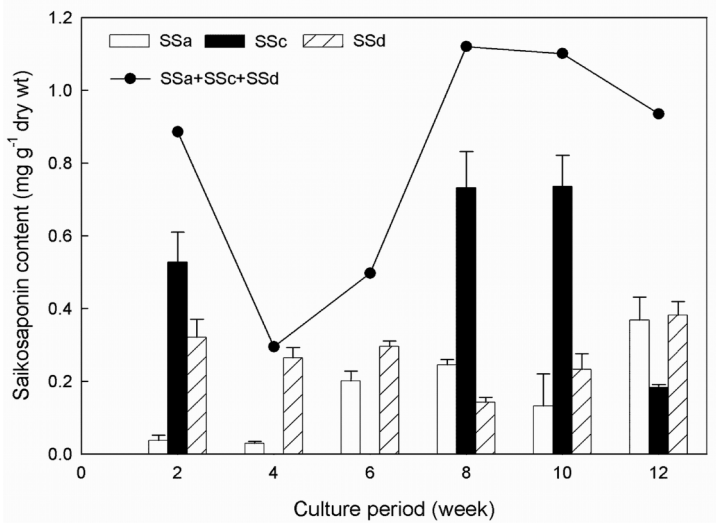


Fig. 3. Time course of saikosaponins accumulation of *Bupleurum kaoi* callus cultured on half-strength MS medium supplemented with 0.2 mg L^{-1} 2,4-D in 2-week-interval for a span of 12 weeks.

討論

優質癒合組織的形成需要選擇適當之植物生長調節劑與濃度方能成功，一般認為2,4-D 對於癒合組織誘導之能力較 NAA、IAA 或 IBA 為佳(Gaspar *et al*. 1996)。當歸(*Angelica sinensis*) (Zhang and Cheng 1988)、恆春薯蕷(*D. doryophora*) (Huang *et al*. 1993)、盾葉薯蕷(*D. zingiberensis*) (Xie *et al*. 1999)、臺灣龍膽(*Gentiana davidii* var. *formosana*) (Chueh *et al*. 2000)、長春花(Zhao *et al*. 1999)以及三島柴胡(Noboru *et al*. 1982)等研究均證實，2,4-D 對於癒合組織誘導的確具有較優異的效果。Wang *et al*. (1998)指出，利用丹參(*S. miltiorrhiza*)葉片培養於添加 2,4-D 之 MS 培養基可誘得癒合組織，而相同培養基亦可達到增殖的效果。此外，Zhang and Cheng (1988)之當歸研究指出，2,4-D 對誘導癒合組織之效果比 NAA 好，且後續應以稍低濃度的 2,4-D 進行癒合組織繼代培養較佳，利用過高濃度 2,4-D 進行癒合組織長期繼代培養，將導致癒合組織產生變異或喪失某種生合成作用。同樣地，臺灣白芷(*Angelica dahurica* var. *formosana*)研究結果亦顯示，葉柄癒合組織繼代培養時以低濃度 0.5-2 mg L^{-1} 2,4-D 較高濃度 4 mg L^{-1} 2,4-D 為佳(Chang *et al*. 1993)。本研究利用高氏柴胡組培苗葉片培養於添加 0.5-4 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2 MS 培養基，均可成功誘得癒合組織。其中以 4 mg L^{-1} 2,4-D 處理之效果最佳，而利用含有較低濃度 2,4-D (0.1-0.2 mg L^{-1})之 1/2 MS 培養基可大量增殖生長良好的癒合組織，其乾重與鮮重上均優於 0.4 與 0.8 mg L^{-1} 2,4-D 之濃度處理。

經由本研究結果得知，2,4-D 對於高氏柴胡葉片癒合組織之誘導與增殖具有良好的效果，但提高濃度至 0.4 mg L^{-1} 2,4-D 時，並不利於癒合組織的增殖，此結果與前人研究結果相類似。而後選擇生長快速、淡黃色且質地綿細之癒合組織，繼代培養於含有 0.2 mg L^{-1} 2,4-D 之 1/2 MS 培養基，結果顯示其鮮重與乾重在培養 10 週後均達到最大量，但其外觀已部分呈現褐化現象，因此高氏柴胡葉片癒合組織之繼代時間應早於培養後 10 週為宜。此外，本研究利用 HPLC 分析癒合組織生長週期與柴胡皂苷(SSa, SSc, SSd)含量之關係，結果顯示癒合組織培養 8 至 10 週後，其 SSa+SSc+SSd 含量可達約 1.1 mg g^{-1} dry wt，而早於 8 週或晚於 10 週之癒合組織 SSa+SSc+SSd 含量均較低(Fig. 3)。由於本試驗之癒合組織均使用相同培養基做為繼代培養之用，因此在繼代培養的初期(2 週)，癒合組織存在相當含量的柴胡皂苷可能源自上一週期的培養，而培養中期(4-6 週)則因癒合組織的大量增殖，導致 SSa+SSc+SSd 快速降低。至於培養後期(8-10 週)，則因癒合組織生長趨緩且開始出現褐化(老化)現象，此時細胞已累積大量柴胡皂苷，使得檢品中 SSa+SSc+SSd 因而提高(Figs. 2, 3)。上述結果顯示，高氏柴胡癒合組織之柴胡皂苷的累積與其生長週期有密切關係，在癒合組織大量增殖時雖然柴胡皂苷的累積並不明顯，至細胞成熟時累積達最大量，惟細胞老化後其 SSa+SSc+SSd 又再度下降，或產生柴胡皂苷種類的變化(Fig. 3)。藉由瞭解癒合組織生長週期與柴胡皂苷含量之關係，可做為未來建立細胞懸浮培養方式與生產二次代謝物研究之參考。

本研究測試不同柴胡檢品之柴胡皂苷含量結果顯示，柴胡市場品、高氏柴胡地上部與根部之 SSa+SSc+SSd 含量分別約為葉片癒合組織含量的 5.3、4 與 31.5 倍(Table 5)，顯示目前葉片癒合組織中 SSa+SSc+SSd

含量並不高，未來改進之道可由培植體來源加以篩選。一般而言，具有分裂能力之細胞、組織或器官均可做為組織培養之培植體，但由於植物組織或器官之不同，其癒合組織誘導與增殖效率並不相同。由於不同培植體來源癒合組織所含二次代謝物含量亦有差異，因此須嘗試以植物體不同部位而建立其細胞系，再根據有效成分含量篩選適當細胞系進行其二次代謝物生產，如此即能兼顧細胞生長與二次代謝物含量的高產。因而，選擇適當培植體，具有相當重要的影響力 (Tsay 1992, Berlin 1988, van der Heijden *et al*. 1989)。由於任一植物單細胞均具有分化全能(totipotency)的特性，若是某成分只在根部合成，是否一定要從根部細胞培養才能獲得此成分？ Tabata and Hiraoka (1976) 於黃花菸草 (*Nicotiana rustica*)研究指出，利用根、葉或種子所誘導產生的癒合組織，不論其生長或 nicotine 形成的能力皆相似。顯然，由根部所合成的二次代謝產物，葉或莖來源癒合組織也能產生，丹參(Wu *et al*. 2003)、恆春薯蕷(Huang *et al*. 1993)、三島柴胡(Hiraoka 1989)與臺灣白芷(Chang *et al*. 1993)之研究均得到相類似的結果。然而，不同培植體來源癒合組織之 nicotine 含量與原植株來源有著顯著的相關性，若培植體來自有效成分含量高的植株，則可較易獲得高產能細胞系 (Kinnersley and Dougall 1980)。前人研究指出，高氏柴胡除根部具有高柴胡皂苷含量外，其地上部 SSa+SSc+SSd 約為根部的 5%，而三島柴胡地上部則未能測得柴胡皂苷(Lin and Yen 1999)。因此，高氏柴胡可能具有獲致高產細胞系的優異潛能。本研究檢測田間種植 18 個月後之高氏柴胡根部與地上部的 SSa、SSc 與 SSd 三者總含量，分別為柴胡市場品-北柴胡根部 SSa+SSc+SSd 含量的 593%與 76%，顯示高氏柴胡極具發展與推廣之潛力。由於柴胡市場品購自中藥行後即貯存於 4℃冰箱備用，其購回前之貯存狀態或採收時間並無從得知；而高氏柴胡係屬於鮮採並烘乾後貯存於相同條件下，因此兩者於柴胡皂苷含量上的差異原因為何，仍有待進一步探討。此外，利用高氏柴胡組培苗葉片誘得癒合組織，大量增殖後經 HPLC 分析結果顯示，葉片來源癒合組織雖僅經過 8 週的培養，其 SSa+SSc+SSd 含量可達柴胡市場品含量的 18.8%。癒合組織之 SSa+SSc+SSd 單位含量雖較低，但若以一年可收穫 6 次計算，則 SSa、SSc 與 SSd 三者總單位含量反較市場品為高，顯示利用癒合組織生產二次代謝物之可行性。現階段柴胡皂苷含量雖較低，未來可經由調整培養條件與選擇高產細胞系，加上其不受環境因子影響且可週年生產之優點，應有助於利用細胞懸浮培養生產柴胡重要二次代謝物-柴胡皂苷之實用性。

誌謝

本文係行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2196 號，承國科會經費補助(計畫編號：NSC 92-2317-B037-001)，試驗材料承農試所農藝組特作研究室劉新裕博士提供，特此誌謝。

引用文獻

Berlin J (1988) Formation of secondary metabolites in cultured plant cell and its impact on pharmacy. p. 39-47. *In*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. YPS Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin.

Bourgaud F, A Gravot, S Milesi, E Gontier (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.** 161: 839-851.

Chang WD, CC Chen, YS Chang, HS Tsay (1993) Studies on tissue culture of *Angelica dahurica*

var. *formosana* I. Callus induction and medium evaluation. (in Chinese) **J. Agric. Res. China** 42: 253-264.

Chen UC, MS Yeh, HS Tsay (2004) Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal herbs - *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang by axillary bud culture. (in Chinese) **J. Agric. Res. China** 53: 27-38.

Chueh FS, CC Chen, AP Sagare, HS Tsay (2000) Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. **Planta Med.** 66: 1-4.

Gaspar T, C Kevers, C Penel, H Greppin, DM Reid, TA Thorpe (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. ***In Vitro* Cell. Dev. Biol.** 32: 272-289.

Hiraoka N (1989) *Bulpeurum falcatum* L. embryogenesis and the production of saikosapins. p. 69-81. *In*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 7. YPS Bajaj (ed.) Springer-Verlag, Berlin.

Hiraoka N, T Kodama, Y Tomita (1986) Selection of *Bupleurum falcatum* callus line produce anthocyanins in darkness. **J. Nat. Prod.** 49: 470-474.

Huang WW, CC Chen, FT Yeh, HS Tsay (1993) Tissue culture of *Dioscoraea doryophora* Hance I. Callus induction from different source organs and the measurement of diosgenin content. (in Chinese) **China Medical College J.** 2: 151-160.

Kan WS (1985) *Bupleurum falcatum* L., *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. (in Chinese) p. 650-651. *In*: Manual of medicinal plants in Taiwan. National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei, Taiwan.

Kinnersleg AM, DK Dougall (1980) Correlation between the nicotine content of tabacco plants and callus. **Planta** 149: 205-206.

Lin CC and MH Yen (1999) Development of crude drug resources and evaluation of *Bupleurum kaol*. (in Chinese) p. 51-55. *In*: Proceedings of the Symposium on Development and Utilization of Medicinal Plants. CY Lin, HS Lu, SY Liu, CC Chen, CG Chang (eds.) Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan.

Mulabagal V, CY Lee, SF Lo, SM Nalawade, CY Lin, HS Tsay (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 45:1-22.

Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 437-497.

Noboru H, T Kodamaand, Y Tomita (1982) *In vitro* propagation of *Bupleurum falcatum*. **Shoyakugaku Zasshi** 37:62-67.

Park IS, EM Kang, N Kim (2000) High performance liquid chromatographic analysis of saponin compounds in *Bupleurum falcatum*. **J. Chromatogr. Sci.** 38: 229-233.

SAS Institute Inc. (2001) SAS/STAT User's Guide. Version 8.2, vol 2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 943 pp.

Tabata M, N Hiraoka (1976) Variation of nicotine production in *Nicotiana rustica* callus cultures. **Physiol. Plant.** 38: 19-23.

Tang W, G Eisenbrand (1992) *Bupleurum* spp.. p. 223-232. *In*: Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Springer-Verlag, Berlin.

Tsay HS (1992) Plant tissue culture studies and application on important agronomy crops. (in Chinese) **J Agric. Assoc. China** (new series) 158:1-18.

Tsay HS (1999) Plant tissue culture studies on medicinal plants. p. 113-124. (in Chinese) *In*: Proceedings of the Symposium on Development and Utilization of Medicinal Plants. CY Lin, HS Lu, SY Liu, CC Chen, CG Chang (eds.) Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan.

van der Heijden R, R Verpoorte, HJG Hoopen (1989) Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: a literature survey. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 18: 231-280.

Wang KC, QY Luo, HX Cheng (1998) Study on production of allochtonic formations in callus

cells of *Salvia miltiorrhiza* Bge. (in Chinese) **China J. Chinese Materia Medica** 23: 592-594.

Wang PJ, CI Huang (1982) Production of saikosaponins by callus and redifferentiated organs of *Bupleurum falactum* L. p. 71-72. *In*: Plant Tissue Culture. A Fujiwara (ed.) Maruzen, Tokyo.

Wu CT, V Mulabagal, SM Nalawade, CL Chen, TF Yang, HS Tsay (2003) Isolation and quantitative analysis of cryptotanshinone, an active quinoid diterpene formed in callus of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Biol. Pharm. Bull.** 26: 845-848.

Xie BI, Y He, ZJ Yi (1999) Tissue culture and screening of high production clone line of *Dioscorea zingibernisis* (in Chinese) **J. Central South Forestry University** 19: 17-21.

Yano H, A Mizoguchi, K Fukuda, M Haramaki, S Momosaki, M Kojiro (1994) The herbal medicine she-saiki-to inhibits proliferation of cancer cell line by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. **Cancer Res.** 54: 448-454.

Yen MH, CC Lin, CH Chuang, SY 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. Ethnopharmacol.** 34: 155-165.

Zhang S, KC Cheng (1988) *Angelica sinensis* (Oliv) Diels.: *In vitro* culture, regeneration and the production of medicinal compounds. p.1-22. *In*: Biotechnology in Agriculture and Forestry 7. Medicinal and Aromatic Plants. YPS Bajaj (ed.) Springer-Verlag. Berlin.

Zhao J, W Wang, W Zhu (1999) Regulation of indole alkaloids synthesisand related enzymes during callus initiationand culture of madagascar periwinkle leaves (*Catharanthus roseus*) (in Chinese) **Chinese Tradit. Herbal Drugs** 30: 533-537.

－編輯：楊純明