

第二節 試驗結果

一、延胡索癒合組織之誘導及生長

(一)癒合組織之誘導

將表面消毒過之塊莖切成厚度約 1-2 mm，邊長約 5 mm 之三角形片狀，接種於誘導癒合組織培養基，經培養 3 天後即有黃色的代謝分泌物，使培養基逐漸變為黃色，培養 10 天後培養基逐漸變為深黃色，因此每隔 10 天即需繼代培養一次。每繼代培養一次其黃色的分泌物即減少一些，且分泌的速度亦漸慢，經培養一個月後調查癒合組織誘得率及平均鮮重，結果顯示培養基中含有 BA、NAA 或 2,4-D，均可誘得 100 % 癒合組織，其中以添加 2 mg/L BA 及 1 mg/L 2,4-D 的培養基，所誘導癒合組織的平均鮮重最佳達 3.84 g，其次以 2 mg/L BA 及 2 mg/L 2,4-D 的處理，所誘得之平均鮮重達 3.43 g；若單獨添加 0.5-2 mg/L 2,4-D，其癒合組織的平均鮮重為 2.1-2.6g (表1)。同時發現培養基中若添加 BA 或 NAA，所誘得的癒合組織有體胚產生，但單獨添加 2,4-D 誘得之癒合組織的細胞色澤及質地最佳，由此可知 1 mg/L 2,4-D 最適宜癒合組織的繼代培養 (圖14)。

(二)癒合組織生長曲線之測定

將 200 mg 癒合組織，接種於含 1 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基，置於黑暗中培養，每隔三天取出癒合組織稱重觀察，得生長曲線如圖15 所示，癒合組織的鮮重隨培養日數的增加而提高，約在 32 天生長達到最高峰，平均鮮重約 2.36 g；培養 36 天後癒合組織不再生長，癒合組織

的形狀慢慢萎縮，重量逐日減少且色澤逐漸轉成棕色，42 天時約有 80 % 癒合組織呈現暗褐色；培養50 天後，癒合組織皆褐化無法繼代培養（圖16）。以上結果得知癒合組織繼代培養的時間以30天為佳。

(三)延胡索癒合組織之生長

1.基本鹽類對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於B₅、MS、N₆及WPM等不同基本鹽類的培養基，經暗培養 30 天後，調查其平均鮮重，結果如表 2 顯示，以 MS為基本鹽類，所誘導之癒合組織的質地及色澤最佳，鮮重達 1.569 g 最高；以 N₆ 為基本鹽類，其癒合組織鮮重為1.385g 次之；而以 WPM 及 B₅ 為基本鹽類，所獲得癒合組織鮮重較差；因此以MS為基本鹽類，最適合延胡索癒合組織之生長（圖 17）。

2.碳源對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於各含 3% 之 sucrose、glucose、fructose 或 maltose 等不同碳源之培養基，經暗培養 30 天後，調查癒合組織之鮮重，結果如表 3 顯示，以 sucrose 為碳源時，癒合組織之鮮重達 1.594 g，效果最佳，其次以 glucose 為碳源，鮮重為 1.335 g，若以 maltose 為碳源，則癒合組織幾乎不生長。由此得知 sucrose 最適合延胡索癒合組織之生長（圖18）。

3.不同蔗糖濃度對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於含 1、3、5 及 7 %

sucrose 之培養基，經暗培養 30 天後，調查其平均鮮重，結果顯示5% sucrose，使癒合組織的鮮重最佳達1.7 g，其次為3% sucrose，所獲得的鮮重為1.53g，sucrose 的濃度太高或太低，使癒合組織的重量降低，不利於延胡索癒合組織之生長 (表4)。因此5% sucrose濃度最適宜癒合組織的生長。

4.瓊脂 (agar) 濃度對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於0.45、0.6、0.9、1.2 及 1.5 % Difco agar等不同濃度之培養基，經暗培養 30 天後，調查其平均鮮重，結果如表5 顯示，0.6 及 0.9 % agar 之處理，癒合組織鮮重約 1.6 g，其中0.6% agar 使癒合組織的鮮重達最高，但凝膠度太軟；而 agar 濃度大於 1.2%或低於 0.6 %，則癒合組織生長較差。因此含有 0.9 % agar 之培養基，對延胡索癒合組織的培養較適宜。

5.不同濃度的 MS 培養基對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於含有不同濃度的MS (1/4 X、1/2 X、1X 及 2X) 基本培養基，經暗培養 30 天後，調查其平均鮮重，結果自表6 可知，1X MS 之處理，其癒合組織鮮重約 1.583 g 最好；1/2 X MS 處理的效果次之達1.419 g；2X MS 之處理癒合組織生長最差。因此 1 X MS 基本培養基，對延胡索癒合組織之生長最適宜。

6.光照對延胡索癒合組織生長之影響

將 200mg 癒合組織繼代培養於光照 (100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) 與黑暗兩種環境。經培養 30天後，調查其平均鮮重，結

果顯示癒合組織於暗培養環境下最佳，鮮重可達 1.553g，而光照培養下之鮮重為 1.301 g 略低(表7)。外觀上暗培養之癒合組織呈淡黃色，質地鬆散均勻無色素點，光照下癒合組織的表面，出現紅色素點且有少許體胚的產生，故延胡索癒合組織之生長及繼代增殖較適合暗培養(圖19)。

7.植物生長調節劑對癒合組織生長之影響

(1) Auxins 類植物生長調節劑對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織培養於添加不同濃度的 2,4-D (0.5、1、2 與 4 mg/L) 及 NAA (0.5、1、2 與 4 mg/L) 之培養基，經暗培養 30 天後，調查其平均鮮重，結果可知添加 1 mg/L 2,4-D 處理之癒合組織鮮重 2.837 g 最高，若以 2 mg/L NAA 或 2 mg/L 2,4-D 處理的效果次之，其鮮重分別為 2.508 g 及 2.436g (表 8)。癒合組織的外觀方面，添加 NAA 處理之癒合組織呈黃色質地緊密，而添加 2,4-D 處理之癒合組織呈淡黃色質地鬆散均勻(圖20)。綜合以上結果可知 1 mg/L 2,4-D 對於癒合組織的生長有利。

(2) Cytokinins類植物生長調節劑對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織培養於 BA, kinetin, zeatin 及 TDZ 各 1 mg/L 的培養基中，經暗培養 30 天後，調查其癒合組織的鮮重，結果如表 9 顯示，添加 TDZ 之處理，癒合組織之生長最好，鮮重約 2.787 g；其次為 1 mg/L BA 之處理約 2.448 g，而 1 mg/L kinetin 之處理較差約重 2.159 g，不添加植物生長調節劑與 1 mg/L zeatin 之處理最差。因此 Cytokinins 類

之植物生長調節劑中以TDZ、BA或kinetin較有利於癒合組織的生長，其中又以TDZ的效果最佳。

(3) TDZ 對延胡索癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織培養於 0.5、1、2 及 4mg/L TDZ 之培養基中，經暗培養 30 天後，調查其鮮重，結果如表10 顯示，添加 1 mg/L TDZ處理之癒合組織之生長最佳，鮮重達 2.892 g，其次為添加 0.5 及 2.0 mg/L TDZ，其鮮重約達 2.7 g，以4.0 mg/L TDZ 及不添加任何 TDZ 之處理最差。

8.有機添加物對癒合組織生長之影響

(1)水解酪蛋白 (CH) 對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織培養於不同濃度之水解酪蛋白 (250, 500, 750 及 1000 mg/L) 的培養基，經暗培養30天後，調查其鮮重結果如表11 顯示，添加250 及 500 mg/L 之水解酪蛋白，對癒合組織之生長最好，鮮重高達 2.1-1.9g，但過高之濃度，較不利於癒合組織生長（圖21）。

(2) Peptone 對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織繼代培養於添加不同之濃度 peptone (1, 2, 3 及 4 g/L) 的培養基，經暗培養 30 天後，調查其鮮重結果顯示，添加 1- 4 g/L peptone 對癒合組織生長並無顯著差異，但添加 peptone 稍有益於對癒合組織的生長（表12）。

(3)椰子汁 (CM) 對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織繼代培養於含有 5、10、20 % 椰子汁之培養基，經暗培養30天後，調查其鮮重結果如表13 顯示，以添加 10 % 椰子汁對延胡索癒合組織之生長最好，鮮重達 1.992 g，但其癒合組織質地較緊密且呈現暗黃色。

(4)酪胺酸 (Tyrosine) 對癒合組織生長之影響

將 200 mg 癒合組織，接種於 5、10、15 及 20 mg/L tyrosine 的培養基，經暗培養30天後，調查鮮重結果得知，添加 5 mg/L tyrosine 有益於癒合組織之生長，鮮重可達 2.124 g，而 10-15 mg/L tyrosine之癒合組織鮮重亦達 1.7-1.8 g 次之，過高濃度則不利於延胡索癒合組織之生長（表14）（圖22）。

二、延胡索細胞懸浮培養之建立

(一)植物生長調節劑對細胞懸浮培養之影響

1.Auxins 類植物生長調節劑對懸浮細胞生長之影響

將懸浮細胞培養於添加 0.5、1、2 及 4 mg/L 2,4-D 或 NAA 之 MS 培養基中，置於平面迴轉式振盪器以 100 rpm 轉速培養，每四天記錄其 PCV 值，結果顯示懸浮細胞初期增殖速度較為緩慢，培養於 1mg/L 2,4-D 的懸浮細胞，約在培養 12 天後呈指數生長期，約在第 28 天時達靜止期，可測得最大之 PCV 值為 18.0 ± 0.9 ml (總體積為 25ml)，此細胞的色澤及生長情形最佳；其次以添加 0.5 mg/L 2,4-D 的懸浮細胞，其最大 PCV 值約為 14ml。而添加 2.0 mg/L NAA 之培養基，同時發現約在培養 12 天後呈指數生長期，第 20 天時達靜止期，可測得最大之 PCV

值為 17.0 ± 0.6 ml；若培養基中不添加任何 auxins 類植物生長調節劑，則懸浮細胞的生長遲緩，於培養 18 天後開始褐化，至第 32 天時漸變為黑褐色（圖 23）；顯示延胡索懸浮細胞生長培養基，適宜添加 auxins 類植物生長調節劑。

2. Cytokinins 類植物生長調節劑對懸浮細胞生長之影響

當懸浮細胞培養於添加 0.5、1、2 及 4 mg/L kinetin 或 BA 之 MS 培養基中，結果顯示培養基中添加不同濃度的 kinetin，對於懸浮細胞的增殖沒有助益，而添加不同濃度的 BA 處理，以 1mg/L BA 處理之懸浮細胞的生長較好，但懸浮細胞之增殖速度緩慢，細胞顆粒增大且有褐化現象（圖 24），顯示延胡索懸浮細胞增殖之培養基中，不適宜添加 cytokinins。

(二) 細胞初體積對懸浮細胞生長之影響

將不同初體積 (0.25、0.5、1、1.5 及 2.5 ml) 之懸浮細胞，培養於含有 1mg/L 2,4-D 之 MS 培養基中，置於平面迴轉式振盪器以 100 rpm 轉速培養，每四天測其 PCV 值記錄，結果如圖 25 顯示，懸浮細胞在第 8-16 天期間，各處理之細胞皆呈穩定增殖，其中以初體積 1ml 之懸浮細胞增殖速度及增殖量均較其他處理佳，於培養後 28 天可達 PCV 最大值約 18.6 ml；初體積為 PCV 2.5 ml，培養初期細胞增殖速度較其它處理快，於培養 16 天後即達高峰，隨後增殖速度呈平緩；PCV 0.25ml 之處理，約在 36 天才達到生長高峰期，增殖速度較緩慢；綜合以上結果可知初體積的細胞濃度太高 (PCV 2.5 ml)，培養初期細胞增殖速度快，繼代培養的期間縮短，反之初體積的細胞濃度太低 (PCV 0.25 ml)，則細胞增殖慢，而初體積最適當的濃度為 1ml，培養 28 天後

細胞增殖量才達最高峰。

(三)培養條件對懸浮細胞生長之影響

1.震盪速度對懸浮細胞生長之影響

將 1ml 之懸浮細胞培養在添加 1mg/L 2,4-D 培養基中，分別以 60、80、100 與 120 rpm 的震盪速度培養，結果顯示細胞培養初期(12 天以前)，60rpm 之處理稍差於其餘處理；但培養 16 天後則處理差異變大，以 80、100 及 120 rpm 的懸浮細胞增殖速度較快，其中尤以 100rpm 處理約在第 28 天，可測得最大之 PCV 值 (約為 17.0 ± 0.9 ml)，且細胞質地亦較佳；故對延胡索之懸浮細胞生長，其振盪速度以 80-120 rpm 較佳 (圖 26)。

2.光照對懸浮細胞生長之影響

將 1 ml 之懸浮細胞培養於 1 mg/L 2,4-D 培養基中，分別置於 暗培養、 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 及 $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 之光照強度下，置於平面迴轉式振盪器以 100 rpm 之速度震盪培養 36 天後，結果顯示懸浮細胞於 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 之光照強度下培養，其細胞增殖速度較快，培養 12-20 天呈指數生長期，約 28 天時可測得最大之 PCV 值 (17.0 ± 0.9 ml)。光照強度過強 ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) 或暗培養均不利於懸浮細胞之生長 (圖 27)。

三、大量繁殖之研究

(一)體胚之誘導

將 100 mg 癒合組織培養於各含 0.5 mg/L BA、zeatin 及 kinetin 之固體 MS 基本鹽類培養基中，經 30 天光照

培養，結果如表 15 顯示，以添加 0.5 mg/L kinetin 處理誘導產生體胚之能力最佳，約有 13.6 個體胚形成，其次為含 0.5 mg/L 的 BA 或 zeatin 之培養基，約有 8-10 個體胚，不添加任何 cytokinin 之培養基，則僅有 3.1 個體胚形成(圖 28)。故欲利用癒合組織誘導體胚的形成，必須於培養基中添加適當的 cytokinin。

(二)自體胚苗誘導體胚及其生長

1.體胚之誘導

(1) ABA 對體胚苗誘導體胚之影響

將 1.0 mg/L kinetin 誘得之體胚，培養於添加 0.1mg/L zeatin-riboside 液體培養基的 250ml 三角錐瓶，置於平面迴轉式振盪器以 100 rpm 之速度震盪培養 15 天後之體胚苗，接種於添加 0.5、1、2、4、8、12 及 16 mg/L ABA 之固體培養基中，經 60 天光照培養，結果顯示 8 mg/L ABA 處理，所誘導體胚最多約 25 個，2 及 4 mg/L ABA 處理誘導約 16 個體胚次之，再次為 0.5-1 mg/L ABA 處理，可誘導約 14 個體胚，而以 12-16 mg/L ABA 處理，僅誘導約 3-4 個體胚，且其植株已褐化(表 16)(圖 29)。8 mg/L ABA 處理誘導體胚雖最多，但其胚的大小及形態較 1 及 2 mg/L ABA 處理差，所以延胡索體胚苗誘導體胚，以添加 1 及 2 mg/L ABA 最佳。

(2)基本培養基對體胚苗誘導體胚之影響

將 0.1mg/L zeatin-riboside 液體培養 15 天之體胚苗，接種於 1/2 X、1 X 及 2X 的 MS，添加 2 mg/L ABA 之固體培養基中，經 60 天光照培養，結果如

表 17 顯示，1X MS 處理誘得體胚個數約 19 個最多，而 1/2X MS 處理誘得體胚個數約 13 個次之，2 X MS 處理僅誘導約 2 個且植株褐化甚至死亡，最不适合體胚的誘導（圖 30）。比較體胚大小則以 1/2 X MS 之處理較 1 X MS 為佳。

2.體胚之發育

將 2 mg/L ABA 誘得之體胚，培養於各添加 1mg/L zeatin-riboside、kinetin 或 0.1mg/L GA₃ 之液體培養基的 250ml 三角錐瓶，置於平面迴轉式振盪器以 100 rpm 之速度震盪培養 15 天顯示，添加 0.1mg/L GA₃ 處理，體胚苗轉化率高達 80%，且幼苗的根及子葉生長最佳；添加 1 mg/L zeatin-riboside 及 kinetin 的處理，體胚苗轉化率較低約在 25-40% 之間，且根太短或無根；不添加植物生長調節劑之體胚苗轉化率有 75%，但幼苗短小（表 18）（圖 31,32）。故延胡索愈二次體胚之發育以添加 0.1mg/L GA₃ 最適當。

3.不同濃度的基本鹽類及蔗糖對塊莖形成之影響

以 0.1mg/L GA₃ 液體培養基培養 15 天後形成的植株，接種於含有不同濃度的 MS (1/4X、1/2X、1X、2X) 及 sucrose (3、6、9%) 等 12 處理的固體培養基中，經 30 天光照培養，發育形態如圖 33A-C，調查其塊莖的形成率，結果如表 19 顯示，1/2 X MS 及 6% sucrose 處理，誘得約 57% 的塊莖效果最佳，而 2 X MS 配合 3-9% sucrose 的處理，使植株褐化甚至死亡，最不适合塊莖的形成。

4.移植及健化

將具有直徑約 0.5 cm 塊莖之植株，接種於全量

MS, 3 % sucrose 及 0.2 % Gelrite 之 250ml 三角錐瓶, 光照下培養, 培養 4-6 個月後將組培苗取出, 用清水沖洗培養基後, 以稀釋 1000 倍的億力浸泡 1 分鐘, 隨即移植於滅菌過的栽培介質 (蛭石: 泥炭土 = 1:1) 中, 將植盆置於網室 [25/16 (日/夜), 12 小時光照] 條件下, 每天澆水二次以保持濕度, 30 天後調查植株存活率高達 82 % 且有部分具有花芽 (圖 34、35)。

四、延胡索體胚內部組織及外部形態之觀察

將體胚苗培養於 2mg/L ABA, 二個月之後在子葉(c)及胚根(r)連接處直接形成體胚 (圖 36A)。以 2 mg/L ABA 處理五個星期後之體胚苗, 利用 SEM 觀察發現體胚苗未經過癒合組織的階段直接形成體胚 (圖 36B)。2 mg/L ABA 處理 15 天後, 切片結果顯示體胚苗之子葉及根連接處, 有表皮胚性細胞 (箭頭所示) 由垂周分裂轉變為平周分裂, 下表皮細胞有液泡 (v) (圖 36C)。當培養於 MS 培養基, 添加 2 mg/L ABA 培養一個月, 顯示已形成球型期且具有胚柄的體胚 (g) 及胚性細胞團 (pe) (圖 36D)。培養二個月後, 顯示該時期之體胚已具有完整之子葉 (c)、維管束 (箭頭所示) 及根原細胞 (r), 體胚沒有任何維管束與原來的體胚苗相連 (圖 36E)。將此體胚培養於 MS 基本鹽類之液體培養基, 不添加任何植物生長調節劑, 震盪培養 2 天的情形 (圖 36F) 將體胚移至 MS 基本鹽類, 添加 0.1mg/L GA₃ 之液體培養基, 體胚轉化為體胚苗 (圖 36G)。體胚苗培養於 MS 基本鹽類之固體培養基, 不添加任何植物生長調節劑, 培養四個月後, 植株有花芽 (箭頭所示) 及塊莖 (t) 的形成 (圖 36H)。上述之結果得知延胡索經由 ABA 可大量, 且同步性的產生構造完整之體胚。

五、延胡索組織培養產生延胡索甲素 (corydaline) 及延胡索乙素 (tetrahydropalmatine) 之含量比較

(一)延胡索市場品 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量

將市場品以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 37 顯示，corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量各為 0.325 mg/g dry wt 及 0.356 mg/g dry wt。

(二)植物生長調節劑對產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

1.Auxins 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

(1) 2,4-D 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加不同濃度 2,4-D (0.5、1 及 2 mg/L) 之培養基，經暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 38 顯示，添加 1 mg/L 2,4-D 處理成分最高 (corydaline 0.326 mg/g dry wt；tetrahydropalmatine 0.432 mg/g dry wt)，0.5 mg/L 2,4-D 處理次之 (corydaline 0.272 mg/g dry wt；tetrahydropalmatine 0.352 mg/g dry wt)，2 mg/L 2,4-D 處理最差。綜合上述結果，癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 以添加 1 mg/L 2,4-D 最佳，濃度高反不利有效成分的產生。

(2) NAA 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加不同濃度 NAA (0.5、1 及 2 mg/L) 之培養基，經暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含

量，結果如圖 39 顯示，添加 1 mg/L NAA 處理的所含成分最高 (corydaline 0.556 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.334 mg/g dry wt) ，1 mg/L NAA 處理亦佳 (corydaline 0.512 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.435 mg/g dry wt) ，0.5 mg/L NAA 處理最差。綜合上述結果，癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 以添加 1-2 mg/L NAA 最佳，濃度低不利有效成分的產生。

2. Cytokinins 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

(1) 不同 Cytokinins 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將分別添加 1 mg/L 之 BA、kinetin、zeatin 及 TDZ，經暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 40 顯示，添加 1 mg/L TDZ 處理的所含成分最高 (corydaline 0.639 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.214 mg/g dry wt) ，1 mg/L kinetin 處理次之 (corydaline 0.358 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.220 mg/g dry wt) ，1 mg/L zeatin 處理最差。綜合上述結果，添加 1 mg/L TDZ 處理之癒合組織雖可產生較高 corydaline，但 tetrahydropalmatine 卻較不添加 cytokinins 的少，顯示添加 cytokinins 有利 corydaline 的產生，而不利 tetrahydropalmatine 的產生。

(2) TDZ 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加不同濃度 TDZ (0.5、1、2 及 4 mg/L) ，

暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 41 顯示，添加 1 mg/L TDZ 處理的所含成分最高 (corydaline 0.596 mg/g dry wt; tetrahydropalmatine 0.203 mg/g dry wt) ， 4 mg/L TDZ 處理 (corydaline 0.236 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.063 mg/g dry wt)較差。綜合上述結果，添加 TDZ 處理之癒合組織雖可產生較高 corydaline ，但不利 tetrahydropalmatine 的生成。

(三)光照對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

將添加 1 mg/L 2,4-D 處理，經光及暗培養 30 天所得的癒合組織，冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 42 顯示，光培養的成分較高 (corydaline 0.279 mg/g dry wt; tetrahydropalmatine 0.368 mg/g dry wt) ，暗培養的成分 (corydaline 0.258 mg/g dry wt; tetrahydropalmatine 0.314 mg/g dry wt) 略低，但暗培養之癒合組織生長快較符合經濟效益。

(四)不同濃度 Agar 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

將添加不同濃度 Difco agar (0.4% 0.6% 0.9% 1.2% 及 1.5%) 之培養基，暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 43 顯示，0.6% Difco agar 處理之所含 corydaline 及 tetrahydropalmatine 成分最高 (0.384 mg/g dry wt; 0.608 mg/g dry wt) ， 1.5 % agar 成分 (corydaline 0.223 mg/g dry wt; tetrahydropalmatine 0.198 mg/g dry wt) 最差，綜合上述結果以癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 以 0.6 %

agar 最多。

(五)有機添加物對延胡索癒合組織生產 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

1.不同濃度水解酪蛋白 (CH) 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加不同濃度水解酪蛋白 (250、500、750 及 1000 mg/l) 之培養基，暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 44 顯示，不添加水解酪蛋白最高 (corydaline 0.253 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.314 mg/g dry wt) ，添加水解酪蛋白 corydaline 及 tetrahydropalmatine 偏低。綜合上述結果延胡索癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 不適合添加水解酪蛋白。

2.不同濃度蛋白 (peptone) 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加不同濃度蛋白 (1, 2, 3 及 4 g/L) 之培養基，暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 45 顯示，不添加蛋白 最高 (corydaline 0.246 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.322 mg/g dry wt) ，添加蛋白之 corydaline 及 tetrahydropalmatine 偏低。綜合上述結果延胡索癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 不適合添加蛋白。

3.不同濃度椰子汁 (CM) 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將添加 5、10 及 20 % 椰子汁之培養基，暗培養 30

天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 46 顯示，不添加椰子汁最高 (corydaline 0.231 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.302 mg/g dry wt)，添加椰子汁之 corydaline 及 tetrahydropalmatine 偏低。綜合上述結果延胡索癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 不適合添加椰子汁。

4.不同濃度酪胺酸 (Tyrosine) 對癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

將 200 mg 癒合組織，接種於於添加不同濃度的 tyrosine (5、10、15 及 20 mg/L) 的培養基，暗培養 30 天所得的癒合組織，經冷凍乾燥後，以 HPLC 偵測 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 47 顯示，添加 10 mg/L tyrosine (corydaline 0.402 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.852 mg/g dry wt) 最高，添加 15 mg/L tyrosine (corydaline 0.368 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.732 mg/g dry wt) 次之。綜合上述結果延胡索癒合組織產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 適宜添加 tyrosine。

(六)培養時間對延胡索懸浮細胞培養生產 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

將懸浮細胞培養於添加 1.0mg/L 24-D、3% sucrose、pH = 5.2 ± 0.1 及 MS 無機鹽類培養基，在 10 μE/m²s 光照及 100 rpm 轉速之環境下培養，每四天收集懸浮細胞測其成分；結果顯示 corydaline 之產量以培養後 12 天時為最多 (0.22 ± 0.01 mg/g dry wt)，而 tetrahydropalmatine 之產量則以 24 天時為最多 (0.29 ± 0.01 mg/g dry wt) (圖 48)。

(七)不同添加物對塊莖產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之影響

1. 不同添加物對初期塊莖培養產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

以 0.1mg/L GA₃ 液體培養基培養 15 天後的植株，接種 1/2 X MS, 6% sucrose 分別添加 ABA (0.5、1、2、5) mg/L、Ancymidol (0.5、1、2) mg/L、GA₃ (0.5、1、2、5) mg/L、Paclobutrazol (0.5、1、2、5、10) mg/L、PEG-4000 (15、20、50、100 mg/L) mg/L 及對照組等 22 處理的固體培養基中，經 30 天光照培養，調查其塊莖的平均鮮重，結果顯示添加 Paclobutrazol 0.5-5 mg/L 塊莖鮮重達 62.8-67.2 mg 最佳，而添加 ABA 10 mg/L 塊莖鮮重僅有 4.8 mg 最差，其植株甚至死亡 (表 20)。偵測其有效成分含量，結果如圖 49 A, B 顯示，以添加 0.5-5 mg/L ABA 處理 (corydaline 1.368-2.268 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.896-2.265 mg/g dry wt) 較佳，Ancymidol 0.5mg/L 處理 (corydaline 0.182 mg/g dry wt; tetrahydropalmatine 0.129 mg/g dry wt) 最差。

2. GA₃ 及 Paclobutrazol 對長期塊莖培養產生 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量比較

培養於含 3% sucrose, 0.2 % Gelrite, 0.1 mg/l GA₃ or 0.5 mg/l paclobutrazol 處理六個月後之塊莖，以 HPLC 偵測其 corydaline 及 tetrahydropalmatine 之含量，結果如圖 49a, b 顯示，0.1 mg/l GA₃ 處理使 corydaline 及 tetrahydropalmatine 成分明顯增多(2.481 mg/g dry wt ; 2.384 mg/g dry wt), 可有效增加其有效成分。0.5 mg/l paclobutrazol (corydaline 3.892 mg/g dry wt ; tetrahydropalmatine 0.853 mg/g dry wt) 則使 corydaline 提高約培養一個月的 3 倍，但

tetrahydropalmatine 卻低於培養一個月的含量。