中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）42(3)：253～264（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[1]

張文德　陳忠川　張永勳　蔡新聲[2]

摘要：利用組織培養技術生產吾人所需之二次代謝產物，最近受到世界各國研究人員的重視。植物細胞不但生長迅速，二次代謝產物粹取容易，而且有些植物細胞培養所得二次代謝產物之量，更高於原植物體，所以組織及細胞懸浮培養技術，目前已成爲製藥工業重要之製藥技術。本研究以臺灣白芷進行癒合組織的誘導及建立細胞懸浮培養，並從培養細胞中抽取有效成分 imperatorin，期能經由本研究的探討，爲臺灣製藥工程界開發出生產 imperatorin 之新方法，進而推廣到其他重要藥材有效成分之大量生產，以利於臺灣省產藥材之開發應用。結果發現將臺灣白芷幼嫩之葉柄，經消毒後接種於含有1mg/l 2,4-D、0.5mg/l kinetin、3％蔗糖及 0.9% agar，pH＝5.7 之 MS 基本鹽類固體培養基中，進行暗培養30天後，可由葉柄邊緣長出質地鬆軟，白色微黃之癒合組織；繼代培養則以稍低濃度的2,4-D（0.25～0.5mg/l）配合0.5 mg/l kinetin、3％蔗醣及 1.2% agar 之 MS 基本鹽類固體培養基較佳。將癒合組織切碎後投入上述繼代培養的液體培養基中，於 100 rpm 轉速，光照約 200 lux 的條件下培養，可建立一分散狀況良好的懸浮培養細胞。Imperatorin 成份測定結果顯示，市場品杭白芷根最高，野生品臺灣白芷之根次之，而以野生品臺灣白芷之莖葉、癒合組織及懸浮細胞的含量最少，顯示白芷不同部位之器官 imperatorin 之含量差異極大。

關鍵詞：白芷、癒合組織、懸浮細胞、二次代謝產物。

白芷（*Angelica dahurica*（FISCHER）BENTHAM et. HOOKER）最早收載於本經中品，爾後歷代諸家本草皆有著錄，並延用至今之重要藥材。本經云：白芷能治女人漏下赤白，血閉陰腫、寒熱、頭風侵目淚出，長肌膚，潤澤顏色，可作面脂，爲治風要藥，對頭痛有卓效。據近代藥理學之研究，白芷可用於流行性感冒及產前產後之頭痛、眩暈、齒痛、顏面神經痛，並有止血作用，對便血、鼻衄亦有效，爲分娩時陣縮催進劑，亦有抗菌作用[1,2,6]。近年來白芷更應用於銀屑病的治療，效果良好[4]；而白芷的主要成分 imperatorin 則是被認爲主要的有效成分之一[3]。

臺灣白芷（*Angelica dahurica*（FISCHER）BENTHAM et. HOOKER var. formosana（BOISSIER）YEN）係臺灣地區自生種，爲繖形科（Umbelliferae）之多年生草本植物。據文獻顯示，臺灣白芷爲白芷市場品之一〝杭白芷〞的基原植物[2]。惟因產量不豐，並未應用於市場的供需。

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1675 號。

2. 中國醫藥學院中國藥學研究所研究生、副教授、副教授（臺中市學士路）及本所農藝系研究員。臺灣省　臺中縣霧峰鄉。

自從1983年日本成功地利用組織培養的方式，大量生產紫草中之有效成分，並應用於商業上的生產，植物細胞懸浮培養就成爲生產吾人所需二次代謝產物的新途徑[5]。懸浮細胞因生長快速，中藥成分抽取容易，而且有些二次代謝物之產量不亞於原植物之含量，所以利用它來大規模生產中藥植物之藥用成分，極爲有利。如何建立一個生長良好，且中藥成份含量高的細胞懸浮培養，是學者們所要探討的目標，因此從癒合組織的誘導，細胞懸浮培養的建立，乃至細胞系（cell line）的篩選到大量工業化生產，有很多重要因素是必須考慮的。本研究將針對臺灣白芷以懸浮細胞生產 imperatorin 之過程做一系列之探討；本文係有關癒合組織的誘導及培養基成份探討之結果。期能經由本研究的探討，爲臺灣製藥工業界開發出生產 imperatorin 之新方法，進而推廣到其他重要藥材有效成分之大量生產，以利於臺灣省產藥材之開發應用。

材料與方法

一、材　料

本研究使用之材料採自臺北陽明山國家公園，大屯山登山步道旁之野生臺灣白芷（*Angelica dahurica* (FISCH) BENTH et. HOOK var. *formosana* (BOISS.) YEN.。

二、方　法

㈠培養基的配製

1. 固體培養基：本研究主要以 MS 無機監類爲基本配方[15]，添加各類植物生長調節劑如 NAA、2,4-D、BA、kinetin 及 zeatin 等，及各類添加物如 casein hydrolysate (CH) 及椰子汁等。培養基於加入 agar 前，先用 1N NaOH 及 HCl 將 pH 值調至5.7±0.1，然後以 121°C，15 lb/in^2 (1.05kg/cm^2) 之壓力殺菌15分鐘後，擺成斜面放冷備用。
2. 液體培養基：配製步驟同固體培養基，惟 pH＝5.2±0.1，且不添加 agar。

㈡培養環境

接種後將材料置於25±1°C之恆溫，照光（固體培養約2,000 lux，液體培養約200 lux）或不照光進行培養。另液體培養則將材料置於迴轉式振盪器上以100 rpm 之速度振盪培養。

㈢臺灣白芷癒合組織之誘導

將採回之白芷植株，先以 Extran (Merck) 中性洗液洗滌，並以清水沖洗乾淨。用刀片切取較幼嫩之葉柄部份，以70%酒精消毒2分鐘，再以2%次氯酸鈉溶液〔每50ml 加 Tween 20一滴〕，於超音波振盪殺菌15分鐘，移至無菌接種箱中，以無菌水清洗三次後，以刀片切除傷面，再切成約2mm 寬的大小，接種於含有植物生長調節劑 1mg/l 2,4-D, 0.5 mg／l kinetin、3%蔗糖、0.9%agar及pH＝5.7之 MS 固體培養基中，進行暗培養以誘導癒合組織。

三、臺灣白芷之化學成份測定

㈠材料

1. 市場售杭白芷乾燥藥材：得自中國醫藥學院附設醫院中藥局。
2. 野生品臺灣白芷：採自臺北陽明山國家公園大屯山登山步道旁，乾燥後備用。
3. 成份標準品：

A. Imperatorin：購自 ROTH® 公司。

B. Byak-angelicin：由中國四川省成都科學生育計畫研究所周繼銘教授提供。

4. 細胞懸浮培養之白芷檢品：將培養後之懸浮細胞，過濾除去培養液，經冷凍乾燥後稱重備用。

㈡儀器

薄層層析 (TLC) 板，kieselgel 60 F254 (Merck)。

Shimadzu UV-160 A, 紫外—可見光分光光度計。

Shimadzu 高效液相層析儀（HPLC），包括 LC-6A 型泵浦，SPD-6A 型可變波長檢測器，C-R6A 型積分儀。

Merak 逆相（reverse phase）層析柱 Rp-18（LichroCART 125-4, 125 x 4 mmI.D.），加上一預柱（pre-column）防止雜質堵塞。

㈢方法

1. 檢品的製備

將乾燥稱重過的市場藥材或培養品研成碎粉，以適量甲醇（methanol）爲溶媒，經超音波震盪十分鐘，過濾收集濾液。如此重覆三次，將濾液合併，以眞空減壓濃縮機濃縮，並用2 ml 甲醇將成份溶出。

2. 薄層層析法

在 TLC 薄板上分別點檢品及標準品溶液，以展開劑（ethylacetate：n-hexane＝1：1）展開，在紫外光下觀察螢光斑點。

3. 高效液相層析法（HPLC）

⑴分析條件的選擇

取 imperatorin 標準品甲醇液，於紫外—可見光分光光度計上掃描，得知 imperatorin 的最大吸收波長爲248nm.,以此爲檢測波長。

在 Rp-18柱上，以不同比例的甲醇—水，甲醇—水—乙酸乙酯作流動相比較分離效果，結果以甲醇—水（55：45）分離效果最好。所以以甲醇—水（55：45）爲流動相並先減壓抽氣過濾脫氣。柱溫爲室溫，流速爲 1 ml/min，檢測波長248nm。

⑵標準曲線的繪製

精確稱取標準品 imperatorin 10mg，用甲醇溶解，定容至100ml，分別取此溶液0,0.5,1.0,1.5,2.0ml，均用甲醇定容至10ml，製得5個不同濃度的標準溶液。在上述的分析件下，分別注射20ul。以峰面積爲縱坐標，各成分濃度爲橫座標，得一通過原點的檢量直線，並求出其迴歸方程式。

⑶加樣回收率試驗

取培養之乾燥材料二份，其中一份加入定量的成份標準品，用上述檢品製備的方法製成檢品，然後測定其成份含量並計算其回收率。

⑷檢品測定

將各個不同的白芷檢品，按照上述檢品製備方法和層析條件，注射 20ul 進行分析，用外標準法計算 imperatorin 的含量。

結　果

一、臺灣白芷癒合組織的誘導及繼代培養

將臺灣白芷幼嫩之葉柄，經消毒後，接種於含有 1mg/ l 2,4-D、0.5mg/l kinetin、3 %蔗糖及0.9%agar，pH＝5.7之 MS 固體培養基中，進行暗培養30天後，由葉柄邊緣長出質地鬆軟，色白微黃之癒合組織，繼代培養之後，做爲下列試驗的材料。

㈠Auxin 類植物生長調節劑對臺灣白芷癒合組織生長之影響

將所誘導的臺灣白芷癒合組織以100mg 之大小，繼代培養在表1所列含不同濃度2,4-D 及 NAA 植物生長調節劑之培養基中，30天之後，發現癒合組織在0.25～2mg/l 2,4-D 之間生長良好，鮮重可達原來的7倍之多，乾重亦最大，且癒合組織質地鬆軟，色白微黃稍透明；但濃度提高到 4 mg/l 時，則有明顯抑制生長現象。而 NAA 濃度則要高至 4～8 mg/l 才有較佳的生長

，但癒合組織之質地及乾重，明顯不及2,4-D 的培養基效果好（表1）。

表1. Auxin 類植物生長調節劑對臺灣白芷癒合組織生長之影響*

Table 1. Influence of auxins on callus growth of *A. dahurica* var. *formosana*

Basal medium with 2,4-D -mg/l-	Basal medium with NAA -mg/l-	Fresh weight of callus** -mg/l-	Dry weight of callus** -mg/l-
0	0	506.8 b***	29.5 b***
0.25	0	779.0 a	46.7 a
0.5	0	660.1 a	43.7 a
1	0	762.2 a	43.5 a
2	0	721.8 a	43.0 a
4	0	249.8 d	19.5 d
0	0.5	231.1 d	18.9 d
0	1	391.6 c	23.9 c
0	2	366.1 c	22.9 c
0	4	662.8 a	35.0 a
0	8	720.6 a	36.0 a

*：Basal medium was MS with 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7.
**：Data collected from 100 mg callus was cultured for 30 days. Each data represents 30 replications.
***：Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level using MRT (Duncan's multiple range test).

㈡Cytokinin 類植物生長調節劑對臺灣白芷癒合組織之影響

表2顯示繼代培養基中添加不同種類的 cytokinin，比不添加者，癒合組織生長較爲良好。雖不同類的 cytokinins 間統計上並無顯著的差異，但數據上仍顯示 kinetin 及 BA 稍優於 zeatin。

表2. Cytokinin 類植物生長調節劑對臺灣白芷癒合組織生長之影響*

Table 2. Influence of cytokinin on callus growth of *A. dahurica* var. *formosana*

Basal medium with Kinetin -mg/l-	Basal medium with BA -mg/l-	Basal medium with Zeatin -mg/l-	Fresh weight of callus** -mg/l-	Dry weight of callus** -mg/l-
0	0	0	333.0 b***	32.5 b***
0.5	0	0	819.5 a	51.9 a
0	0.5	0	815.2 a	51.8 a
0	0	0.5	775.1 a	47.8 a

*：Basal medium was MS with 1mg/l 2,4-D, 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7.
,*：Same as Table 1.

㈢水解酪蛋白的添加對臺灣白芷癒合組織生長之影響

表3顯示不同濃度的水解酪蛋白，對臺灣白芷癒合組織生長並無幫助。

表3. 水解酪蛋白對臺灣白芷癒合組織生長之影響*

Table 3. Influence of casein hydrolysate on callus growth of *A. dahurica* var. *formosana*

Casein hydrolysate -mg/l-	Fresh weight of callus** -mg/l-	Dry weight of callus** -mg/l-
0	832.2 a***	44.8 a***
250	825.1 a	42.9 a
500	713.2 a	39.4 a
750	763.4 a	43.2 a
1,000	785.0 a	44.7 a

*: Basal medium was MS with 1mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7.
,*: Same as Table 1.

㈣椰子汁（CM）的添加對臺灣白芷癒合組織生長之影響

表4顯示10%CM 對臺灣白芷癒合組織之鮮重與乾重無明顯助益。

表4. 椰子汁對臺灣白芷癒合組織生長之影響*

Table 4. Influence of coconut milk on callus growth of *A. dahurica* var. *formosana*

Coconut milk -%-	Fresh weight of callus** -mg/l-	Dry weight of callus** -mg/l-
0	658.8 a***	46.3 a***
10	684.4 a	46.5 a

*: Basal medium was MS with 1mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7.
,*: Same as Table 1.

㈤Agar 濃度對臺灣白芷癒合組織生長之影響

將臺灣白芷癒合組織接種於含有不同濃度之 agar，形成軟硬度不同培養界面的培養基中，30天後，發現0.6% agar 的培養基，由於培養基含水量較多，使得癒合組織呈水浸狀，且乾重只有1.2% agar 癒合組織的一半。1.2% agar 的癒合組織其鮮重可達1,168mg，比一般用量0.9% agar 的鮮重超出甚多。但 agar 濃度提高到1.5%時，癒合組織之生長又呈抑制之現象（表5）。

表5. 不同的洋菜濃度對臺灣白芷癒合組織生長之影響*

Table 5. Influence of agar concentration on callus growth of *A. dahurica* var. *formosana*

Agar -%-	Fresh weight of callus** -mg/l-	Dry weight of callus** -mg/l-
0.6	658.3 c***	31.7 c***
0.9	860.9 b	47.4 b
1.2	1,168.6 a	61.7 a
1.5	754.9 c	29.4 c

*: Basal medium was MS with 1mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and 0.9% agar, pH=5.7.
,*: Same as Table 1.

二、臺灣白芷細胞懸浮培養之建立

臺灣白芷的癒合組織，以含有 1mg/l 2,4-D及0.5 mg/l kinetin之MS 基本鹽類爲繼代培養基，經幾代培養之後，長出的癒合組織仍然質地鬆軟，色白微黃。取0.5g 經繼代培養之癒合組織，切碎後培養在含有20ml 培養基的的125ml 三角瓶中，在25±1°C恆溫，以100rpm 轉速進行水平迴轉式振盪培養，每7天更換培養液一次，其方法爲抽出15ml 懸浮液，換入等量新鮮的培養基，約一個月後可形成一分散狀況良好的懸浮培養細胞（圖1）。

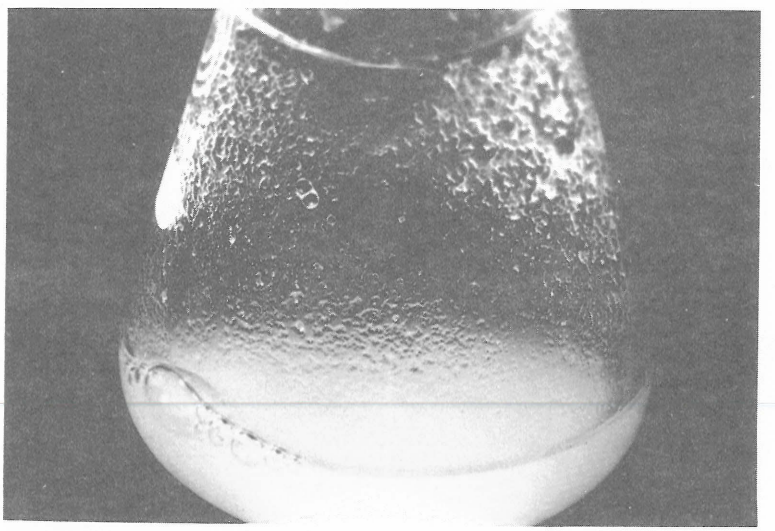


圖1. 臺灣白芷之細胞懸浮培養

Fig. 1. The cell suspension of *A. dahurica* var. *formosana*.

三、市場品杭白芷、臺灣白芷野生品與組織培養品化學成份之比較

㈠薄層層析法

將市場品杭白芷、臺灣白芷野生品及其所誘導之癒合組織和懸浮培養之細胞，經前述之檢品製備方法處理，製成檢品。利用薄層層析法（TLC），與標準品作定性比較。經展開劑（ethylacetate：n-hexane=1：1）展開後，在紫外光下觀察螢光斑點，如圖2。

Imperatorin 之 Rf 值（ratio of front）爲0.68；byak-angelicin 之 Rf 值爲0.20。從 TLC 板的螢光斑點觀之，無論是市場品的杭白芷，野生品臺灣白芷之根和莖葉，及組織培養檢品，皆含有這兩個成份。

㈡高效液相層析法

在 RP-18的層析柱上，以甲醇—水〔55：45〕爲移動相，對白芷檢品中 imperatorin 的分離情況進行試驗，用保留時間（retention time）和加入標準品方法確認，得到一分離效良好的圖譜，結果如圖3。

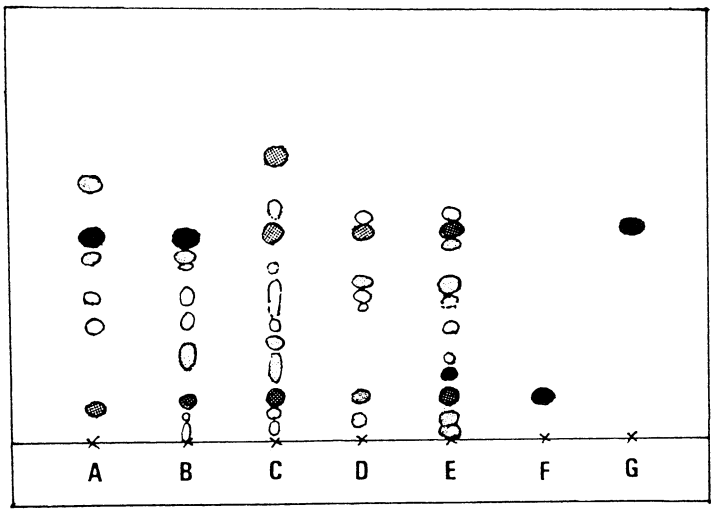


圖2. 不同來源之白芷與標準品之薄層層析譜
A. 市場品 B. 臺灣白芷野生根 C. 臺灣白芷野生葉
D. 臺灣白芷癒合組織 E. 臺灣白芷懸浮細胞
F. byak-angelicin G. imperatorin
Fig. 2. TLC of various source of *A. dahurica* and standard.

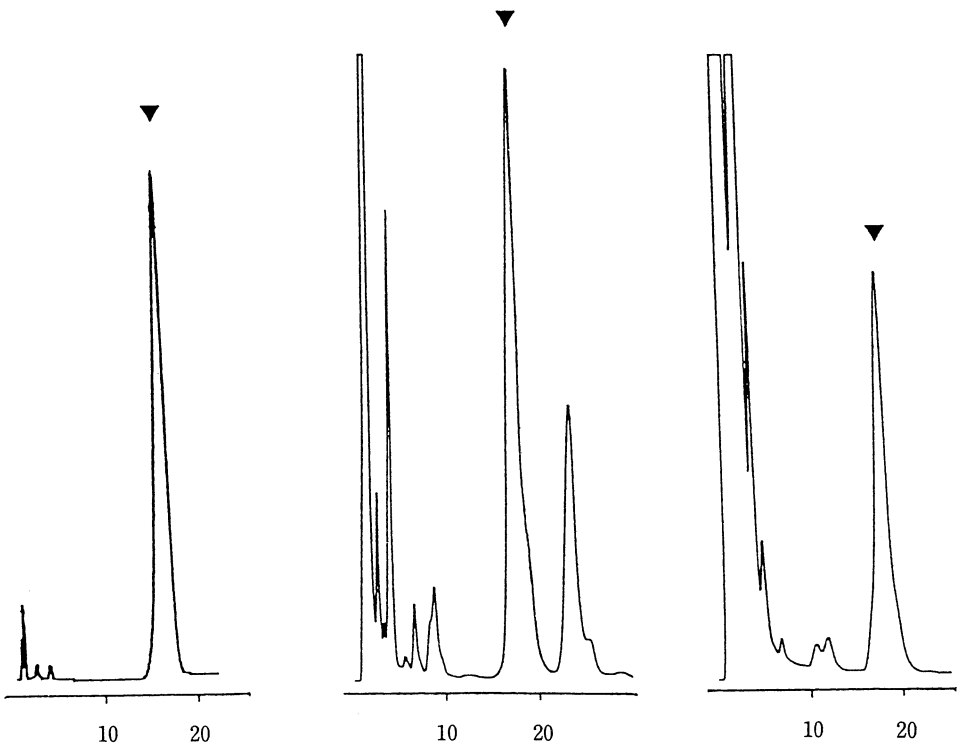


圖3. 白芷 imperatorin 的高效液相層析譜
Fig. 3. HPLC of imperatorin formed by *Angelica dahurica* var. *formosana* cell suspension culture. Retention time : 18 min.

1. 標準曲線的繪製

精確配製5個不同濃度的 imperatorin 標準品溶液，利用 HPLC 所得的波峰面積（peak area）爲縱座標，成分濃度爲橫座標，繪製一通過原點的迴歸檢量直線（圖4），其迴歸方程式如下：

Imperatorin　　y＝4168607x－20785.5　　r＝0.998295

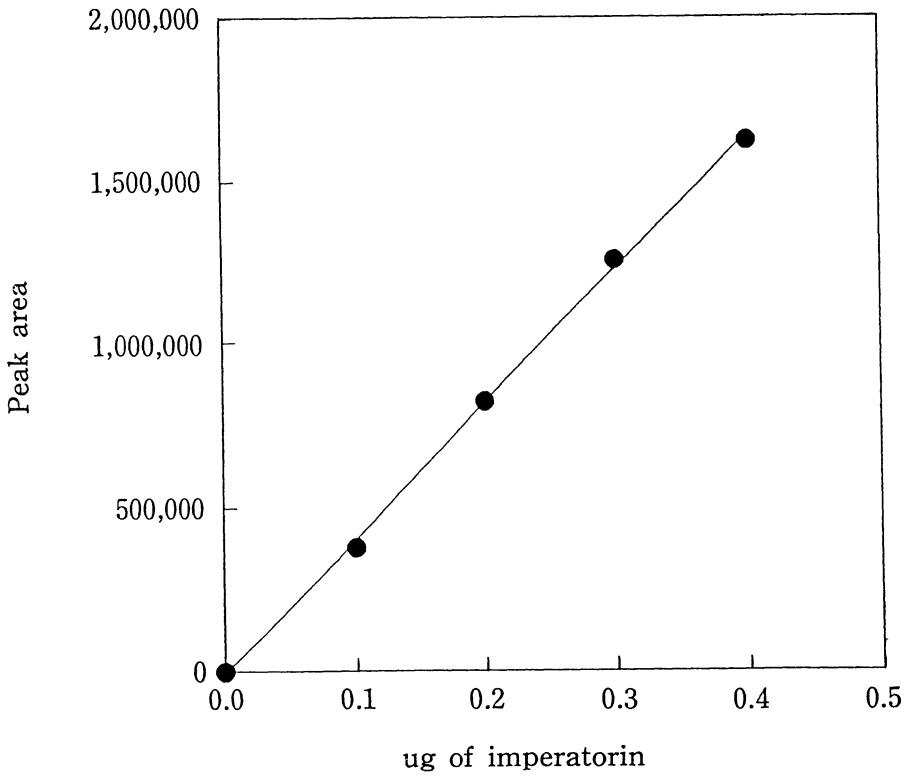


圖4. Imperatorin 之迴歸檢量線

Fig 4. The regressive curve of imperatorin

利用此一迴歸方程式，以波峰面積求出 imperatorin 的含量。以下的試驗即根據此方程式，作定量方面的試驗。

2. 加樣回收率試驗

精密稱取培養之乾燥材料二份，其中一份加入定量的 imperatorin 標準品，利用前述的方法製成檢品，以同樣的分析條件測定，計算含量並求出回收率。得知加樣回收率爲99.8%。

3. 檢品中 imperatorin 的含量測定

將不同的市場品杭白芷、野生品臺灣白芷、培養出的癒合組織及懸浮細胞，經乾燥製成檢品，分別注射20μl 於高效液相層析儀，得到波峰底下面積之值帶入迴歸公式，分別求出其 imperatorin 的含量如表6顯示，imperatorin 的含量以市場品杭白芷最高達667μg/g.d.w，野生品臺灣白芷之根次之，而以野生品臺灣白芷之莖葉、癒合組織及懸浮細胞的含量最少，顯示白芷不同部位之器官，imperatorin 之含量差量極大。

表6. 不同來源白芷 imperatorin 之含量

Table 6. The content of inperatorin from various *A. dahurica*

Sample	imperatorin -μg/g.d.w.-
市場品杭白芷	667.32*
野生品臺灣白芷 根	234.75
莖葉	11.75
臺灣白芷癒合組織	7.61
臺灣白芷懸浮細胞	8.24

* Mean values of at least 3 replicate determination.

討 論

一、臺灣白芷癒合組織培養

1982年 Gu 以當歸 (*Angelica sinensis* Diels.) 的葉柄，接種於含有2,4-D 的 MS 培養基上，成功地誘導出癒合組織[10]；1988年 Zhang and Cheng也利用當歸不同部位的培殖體，接種於含有不同 auxin 類植物生長調節劑之培養基以誘導癒合組織，結果發現2,4-D 的效果比 NAA 好[21]。而同爲繖形科的柴胡 (*Bupleurum falcatum* L.) ，也可利用葉、莖或種子接種於 LS+2,4-D 的培養基誘導癒合組織。雖然2,4-D 可用 NAA 代替，但其濃度必須較高些 (10^{-7} -10^{-5} M 2,4-D ，$10^{-6}-10^{-5}$ M NAA) [17,20]。Zhang and Cheng 在當歸癒合組織的誘導中也指出，以 cytokinin 搭配 auxin，其效果比單用 auxin 的結果更令人滿意[21] 。繖形科的防風 (*Saposhnikovia divari-cate*) 癒合組織的誘導也有同樣的結果，這與早期學者所建議的理論相同[16]。本試驗以臺灣白芷的葉柄作培殖體，培養在 MS 加1mg/l 2,4-D 及 0.5mg/l kinetin 的培養基中，可成功地誘導出癒合組織，且質地鬆軟透明，色白微黃。將癒合組織培養於含有不同濃度2,4-D 及 NAA 的繼代培養基上，也發現較低濃度的2,4-D (0.5～2mg/l) 比較高濃度 NAA (4～8mg/l) 對癒合組織生長有利 (表1) 。而過高濃度的2,4-D (4mg/l) 對癒合組織有毒害作用，所以長得較差且易褐化。Zhang and Cheng 在當歸癒合組織繼代培養中也曾指出，應以較高濃度的 auxin 來誘導癒合組織，而以稍低的 auxin 濃度繼代培養，或進行其後的分化處理[21]。通常過高濃度的2,4-D，長期繼代培養癒合組織，容易使癒合組織產生變異或喪失某種生合成作用[7]。本研究結果顯示，0.5～2mg／l 2,4-D 對癒合組織的繼代培養效果極爲接近，所以繼代培養之繁殖培養基，以較低濃度的2,4-D (0.5mg/l) 爲宜。如前所述，auxin 類植物生長調節劑配合 cytokinin，對癒合組織的誘導有很大的助益。雖然不同的 cytokinin 其效果不一，但本研究卻發現對癒合組織的生長效果頗爲一致 (表2) 。

水解酪蛋白與椰子汁是最常被加入培養基中，以促進癒合組織生長的二種有機物質。Gray and Conger 報導有機氮源水解酪蛋白的主要成份爲18種胺基酸[9]；椰子汁爲椰子種子之胚乳，養分豐富且複雜。兩者皆可促進靜止細胞之有絲分裂，但非絕對必要[16]。本研究顯示，添加水解酪蛋白和椰子汁無益於臺灣白芷癒合組織的生長 (表3，表4) 。

固體培養基最常使用的支持固定劑是洋菜 (agar) ，它含有多種成份不明但具有生理活性的物質，故添加量的多寡常影響試驗結果。臺灣白芷癒合組織培養在0.9～1.2%agar 濃度的培養基中，生長情況良好，尤以1.2%agar 最佳 (表5) ；而0.6%和1.5%生長情形較差，這可能與培養基間之滲透壓高低有關。

具有分裂能力之植物組織或器官，皆可作爲組織培養之材料；例如種子、根莖、莖頂、頂芽、葉

、腋芽、梗節、葉柄、下胚軸、花藥、子房、塊莖、鱗片及柱頭等植物器官，皆可做爲大量繁殖及誘導癒合組織的材料。但如果某種成分只是在根部合成，是否一定要從根部細胞開始培養？答案是否定的，因爲植物細胞具有分化全能性，可經由不同的分化過程長成一完整植物，也就是說由根衍生之癒合組胞所合成的產物，葉或莖的癒合組織一樣可以做到[7]。例如 *Nicotiana rustica* 由根、葉、種子所誘導的癒合組織，不論其生長或生成 nicotine 的能力皆相似[19]。一般而言，二次代謝產物得自不同層次分化的植物組織，分化（differentiation）對此代謝產物有重要的決定性，因分化能使酵素作空間上的安排及分佈，同時能產生特殊的胞器，隔離基質與酵素[5]，這與培養基的調配有很大的關係。但值得注意的是，原植物的篩選非常重要，如果培殖體來自某成分高產量品種之母株，那麼可能會得到產量較高的細胞。Kinnersley and Dougall 指出由癒合組織產生之 nicotine 含量，與其所衍生之母株有顯著的相關[13]。因此 Berlin 建議，儘可能試著從植物體不同部位建立 cell line，再篩選適當的種原[7]。本研究初步試驗只從白芷葉柄誘導癒合組織，未來應可考慮從其它部位之培殖體著手。

二、臺灣白芷細胞懸浮培養

懸浮細胞生長快速且均一，所以較癒合組織更適合作生理、生化及成份上的研究。Hunault et at. 在懷香（*Foeniculum vulgare* Miller）的細胞培養中指出，建立一個細胞懸浮培養其實非常簡單，因爲使用於固體培養的培養基，同樣也適用於液體培養[12]。Hiraoka et al. 也使用與癒合組織培養相同的培養基（不含 agar），建立柴胡細胞懸浮培養[11]。本研究亦發現以癒合組織生長相同的 MS+1mg/l 2,4-D 及0.5mg/l kinetin 培養基作爲液體培養基，將臺灣白芷的癒合組織切碎後培養，可得到一生長良好的細胞懸浮培養。

三、Imperatorin 含量之檢測

本研究經測得白芷各種培殖體 imperatorin 的含量如表6顯示，以根部最高，但但因根部生長在泥土中消毒不易，所以採用葉柄之癒合組織做爲研究的材料，雖 ipmeratorin 含量遠不及根部者，但相信經由 cell line 之篩選，或培養基之檢討及誘引劑（elicitor）之添加，將可改進癒合組織及 cell line 中 imperatorin 的含量[8,14,18]，這方面的研究實在值得深入探討。

誌 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會經費補助（82NSC-0409-B055-04），謹此申謝。

引用文獻

1. 甘偉松。1980。臺灣藥用植物誌。p.644。國立中國醫藥研究所。臺北。臺灣。
2. 邱年永。張光雄。1991。原色臺灣藥用植物圖鑑。第三册。南天書局。臺北。臺灣。
3. 周繼銘。1980。白芷治療銀屑病有效成分研究。中成藥研究 4：33。
4. 重慶市銀屑病防治研究協助作組。1981。口服川白芷制劑加黑光照射治療銀屑病159例療效觀察。中華皮膚科雜誌 131：129。
5. 蘇遠志。楊瑞森。高建元。1990。利用植物組織培養二級代謝產物。生物產業 1(1)：1-14。
6. 森立之。重輯神農本草經。南大阪印刷株式會社。
7. Berlin, J. 1988. Formation of secondary metabolites in cultured plant cell and its impact on pharmacy. In：Biotechnology in Agriculture and Forestry 4 (ed. by Bajaj, Y.P.S.). pp.39-47. Springer-Verlag, New York.
8. Funk C., K. Gugler and P. Brodelius. 1987. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate prepatation (elicitor). Phytochemistry 26：401-40.

9. Gray. D. J. and B. V. Conger. 1985. Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and culture quality in cell suspension of *Dactylis glomerate.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4 : 123-133.

10. Gu, J. W. 1982. Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Olive) Diels. Acta Pharm. Sin. 17 : 131 -138.

11. Hiraoka, N., N. Yamada, M. Oyanagi and Y. Tomita. 1987. Vegetative propagation of *Saposhnikovia divaricata* through embryogenesis of leaf callus. Shuyakugaku Zasshi 41(1) : 43-47.

12. Hunault, G., P. Desmarest and J. Du Manoir. 1988. *Foeniculum Vulgare* Miller : Cell culture, regeneration, and the production of anethele. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry 7 (ed. by Bajaj,Y. P. S.). pp.185-212. Springer-Verlag, New York.

13. Kinnersleg. A. M. and D. K. Dougall. 1980. Correlation between the nicotine content of tabacco plants and callus cultures. Planta 149 : 205-206.

14. Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. Adv. Biochem. Eng. 31 : 59-88.

15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

16. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plant from tissue culture. In : Plant Cell Tissue, and Organ Culture (ed. by Reinert J. and Bajaj, Y. P. S.). pp.179-207. Springer-Verlag, New York.

17. Niraoka, N. 1988. *Bupleurum falcatum* L. embryogenesis and the production of saikosapins. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry 7 (ed. by Bajaj, Y. P. S.). pp.69-81. Springer-Verlag, New York.

18. Robins, R. J. and M. J. C. Phodes. 1986. The stimulation of anthraquinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 35-41.

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

20. Uomori, A., S. Seo and Y. Tomita. 1974. Studies of the constituents in tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. Shuyakugaku Zasshi 29 : 152-160.

21. Zhang. S. and Cheng K. C. 1988. *Angelica sinensis* (Oliv) Diels : In vitro culture, regeneration and production of medicinal compounds. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry 7 (ed. by Bajaj, Y. P. S.). pp. 1-22. Springer-Verlag, New York.

Studies on Tissue Culture of *Angelica Dahurica* Var *Formosana*

I. Callus Induction And Medium Evaluation[1]

Wen-Der Chang, Chung-Chuan Chen, Yuan-Shiun Chang[2] and Hsin-Sheng Tsay[3]

Summary

The production of secondary metabolites from suspension cell culture system is one of the most promising methods in medicinal industry. The cells from callus or suspension cultures not only grow faster and the products produced can be extracted more easily than cells from the intact plants, but also the quantities of the products produced are much higher than those of the field-grown plants. The tissue or suspension cell culture techniques have made industrial production of some natural products possible.

Bai-Zhi (*Angelica dahurica*) was first recorded in Shen-Nung-Pen-Ts'ao-Ching under middlior category and was also recorded in the successive Pen-ts'aos of the descending dynasties. It has been used for the cure of headache. Recently it has also been used for treating a skin disease, Yin-Hsieh Ping with good healing effect. The component imperatorin of Bai-Zhi has been suggested as the major active ingredient for healing the skin disease. The purpose of this study was to establish the tissue culture system including callus induction from petiole and to establish the suspension culture for the production of imperatorin. It was found that the soft and light-yellowish callus from petiole of *A. dahurica* could be induced on solid medium containing MS basal salts supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin and 3% sucrose. The callus could be maintained by successive culture on medium containing MS basal salts, 0.25-2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, and 3% sucrose, solidified with 1.2% agar at pH 5.7. For developing a finely dispersed cell suspensoin culture, the callus was cut and cultured on a medium containing 0.25-0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose and pH 5.2 and shaking at 100 rpm. Analyses by TLC and HPLC indicated that both callus and suspension cells contained imperatorin and byak-angelicin. Although the content of imperatorin in callus and suspension cell was lower than market products and wild species.

Key words : *Angelica dahurica,* Callus, Suspension culture, Secondary metabolites.

---

1. Contribution No. 1675 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant from National Sciences Council (82NSC-0409-B055-04) , Republic of China.
2. Former graduate student, Professors of Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College, Taichung, Taiwan 400, ROC.
3. Senior Plant Tissue Culturist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, ROC