

第三節 討 論

一、延胡索癒合組織之誘導

1977 年 Murashige 指出組織培養欲得滿意結果，首先選擇培養體需考慮取材部位⁽⁹⁷⁾；具有分裂能力之細胞或組織，則是最佳的材料，如塊莖 (Chow, 1986)、根 (Stewart and Button, 1978)、葉 (Amaki, 1989)、莖頂 (Morel, 1960)、頂芽 (Irawati *et al.*, 1977) 及腋芽 (Widiastoety, 1986) 等。植物生長調節劑是誘導癒合組織之另一重要因素，Shoyama *et al.* (1987) 報導於 1 mg/L 2,4-D 之 MS 培養基中可誘導竹節人參 (*Panax japonicas*) 形成癒合組織 Zhang *et al.* (1982) 指出誘導當歸之癒合組織，2,4-D 的效果優於 NAA⁽¹⁸⁵⁾；Noboru *et al.* (1983) 發現以 0.1 μ M 2,4-D 可誘導 70 % 柴胡之嫩葉形成癒合組織，而相同濃度的 NAA 只有 20 % 成功率 Ikuta and Itokawa (1968) 以 1 mg/L 2,4-D 配合 0.1 mg/L kinetin 誘導日本黃連 (*Coptis japonica*) 之葉柄生成癒合組織。丁 (1984) 則提出 0.5-1 mg/L 2,4-D 可使黃連 (*Coptis chinensis*) 的花梗形成癒合組織。本試驗以塊莖為試驗材料，以 MS 基本鹽類，添加 3% 蔗糖及 1 mg/L 2,4-D，所誘得癒合組織的色澤及質地最佳，最適合癒合組織的誘導及繼代培養(表 1) (圖 14)，同時亦發現 2,4-D 的誘導效果較 NAA 佳，此結果與上述學者相同。而 Kitamura *et al.* (1989) 指出 *Swertia pseudochinensis* 癒合組織之誘導，NAA 的效果優於 2,4-D⁽¹⁸⁶⁾。

一般常將 cytokinins 與 auxins 配合使用，效果比單獨使用 auxin 更好⁽¹⁸⁵⁾。Skoog and Miller (1957) 提出，cytokinin / auxin 比例增高時，可促進芽的分化；反之則有利於根與癒合組織形成⁽⁴²⁾。Zhang *et al.* (1989) 曾述及 auxins 類植物生長調節劑配合 cytokinins，對當歸誘導癒合組織的形成有所助益，但不同種類

cytokinin 之效果不同。本試驗亦顯示以延胡索塊莖為培植體，添加 2mg/L BA 配合 1mg/L 2,4-D 所獲得癒合組織的平均鮮重及誘導率最佳。單獨使用 2,4-D 或 NAA 的癒合組織誘導率達 100 % 但量較少 (表 1)。

二、延胡索癒合組織之生長與增殖

組織培養所使用的培養基有 MS (Murashing and Skoog, 1962)、White (White's, 1963)、LS (Linsmaier and Skoog, 1965)、B₅ (Gamborg et al., 1968)、N & N (Nitsch and Nitsch, 1969)、SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)、N₆ (Chu *et al.*, 1975) 與 WPM (Lloyd & McCown, 1980) 等⁽⁴⁴⁾。其中 MS 配方最為常用，其無機鹽類的離子濃度較高，為較穩定的離子平衡溶液。Evans 等(1981)認為有 70% 作物類的培植體，皆由 MS 培養基誘導體胚形成⁽¹⁰⁴⁾；本試驗以較常用之基本鹽類 (MS、B₅、N₆、WPM 等四種) 進行延胡索癒合組織生長影響之試驗，結果顯示癒合組織最適宜培養於全量的 MS 基本鹽類培養基 (表 2, 表 6)。添加醣類的目的，主要是提供碳源、供給能量及維持滲透壓，依植物種類之不同，對碳源及滲透壓的需求有所不同。Yeh *et al.* (1984) 報導醣類主要功能為提供植物生長所需碳源及調節滲透壓，濃度太低可能造成碳源不足且生長不良；濃度太高則可能導致滲透壓太大而無法生長^(72,187)。Gautheret (1942) 指出培養基中蔗糖為最佳碳源，而葡萄糖及麥芽糖次之⁽¹⁸⁸⁾。Arya *et al.* (1991) 將人參的原生質體培養在不同的醣類中，發現培養於 myo-inositol 之 plating efficiency 最佳，mannitol 最差⁽¹³²⁾。Minocha and Halperin (1974) 指出朝鮮薊 (*Holianthus tuberosus*) 的癒合組織生長，以蔗糖為碳源的效果最好⁽¹⁸⁹⁾。陳 (1996) 亦指出蔗糖對雙鋸齒葉玄參 (*Scrophularia yoachimurae*) 的癒合組織生長較有利⁽¹⁸²⁾。表 3 及表 4 亦顯示以蔗糖為碳源對延胡索癒合組織之生長最佳，其中以 3-5% 的蔗糖濃度最利於癒合組織之生長及繼代，濃度過高或太低則

不利生長，本試驗所得結果與上述學者頗類似。

固體培養基必須使用凝膠物質來固化培養基，最常使用的是瓊脂 (agar)，因含有多種不明成分之生理活性物質，因此添加量的多寡常影響植物生長結果，一般常用的濃度是 0.8-1.2 %。Morimoto (1989) 報告指出在 *Croton sublyratiun* 的癒合組織中，增加 gellam gum 或 agarose 的濃度，雖然降低了生長速率，但卻可以促進 phytosterol 的生成。Fukui (1982) 報導在細胞懸浮培養中加入少量 agar 可使 shikonin 產量增加⁽⁸⁸⁾。本試驗顯示 0.9-1.2 % agar 為最佳濃度，足見延胡索癒合組織適合硬度較高之培養基(表 5)。培養環境中，光照主要不是供給組織培養物行光合作用以產生營養，而是生長和分化的一種刺激或誘導因素。George and Sherrington (1984) 指出使用適當的光源照射植物，有助於植物的生長，但在誘導癒合組織時，一般多以不照光較好⁽¹²⁵⁾。Economou (1987) 指出培養組織或器官，最適當的光照強度，會依培養階段、培植體型式及植物品種而有不同⁽¹⁶⁵⁾。Nigra *et al.* (1989) 指出暗處理對於 *Solanum eleagnifalim* 的癒合組織生長良好，但光照對 solasodine 的生成較有利。林 (1998) 指出延胡索 (*C. yanhusuo*) 癒合組織培養於 1-4g/L 水解酪蛋白，於光照培養可獲得不定芽⁽¹⁹⁰⁾。Mantell *et al.* (1978) 指出 *Dioscorea alata* 及 *D. rotundata* 培養於 16 小時光照下，小苗之形成率是 12 小時的 4 倍，但在癒合組織形成方面則 12 小時較 16 小時光照佳⁽¹⁶⁶⁾。本試驗亦顯示癒合組織之繼代增殖，以暗培養所得癒合組織細胞色澤鮮黃、質地均勻緊密較佳；光照下癒合組織的細胞鬆散，表面呈現紅點且有體胚分化的趨勢，顯然光照培養有利於胚的分化(表 7)。

植物生長調節劑控制植物生長與分化的重要因子。植物細胞本身雖能合成一些內源性的荷爾蒙，但生成量少，不足以供應植物生長所需，故需外加植物生長調節劑。Hu and Wang (1983) 指出 IAA、IBA、NAA 及 2,4-D 等四種 auxins 類植物生長調節劑中，以

2,4-D 誘導癒合組織之能力最強。Zhang *et al.* (1986) 於當歸癒合組織繼代培養中指出，先以較高濃度之 auxin 誘導癒合組織，再以稍低濃度之 auxin 繼代培養，所得之癒合組織更均質。本試驗亦發現 2,4-D 對癒合組織的誘導率最強，添加 1 mg/L 2,4-D 所獲得癒合組織的鮮重最多，並且呈淡黃色質地鬆散均勻，最利於癒合組織的繼代培養；其次添加 NAA 的處理，使癒合組織呈黃色質地緊密，綜合以上結果延胡索癒合組織之繼代繁殖適合添加 auxins(表 8)(圖 20)

Cytokinins 是指能夠促進細胞分裂 (cytokinesis)，同時具有類似 kinetin 生理作用之物質，cytokinins 之發現主要是由於菸草切離髓組織 (pith tissue) 培養之研究⁽¹⁹¹⁾，常用的 cytokinins 有 BA、kinetin、zeatin、adenine、2ip 及 Thidiazuron (TDZ) 等，TDZ 最早被利用為棉花的落葉劑，許多報告指出 TDZ 是一種類似 Cytokinins 作用很強的植物生長調節劑，可促進許多植物的芽體繁殖，例如薔薇科、豆科、錦葵科及十字花科等，TDZ 是一種苯基尿素(diphenyl urea)置換物，其作用與細胞分裂素類似(cytokinin-like)，特別應用在木本植物 (Huetteman and Preece, 1993)⁽¹⁹²⁾；Nayak *et al.*(1997)指出石斛蘭屬 *D. aphyllum* 及 *D. moschatum* 培養於 MS 基本培養基，添加 4.5 μ M (1ppm) TDZ 的濃度，可使得一個芽體增殖為 36-40 個芽體⁽¹⁹³⁾；本研究將培養於 1mg/L 2,4-D 之癒合組織繼代培養三次，再移至各 1 mg/L 的 BA kinetin zeatin 及 TDZ 培養基中，結果以 1mg/L TDZ 使癒合組織的生長最快速(表 9, 10)；此可能為癒合組織長期培養於含有 2,4-D 的培養基中，使細胞不斷的分裂及惰性，即使將癒合組織移至作用甚強的 TDZ 培養，仍無體胚形成。

Overbeek (1942) 首次以椰子汁 (CM) 培養蔓陀蘿的幼胚，發現對於細胞的增殖有極佳的效果，因此椰子汁、馬鈴薯汁液、香蕉泥、水解酪蛋白及人參煮液等，常被添加至培養基中，有促進細胞分裂、生長分化、降低褐化率或促進二次代謝物之生成。Grayand (1985) 報導有機氮源水解酪蛋白之主成分為 18 種氨基酸 Bajaja *et al.* (1982)

指出花生之雜交培養中，培養基添加 CH 有助癒合組織之產生⁽¹⁹⁴⁾。Hossain *et al.* (1993) 指出 100 mg/L CH 可促進木瓜 (*Carica papaya*) 癒合組織之生長⁽¹⁹⁵⁾。CM 則為椰子種子之胚乳內腔汁液，含有類似 cytokinin 物質，養分豐富且複雜，可提供部份芽球早期生長所需物質，且椰子汁也具有緩衝培養基 pH 值之作用 (Vacin and Went, 1949)。Kerbaui and Handro (1981) 發現 15 % 椰子汁可使 *Cattleya epidendrum* 之未成熟胚發育成芽球。莊等 (1986) 報導椰子汁、香蕉泥可促進台灣一葉蘭早期原球體及小苗之發育⁽¹⁴⁷⁾。本試驗亦發現添加 250-500 mg/L 水解酪蛋白 (CH) 或 10 % 椰子汁 (CM) 或 5 mg/L tyrosine 皆有助於延胡索癒合組織之生長 (表 11,13,14)；而添加 1-4g/L Peptone 對於癒合組織之生長無顯著的差異，僅稍優於對照組 (表 12)。

三、延胡索細胞懸浮培養

細胞懸浮培養成功之先決條件，為選擇生長快速及活性成分含量高之癒合組織。細胞懸浮培養系統的建立，將有助於得到生長快速且均一化的細胞，而懸浮細胞亦較癒合組織更適合作生理、生化及成分等方面的研究。Zenk *et al.* (1975) 指出 *Morinda citrifolia* 的細胞懸浮培養，2,4-D 會強烈抑制 anthraquinone 的生合成⁽¹¹⁸⁾；Furuya *et al.* (1971) 也指出 2,4-D 會抑制菸草 (*Nicotiana tobacco*) 癒合組織對 nicotine 的生合成⁽¹⁹⁶⁾。Sharp *et al.* (1980) 報導高濃度 auxins 類植物生長調節劑，可抑制體胚形成，但促進細胞均勻分散及快速生長⁽¹⁹⁷⁾，Hatanaka *et al.* (1991) 報導 *Coffea canephora* 的葉片，必須培養於 2,4-D 之培養基，以抑制體胚形成⁽¹⁹⁸⁾，Hunault *et al.* (1988) 指出建立懷香 (*Foeniculum vulgare* MILLER) 細胞懸浮培養甚易，因為固體及液體培養的培養基皆相同⁽¹⁹⁹⁾。所以一般認為 auxins 添加於細胞懸浮培養中，可維持細胞分散均勻和分裂增殖的重要植物生長調節劑。陳等 (1994) 報導臺灣白芷 (*Angelica dahurica* var. *formosana*)

的懸浮細胞於不同濃度 auxins 下，其生長情形均佳⁽¹⁰⁹⁾。而本研究利用 PCV 法測定懸浮細胞，於培養期間體積生長之變化，當液體培養基添加 1.0 mg/L 2,4-D 之懸浮細胞增殖最快且細胞形狀均勻，而且 2,4-D 的懸浮細胞的靜止期較 NAA 慢約一週，同時將懸浮細胞培養於 cytokinins 的培養基中，對於細胞的增殖速度減緩且有褐化現象，因此可知延胡索的細胞適合添加 2,4-D (圖 23, 24)。Narayanaswamy (1977) 指出 *Nicotiana bigelovii* 於 2,4-D 培養基中誘導癒合組織，再移至沒有任何植物生長調節劑之調控下亦能生長。此種已“習慣性”的組織，在細胞學上並不異於正常組織，但通常不能再誘導器官形成，或僅具極低之形態發生能力⁽²⁰⁰⁾。本研究亦發現超過十次繼代之長期培養的延胡索懸浮細胞亦具備與 *N. bigelovii* 相同的特性。

培養初體積對延胡索細胞懸浮培養生長之影響。Yamamoto and Yamada (1986) 報導 *Rauwolfia serpentina* 的細胞初體積會影響細胞生長曲線與 reserpine 的生成，較少的接種量比較大的接種量其生長率較好，但 reserpine 的含量卻以接種量大者為多，並認為高密度之細胞培養，易因培養基養分的快速耗盡與細胞間的相互作用所傷害⁽⁸⁹⁾。Ammirato (1983) 指出低密度之懸浮細胞，較有利於體胚生長及成熟，不利於細胞增殖⁽²⁰¹⁾。本研究結果亦顯示，初體積為 1 ml 之延胡索懸浮細胞，培養 28 天後細胞增殖量達最高峰，生長情形最為理想；而欲於短時間內獲得大量的懸浮細胞，初體積的細胞濃度可提高為 2.5 ml，培養初期細胞增殖速度快，培養 16 天後即達高峰 (圖 25)。懸浮細胞震盪速率會影響細胞與培養基之養分接觸與空氣交換率，Steward *et al.* (1975) 指出振盪速度影響胡蘿蔔細胞生長，轉速愈快，細胞與培養基接觸及空氣交換之機會較多，生長較旺盛；轉速慢則有助於細胞進一步分化成體胚⁽²⁰²⁾，一般細胞懸浮培養之震盪速率約在 60-150 rpm 之間。本研究結果顯示，延胡索細胞懸浮培養最適於轉速為 80-100 rpm 時，細胞生長情形最佳，轉速過

快或過慢，對細胞生長均有不利影響（圖 26）。

Economou (1987) 指出培養組織或器官，最適當的光照強度，會依培養階段、培植體型式及植物品種而有不同⁽¹⁶⁵⁾；Reinert (1958) 曾報導光線影響胡蘿蔔懸浮細胞之生長，弱光源(30 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)有益細胞增殖，而 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 之強光則抑制細胞生長⁽²⁰³⁾；Nigra 等 (1989) 發現暗處理對 *Solanum eleagnifalim* 的癒合組織生長較好，但照光對 solasodine 的生成較有利⁽²⁰⁴⁾；然 Yazaki 與 Okada (1989) 在 *Cornus officinalis* 的細胞培養中卻發現，光雖有助於細胞生長，但對 tannin 的生成卻有抑制作用⁽²⁰⁵⁾。Kreis 與 Reinhard (1990) 指出 *Digitalis lanata* 之細胞懸浮培養，是在弱光 (10 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) 下建立的⁽⁹⁶⁾；Shepard 與 Street (1974) 認為光線會促使懸浮培養中之細胞聚集成團，易分化成器官⁽¹²⁴⁾。本研究亦發現延胡索細胞懸浮培養，於弱光 (10 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) 下培養可獲得大量的懸浮細胞（圖 27）。

一般認為 pH 值與植物形態之發生及代謝物的生成有密不可分關係；Skirvin 等人(1986) 指出培養基經高溫高壓殺菌，或長時間的培養皆會使 pH 值降低⁽¹⁶⁰⁾。Rose 與 Martin (1975) 指出降低培養基的 pH 值，可促進硝酸態氮的利用量，而提高 pH 值則使銨態氮利用率提高⁽¹⁶¹⁾。陳等 (1994) 指出白芷懸浮細胞培養，在 pH 值為 4-7 之不同的培養基中，14 天後以 pH 值為 7 之生長效果最好⁽¹⁰⁹⁾。Ohira 等 (1973) 認為水稻癒合組織培養，在 pH 值為 6 左右時生長快速⁽²⁰⁶⁾。pH 值影響懸浮細胞生長的原因，可能與維持鹽類呈可溶性形式，培養基梯度的吸收及生長調節劑的活性等作用有關。細胞膜內外的 pH 值梯度差，會促進膜外的植物生長調節劑吸收到膜內，特別是對 auxins 的效果更顯著，在細胞的生長與分化上，需要不同濃度的 auxins，因此 pH 值對植物生長調節劑的影響，會間接的表現在細胞的生長與分化上。本研究發現延胡索液體培養基於 pH = 5.2 ± 0.1 時對懸浮細胞生長最佳。綜合本研究結果顯示，延胡索塊莖所誘導癒合組織之懸浮細胞，置於含有全量 MS 基本鹽類，添加

1.0mg/L 2,4-D 及 3% sucrose , 於 pH = 5.2 ± 0.1 之 25ml 液體培養基的 125ml 三角錐瓶 (Pyrex®, U.S.A.) 中, 以 10 μE/m²s 光照強度, 25 ± 1 恆溫及 80-100 rpm 轉速下培養, 每二週繼代培養一次, 可得分散均勻且生長良好之懸浮細胞。

四、延胡索藥用成分之含量

(一)癒合組織之成分影響

許多報告指出 auxins 類植物生長調節劑, 不僅可抑制體胚形成及促進細胞分散, 亦會影響二次代謝物之形成。Sharp *et al.* (1980) 報導降低 auxin 之濃度, 有助於二次代謝物生成; 但 Misawa (1985) 卻指出高濃度 2,4-D 較有利於 *Dioscorea deltoidea* 細胞形成 diosgenin, 由此可知因植物種類與成分不同, auxins 類植物生長調節劑具有不同的調節作用。張 (1991) 指出台灣白芷在不同濃度的 2,4-D 及 NAA 試驗中, 以不含任何 auxin 之培養基 imperatorin 含量最高⁽¹⁷⁰⁾。本試驗發現偏高濃度之 NAA (1-2 mg/L) 具有較高 corydaline 與 tetrahydropalmatine 成分; 較低濃度 2,4-D (0.5-1mg/L) 卻也有較佳的 corydaline 與 tetrahydropalmatine 成分 (圖 38, 39); 許多報告指出添加 cytokinin 類植物生長調節劑, 可以增加細胞生長和二次代謝產物的產量⁽¹⁰²⁾。Ikuta *et al.* (1980) 在 *Thalictrum thunbergii* 生成 berberine 的研究中, 報導 BA 的效果優於 kinetin⁽²⁰⁷⁾。Kobayashi *et al.* (1991) 報導於 *Thalictrum minus* 之懸浮細胞培養中, 添加 ethylene 能促進前期之 berberine 生合成, 但後期則因形成 polyphenols, 反而使細胞褐化⁽²⁰⁸⁾。張 (1991) 指出於台灣白芷懸浮細胞培養基中加入不同的 cytokinin, 發現以 BA 對 imperatorin 的生合成較有助益, 其中以 1 mg/L BA 處理時所得含量最高⁽¹⁷⁰⁾。闕 (1993) 報導當歸懸浮細胞於全量 MS 基本鹽類培養基, 細胞生長最快速及較多成分形成⁽¹²⁰⁾。本試驗發現

TDZ 處理所生成 corydaline 和 tetrahydropalmatine 成分較多，同時發現 1-2 mg/L TDZ 有較高的 tetrahydropalmatine 成分產生；而 corydaline 則以 0-0.5 mg/L TDZ 處理者較高（圖 40,41），本研究未比較 TDZ 及 BA 之間的處理效果，值得進一步探討。比較 auxins 類及 cytokinins 類，對於癒合組織二次代謝物的影響；若培養基中添加 cytokinins，對於癒合組織二次代謝物的合成有消長的作用，而 auxins 對於二次代謝物無消長的現象。此等狀況與延胡索癒合組織生長情形類似，但兩者之間關係有待進一步探討。

Yazaki and Okada (1989) 指出在 *Cornus officinalis* 的細胞培養中，光照雖有助於細胞生長，但對於 tannin 的生成有抑制作用⁽²⁰⁵⁾。本試驗顯示光照培養較不利於癒合組織的生長，而 corydaline 與 tetrahydropalmatine 含量和暗培養無明顯不同（圖 42）。

瓊脂本身含有多種不明成分之生理活性物質，其添加量多寡常影響植物生長的結果。Morimoto (1989) 報告在 *Croton sublyratiun* 的癒合組織中，增加 gellam gum 或 agarose 的濃度，雖然降低了生長速率，但卻可以促進 plannotol 的生成。Fukui (1982) 報導在細胞懸浮培養中加入少量 agar 可使 shikonin 產量增加⁽⁸⁸⁾。本試驗顯示添加 0.45-0.6 % agar 處理所得 corydaline 與 tetrahydropalmatine 有較高含量，但 1.5 % agar 處理使 corydaline 和 tetrahydropalmatine 含量偏低（圖 43）。

Tetrahydro-palmatine 成分產生的多寡，似乎取決於癒合組織生長的好壞，若癒合組織生長良好則 tetrahydropalmatine 成分也較多；反之則減少，其關連性有待進一步研究。

在添加有機物方面，本試驗結果顯示，水解酪蛋白(casein hydrolysate, CH) 和椰子汁 (coconut milk, CM), 雖有促進細胞分裂之功能，但對延胡索成分之形成卻無助益（圖 44）；培養基

中添加蛋白 不利於 corydaline 及 tetrahydropalmatine 的合成 (圖 45) ; 而添加椰子汁處理之 corydaline 與 tetrahydropalmatine 甚至有偏低現象(圖 46) ; 但添加 5-10 mg/L tyrosine 對 tetrahydropalmatine 有明顯增加 , corydaline 則以 10-15 mg/L tyrosine 處理者較高(圖 47) , 此結果與 Kamigauchi (1994) 及 Staba *et al.* (1982) 均報導延胡索添加 tyrosine , 利於有效成分產生之結果相同^(3,209)。

(二)細胞懸浮培養之成分影響

本試驗以 1.0mg/L 2,4-D 及 3% sucrose 之液體培養基 , 培養所得之懸浮細胞 , 偵測其 corydaline 與 tetrahydropalmatine 之含量 , 結果顯示 corydaline 之產量 , 以培養 12 天後其含量最多 (0.22 ± 0.01 mg/g dry wt) , 而 tetrahydropalmatine 之產量 , 則以 培養 24 天後為最多 (0.29 ± 0.01 mg/g dry wt) , 但 corydaline 含量並不高 (圖 48) 。另外本試驗發現長期繼代培養之延胡索懸浮細胞 , 每週以 HPLC 測定 corydaline 與 tetrahydropalmatine 之含量 , 結果所有檢品均無 corydaline 與 tetrahydropalmatine 成分 。 據 張 (1987) 報導 tetrahydropalmatine 經繼代培養 8 次後 , 其成分有緩慢下降現象 , 繼代培養達 15 次後 , 其成分完全消失 ; corydaline 結構近似 tetrahydropalmatine , 僅有 R5 位上甲基(CH₃)的差異 , tetrahydropalmatine 可能因培養時間、培養基種類或細胞產生變異失去前趨物.....等眾多因素而消失 , 其原因有待進一步探討。

具有分生組織之培植體 , 於適量 auxins 含量的培養基中可形成癒合組織 , 而利用癒合組織建立細胞懸浮培養 , 已成為今日許多學者的研究方向。原因不外乎細胞懸浮培養生長迅速 , 除可提供育種及原生質分離的材料外 , 利用細胞懸浮培養生產大量醫藥用二次代謝產物 , 更為製藥界提供新路程。Nakagawa

(1986) 以 *Thalictrum minus* 進行細胞懸浮培養，經 2-3 週後可得 400-800 mg/L berberine⁽²¹⁰⁾，日本三井石化於 1983 年已量產紫草 shikonin 的成分；現在臨床常用紫杉醇 (taxol) 治療卵巢癌及乳癌，具有良好的作用，此亦是相當熱門的研究課題。藉由細胞懸浮培養技術生產二次代謝產物，其商業化的生產預期可見，延胡索自古即為重要藥物，具有良好鎮痛功能，其成分 corydaline 與 tetrahydropalmatine 效用顯著且價格昂貴，至於如何改進培養基及培養環境，或以適當的誘引劑處理，使懸浮細胞能合成更多量的 corydaline 與 tetrahydropalmatine 以達到商業化生產之目標，則有待進一步的探討。

(三)塊莖之成分影響

試驗中發現癒合組織及懸浮細胞培養之有效成分含量均相近於市售品，本試驗將小苗分別以不同的化學藥劑及培養時間處理，使得體胚苗之塊莖形成及其含量 (corydaline 與 tetrahydropalmatine) 之累積，使其成分含量均遠高於癒合組織、懸浮細胞培養及市售品，由此顯示經由植物體之特定器官，例如塊莖之形成，使 corydaline 與 tetrahydropalmatine 累積之含量遠高於癒合組織及懸浮細胞培養。Kamigauchi *et al.* (1994) 及 Staba *et al.* (1982) 均指出 corydaline 和 tetrahydropalmatine 之前驅物，例如培養基中添加酪胺酸，可以提高 corydaline 與 tetrahydropalmatine 之產量^(3,209)。因此利用組織培養之方式，進行商業生產高品質及無病害之塊莖，並進一步加以控制 corydaline 與 tetrahydropalmatine 之產量，可藉由本試驗之方法達成目的，此篇為首次報導延胡索利用體胚苗生產塊莖及其 corydaline 與 tetrahydropalmatine 的成分(表 20)(圖 49 a, b)。

五、體胚的誘導及生長

Sharp *et al.* (1980) 指出經由 ABA 誘導體胚之表皮細胞可發育成體胚，認為該表皮細胞早已具有形成體胚之能力，此表皮細胞稱為胚性細胞 (pre-embryonically determined cells; PEDCs)⁽¹⁹⁷⁾。Maheswaran 與 Williams (1985) 亦證明可自 *Trifolium repens* 未成熟種子胚之表皮細胞形成體胚⁽²¹¹⁾。因此本試驗將培養於 MS 全量鹽類，添加 3% sucrose，0.5 mg/L kinetin 誘得之體胚，再移植至 0.1mg/L zeatin-riboside 之液體培養基，培養一次體胚 15 天，產生之體胚苗，可以使子葉與胚根之交接處產生膨大之塊莖，目的乃增加體胚苗表皮中，胚性細胞的數目；進而培養於含有 ABA 的培養基中，體胚苗在不同濃度的 ABA 試驗中，以 2 mg/L ABA 所誘導的體胚數雖不如 8 mg/L 之處理多，體胚苗發育為正常體胚苗的形態最佳，若培養於高濃度 ABA (12-16 mg/L)，造成體胚數目的減少，且導致體胚苗褐化(表 15, 16)。由此推論自 ABA 所誘導的體胚，乃來自於體胚苗之表皮細胞 [由垂週分裂轉變為平週分裂] (圖 36C)，而這些細胞在 ABA 處理之前，已具有形成體胚之能力即為胚性細胞，該細胞經由 ABA 誘導直接形成體胚。

六、延胡索體胚內部組織及外部形態之觀察

Raemakers *et al.* (1995) 指出許多物種，其體胚之發育僅止於圓球期，而無法發育成構造完整之體胚⁽²¹²⁾；並且亦指出不同世代之體胚，往往有不易區別之現象。本試驗將體胚苗培養於 0-16 mg/L ABA，利用 SEM 觀察發現體胚苗，發現未經過癒合組織的階段直接形成體胚，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)。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 36)。從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。延胡索之組織培養經由人工的控制之下，產生可預測、一致性且穩定之結果，對於商業化的應用極具價值。

七、延胡索組織培養苗塊莖的形成及健化

由結果得知添加 0.1 mg/L GA₃ 之液體培養基，培養 15 天後體胚之轉化率，可達 80 % 且為發育良好之體胚苗(表 18)；此一結果與植物賀爾蒙 GA 在種子發芽時所扮演的生理功能極為相似^(86,136)。將發育良好的體胚苗，先培養於 1/2 X MS 基本鹽類, 6% sucrose, 0.9% agar，一個月後可誘得約 57 % 的塊莖(表 19)(圖 33)，再繼代培養於 MS 基本鹽類, 3% sucrose 及 0.2% Gelrite 的培養基中，培養二 三個月後，可形成 0.7-1.2 cm 之塊莖，且約有 5% 的植株會開花，此一現象與 *Panax ginseng* 及 *Brassica* spp. 等植物，於試管培養中植株有開花的現象類似⁽²¹³⁻²¹⁵⁾。

本試驗取培養 3-4 個月，具有塊莖約 0.5-1.2 cm 且生長良好之試管苗，種植於泥炭土：蛭石 (1:1) 混合之培養土，栽培於每日照光 12-14 小時之溫室，二個月後調查其存活率，結果存活率達 82%，其中 36% 具有花芽(圖 34,35)。此結果與闕(2000) 將台灣龍膽 (*Gentiana davidii* var. *formosana*) 之試管苗，移植於泥炭土：蛭石 (1:1) 混合之培養土，培養 30 天後，有 86% 高存活率相同⁽²¹⁶⁾。顯示延胡索可利用組織培養大量繁殖種苗。