

生藥組織培養之研究

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCHER) 組織培養之研究： 甘草癒合組織培養及其成分之測定

中國醫藥學院 中國藥學研究所 生藥組*

張宏祺**

第一章 緒言

數千年來，我國傳統藥材多以植物性藥物為主。自國民政府遷台後，我國所需之藥材，至今仍多仰賴中國大陸進口；因此，中草藥之科學化與本土化向來為我國政府積極努力與推動政策之一，尤其近年來生物科技的蓬勃發展更為此政策帶來曙光。

甘草：自古即為我國常用中藥之一，文獻記載始於神農本草經，列為上品，歷代諸家本草皆有收載。陶弘景曰：「此草最為眾藥之主，經方少有不用者。」，因而素有『十方九草』之美譽。其應用歷史悠久，不但在我國，在世界其他國家也廣泛應用。自從二十世紀 40 年代發現甘草具有抗消化道潰瘍以後，至今各國學者已對其藥理作用及化學成分進行了深入研究⁽¹⁾。其運用已由傳統清熱解毒、祛痰止咳、補脾和胃與調和諸藥等轉而用於治療潰瘍、癌症及愛滋病等疾病。甘草甜素 (glycyrrhizin) 為甘草的主要成分之一，含量約為 6-14%，具有特殊甜味且甜度比等量蔗糖高 50 倍⁽²⁾，因而在醫藥食品工業，應用頗廣。

近年來由於甘草使用量大，造成大陸野生甘草面臨枯竭，中國大陸

* 台中市北區學士路 91 號 台灣省 中華民國

** 中國醫藥學院 中國藥學研究所 研究生

政府列為管控中藥材之一。我國雖限於自然環境之因素，多數藥材未能生產，但拜生物科技之賜，歷年來已從事多種中草藥之大量繁殖與二次代謝產物之研究^(3,4,5,6,7)。本研究即著眼於此，運用植物組織培養技術建立甘草癒合組織培養系統，並對其成分glycyrrhizin做測定。

第二章 總論

第一節 甘草之本草學考察

一、藥名之考訂

甘草名出本經⁽⁸⁾，別錄⁽⁹⁾名曰國老，並有蜜甘、美草、蜜草、落草等稱，至綱目⁽¹⁰⁾並引記事珠之說而錄靈通一名。

甘草以味甘得名，蜜甘、美草、蜜草等稱，均為此意；至於國老一稱，陶注及藥性論中有所注釋，陶注：「此草最為眾藥之主，經方少不用者，猶如香中有沉香也。國老，即帝師之稱，雖非君，為君所宗，是以能安和草石而解諸毒也。」藥性論：「諸藥眾中為君。治七十二種乳石毒，解一千二百般草木毒，調和使諸藥有功，故號國老之名矣。」

二、形態、產地、種類

(一) 形態

嘉祐⁽¹¹⁾引爾雅：「藹，大苦。注：今甘草也，蔓延生，葉似荷，青黃，莖赤有節，節有枝相當。」

圖經⁽¹²⁾：「春生青苗，高一、二尺，葉如槐葉，七月開紫花似柰，冬結實作角子如畢豆。根長者三、四尺，羸細不定，皮赤，上有橫梁，梁下皆細根也。謹按爾雅云：藹，大苦。釋曰：藹，一名大苦。郭璞云：甘草也，蔓延生，葉似荷，青黃，莖赤有節，節有枝相當。或云：藹似地黃。」

衍義：「甘草，枝葉悉如槐，高五、六尺，但葉端微尖而糙澀，似有白毛。實作角生，如相思角，作一本生，子如小扁豆，齒嚙不破。」

故爾雅所述之藹應非甘草而為黃藥，而證類本草⁽¹³⁾引本草圖經之藥圖，有汾州、府州及另一汾州甘草圖，並清代植物名實圖考⁽¹⁴⁾一圖，以圖考之圖為清晰，其葉作奇數羽狀複葉，花作總狀花序之蝶形花，且圖經云開紫花，衍義曰葉端微尖而糙澀，似有白毛。綜如上述形態之概述，可能不出 *Glycyrrhiza glabra* LINNAEUS var. *glandulifera* REG. et HERDER 及 *Glycyrrhiza uralensis* FISCHER 兩種，藤田路一博士於研究日本正倉院所保存之唐代輸入甘草，解剖鏡檢之結果為 *Glycyrrhiza glabra* LINNAEUS var. *glandulifera* REG. et HERDER。又日本古方藥品考有甘草圖，難波恒

雄博士指其為 *Glycyrrhiza uralensis* FISCHER，即東北甘草也⁽¹⁵⁾。

(二) 產地

別錄⁽⁹⁾：「生河西川谷積沙山及上郡。」

陶注：「河西、上郡不復通市，今出漢蜀中，悉從汶山諸夷中來。赤皮斷理，看之堅實者，是枹罕草，最佳。枹罕，羌地名。亦有火炙乾者，理多虛。又有如鯉魚腸者，被刀破，不復好。青州間亦有，不如。又有紫甘草，細而實，乏時可用。」

圖經⁽¹²⁾：「甘草。生河西川谷積沙山及上郡，今陝西河東州郡皆有之。並收錄汾州、府州及另一汾州甘草圖。」

衍義：「今出河東西界。」

植物名實圖考⁽¹⁴⁾：「余以五月按兵塞外，道傍轍中，皆甘草也，諦葉玩藹，卻車載之。聞甘、涼諸郡尤肥壯，或有以為杖者，蓋其地沙浮土鬆，根莖直下可數尺，年久則巨耳。」

河西⁽¹⁶⁾泛指黃河以西之地，為今之陝西、甘肅、蒙古一帶。積沙山在古今地名大辭典中並無記載，但有積石山，亦在西北甘肅境內，本草學家均解釋為積沙之山地。上郡位今陝西省，而四川省古時為蜀地，故簡稱曰蜀。汶山為岷山南下之正支，主峰在四川茂縣東南處。枹罕即今甘肅省導河縣一帶，指古之青海西藏一帶之地。青州即今山東一帶，當係泛指華北所出者。又黃河流經山西西境成南北線，故山西境內，在黃河以東者，統稱河東。汾州即今山西汾陽。府州即今陝西谷縣。故本草所記甘草，自西北迄西南青藏諸地，偶及華北一帶，為甘草之主產地⁽¹⁵⁾。

(三) 種類

陶注：「赤皮斷理，看之堅實者，是枹罕草，最佳。枹罕，羌地名。亦有火炙乾者，理多虛。又有如鯉魚腸者，被刀破，不復好。青州間亦有，不如。又有紫甘草，細而實，乏時可用。」

圖經⁽¹²⁾「今甘草有數種，以堅實斷理者為佳，其輕虛縱理及細韌者不堪，惟貨湯家用之。」

此二說相近也；本草中以西北產者為主，但 *G. glabra glandulifera* L. 及 *G. uralensis* FISCH. 兩種均屬紫花，全株有毛，且 *G. uralensis* FISCH.

在西北各地亦有出產，是以本草文獻中難於確認究屬何種也⁽¹⁵⁾。

三、性味、藥能

本草經：「甘草。味甘，平。主五藏六府寒熱邪氣，堅筋骨，長肌肉，倍力，金瘡腫，解毒。久服輕身延年。」

別錄：「國老。無毒。溫中下氣，煩滿短氣，傷藏咳嗽，止渴，通經脈，利血氣，解百藥毒。為九土之精，安和七十二種石，一千二百種草。」

嘉祐引藥性論：「主腹中冷痛，治驚癇，除腹脹滿，補益五藏，制諸藥毒，養腎氣內傷，令人陰痿。主婦人血瀝，腰痛，虛而多熱，加而用之。」又引日華子：「安魂定魄，補五勞七傷，一切虛損，驚悸，煩悶，健忘，通九竅，利百脈，益精養氣，壯筋骨，解冷熱，入藥灸用。」

至金元以降諸說極多，亦有生用、熟用之分及依藥用部位（頭、稍）之分而具有不同之功效。

四、修治、禁忌、方用

（一）修治

別錄：「二月、八月除日，採根暴乾，十日成。」

證類引雷公：「凡使，須去頭尾尖處，其頭尾吐人。每斤皆長三寸，剉劈破作六、七片，使器中盛，用酒浸蒸，從巳至午，出暴乾細剉。使一斤，用酥七兩塗上，炙酥盡為度。又，先炮令內外赤黃用，良。」

品彙精要⁽¹⁷⁾：「〔製〕炙去蘆頭，刮赤皮，生亦可用。」

本草綱目：「〔修治〕（時珍曰）方書炙甘草皆用長流水蘸溼炙之，至熟刮去赤皮，或用漿水炙熟，未有酥炙酒蒸者，大抵補中宜炙用，瀉火宜生用。」

今之甘草常用者為生用及蜜炙兩種。

（二）禁忌

藥對：「惡遠志，反大戟、芫花、甘遂、海藻四物。」

藥性論：「甘草，君，忌豬肉。」

品彙精要：「〔禁〕中滿者勿服。」

故甘草雖有解百藥毒之說，十八反歌訣中「藻戟遂芫俱戰草」即雷公藥對所述，仍需注意。

(三) 方用

圖經：「張仲景傷寒論有一物甘草湯、甘草附子、甘草乾薑、甘草瀉心等湯，諸方用之最多，又能解百毒，為眾藥之要。孫思邈論云：有人中烏頭、芭豆毒，甘草入腹即定。方稱大豆解百藥毒，嘗試之不，乃加甘草為甘豆湯，其驗更速。」

此外，外台秘要之救急瘦疾及綱目附方又增加新方二十，治療傷寒心悸、肺痿久嗽、赤白痢下、諸般癰疽等。而今日甘露飲、補中益氣湯等極多種方劑均配伍甘草。

第二節 甘草之藥用植物學考察

全世界甘草屬 (*Glycyrrhiza* L.) 植物約 24 種。我國產約 11 種，其中有藥用價值 (指含甘草甜素類成分者) 約 8 種。中國藥典 收載 3 種：甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.)、脹果甘草 (*G. inflata* BATAL.) 和光果甘草 (*G. glabra* L.) 三種⁽¹⁸⁾。

一、甘草屬植物特徵：

多年生草本或半灌木，常有刺毛狀或鱗片狀腺體；奇數羽狀複葉，小葉多數，稀 3~5 片，全緣或有微齒，無小托葉；花組成腋生的總狀花序或穗狀花序；萼裂片近相等或上面 2 枚較短且基部合生；旗瓣狹卵形或長圓形，直，龍骨瓣急尖或鈍頭；雄蕊 10，二體(9+1)，藥室於頂端聯合，花藥不等大，其中有 5 枚較小；子房無柄，有胚珠 2 至多顆，花柱絲狀或稍粗，先端內彎；莢果卵形、長圓形或線形，腫脹或扁平，不開裂或遲 2 瓣裂，果瓣有刺毛狀腺體或小瘤狀凸起，稀平滑⁽¹⁹⁾。

1998 年出版的中國植物誌將黃甘草 (*G. eurycarpa* P.C.LI) 歸入脹果甘草⁽²⁰⁾。

二、甘草之檢索表：

1、根和根莖甜或微甜，莢果線形、長圓形，含種子 2~9 枚，外面被鱗片狀腺點，刺毛狀腺體或光滑，較少有瘤狀突起；小葉橢圓形、長圓形、卵形，較少披針形

2、莢果扁平或膨脹，但不呈念珠狀，外面被鱗片狀腺點、刺毛狀腺體或瘤狀突起；小葉橢圓形或長圓形；植株較粗壯，高 30 cm 以上

3、莢果兩側壓扁，在種子同下凹或之字形曲折；在背腹面直、微彎或彎曲呈鐮刀狀至環狀

4、小葉橢圓形或長圓形

5、莢果彎曲成鐮刀狀或環狀，在序軸上密生成球形果穗，除被刺毛狀腺體外，尚有瘤狀突起.....

.....甘草 *Glycyrrhiza uralensis* FISCH.

5、莢果之字形曲折，形成長圓形的果穗，光滑或被疏散的白色茸

毛……………無腺毛甘草 *G. eglandulosa* X. Y. LI

4、小葉披針形或長圓狀披針形；莢果直或微彎，光滑或具刺毛狀腺

體……………光果甘草 *G. glabra* L.

3、莢果膨脹，直，種子間不下凹，被褐色腺點……………

……………脹果甘草 *G. inflata* BATAL.

2、莢果念珠狀，光滑；小葉 5~9 枚；植株矮小，高 10~30 cm……………

……………粗毛甘草 *G. aspera* PALL.

1.根和根莖不甜；莢果長卵形或卵圓形，有種子 2 枚，外面被黃色剛硬的刺；小葉披針形

6.總狀花序長圓形；莢果卵圓形，預端突尖，疏被剛硬刺……………

……………刺果甘草 *G. pallidiflora* MAXIM.

6.總狀花序近球狀；莢果長卵形，預端驟尖，密被剛硬的刺……………

……………雲南甘草 *G. yunnanensis* Cheng f.et L.K.Dai ex P.C.LI

三、甘草正品藥材之形態特徵^(20,21)：

依據中國藥典記載甘草藥材來源為豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.)、脹果甘草 (*G. inflata* BATAL.) 或光果甘草 (*G. glabra* L.) 三種的乾燥根及根莖。茲將其形態特徵及產地詳述於後：

(一) 甘草：*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.

多年生草本，高 30~80cm，罕達 1m。根莖圓柱狀，多橫走；主根甚長，粗大，外皮紅棕色至暗棕色或暗褐色。莖直立，稍帶木質，被白色短毛及腺鱗或腺狀毛。奇效羽狀複葉，托葉披針形，早落；葉片長 8~24 cm，小葉 5~17，小葉片窄長卵形，倒卵形或闊橢圓形至近圓形，兩面被腺鱗及白毛，下面毛較密。總狀花序腋生，較葉短，花密集，長 5~12 cm；花萼鐘狀，長約為花冠的 1/2，萼齒 5，披針形，較萼筒略長，外被短毛及腺鱗；花冠淡紫堇色，長 14~93 mm，旗瓣大，長方橢圓形，先端圓或微缺，下部有短爪，龍骨瓣直，較翼

瓣短，均有長爪；雄蕊 10，9 枚基部連合，花絲長短不一，花藥大小亦不等；子房無柄，上部漸細成短花柱。莢果扁平，多數緊密排列成球狀，窄長，彎曲成鐮狀或杯狀，密被絨毛腺瘤，黃褐色刺狀腺毛和少數非腺毛。種子 2~8，扁圓形或腎形，黑色光亮。花期 6~7 月，果期 7~9 月。

生於向陽乾燥的棕鈣土，含鹽分較少、土層深厚、排水良好的鈣質草原。在河岸沙質土生長良好。在土壤鹽分重或鹼灘地生長不良或不能生長。

分布於黑龍江、吉林、遼寧、河北、山東、山西、內蒙古；陝西、寧夏、甘肅；青海、新疆等省。

(二) 光果甘草：*Glycyrrhiza glabra* L.

植物體密被淡黃褐色腺點和鱗片狀腺體，常局部有白霜，不具腺毛。小葉片較多，約 19 片，窄長平直，長橢圓形或窄長卵狀披針形，兩面均淡綠色，上面無毛或有微柔毛，下面密被淡黃色、不顯明的腺點。花序穗狀；較葉為短，花稀疏。果序與葉等長或略長，莢果扁而直，多為長圓形，無毛，亦無腺毛，有時具少許不顯明的腺瘤。種子通常數目較上種為少。花期 6~8 月，果期 7~9 月。

生長於荒漠、半荒漠或帶鹽鹼草原、撩荒地，生長條件大體與甘草同，但生態幅度沒有甘草廣。

分布於新疆北部、青海、甘肅。分布歐洲以地中海為中心，為前蘇聯主要的甘草植物資源。

(三) 脹果甘草：*Glycyrrhiza inflata* BATAL.(*G. eurycarpa* P. C. LI; *G. korshinskyi* auct non. G. GRIG.)

植物體局部常被密集成片的淡黃褐色鱗片狀腺體，無腺毛，有時有微柔毛或無毛。根與根狀莖粗壯木質，外皮褐色。小葉 3~7(~9) 枚，卵形、橢圓形至長圓形，先端銳尖或鈍，基部近圓形，兩面被黃褐色腺點，下面有似塗膠狀光澤，邊緣或多或少波狀，乾時有皺褶。總狀花序腋生，具多數疏生的花；總花梗與葉等長或短於葉；花萼鐘狀，長 5~7 mm，萼齒 5，披針形，與萼筒等長；花冠紫色或淡紫色，翼瓣長橢圓形，翼瓣與旗瓣近等大，明顯具耳及瓣柄。莢果短小，直或微彎，橢圓形或長圓形，二種子間脹膨或與側面不同程度下隔，被褐色的腺點和刺毛狀腺體，無腺毛或疏被長柔毛。種子 1~4 枚。花期 5~7 月，果期 6~10 月。

一般生於河岸險地、農田邊、荒地，亦生長於鹽漬化壤土的蘆葦灘草地。

分布於內蒙古、新疆南部的塔里木盆地及東部哈密、吐魯番為中心，東達甘肅的酒泉和金塔一線以西地區。

四、甘草之栽培^(21,22,23,24)：

甘草為多年生豆科作物，是主要藥用植物之一，素有十方九草“百藥之王”美稱，同時也是防風固沙，防止水土流失的天然植物資源，2000年中國將甘草列為國家緊控物資，不准隨意挖取野生甘草，因此人工栽培種植甘草越來越引起中國各級政府及廣大農民的重視。

(一) 甘草之生態習性與栽培技術：

生態習性：

甘草分布於大陸性氣候帶，以其很深的根吸收地下水，來適應乾旱的環境條件，地上部分每年秋末死亡，根及根莖在土中越冬，翌年春3~4月從根莖上長出新芽，長枝發葉，5~6月枝葉繁茂，6~7月開花結果，9月莢果成熟。主要生長在鈣質土上，在荒漠草甸土和鹽化草甸土也可生長，能忍受輕度鹽鹼，最宜沙質或沙壤質土壤，在綠洲村庄附近、田邊、渠沿、路旁、果園荒地等零星分布。

栽培技術：

(1) 種子繁殖

一般於春季用苗床育苗，苗床應遺排水良好和向陽的地方，深翻土壤，施入腐熟堆肥，耙平後，作成寬90~120 cm，長300~450 cm的畦。選取優良充實的種子，用30℃左右的溫水浸2~3小時，然後條播或點播，條播，先在畦內按15 cm左右的行距開溝，將種子均勻撒入溝內。若點播株距約為3~5 cm。播後覆土5 cm左右，然後澆水，再覆蓋稻草，待發芽後除去覆草。移苗可於當年九月或翌年春天進行，按行距90 cm，株距30 cm栽種。

(2) 根莖繁殖

於春季或秋季將根挖出，粗根入藥，選出細根剪成半尺左右，有1~2個芽的根段，按90 cm的行距開溝，按半尺的株距將根段順序排列在溝內，溝深12~15 cm，覆土壓實，即可成活。

(3) 田間管理

種子發芽後，過密處應行間苗。生長期間，特別是苗期，應隨時注意鬆土和除草，一般可除草 2~3 次。肥料以腐熟的廐肥，過磷酸鈣及糞稀為主，於每年生長期間施用 1~2 次。在酸性土壤上可適量施用石灰，中和土壤酸性，促進根的發育。

(4) 病蟲防治

病害有銹病，危害葉、莖，形成黃色夏孢子堆，後期為褐色冬孢子堆，致使葉黃，嚴重時葉脫落。發病初期用粉銹寧 1000 倍液噴霧。白粉病，葉部正面如覆白粉，後期致使葉黃。用 0.3~0.5 波美度石硫合劑噴灑。蟲害有蚜蟲、紅蜘蛛，用 40% 樂果 1000~1500 倍液噴霧防治。

(5) 採收加工：

種子繁殖第三、四年根莖繁殖第二、三年後春季芒種前，秋季白露後，均可採收，以秋季為好。挖出後，趁鮮切去枝叉，鬚根及莖基，晒至半乾，按粗細分別紮成小捆，再晒至全乾。

第三節 甘草之生藥學文獻考察

- (1) 2003 年朱緒民等學者從甘草中分離出 2 個 triterpenoid saponins、2 個 coumarins 和 8 個 flavonoids⁽²⁵⁾。
- (2) 2001 年 Lauren 等學者研究有效萃取及偵測甘草屬新鮮根及乾燥根所含的 glycyrrhizin 成分⁽²⁶⁾。
- (3) 2001 年張繼等學者在甘草生物鹼成分的分析及含量測定之研究中表示：甘草生物鹼成分為 quinoline 和 isoquinoline 衍生物類，總含量平均為 0.29 %，此結果為生物鹼類藥物的生產及甘草的進一步開發利用提供科學依據⁽²⁷⁾。
- (4) 2000 年陳志強在中藥材甘草成份分析論文中分離出十個化合物，經光譜資料之分析，鑑定其結構有九個屬於 flavonoids 類化合物，分別為 liquiritigenin、4',5-dihydroxy-3,7-dimethoxy-flavone、licoflavonol、topazolin、formononetin、isoangustone A、4,2',4'-trihydroxy-chalcone、isoliquiritin、isoliquiritin apioside。另外，一個結構屬於 coumarin 類化合物，為 glycycomarin⁽²⁸⁾。
- (5) 2000 年李偉東及關毓銘兩位學者從刺果甘草中分得 3 個化合物分別為 hexadecic acid、ononis spinosael ement、isoliquiritin。其中 hexadecic acid 首次從刺果甘草中分得⁽²⁹⁾。
- (6) 2000 年梁玉玲等學者在脹果甘草癒傷組織培養及甘草酸含量分析中，將脹果甘草的根、胚軸、子葉分別接種到含有不同激素組合的 MS 培養基上，在光照或黑暗下培養，將根接種到液體培養基中培養。結果發現不同的激素組合對癒傷組織生長和甘草酸質量分數的影響是不同的⁽³⁰⁾。
- (7) 1999 年戰旗及王蕾兩位學者對國內外採用薄層掃描、高效液相色譜、分光光度法等測定甘草次酸含量的方法進行了綜合分析，認為採用薄層掃描法檢測甘草藥材和飲片質量為宜⁽³¹⁾。
- (8) 1999 年藍文孝在甘草成分抑菌性之研究中探討極性不同溶劑萃取物之抑菌圖譜，甲醇萃取物之抑菌活性，並對甲醇萃取物之抑菌成分分離純化，純化之抑菌化合物進行抑菌性質測定。結果顯示甲醇萃取物具有最佳之抑菌圖譜⁽³²⁾。
- (9) 1999 年李偉東與關毓銘兩位學者從刺果甘草中分得 5 個化合物分別為 homopterocarpin、 β -sitosterol、4',7-dimethoxy-isoflavone、

medicarpin、isoglabrol⁽³³⁾。

- (10)1999 年張繼等學者在烏拉爾甘草營養成分的分析研究中，對烏拉爾甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)地下、地上部分分別進行了微量元素及營養成分的測試分析。結果顯示，烏拉爾甘草中糖、蛋白質、脂肪含量較高，並且含有豐富的礦質元素⁽³⁴⁾。
- (11)1998 年孫淑巧等學者對甘草提取甘草甜素後的殘液進行研究，經溶劑提取、矽膠柱層析分離，共分離鑑定了 21 種化合物⁽³⁵⁾。
- (12)1997 年許旭東等學者從黃甘草 (*Glycyrrhiza eurycarpa*) 根及根莖中分到 4 個化合物⁽³⁶⁾。
- (13)1997 年張聿梅等學者從黃甘草 (*Glycyrrhiza eurycarpa*) 根及根莖中分得 5 個異黃酮化合物⁽³⁷⁾。
- (14)1996 年劉艷華及傅克治兩位學者在不同土壤環境生長烏拉爾甘草主要化學成分含量測定之研究中得知：不同土壤生產的甘草產品間存在差異⁽³⁸⁾。
- (15)1996 年李樹殿等學者自烏拉爾甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.) 葉中分離得到 10 餘種化合物⁽³⁹⁾。
- (16)1995 年沈鳳嘉等學者在烏拉爾甘草化學成分的研究中分離鑑定得 6 個化合物其中 6'-O-acetyllicuritin, 3 β -formylglabrolide, 22 β -acetylglabric acid 為新化合物，首次從該植物中獲得⁽⁴⁰⁾。
- (17)1995 年胡金鋒等學者在雲南甘草中分離出 10 個化合物⁽⁴¹⁾。
- (18)1995 年王靜竹等學者在甘草及其炮製品中甘草酸的含量測定之研究中得知：蜜製法並未使甘草酸含量明顯減少⁽⁴²⁾。
- (19)1994 年馮元忠及馮德誠兩位學者以脹果甘草 (*glycyrrhiza inflata*)、光果甘草 (*G. glabra*)、烏拉爾甘草 (*G. uralensis*) 為對象，對 1-4 年生主根及根莖內部結構的變化及粉末作比較研究⁽⁴³⁾。
- (20)1994 年賈世山等學者在甘草地上部分的活性成分和資源利用之研究中指出：甘草的地上部分和地下部分相交叉重複的黃酮類化合物有 10 個，分別為：isoavoroside、schaftoside、pinocembrin、liquiritigenin 和 isoliquiritigenin 等 10 個化合物⁽⁴⁴⁾。
- (21)1994 年闕毓銘等學者從刺果甘草 (*Glycyrrhizin pallidiflora*) 的根和根莖中分離得 42 個化合物結晶⁽⁴⁵⁾。

- (22)1994 年張海軍等學者從烏拉爾甘草根中分離得 5 種化合物，經鑑定為 isoformononetin-4'-glucoside、liquiritin、isoliquiritin、liquiritigenin-7、4'-diglucoside 及 neisoliquiritin⁽⁴⁶⁾。
- (23)1990 Fenwick 等學者指出：甘草根中萃取物包含有，essential oils, polysaccharide, polyamines, triterpenoids 和 flavonoids 等類成分⁽⁴⁷⁾。
- (24)1979 年文獻即有記載甘草中的重要成分為 glycyrrhizin，其含量約為乾根重的 3.63-13.06 %⁽⁴⁸⁾。

第四節 甘草之藥理學文獻考察

- (1) 2002 年學者 Kumaday 研究長期使用 glycyrrhizin 治療慢性 C 型肝炎以預防肝硬化和肝癌，結果顯示 glycyrrhizin 的長期治療對慢性 C 型肝炎病人，有防止 hepatocellular carcinoma 的發展。Glycyrrhizin 用在對干擾素無反應的慢性 C 型肝炎病人和各種原因不能用干擾素治療的那些人中特別有益⁽⁴⁹⁾。
- (2) 2002 年 Hsiang 等學者對 glycyrrhizin 在 activator protein 1 的活動差異調節做了研究，結果可為 glycyrrhizin 在治療癌症的新化學療法中的生物活性提供佐證⁽⁵⁰⁾。
- (3) 2002 年 Yoh 等學者研究 glycyrrhizin 在肝膽的 glucocorticoid signaling pathway 的影響，結果顯示 glycyrrhizin 透過減少 heat-shock protein 90 的表現來減少 glucocorticoid receptors 與配位子的關係⁽⁵¹⁾。
- (4) 2002 年王麗香在生甘草對關木通誘發大鼠急性腎毒性之效應：證實了生甘草可減輕關木通的急性腎臟傷害以及胃部傷害⁽⁵²⁾。
- (5) 2001 年 Sekizawa 等學者研究 glycyrrhizin 增加患有 herpes simplex encephalitis 老鼠存活試驗中：證明 glycyrrhizin 的刺激影響老鼠的防禦系統使能對抗一型單純皰疹病毒（HSV-1）的感染⁽⁵³⁾。
- (6) 2001 年 Jung 等學者在研究 glycyrrhizin 在 B16 黑色素瘤細胞中對黑色素生成的刺激作用，結果顯示 glycyrrhizin 引起的黑色素生成刺激作用很有可能透過轉錄激活發生⁽⁵⁴⁾。
- (7) 2001 年 Kimura 等學者研究 glycyrrhizin 和一些類似物透過表皮的成長因子感受器，引起最初養殖成年老鼠的肝膽成長之影響，結果顯示 glycyrrhizin 和一些類似物，是結合 epidermal growth factor 感受器的初級肝膽有絲分裂，其後刺激 tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase 這個感受器的路徑，引起肝膽 DNA 合成和增殖⁽⁵⁵⁾。
- (8) 2001 年史桂蘭及胡志浩兩位學者在甘草酸藥理作用及臨床應用研究進展報導指出：甘草酸類的藥理作用是多方面的，其應用已向抗病毒、抗愛滋病毒、抗癌、防癌、增強免疫力等領域拓展。因此，深入進行該類藥物的研究具有重要的意義⁽⁵⁶⁾。
- (9) 2001 年王玲在甘草及其主要成分藥理作用的實驗研究結果中表

示：人在子宮肌組織內存在 Phospholipase A2 的活性。甘草和甘草次酸可能是通過抑制子宮肌組織 Phospholipase A2 的活性而使花生四稀酸代謝受阻，降低子宮肌組織前列腺素濃度，緩解子宮肌的痙攣收縮⁽⁵⁷⁾。

- (10)2000 年經總在甘草之生物藥學研究中，發現市售甘草藥材雖有甲、乙、丙、丁各種等級，但同等級藥材間含量相差甚多，而各等級藥材間之含量並無顯著差異。甘草經蜜炙後，甘草酸之含量並無明顯差異⁽⁵⁸⁾。
- (11)2000 年王岳五等學者在甘草殘渣中 polysaccharide 抗腫瘤作用的研究中，證實自甘草殘渣中分離一種水溶性葡聚糖 polysaccharide，其急性毒性實驗證明其屬無毒物質。通過體內抑瘤實驗證明，polysaccharide 對小鼠 sarcoma-180 及艾氏腹水移植瘤皆有明顯抑制作用⁽⁵⁹⁾。
- (12)2000 年沈以鳳等在愛滋病治療藥物應用中得知，glycyrrhizin 在機體不僅具有誘導干擾素及增強自然殺傷細胞活動功能，且能抑制免疫缺陷病毒（HIV）增殖，並具有免疫激活作用⁽⁶⁰⁾。
- (13)1993 年羅德仁在甘草次酸衍生物 carbenoxolone 對 prednisolone 藥物動力學影響之研究論文中探討 carbenoxolone (CBX)在家兔體內對 prednisolone (PSL) 藥物動力學之影響。結果顯示，單次劑量的 CBX 不影響 PSL 在家兔體內的分佈代謝及排泄，就藥物動力學的觀點，不會發生交互作用。多次劑量投與 CBX 會使 PSL 的血中濃度升高，PSL 在家兔體內的代謝、排泄變慢，但不影響 PSL 的分佈⁽⁶¹⁾。
- (14)1999 年張芸潔在甘草次酸對培養的幼鼠心肌細胞接合之影響：功能及形態學研究其結果顯示：18 β -GA 先抑制了間隙接合的溝通功能，才影響 Cx43 的染色，之後 N-cadherin 的染色方受影響。因此黏附蛋白之穩定性，也有賴完整的間隙接合功能來維持⁽⁶²⁾。
- (15)1998 年賈國惠及賈世山兩位學者在甘草中黃酮的藥理作用研究進展中表示：甘草及其地上部分中黃酮類成分是甘草中重要的有效成分，是很值得研究的⁽⁶³⁾。
- (16)1998 年朱自平等學者探討生甘草和白癬皮對消化系統的影響，結果顯示生甘草對小鼠蓖麻油性腹瀉有較弱抑制作用⁽⁶⁴⁾。
- (17)1996 年吳勇杰研究甘草次酸鈉的鎮咳、消痰、降低氣道阻力作

- 用，結果顯示甘草次酸鈉有鎮咳、消痰、降低氣道阻力作用⁽⁶⁵⁾。
- (18)1995 年林宜信在甘草與豬苓等數種中藥對於照射過伽瑪射線小鼠細胞免疫效應之研究中，發現甘草及甘草酸對於照過 γ -射線小鼠之脾臟損傷具有顯著的促進修復作用⁽⁶⁶⁾。
- (19)1994 年 Kelloff 等學者指出甘草具有很多的藥理作用，包括有去毒、抗氧化、抗潰瘍、抗過敏和抗病毒等作用⁽⁶⁷⁾。
- (20)1994 年董菁等學者證明在一定濃度下，甘草葉中的黃酮類成分對小鼠的 bone marrow cell (BMC) 和 peritoneal exudate cell (PEC) 胞無直接毒性作用，但能誘導 BMC 和 PEC 產生具有殺傷作用的細胞毒因子⁽⁶⁸⁾。
- (21)1989 年彭智聰等學者證明甘草蜜製後增強了緩急止痛的功效，其中蜜製甘草臨床效果優於生甘草⁽⁶⁹⁾。
- (22)1988 年 Hantano 等學者，報道了甘草根中黃酮類成分的清除自由基作用。作用強弱依次為：licochalcone B ($2.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) > licochalcone A ($12 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) > isoliquiritigenin ($96 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) > liquiritigenin ($100 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)⁽⁷⁰⁾。
- (23)1986 年呂圭源等學者報導甘草無論生品、炒品和蜜炙品，解癭作用無論在單味使用時還是在複方中使用均無顯著差異⁽⁷¹⁾。
- (24)1984 年黃維良等學者報導：炙甘草對抗因 BaCl_2 誘發的大鼠心律失常作用優於生甘草⁽⁷²⁾。

第五節 植物組織培養考察

組織培養係利用不同生物細胞具有不同特性的原理，為生物技術之基礎，而生物技術廣泛來說，是一門包含植物學、微生物學、免疫學、分子生物學、生物化學、遺傳學、化學工程及電子工程學之綜合性科技⁽⁷³⁾。

「生物技術」(biotechnology)，一詞源於英文 bio (生命、生物) 及 technology (工藝、技術) 兩字，涵蓋了醫藥工業、食品發酵工業、化學工業、能源工業、礦業、農業及環境工程等。就應用層面而言，生物技術乃是指利用生物細胞或其代謝物質製造產品及改進人類生活品質的科學技術。因而蘇遠志教授將生物技術定義為：利用生物程序、生物細胞或其代謝物質來製造產品及改進人類生活素質的科學技術^(74,75)。近幾年來因生物技術快速發展，使得植物組織培養技術日益精進。目前組織培養技術已廣泛應用於農藝、園藝、林業、色素、香料、製藥及生物農藥等方面，更在傳工程及藥學研究上佔有一席之地。

植物組織培養係利用植物體的細胞具有特殊的分化全能性(totipotency)，即每個細胞具有該植物的全部遺傳信息的特性，以及離體細胞在某一適當培養條件下，能發展成為完整植株的潛在能力，使其在人為的環境中以人工培養基，進行器官、組織、細胞增殖或分化培養之一種技術^(74,76,77)。學界更將植物組織培養定義為自植物體取出部分組織或器官為培植體(explant)，如胚、花器、莖頂、生長點、芽體、葉、根、根莖、或其衍生的細胞及原生質體等，在含有無機鹽類、糖類、植物生長調節劑等人工培養基上，以無菌方式培養，並觀察其生理及型態之反應，得到大量的繁殖個體或進行育種、生理等之研究與改良⁽⁷⁵⁾。

植物組織培養發展史可分成五個階段：

第一階段是思想準備時期，可追溯至 1667 年 Hooke 發現細胞開始，此為生物學中首次出現細胞的概念。其後 1756 年 Duhamel 發現癒合組織；1838 年 Schleiden 提出植物細胞學說；1839 年 Schwann 認為細胞學說亦可適用於動物細胞範疇，提出了細胞是生物體的基本結構，具有生理及發育上潛在全能性功能的論點，亦即每個細胞係一單位之生活物質團塊，此論點遂成為植物組織培養研究的思想基礎⁽⁷⁸⁾。

第二階段為理論奠基時期，1902 年德國植物學家 Haberlandt 首次以人工分離培養植物單細胞，提出植物單細胞具有分化全能特性的

理論，1908 年 Goebel 以薯蕷 (*Dioscorea* sp.) 及 罌粟科紫堇屬 (*Corydalis* sp.) 為材料進行試驗，發現切口上部發芽，而下部長根，同時發現其體細胞具有分化全能特性⁽⁷⁹⁾。1904 年德國植物胚胎學家 Hanning 以胡蘿蔔為材料，首次獲得成功的胚培養，提早了植株的形成。1922 年 Knudson 報導將蘭花種子以無菌播種法成功的獲得植株。1925 年 Laibach 進行亞麻種間雜種幼胚培養，成功地得到了雜種植物。1933 年李等進行銀杏離體胚培養，可於 3 mm 以上之胚長成小植株，並發現胚乳抽出物能促進銀杏離體胚的生長，為後人利用植物體組織抽出液促進培養物之生長，提供了試驗的根據，此階段由於分化細胞全能性學說及許多學者的探索性實驗研究，獲得不少有價值的結果，讓後來的學者有所依據，而邁入第三階段⁽⁷⁸⁾。

第三階段為技術建立時期，當 1934 年 White 用無機鹽類、糖類和酵母抽出物的培養基，進行蕃茄根尖離體培養，繼代培養建立了第一個活躍生長的無性繁殖系之後，1937 年 White 發現維生素 B 群對培養之離體根生長具有重要性，同時，Went 等發現 IAA 及其控制植物生長中之作用，1942 年 Overbeek 等首次利用椰子汁培養蔓陀蘿的幼胚，此液體胚乳含豐富滋養胚生長的養分外，並認為對細胞的增殖有極佳的效果，因此在培養基中添加未知成分的抽出物，該配方歸為自然培養基 (natural medium)，而椰子汁和其它抽出物至今仍被延用。此階段，由於 White、Gautheret 及 Nobecourt 等人，在基礎上建立了植物組織培養的綜合培養基，其中包含無機鹽類、有機成分和生長調節因素，這是隨後創立的各種培養基的基礎，成為當今各種植物組織培養的技術基礎⁽⁷⁸⁾。

第四階段，由於植物實驗形態學方面的需求，組織培養進入探討調控細胞培養物器官分化之研究。1948 年 Skoog and Tsuei 在煙草莖切段和髓培養研究中，發現腺嘌呤與腺苷以解除培養基中生長素 (IAA) 對芽的抑制作用，進而發現腺嘌呤與生長素的比例是控制芽體和根分化的決定性因素之一⁽⁷⁸⁾。1957 年 Skoog and Miller 調節 auxin 與 cytokinin 的使用濃度，得到再生植株⁽⁸⁰⁾。1958 年 Steward 等學者將細胞誘導成體胚⁽⁸¹⁾。而後陸續建立 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) 等綜合性植物組織培養基⁽⁸²⁾。此階段從開始研究培養細胞的發生，同時證實細胞培養的全能性，這是植物組織培養的關鍵時期，也是組織培養的全盛時期。

自 1950 年獲得培養細胞分化成功後，證明植物分化全能的特性，以及每一個細胞均攜帶有完全的遺傳基因之理論，自此進入組織培養的應用研究時期的第五階段。組織培養發展至今，已建立了一套完整的植物組織培養技術，現正朝向擴大各種經濟作物上的研究，如加強細胞生長、生化機理和遺傳變異的研究，將傳統植物組織培養帶入另一個嶄新的遺傳工程世界^(78,82)。

1974 年 Murashige 提出植物組織培養可分成三大階段，第一階段『無菌培植體之建立』、第二階段『大量繁殖』及第三階段『移植前之馴化處理』⁽⁸³⁾。由於植物組織培養具有：1. 節省大量的空間及時間；2. 培養過程不受外在環境因子的影響，且終年均可進行；3. 可重複性等三大優點。因此常被廣泛推展與應用於下列範疇：

- A. 利用莖頂培養技術於短時間內，可獲得無病毒苗及大量繁殖的植株；
- B. 利用花藥培養單倍體及同質雙倍體植株，縮短育種年限提高選拔效率；
- C. 試管授精與胚培養技術，克服植物遠緣雜交不親合之障礙，以拯救瀕臨死亡或退化的幼胚；
- D. 利用組織培養細胞從事誘變，以擴大親代種質或篩選有價值的新品種；
- E. 細胞培養形成之擬胚體，可製造人工種子或應用超低溫冷凍保存技術貯存種子；
- F. 利用原生質體分離、培養及融合可產生體細胞雜種；
- G. 利用二階段培養，大量生產二次代謝物，應用於製藥、香料及色素等工業上，亦可結合農桿菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 基因轉殖，產生大量根毛 (hairy roots) 或生產二次代謝物，應用於製藥工業；
- H. 利用 DNA 重組技術及農桿菌進行形質轉換，配合組織培養的方法，將有用的基因導入缺乏此基因之植株中，因此有效的縮短品種改良的年限。

由於植物組織培養有著如此廣闊的應用前景，遂使植物組織培養技術倍受先進國家學者所熱衷研究^(74,75,77,78)。

近幾年來因生物技術的快速發展，使得組織培養技術日新月異。在藥學研究上，運用植物『細胞工廠』觀念來製造合成成分(代謝物)。1851 年德國人 Kossel 提出一次代謝產物 (primary metabolite) 及二次代謝產物 (secondary metabolite) 的論點，所謂一次代謝產物，乃指生物體生長及存活不可或缺的元素；二次代謝產物，則衍生自一次代

謝物，其化學結構較複雜，由特殊遺傳形質所控制，非全部植物細胞均具合成二次代謝物之能力。植物體具有很強的生合成能力，所合成的化合物種類繁多且範圍廣泛，目前已知的三萬多種天然化合物中，大約有 80% 來自植物。但近年來自然環境的被破壞，使得具經濟價值植物的開發與利用更加困難。由於利用植物組織和細胞培養的方法，可有效地縮短繁殖和栽培的時間，且培養的細胞於人工控制下，可進一步利用科學方法，提高代謝物之品質和產量。

植物組織培養影響因子相當多，包括植物本身之特性、培養方式、培養環境及培養基之組成等，如何建立一個生長良好，且可提高二次代謝產物產量的培養方式，茲將影響植物組織培養所收集之相關文獻整理如下：

一、 培植體之選擇

培植體的選擇影響到器官的分化能力。雖然植物細胞具有分化全能性，但有時只侷限於某些細胞。1977 年 Murashige 認為選擇培植體時須考慮：取材部位、培植體大小、培植體之年齡及採樣季節等因子⁽⁸⁴⁾。一般培植體之選擇，需依材料特性及實際需要而定，除了培養系統的形式外，培植體的選擇對產品的質與量有所影響。通常植物的分生組織及生殖器官如胚、未成熟胚、下胚軸、胚珠、花柄、未成熟子房、幼根、主根、葉柄等細胞分裂旺盛部位之培植體，各具有不同之分化能力。一般研究顯示以莖頂為大量繁殖之培植體，其成功機會遠較其他組織為佳。

培植體的來源部位、成熟度或季節所採取的材料，產生的芽體、癒合組織或體胚的能力可能也不同，甚至影響到活性成分的產生。1981 年陳等學者指出，黃蘗在春天之癒合組織誘導率為 100%，培養三天後即可形成顏色透明嫩綠之癒合組織；夏天所採之培植體，則需一週始可誘導質地較硬之癒合組織；秋天則更遲⁽⁸⁵⁾。一般認為經過低溫打破休眠，或生長週期之初，為最佳採樣與培養季節。1983 年 Hiraoka 等學者報導柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 近頂芽尖端之嫩芽，誘導癒合組織能力可達 100%，隨著葉片年齡增加，誘導率驟降，老葉幾乎喪失癒合組織之誘導力⁽⁸⁶⁾。1985 年 Jenny 等學者指出松 (*Pinus radiata*) 之子葉年齡，直接影響芽體形成，可能是較老之子葉，所含內生性 cytokinins 和 gibberellins 量少，不易形成分生組織⁽⁸⁷⁾。1987 年 Nigra et al. 指出茄科之 *Solanum eleagnifolium* 不同部位之組織，如下胚軸、子葉、根、葉及果實等，所形成之癒合組織，各有不同之生長速率，內含之 solasonine 亦隨著培養期間長短而有所變化

(88)；因此植物的再生能力與取材部位有極大之關係；其成分含量也隨取材部位而有不同。1991年 Margarita and Margarita 指出毛地黃 (*Digitalis thapsi*) 以葉、根和下胚軸誘導的癒合組織中，以下胚軸為來源的癒合組織再生芽之能力最強⁽⁸⁹⁾；因此生長旺盛的培植體，是培養成功與否的重要因素。綜上所述，培植體的來源部位不同、大小不同或年齡不同，其組織分生能力將不盡相同，因此培植體對組織培養的成敗，有著決定性的影響，如何選擇適當的培植體，是值得研究的重要課題。

二、 培養基的組成

要建立一個成功的植物組織培養系統，除了培植體的選擇外，培養基的組成對植物之生長或繁殖影響甚鉅，隨著植物種類或生長時期的不同，所需求之營養成分及濃度亦有差異，可利用不同培養基的組成或比例上的改變來達成目的。一般草本類植物之組織培養，使用最普遍的基本培養基為 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培養基⁽⁹⁰⁾，根據 1981年 Evans 等學者統計，作物類有 70% 的培植體，皆由 MS 培養基誘導體胚⁽⁹¹⁾；木本植物則以 WPM (Lloyd & McCown, 1980) 培養基最為常見⁽⁸²⁾。植物組織培養培養基內所含的成分大致可區分為：1.大量鹽類；2.微量鹽類；3.維生素；4.醣類；5.植物生長調節劑；6.未定組成之添加物；7.前驅物與誘導劑等七大類。

(一) 大量元素

大量無機鹽類包括 N、P、K、Ca、Mg 及 S 等六種元素，此乃高等植物生長不可或缺的養分。1980年 Wang and Hu 指出早期 White 培養基廣泛被應用於莖頂培養，後來學者繼續研究改進，發現提高 N、P、K 三種元素，及加入 EDTA 與鐵源產生螯合型態，可防止鐵離子於高 pH 時產生沉澱；在此觀念影響下研發出著名的 MS 培養基⁽⁹²⁾。MS 培養基總鹽類濃度為 93.41 mM，為含高濃度大量元素之培養基，以其優異組合作各種不同濃度稀釋，可適用於極多種類之植物。

氮源

氮 (N) 顯著影響植物的形態及生長，一般氮源可分成無機氮源與有機氮源，無機氮源包括硝酸鹽 (NO_3^-) 及銨鹽 (NH_4^+)，有機氮源包括了氨基酸及其衍生物，如 casein hydrolysate (CH)、tryptone、peptone、arginine、aspartic acid、glutamic acid 及 tyrosine 等。硝酸

鹽是組織培養中氮源最重要的型式，吸收後可使培養基變為鹼性，若以銨態氮 (NH_4^+) 為氮源，則細胞吸收後使培養基變酸性，所以培養基中使用 NH_4^+ 、 NO_3^- 、銨鹽及少量硝酸鹽，一方面可當作氮源，另一方面可穩定培養基的 pH 值。1980 年 Gandaedaja 指出石斛 (*Dendrobium phalaeopsis*) 的頂芽試驗，發現 NH_4^+ 比 NO_3^- 的效果佳，但發根時卻以 NO_3^- 較佳⁽⁹³⁾。1981 年 Erdei 等學者指出 LS (Linsmaier and Skoog, 1962) 培養基的氮含量改為 1/5 時，可縮短法國毛地黃 (*Digitalis lanata*) 的發根時間⁽⁹⁴⁾。1985 年 De-Ehnamkul and Ellis 指出紫草科之 *Anchusa officinalis* 的細胞懸浮培養，改變 B₅ 培養基的 NO_3^- 為 15 mM 時生長情形較佳，產生 rosmarinic acid 的量最多⁽⁹⁵⁾。Yamamoto and Yamada (1986) 指出印度蘿芙木 (*Rauwolfia serpentina*) 的培養基中 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ 的比例改變，生合成 reserpine 的量也不盡相同， NO_3^- 可以促進 reserpine 之產生⁽⁹⁶⁾。1988 年 Kim 等人發現大戟科鐵海棠 (*Euphorbia milli*) 的細胞培養於 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+ = 1$ 時，anthocyanin pigment 的生合成最迅速⁽⁹⁷⁾。1994 年 Tsay 等學者在白芷懸浮細胞培養中，發現 $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+ = 1/2$ 時，imperatorin 產量最多⁽⁹⁸⁾。1994 年 Cao and Tibbitts 指出 NH_4^+ 與 NO_3^- 配合使用，可使 pH 值之容許範圍增大，且效果比單獨使用者好⁽⁹⁹⁾。

有機氮源包括氨基酸及其衍生物，如 casein hydrolysate (CH)、tryptone、peptone、arginine、aspartic acid、glutamic acid 及 tyrosine 等，較有利於體胚或器官的形成。1984 年 Stuart and Strickland 指出苜蓿 (*Medicago sativa*) 培養基中添加 proline 可刺激體胚形成⁽¹⁰⁰⁾。Casein hydrolysate 是最常用的有機氮源，1972 年 Fannesbech 指出 2-3 g/l CH 有助於蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 芽球之生長⁽¹⁰¹⁾。1983 年 Siriwardana and Nabors⁽¹⁰²⁾ 及 1987 年 Raina⁽¹⁰³⁾ 等人指出添加 240 μM L-tryptophan，可提高植物的生產率。因此於組織培養中，尋求適當的氮源、無機氮源或有機氮源，乃至此兩者的組合，極為重要。

磷源

1990 年 Smith and Krikorian 曾就磷鹽對植物體的影響，進行一系列的濃度測試，發現 1.25 mM 及 2.5 mM 磷酸有助於植物發根及發芽⁽¹⁰⁴⁾。而磷對於植物懸浮培養產生的二次代謝物生合成也扮演重要的角色，有些植物細胞懸浮培養產生之二次代謝物產量，會隨著磷離子濃度提高而增加，相反地有些則隨之降低。1985 年 De-Eknamkul and Ellis 指出紫草科之 *Anchusa officinalis* 產生的 rosmarinic acid，隨磷離子濃度提高而增加⁽⁹⁵⁾，而 1982 年 Sasse *et al.* 認為芸香科之 *Peganum harmala* 產生的 β -carbolin alkaloids，隨磷離子濃度的下降

而減少⁽¹⁰⁵⁾。夾竹桃科之長春花 (*Catharanthus roseus*)⁽¹⁰⁶⁾及 *Peganum harmala*⁽¹⁰⁵⁾植物的細胞懸浮培養中，磷會抑制其二次代謝產物的生合成；在茜草科之 *Morinda citrifolia* 生產 anthraquinone⁽¹⁰⁷⁾、*Digitalis purpurea* 生產 digitoxin⁽¹⁰⁸⁾、*Anchusa officinalis* 生產 rosmarinic acid⁽⁹⁵⁾、白芷生產 imperatorin⁽⁹⁸⁾、當歸生產 ferulic acid 及 n-butylidene phthalide⁽¹⁰⁹⁾的細胞懸浮培養中，提高磷離子的濃度，二次代謝產物的產率隨之增加。

鉀、鎂、鈣、硫等離子

1985 年 Paek 等學者指出蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 之擬原球體 (*Protocorm*) 的培養基中，添加 8 mM 的鈣離子，可提高芽的形成率及促進生長，4 mM 的濃度增強根的生長，8-12mM 反而降低組織中葉綠素 (chlorophyll) 的含量。1993 年 Irintoto *et al.* 利用 X-ray energy dispersive analysis，指出培養基含 P、K、Ca、S，能促進癒合組織生長⁽¹¹⁰⁾。此外 1982 年 Sasse 等人發現培養基中缺乏 K⁺ 或 SO₄²⁻，會降低 serotonin 的形成；若缺乏 Ca 及 Mg 則使 alkaloid 的生合成受到抑制⁽¹⁰⁵⁾。1990 年 Fukui 等學者指出紫草懸浮細胞中提高 SO₄²⁻ 的濃度，可使紫草懸浮細胞形成 shikonin 的產量增加三倍，但會抑制細胞生長⁽¹¹¹⁾。

(二) 微量元素

培養基中的微量元素，主要包括鐵、硼、錳、鋅及銅等五種，其中以鐵源對體胚的影響最大。培養基中缺乏鐵鹽時，蛋白質合成受阻，細胞分裂無法進行。早期研究皆以硫酸亞鐵、酒石酸鐵或檸檬酸鐵等鹽類為鐵之來源，但由於鐵鹽易沉澱，並使培養基變為鹼性，而無法被培植體吸收利用。1974 年 Shepard and Street 首先將 EDTA 加入培養基中，使鐵離子形成螯合物不易沉澱，並維持適當的 pH 值及降低毒性⁽¹¹²⁾。1984 年 George and Sherrington 認為胡蘿蔔癒合組織之生長，因硼的缺乏而減緩⁽¹¹³⁾。1987 年 Caboche 報導眾多微量元素中，Zn 及 Mn 可明顯提高菸草芽體之形成⁽¹¹⁴⁾。1990 年 Fukui *et al.* 指出紫草的懸浮細胞生成二次代謝產物中，銅可刺激紫草的懸浮細胞生合成 shikonin⁽¹¹¹⁾。1999 年 Andrijany 等以龍舌蘭為材料，測試 Ca²⁺、Co²⁺、Cu²⁺ 及 Mg²⁺ 等元素，對癒合組織中 sapogenin steroids 的產率，發現當培養基缺乏 Ca²⁺ 時，有助於 sapogenin steroids 生成；若 Co²⁺、Cu²⁺ 及 Mg²⁺ 的濃度提高時，反而抑制 sapogenin steroids 生成⁽¹¹⁵⁾。其它如碘等微量元素或多或少影響植物之生長。

(三) 維生素

培養基常用的維生素包括 Vitamin B₁ 及 Nicotinic acid。實際上，植物本身雖具有合成維生素的能力，但於培養基上生長時，某些維生素的合成會受到限制，因此添加適量的維生素幫助植物生長是必需的。例如 ascorbic acid 可防止培養基中 thiamine · HCl 氧化而失去作用，並且延緩培植體的褐化。葉酸 (folic acid) 於光培養時可促進組織增殖，但於暗培養則呈抑制的現象。1986 年陳等人於青蒿癒合組織培養基中，加入 Vitamin B₁₂，發現可提高不定芽形成根之能力，並縮短誘導時間，使根粗壯及促進生長⁽¹¹⁶⁾。1988 年 Sanchez 指出 thiamine · HCl 可促進 *Cytopodium* 根之形成及擬原球體 (protocorm like body) 分化芽的能力⁽¹¹⁷⁾。1989 年 Sauerwein and Becker 在培養基內添加 Vitamin B₁₂，可促進地錢組織的生長⁽¹¹⁸⁾。其它如 Vitamin C (ascorbic acid) 一般認為可防止培養基中 Vitamin B₁ 氧化，並延緩培植體之褐化。1988 年 Richard 等學者指出 Vitamin C 能促進菸草癒合組織，於多次繼代培養後之生長活性⁽¹¹⁹⁾。

(四) 糖類

培養基中添加糖類具有提供碳源，及培植體生長所需之能量來源和調節滲透壓的功能，不同碳源對細胞懸浮培養二次代謝產物之產生有所影響。常用的碳水化合物有蔗糖 (sucrose)、葡萄糖 (glucose)、果糖 (fructose)、麥芽糖 (maltose) 及 D-甘露醇 (D-mannitol) 等，一般較常使用蔗糖，其濃度為 1-6%，濃度過高時會抑制細胞的生長。1981 年 Fujita 指出紫草於 2% 蔗糖濃度時，shikonin 產量會隨著蔗糖濃度升高而增加，但超過 5% 則反成抑制⁽¹²⁰⁾。1986 年 Yamamoto 等學者報導黃芩培養基中，5% 的麥芽糖取代 3% 的蔗糖時，其癒合組織的生長速率及 flavonoid 的含量明顯增加⁽¹²¹⁾。1995 年 Cabasson 等人於柑橘培養中，以半乳糖取代蔗糖成為單一碳源，可使 non-embryogenic callus 形成 embryogenic callus⁽¹²²⁾。1990 年周等學者以多醣和寡糖為碳源，探討紫草懸浮細胞生長及紫草素 (shikonin) 的形成，亦發現糖類濃度的差異，直接影響細胞生長和紫草素產量⁽¹²³⁾。1994 年 Tsay 等學者指出以葡萄糖為碳源，對白芷懸浮細胞之 imperatorin 的生成最佳⁽⁹⁸⁾。

(五) 植物生長調節劑

植物生長調節劑是控制植物生長與分化的重要因子。一般而言，進行組織培養時，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。植物生長調節劑約可分為 auxins、cytokinins、gibberellins、abscisic acid、ethylene、brassinosteroids 及 tricontanol 等七大類，前四大類較常應用

在植物組織培養上，而各類植物生長調節劑皆有其特殊的作用。

Auxins

最早被發現的植物生長調節劑是 auxin 類，與植物的趨光性有關，其生理作用極為複雜，在植物組織培養中，常用於誘導癒合組織及根的形成。在植物體內生長分裂最旺盛的生長點部位含量最多，其餘部位僅有少量存在，可能係由生長點合成後，再運送到各部位之故。一般 auxin 類有促進植物細胞生長、誘導細胞分裂及分化、促進發根、抑制花與果實脫落及控制開花與結果等作用⁽¹²⁴⁾。高濃度的 auxins 可誘導培植體形成癒合組織，而較低濃度或不添加 auxins 時則可產生胚狀體。常用於組織培養的 auxins 有 IAA、IBA、NAA 及 2,4-D，除了 IAA 為植物的內生荷爾蒙外，其餘均為人工合成。植物誘導癒合組織所需之的 auxins，隨植物種類不同而有所差別。在所有的 auxins 或是類似 auxins 物質的植物生長調節劑中，最常用的是 2,4-D。據 Evans 等學者於 1981 年的統計，大約有 57.1% 的體胚培養，皆由使用 2,4-D 所建立的⁽⁹¹⁾。植物通常誘導癒合組織時，需要較高濃度的 auxins，降低 auxins 濃度則有利於體胚或高擬胚化癒合組織的形成。

Cytokinins

在 1950 年代發現 cytokinin 存在植物體內，在植物組織培養中，常應用於打破頂芽優勢產生不定芽，促進癒合組織生長，及原生質體融合後幼芽之誘導，過量則會抑制側根及不定根形成。在田間常應用於促進種子發芽、果實生長及著果等方面。常用的 cytokinins 有 BA、kinetin、zeatin、adenine、2ip 及 thidiazuron (TDZ) 等，其中 adenine、zeatin、2ip 為植物本身可合成，BA、kinetin 及 thidiazuron 則是由人工合成⁽¹²⁴⁾。1957 年 Skoog and Miller 調整 auxins 與 cytokinins 比例，以誘導菸草癒合組織獲得再生植株⁽⁸⁰⁾。後人發現 auxin 與 cytokinin 高比率，可促進根及癒合組織形成；低比率則促進芽之分化。植物組織培養常以 auxin 與 cytokinin 兩者混合使用，例如 $\text{auxin/cytokinin} > 1$ 可誘導癒合組織或芽體形成根的分化； $\text{auxin/cytokoinin} = 1$ 可以形成癒合組織、器官或不定芽的分化，如適量的 auxin 及 cytokinin (濃度各為 2 mg/l) 可誘導培植體產生不定芽； $\text{auxin/cytokinin} < 1$ 則會促進癒合組織形成芽體，將高濃度的 cytokinin (1-3 mg/l BA 或 kinetin) 配合含少量的 auxin (0.2-0.5 mg/l NAA) 可誘導腋芽的形成，此時若將 cytokinin 降低或除去則可促進芽體大量發根。簡單述之，cytokinin 和 auxin 的比值增高時，可促

進芽的分化；比值降低時，則可促進根及癒合組織的形成。

TDZ 最早在 1982 年被報導具有 cytokinin 的活性，可用於誘導不定芽及側芽之形成，尤其對木本植物極為有效，同時對體胚形成具有良好的助益。TDZ 不會被 cytokinin oxidase 所分解，穩定性較高，但材料如培養於 TDZ 的時間過長，會導致玻璃質化，並產生不正常的不定芽及發根受阻⁽¹²⁵⁾。

Gibberellins (GA₃)

Gibberellins 是一種天然的植物生長激素，於植株生長旺盛的地方含量最高。最常見的 gibberellins 是 GA₃，通常被應用於促進種子萌芽和打破休眠等方面。1990 年 Agnihotri 等學者報導 GA₃ 可提高十字花科之 *Brassica nigra* 的癒合組織產生擬胚化作用⁽¹²⁶⁾。1991 年 Ghosh and Sen 報導 GA₃ 可使 *Asparagus cooperi* 的體胚成熟⁽¹²⁷⁾。1995 年 Hunault and Maatar 於培養基中加入 GA₃，在茴香葉柄誘導 somatic embryogenesis 之試驗中，以 2.9 μM GA₃ 誘導形成植株的效果最好⁽¹²⁸⁾。

Abscisic acid (ABA)

於 1953 年 Bennet and Keffor 首次在植物的乙醚抽出物中，找到一種具有抑制芽鞘生長的物質，稱 β-抑制劑。1968 年 Miborrow 發現 β-抑制劑內含 ABA⁽¹²⁹⁾。ABA 是一種生長抑制劑，具有促進種子休眠、葉片老化及果實後熟的作用，並具有抑制莖、葉的生長及種子發芽等生理作用⁽¹²⁴⁾。1983 年 Chandler 等學者發現加入 ABA，能增加 *Solanum aciniatum* 癒合組織所含 solasodine 的產率⁽¹³⁰⁾。1973 年 Ammirato 於 *Carum carvi* 的培養中，提出 0.1 μM~10 μM ABA 濃度的作用有二：(1)使胚成熟且能抑制不正常增生。(2)抑制早熟性萌發，使體胚成長正常化⁽¹³¹⁾。1993 年 Attree and Fowke 提出 ABA 在體胚發育中為重要的荷爾蒙，如果缺乏 ABA，很少體胚能夠產生⁽¹³²⁾。1995 年 Li and Wolyn 發現 ABA 和 ancymidol 比 uniconazol 及 paclobutrazol 更能促進體胚的發育⁽¹³³⁾。

(六) 未定之組成添加物

1942 年 Overbeek 等首次利用椰子汁 (CM) 培養曼陀蘿的幼胚，此液體胚乳含豐富滋養胚生長的養分外，並認為對細胞的增殖有極佳的效果，因此培養基中添加有機添加物，該配方歸為自然培養基 (natural medium)。椰子汁、活性碳 (activated charcoal)、人參煮液等

抽出物，常被添加至培養基中，以促進生長分化、降低褐化率或促進二次代謝物之生成。雖然此等未定組成抽出物對植物生長之促進有一定程度之作用，但其詳細作用原理仍有待研究。

活性碳

在培養基中加入活性碳可吸附植物所分泌的毒素，並可克服褐化現象。如添加 BA 使根的形成和生長受到抑制，但加入活性碳可改善此情形。1978 年 Fridborg 等學者指出在 *Daucus carota* 及 *Haplopappus gracilis* 細胞培養中，加入活性碳可促使癒合組織的體胚再生及根之形成。在不含活性碳之培養基中，可發現高含量的 PAA (phenylacetic acid) 及 *p*-hydroxybenzoic acid 會抑制 embryogenesis⁽¹³⁴⁾。而活性碳可吸附此二物質，故在含活性碳之培養基中不含 PAA 及 *p*-hydroxybenzoic acid。1980 年莊和李指出加入 2 g/l 活性碳，可促進台灣一葉蘭種子發芽及小苗發育與結球⁽¹³⁵⁾。活性碳對培植體的影響可能和吸附作用有關，其主要功能有：

- (1) 可吸附酚類物質。分析添加活性碳的培養基，其酚類物質如 phenylacetic acid 和 *p*-hydroxybenzoic acid 的含量，均較不加活性碳的培養基低，酚類物質存在培養基中，會抑制體胚的形成。
- (2) 可吸附植物生長調節劑。如 auxins、cytokinins 及 ABA 等，而影響培植體對培養基的反應。
- (3) 可吸附體胚成熟所需要的天然物質。如生長促進劑，而阻礙體胚的成熟，而使其持續性增生。
- (4) 可吸附鐵的螯合物，如 Fe-EDDHA，使體胚無法由球形期長成心臟期；但不會吸收 Fe-EDTA。

其他添加物

椰子汁為椰子種子之胚乳，養分豐富且複雜，一般認為含有大量 cytokinin 類似物質，且具有緩衝 pH 之功能。1980 年莊和李指出椰子汁可明顯地促進台灣一葉蘭早期原球體及小苗之發育及鮮重；添加 25-100 g/l 香蕉泥對早期原球體及小苗之發育略有促進作用，但明顯抑制小苗葉片之生長⁽¹³⁵⁾。1986 年陳等於青蒿癒合組織培養基中，加入人參煮沸液，可提高芽分化率及縮短分化時間⁽¹¹⁶⁾。其他植物抽出物如柳橙汁、酵母抽出物、麥芽抽出物、蕃茄汁、蘋果汁、蘆薈抽出物、白麥精、香蕉汁、馬鈴薯泥、紅蘿蔔汁亦為常用之添加物，至於在培養過程中所扮演的角色，須更進一步研究。

(七) 前驅物與誘引劑

二次代謝產物量的提高方法，除了從上述諸因子著手外，最常用的即是加入前驅物或誘引劑。

前驅物 (Precursors)

許多報告指出，添加前驅物可提高二次代謝產物的產量。由於細胞系的產率取決於細胞內部酵素的活性，因此原本具高產潛能的細胞系，藉著前驅物的加入，可使產能完全發揮。例如在金雞納 (*Cinchona ledgeriana*) 的根狀器官懸浮培養中，加入 L-tryptophan 可以得到近 5 倍的 quinoline alkaloid⁽¹³⁶⁾。在 *Digitalis lanata* 細胞懸浮培養中，加入 progesterone，可得到更多量的 5- β -pregnanes 或 cardenolides⁽¹³⁷⁾。1986 年 Anderson 等學者建議於生長曲線的緩慢生長期 (lag phase) 加入前驅物效果最好⁽¹³⁸⁾。目前有些學者利用此法探討細胞內生合成的酵素及其路徑。

誘引劑 (Elicitor)

為促使培養細胞生產二次代謝產物，除添加前驅物外，也常使用誘引劑。許多報告提出在植物細胞培養中，加入某些誘引劑可以增加二次代謝產物之產量。1986 年 Robin and Rhodes 在金雞納 (*Cinchona ledgeriana*) 的細胞懸浮培養中，添加一種高分子量樹脂類的吸附物質 XAD-7，可使 anthraquinones 的產量提高 15 倍⁽¹³⁹⁾。此外添加吸附劑的量與時間，對大量生成二次代謝產物也極為重要，主要原因是誘引劑具有維持二次代謝產物在培養基內的濃度，並防止因產物濃度過高而抑制了細胞生長。1980 年 Shimokawa 等學者在柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 毛狀根培養中，嘗試以 XAD-2、XAD-4、XAD-7 誘引 saikosaponin 的生合成，結果以 XAD-2 的誘引效果最好，且對細胞的生長及活力影響較小⁽¹⁴⁰⁾。1994 年 Tsay 等學者在白芷懸浮細胞培養中，亦發現於培養基中添加 20 g/l XAD-7，可使生合成 imperatorin 大幅增加⁽⁹⁸⁾。此外 1987 年 Funk 等學者從酵母抽出物 (yeast extract) 分離出的碳水化合物提取物，也可誘引大豆生成 glycellin 和提高 *Thalictrum rugosum* 的 berberine 產量⁽¹⁴¹⁾。1988 年 Tyler 等學者指出在 *Papaver somniferum* 細胞懸浮培養中，利用 fungal homogenate 可生成 sanguinarine 和 di-hydrobezophenanthridine oxidase⁽¹⁴²⁾。一般添加誘引劑的適當時機，為細胞生長周期中的快速生長期 (log phase) 後段或靜止期 (stationary phase) 前段。

三、 培養方式

植物組織培養之培養基，一般由凝膠物質添加與否，分為固體培養基及液體培養基二種。1984年 George and Sherrington 報導固體培養具有下列優點：1.適合培植體的生長與再生，2.不需要特殊的通氣設備，3.芽體與根之生長情形較規則，4.癒合組織不會散落而形成懸浮培養⁽¹¹³⁾，故固體培養為大多數研究人員所採用，而液體培養則具有加速癒合組織和器官之生長分化、清洗廢物與減少褐化之優點。1977年 Ichihashi and Kako 報導洋蘭採用液體培養，可有效地抑制莖頂褐化，此乃固體培養常有異常代謝物蓄積，而液體培養則因沖洗效果而減少褐化現象⁽¹⁴³⁾，但亦有例外之情形如 1985年 Hasegawa 等學者將 *Cymbidium faberi* 之莖頂以液體方式培養，則培植體全部死亡⁽¹⁴⁴⁾。1988年 Kandeel and Hughes 發現生長於試管內之馬鈴薯植株，經液體振盪培養後有較多的節形成，而且長得較高⁽¹⁴⁵⁾。有效的將固體培養基和液體培養基混合使用，常使微體繁殖法得到斐然的成果。如先以固體培養誘導出嫩芽，然後移至液體培養基中可使芽體快速的發育。1989年 Tsay 等學者以半夏珠芽為材料進行大量繁殖，採用固體及液體交互培養的方式，發現可使繁殖倍率恆久不變⁽¹⁴⁶⁾。

雖然液體培養對促進培植體的生長及分化能力，遠較固體培養為佳，但它亦有一些缺點，如 1974年 Earle and Langhans 指出除蟲菊 (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) 之芽體以液體培養會導致培植體產生玻璃質化，葉片呈不正常寬厚，若照光芽體受損更嚴重⁽¹⁴⁷⁾；1994年古等學者指出康乃馨進行液體培養時，芽體會有玻璃質化的現象，即芽體呈現腫脹、濕透及易碎的狀態，葉片則出現不正常的肥厚且透明狀，葉面無蠟質，乾燥稍久或照光會使受損更嚴重，無法健化移植⁽¹⁴⁸⁾。

四、 培養環境

(一) pH 值

一般認為 pH 值與植物形態之發生與生成有密不可分關係，尤其對培養基的軟硬度、鹽類沉澱與否及培植體生長發育有很大影響。pH 值具有維持鹽類可溶的形式、影響培養基梯度的吸收、生長調節劑的酸性及促進洋菜之膠絮等作用。在培養基配製時 pH 值大多調整在 5.2-5.8 之間（固體培養基 pH 值約為 5.7；液體培養基約為 5.2）。若 pH 值太高則會形成固體培養基太硬；pH 值太低則洋菜不

易凝結。1986 年 Skirvin 等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⁽¹⁴⁹⁾。1975 年 Rose and Martin 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⁽¹⁵⁰⁾。auxins 類物質於細胞膜內外的 pH 梯度差越大，會加快膜外的植物生長調節劑被吸收到膜內的速度。如培養基中的 pH 值低於 6.0，IAA 進入細胞的作用即停止。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。1990 年 Smith and Krikorian 指出懸浮培養中以 1 μM 之 NH_4^+ 為單一氮源時，培養期間培養基的 pH 值會下降，而使體胚維持於 preglobular stage proembryos (PGSPs)，而無法進一步成熟發育⁽¹⁰⁴⁾。近年來為大量生產二次代謝產物及克服產物之分離不易，1990 年蘇等指出利用培養基 pH 值之改變，使細胞將空泡內代謝物釋出以利於抽取，能促使植物細胞二次代謝物釋出，以利工業化大量生產⁽⁶⁾。

(二) 凝膠物質 (gelling agent)

培養基中常用瓊脂 (agar) 來支持培植體，常用濃度在 0.5-1% 間。1981 年 Fujita 等學者指出在紫草細胞培養中，以固體培養可以獲得 shikonin，但在液體培養時則 shikonin 停止合成。在 30 ml 之液體培養基中加 1.5 g 的 agar powder，則可產生 shikonin，於是學者開始探討凝膠劑對成分形成之影響⁽¹²⁰⁾。1990 年 Hiraoka 指出不同種類及廠牌的凝膠物質，如 gelrite (Kelco)、purified agar (Difco)、agar (Nakarai)、phytagar (Gibco) 及 phytagar (commercial grade, Gibco)，用在紫草細胞培養中發現，只有 gelrite (Kelco) 及 purified agar (Difco) 能顯著增加 naphthoquinone pigments 之生成，約較其他的凝膠物質增加 6-9 倍的產率⁽¹⁵¹⁾。

(三) 光源

1984 年 George and Sherrington 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，大多不照光⁽¹¹³⁾。『適當的光源』通常又可分：1. 光照的強度，2. 光週期，3. 光譜性質。1987 年 Economou 指出最適當的光強度，依所培養的組織或器官，其培養階段、培植體型式及植物品種而定⁽¹⁵²⁾。光強度太高則會抑制根部的生長。一般實驗室以 14/10 小時的光/暗週期為主。1978 年 Mantell 等學者指出 *Dioscorea alata* 及 *D. rotundata* 小苗之形成率，在 16 小時光照下為 12 小時光照之 4 倍，但在癒合組織形成方面，則 12 小時光照較 16 小時光照佳⁽¹⁵³⁾。1989 年 Chee and Pool 作一系列光源對植物體的影響，指出藍光有助於莖頂培養之芽體誘導；紅光則有助

於生成不定根⁽¹⁵⁴⁾。所以一般實驗室常以藍光及紅光二種植物生長燈搭配使用，或使用全太陽能植物生長燈。光源對於某些細胞在某方面的生合成途徑，扮演極重要角色，如 flavonoid、cardenolide 及 betacyanins 的生合成即受到光線的影響。植物細胞懸浮培養之照光與否，與二次代謝產物生合成有關，1987 年 Nigra 等學者發現 *Solanum eleagnifolium* 在照光下可使 solasodine 的產量提高⁽⁸⁸⁾。1990 年 Takio 等學者亦指出以光照射 *Barbula unguicula* 可提高 chlorophyll 的產量⁽¹⁵⁵⁾。但有些作物則相反，如 1989 年 Uden 等學者指出 *Podophyllum hexandrum* 暗培養下，其 podophyllotoxin 的產量較光培養為高⁽¹⁵⁶⁾。這些結果可能因細胞對光反應的生理狀態所造成。

(四) 溫度與相對濕度

1984 年 George and Sherrington 指出組織培養研究中，大多數培養室皆維持恆溫狀態，尤以 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 最為普遍⁽¹¹³⁾。1979 年 Lane 指出當培養室溫度超過 28°C 時，水分會聚集於植物及容器壁上，對培養效果呈負面影響⁽¹⁵⁷⁾。部份學者採取日夜不同溫度以達特殊目的，1969 年 Gautheret 在 *Helianthus tuberosus* 研究中，以 26°C 之日溫及 15°C 之夜溫進行變溫處理。此乃因較高的日溫有利於形成層新生細胞之形成；而較低之夜溫則有利分生細胞分化成初生根⁽¹⁵⁸⁾。1986 年 Hatano 等學者報導半夏癒合組織若貯存於 4°C ，而後恢復為常溫，其癒合組織之繁殖與再生能力，皆比貯存於 0°C 者為高⁽¹⁵⁹⁾。大多數的培養室之相對濕度並未控制，一般以 70% 最常用。濕度高易滋生黴菌及微生物，或造成玻璃質化現象。1984 年 Arnold and Eriksson 報導 *Picea abies* 之玻璃質化及移植之存活率，與濕度高低有關⁽¹⁶⁰⁾。1991 年 Ritchie 等學者報導高濕度會提高 *Beta vulgaris* 之玻璃質化現象⁽¹⁶¹⁾。

第三章 試驗部分

第一節 材料與方法

一、甘草之基原鑑定

(一) 材料

於 2001 年 9 月，由林郁進學長採自中國東北 吉林省 白城栽培基地 (Fig. 3-4)。

(二) 方法

1. 外部形質鑑別

利用五官檢查法配合立體顯微鏡觀察。

2. 內部組織鑑別

將材料進行徒手切片，以橫切 (Transverse section, X.S.)、放射性縱切 (Radial longitudinal section, R.L.S.)、與切線性縱切 (Tangential longitudinal section, T.L.S.) 等，切取近 $10\ \mu\text{m}$ 之薄片檢體置於載玻片上，先以 chloral hydrate solution 清除細胞內含物後，再滴加各種不同化學試劑，如 phloroglucinol solution 與 hydrochloric acid 進行木化反應；或滴加 sudan III solution 進行木栓化反應，或利用 Schultz's 與 KOH maceration method 將材料予以解離，最後以 glycerin-water (1:1) 混合溶液將檢體封鎖，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下，先用低倍鏡檢查其輪廓，再以高倍鏡觀察各個組織之特徵，並以顯微測微計測量各組織或細胞之大小。

(三) 結果分析

利用顯微攝影技術紀錄觀察結果，並製作生藥組織顯微照相圖，作為本試驗甘草之基原依據 (Fig. 5)。

二、甘草之組織培養

(一) 材料

本研究使用之藥材，係 2001 年 9 月由林郁進學長採自中國東北吉林省白城栽培基地，經顯微鑑定確認為甘草之基原植物烏拉爾甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.)，切取其葉片 (Fig. 6) 經誘導形成癒合組織作為本試驗之材料。

(二) 方法

1. 培養基之製備

培養基主要以 MS (Murashige and Skoog, 1962)⁽⁹⁰⁾ 無機鹽類為主，分別添加各類植物生長調節劑及各種添加物。培養基在加入凝膠物質前，先用 0.5 N NaOH 或 HCl，將 pH 值調至 5.7 ± 0.1 ，以 121°C 、 15 lb/in^2 (1.05 kg/cm^2) 之條件，高溫高壓滅菌 15 分鐘後，擺成斜面放冷凝固備用。

2. 培植體之消毒

甘草葉片以清水洗淨 (Fig. 6)，於 70% 乙醇中浸泡 1 分鐘，再以 0.5% 次氯酸鈉 (每 50 ml 滴加 Tween 20 一滴) 溶液於超音波振盪器消毒 10 分鐘，移至無菌接種台後，以無菌水清洗五次，置於無菌濾紙上吸乾表面水分，去除邊緣部分後切成約 0.7 cm^2 大小，以備進行癒合組織誘導。

取甘草種子為培植體 (Fig. 6)，經清水洗淨後，先以 70% 乙醇中浸泡 1 分鐘，再以 0.5% 次氯酸鈉 (每 50 ml 滴加 Tween 20 一滴) 溶液於超音波振盪器消毒 10 分鐘，移至無菌接種台後，以無菌水清洗五次，置於無菌濾紙上吸乾表面水分備用。

3. 培養環境

接種後之材料置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫，於黑暗或照光 (光量 $100\ \mu\text{E/m}^2\text{s}$ ，光波長 350-800 nm) 環境下培養。

4. 接種方式

癒合組織生長和繼代培養試驗皆以 $25 \times 120\text{ mm}$ 之試管為培養容器，內含 10 ml 培養基。皆秤取癒合組織 100 mg 為一團，每支試管接種兩團癒合組織。接種後於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、黑暗或照光 (每日照光 14 小時) 且相對濕度為 70% 之培養室靜置培養。

5. 癒合組織之誘導

將表面消毒過之葉片接種於含有 0.5 mg/L BA 及 1 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中，在黑暗下培養，經 30 天後將誘導出之黃綠色癒合組織以原培養基繼代培養，以形成出更多的癒合組織供本試驗探討各種不同因素影響之用 (Fig. 6A, B)。

將消毒過之甘草種子，接種於 MS 基礎鹽類培養基中，經 3 天後即長出根，待 30 天後切取甘草無菌苗之根為培植體，培養於含有 0.5 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中誘導癒合組織，以供本試驗探討不同培植體誘導出的癒合組織對誘導其 glycyrrhizin 成分上的差異 (Fig. 6A, C, D)。

6. 統計分析方法

各處理間之比較，係以最小顯著差異測驗法 LSD (least significant difference test) 判定其差異性。

三、甘草之化學成分含量測定

(一) 材料

1. 組織培養法所得之甘草癒合組織。

2. 甘草之栽培品

2001 年 9 月，由林郁進博士採自中國東北吉林省 白城 栽培基地，經基原鑑定確認為 2-3 年生之烏拉爾甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* FISCH.)，取其根莖經乾燥後稱取備用(以下稱為 GUF) (Fig. 7A)。

3. 市售甘草之飲片：

2002 年 2 月購自 台中市 健行路 聯合中西藥局(以下稱為 GUM) (Fig. 7B)。

4. 市售甘草之科學濃縮品：

2002 年 2 月購自 台中市 健行路 聯合中西藥局(以下稱為 GUS)。

5. 甘草之野生品

2002 年 7 月由中國醫藥學院中國西北藥用植物考察團於甘肅省天水取得之 5 年生以上之甘草(以下稱為 G UW)。

6. 甘草之台灣栽培品

2003 年 3 月取自雲林縣 古坑栽培場之約 2 年生之甘草(以下稱為 G UT)。

7. 台灣進口之原藥材

2003 年 4 月由某製藥廠提供(以下稱為 G UX)。

8. 成分標準品

Glycyrrhizin 購自建吾公司 (代理日本 米山藥品工業株式會社)。

(二) 儀器

1. 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography) :

- (1) 幫浦：Waters 2695 Separations Module
- (2) 自動注入器：Autosampler 717⁺
- (3) 檢測器：Waters 996 Photodiode Array Detector
- (4) 分析軟體：Waters Empower software
- (5) 層析柱：MERCK 公司 LiChroCART[®]250-4 HPLC-Cartridge Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m)。前端加上管柱(MERCK 公司 LiChroCART[®]4-4 Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m)，以濾除雜質。

2. 烘箱

採用德國 Memmert 製造 Class M 型 OVEN

(三) 試驗方法

1. 標準品之製備

分別稱取 glycyrrhizin 之標準品 10 mg，分別溶於 10 ml 甲醇中，以 0.45 μ m (Nalgene[®], New York, USA)濾膜過濾，為含量 1 mg/ml 之母液，供 HPLC 偵測 glycyrrhizin 含量之用。

2. 檢品之製備

材料經烘箱乾燥後，各稱取 2 g 研碎，以 50 ml 甲醇經超音波震盪萃取 60 分鐘，收集濾液，重複萃取且浸泡隔夜，合併濾液，再以減壓濃縮方式將濾液濃縮至乾，再以 10 ml 甲醇溶出，並以 0.45 mm 濾膜過濾，供 HPLC 偵測 glycyrrhizin 含量之用。

3. 高效液相層析法

(1) 分析條件

依 2001 年經總之『甘草之生物藥學研究』所使用之方法，在室溫下以 acetonitrile：水（含 1% acetic acid）= 36：64 為流動相，流速為 1 ml/min，檢測波長為 254 nm。

(2) 標準曲線之繪製

取 glycyrrhizin 之標準品，以濃度 10 mg/ml 作為稀釋母液，再分別稀釋成母液的 1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 及 1/64 倍等 7 個濃度之標準品溶液，各以 0.45 μ m 之微孔膜過濾，濾液用 Autosampler 每次自動定量注射 20 μ l 注入 HPLC 分析，每個濃度處理重複 3 注射，將 3 次總和平均。以濃度及積分面積各為橫座標和縱座標，利用線性迴歸分析獲得方程式，製成標準檢量線（Fig. 8-9）。其迴歸方程式如下：

$$Y = (1.407745e+007) X + (-3.781059e+006); R^2 = 0.997661$$

利用此迴歸方程式，以波峰面積求出檢品 glycyrrhizin 之含量。

(3) 檢品之測定：

將上述各種不同甘草的檢品，以前述檢品的製備方法與分析條件，每次自動定量注射 20 μ l 注入 HPLC 分析，並用內標準法計算 glycyrrhizin 之含量。

第二節 結果

一、甘草癒合組織之誘導

將表面消毒過之葉片接種於含有 0.5 mg/L BA 及 1 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中，在黑暗下培養，經 30 天後，葉片漸漸變黑褐色及捲曲，並由葉脈及葉片邊緣長出癒合組織 (Fig. 6B)，將誘導出之黃綠色生長良好的癒合組織以原培養基繼代培養，以形成出更多的癒合組織供本試驗探討各種不同因素影響之用。

將消毒過之甘草種子，接種於 MS 基礎鹽類培養基中，經 3 天後即長出根，待 30 天後根系發展後 (Fig. 6C)，切取甘草無菌苗之根為培植體，培養於含有 0.5 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中，誘導培養 30 天後根部漸漸膨大且長出黃綠色癒合組織 (Fig. 6D)，根部癒合組織為本試驗探討不同培植體誘導出的癒合組織對其成分 glycyrrhizin 上的差異。

二、甘草癒合組織之培養

1. 光照對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織分別培養於黑暗與 2000 lux 光源處理下，經培養 35 天後測其鮮重。結果顯示，在黑暗環境下培養，癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.830 g，而在 2000 lux 的光源下培養，癒合組織生長較差，其平均鮮重為 0.446 g，從外觀可見光照處理的癒合組織呈現綠色 (Table 1; Fig. 10)。

2. 不同基礎鹽類對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同基礎鹽類 (MS_A 、MS、 N_6 、WPM、 B_5) 培養基中，經暗培養 35 天調查其平均鮮重，結果顯示培養於 MS_A 及 MS 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重分別為 0.701 g 及 0.654 g，培養於 N_6 及 WPM 培養基之癒合組織次之，其平均鮮重分別為 0.465 g 及 0.460 g，而培養於 B_5 培養基之癒合組織則較差，其平均鮮重為 0.373 g (Table 2; Fig. 11)。

3. MS 鹽類濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同 MS 濃度 (1/2MS、MS 及 2MS) 培養基中，經暗培養 35 天調查其平均鮮重。結果顯示培養

於 MS 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.804 g，培養於 2 MS 培養基之癒合組織次之，其平均鮮重為 0.607 g，而培養於 1/2 MS 培養基之癒合組織則較差，其平均鮮重為 0.497 g (Table 3; Fig. 12)。

4. 不同碳源對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同碳源 (sucrose、glucose、fructose、maltose) 之培養基中，經暗培養 35 天測其平均鮮重，結果顯示培養於含 3 % sucrose 及 3 % glucose 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重分別為 0.653 g 及 0.621 g，培養於含 3 % fructose 培養基之癒合組織次之，其平均鮮重為 0.421 g，而培養於含 3 % maltose 培養基之癒合組織幾無生長，其平均鮮重為 0.158 g (Table 4; Fig. 13)。

5. 不同蔗糖濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同蔗糖濃度 (0 %、1 %、3 %、6 % 及 9 %) 培養基中，經暗培養 35 天調查其平均鮮重，結果顯示培養於含 3% 蔗糖培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.830 g，其次為培養於添加 6 % 蔗糖培養基之癒合組織，平均鮮重為 0.761 g，培養於添加 1 % 及 9 % 蔗糖培養基之癒合組織最差，平均鮮重分別為 0.438 g 及 0.432 g，而對照組 (未添加蔗糖) 則幾乎沒有生長，其平均鮮重為 0.136 g (Table 5; Fig. 14)。

6. 不同凝膠物對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同凝膠物 (0.35 % gelrite、0.9 % Difco agar 及 0.175 % gelrite + 0.45 % Difco agar) 培養基中，經暗培養 35 天測其平均鮮重。結果顯示培養於含 0.35 % gelrite 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.923 g，培養於含 0.175 % gelrite + 0.45 % Difco agar 培養基之癒合組織次之，其平均鮮重為 0.699 g，而培養於含 0.9 % Difco agar 培養基之癒合組織生長較差，其平均鮮重為 0.645 g (Table 6; Fig. 15)。

7. 不同 gelrite 濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同 gelrite 濃度 (0.3 %、0.35 % 及 0.4 %) 培養基中，經暗培養 35 天調查其平均鮮重。結果顯示培養於添加 0.3 % 至 0.4 % gelrite 濃度之間培養基，其平均鮮重分別為 0.908 g、0.985 g 及 0.917 g。可知甘草癒合組織培養於添加 0.3% 至 0.4 % gelrite 濃度之間培養基並無顯著差異 (Table 7; Fig. 16)。

8. 不同酸鹼度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於不同酸鹼度 (pH 4.7、pH 5.7、pH 6.7) 培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示酸鹼度在 pH 5.7 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.835 g，在 pH 4.7 及 pH 6.7 培養基之癒合組織生長較差，其平均鮮重分別為 0.644 g 及 0.676 g (Table 8; Fig. 17)。

9. Auxins 類植物生長調節劑對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織繼代培養於含有不同 auxin 類(0.5 mg/l NAA、IAA 及 2,4-D) 植物生長調節劑之培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重，結果顯示培養於 0.5 mg/l 2,4-D 之培養基生長較好，平均鮮重約 0.782 g；培養於含 0.5 mg/l NAA 及 0.5 mg/l IAA 培養基之癒合組織，其平均鮮重分別為 0.531 g 及 0.535 g (Table 9; Fig. 18)。

10. Cytokinins 類植物生長調節劑對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織繼代培養於含不同 cytokinins(0.5 mg/l BA、zeatin、kinetin 及 0.05 mg/l TDZ) 之培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示培養於含 0.5 mg/l zeatin 及 0.5 mg/l BA 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重分別為 1.047 g 及 0.986 g，培養於含 0.05 mg/l TDZ 培養基之癒合組織次之，平均鮮重為 0.775 g，而培養於含 0.5 mg/l kinetin 培養基之癒合組織生長較差，其平均鮮重為 0.494 g (Table 10; Fig. 19)。

11. 不同 2,4-D 濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之癒合組織培養於含不同濃度 2,4-D (0、0.1、0.5、1.0 及 2.0 mg/l) 之 MS 基本鹽類培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示培養於含 0.5 mg/l 2,4-D 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 1.058 g；培養於添加 1 mg/l 2,4-D 培養基之癒合組織次之，其平均鮮重為 0.900 g，而培養於添加 0.1 mg/l 2,4-D 及 2.0 mg/l 2,4-D 培養基之癒合組織，其平均鮮重分別為 0.768 g 及 0.807 g (Table 11; Fig. 20)。

12. 不同 BA 濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同濃度的 BA(0、0.1、0.5、1.0 及 2.0 mg/l) 之 MS 基本鹽類培養基中，經暗培養 35 天調查其平均鮮重，結果顯示培養於含 0.5 mg/l 及 1.0 mg/l BA 培養基之癒合組

織生長較好，其平均鮮重分別為 0.954 g 及 0.968 g；而培養於含 0.0.1 mg/l 及 2.0 mg/l BA 培養基之癒合組織，生長較差，其平均鮮重分別為 0.710 g 及 0.765 g；對照組(未添加 BA)之平均鮮重為 0.340 g (Table 12; Fig. 21)。

13. 不同椰子汁濃度對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同椰子汁濃度 (0%、10% 及 20%) 培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示對照組 (未添加椰子汁) 及添加 10% 椰子汁培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重分別為 0.759g 及 0.700g，培養於含 20% 椰子汁培養基之癒合組織生長最差，其平均鮮重為 0.570 g (Table 13; Fig. 22)。

14. 添加不同濃度的 casein hydrolysate 對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同濃度的 casein hydrolysate (0 mg/l、250 mg/l、500 mg/l 及 750 mg/l) 培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示添加 250 mg/l casein hydrolysate 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.844g，對照組 (未添加 casein hydrolysate) 培養基及添加 500 mg/l casein hydrolysate 培養基之癒合組織之癒合組織生長次之，其平均鮮重均為 0.791g，添加 750 mg/l casein hydrolysate 培養基之癒合組織生長最差，其平均鮮重為 0.778g (Table 14; Fig. 23)。

15. 添加不同濃度的 peptone 對甘草癒合組織生長之影響

將 100 mg 之甘草癒合組織培養於含不同濃度的 peptone (0 g/l、1 g/l、2 g/l 及 4 g/l) 培養基中，經暗培養 35 天後調查其平均鮮重。結果顯示對照組 (未添加 peptone) 培養基之癒合組織生長較好，其平均鮮重為 0.691 g，添加 1 g/l peptone 培養基之癒合組織生長次之，其平均鮮重為 0.608 g，培養於含 2 g/l 及 4 g/l peptone 培養基之癒合組織生長最差，其平均鮮重分別為 0.516 g 及 0.399g (Table 15; Fig. 24)。

三、不同甘草檢品之甘草酸含量

檢品經 HPLC 偵測 glycyrrhizin 含量。結果顯示甘草之野生品 (GUW) 含量百分比達 2.45 % 為最高，其次依序為市售甘草之科學濃縮品 (GUS)、台灣進口之原藥材 (GUX)、甘草之台灣栽培品 (GUT)、甘草之栽培品 (GUF) 及市售甘草之飲片 (GUM)，其含

量百分比依序為 1.75 %、1.43 %、1.24 %、0.93 % 及 0.77 % (Fig. 25)。

四、甘草癒合組織成分之測定

1. 對在不同基礎鹽類培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於含不同基礎鹽類 (MS_A 、MS、 N_6 、WPM、 B_5) 培養基中，觀察結果以 MS_A 及 MS 培養基之癒合組織生長較好。但對在不同基礎鹽類培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin (Fig. 26)。

2. 對在不同碳源培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於含不同碳源 (sucrose、glucose、fructose、maltose) 之培養基中，觀察結果以培養於含 3 % sucrose 及 3 % glucose 培養基之癒合組織生長較好。但對在添加不同碳源培養下的的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin (Fig. 27)。

3. 對在不同酸鹼度之培養基培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於不同酸鹼度 (pH 4.7、pH 5.7、pH 6.7) 培養基中，觀察結果以酸鹼度在 pH 5.7 培養基之癒合組織生長較好。但對在不同酸鹼度之培養基培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 28)。

4. 對在不同 auxin 類植物生長調節劑培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織繼代培養於含有不同 auxin 類 (0.5 mg/l NAA、IAA 及 2,4-D) 植物生長調節劑之培養基中，觀察結果以培養於 0.5 mg/l 2,4-D 之培養基生長較好。但對在不同 auxin 類植物生長調節劑培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 29)。

5. 對在不同 cytokinin 類植物生長調節劑培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織繼代培養於含不同 cytokinin (0.5 mg/l BA、zeatin、kinetin 及 0.05 mg/l TDZ) 之培養基中，觀察結果以培養於含 0.5 mg/l zeatin 及 0.5 mg/l BA 培養基之癒合組織生長較好，但對在不同

cytokinin 類植物生長調節劑培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 30)。

6. 對添加不同椰子汁濃度培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於含不同椰子汁濃度 (0%、10% 及 20%) 培養基中，觀察結果以對照組 (未添加椰子汁) 及添加 10% 椰子汁培養基之癒合組織生長較好。但對添加不同椰子汁濃度培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 31)。

7. 對添加不同濃度的 casein hydrolysate 培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於含不同濃度的 casein hydrolysate (0 mg/l、250 mg/l、500 mg/l 及 750 mg/l) 培養基中，觀察結果以添加 250 mg/l casein hydrolysate 培養基之癒合組織生長較好。但對添加不同濃度的 casein hydrolysate 培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 32)。

8. 對添加不同濃度的 peptone 培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養於含不同濃度的 peptone (0 g/l、1 g/l、2 g/l 及 4 g/l) 培養基中，觀察結果以對照組 (未添加 peptone) 培養基之癒合組織生長較好。但對添加不同濃度的 peptone 培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 33)。

9. 暗培養與光 (2000 lux) 培養下的甘草癒合組織作 glycyrrhizin 之測定

甘草癒合組織培養在黑暗與光 (2000 lux) 培養下，觀察結果以黑暗培養之癒合組織生長較好。但對癒合組織作 glycyrrhizin 之測定，結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 34)。

10. 甘草葉片及無菌苗之根所誘導出之癒合組織進行 glycyrrhizin 之測定

葉片及無菌苗之根所誘導出之癒合組織進行 glycyrrhizin 之測定結果均未測定到含有 glycyrrhizin 存在 (Fig. 35)。

第三節 討論

一、 甘草癒合組織之誘導

植物組織培養常利用添加適量生長調節劑於培養基來誘導培植體產生癒合組織，而成功與否，培植體來源具有相當重要的地位。1977年 Murashige 指出選擇培植體必須考慮取材部位、培植體大小、培植體年齡及取材時間等因素⁽⁸⁴⁾。1982年 Gu 將當歸 (*Angelica sinensis* DIELS) 的葉柄，接種於含有 2,4-D 的培養基上，成功的誘導出癒合組織⁽¹⁶²⁾。1982年 Noboru *et al.* 指出以 0.1 μM 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⁽¹⁶³⁾。

然而單一種類生長調節劑的誘導方式不一定是最好的，auxin/cytokinin 比例變化的運用是植物組織培養常用的方法。1957年 Skoog and Miller 即藉著調節培養基中 auxin 與 cytokinin 之比例，成功的誘導菸草癒合組織分化及植株再生；其後學者更進一步發現 auxin / cytokinin 的比值，在高比率時，可促進根及癒合組織的形成，而於低比率時，則可促進芽之分化⁽⁸⁰⁾。1995年孟與賈指出 0.5 mg/l BA 與 2 mg/l 2,4-D 配合使用，可使秦九子葉及下胚軸的癒合組織誘導率達到 100% ⁽¹⁶⁴⁾。1998年王等以丹參之嫩葉為培植體，培養於以 MS 為基本鹽類，添加 NAA、2,4-D 及 kinetin 之培養基中，成功的誘導出癒合組織⁽¹⁶⁵⁾。本試驗以 MS 為基礎鹽類添加 1.0 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l BA 之培養基，可順利誘導出甘草葉片之癒合組織；以 MS 為基礎鹽類添加 0.5 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l BA 之培養基，可誘導出無菌苗根部之癒合組織。

二、 癒合組織之生長與繼代培養

癒合組織培養常於黑暗下培養，而少以光照培養，主要在於照光的目的是生長與分化的一種刺激或誘導因素，並不是供給植物進行光合作用產生養分。1984年 George and Sherrington 指出使用適當的光源培養，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⁽¹¹³⁾。1989年 Nigra *et al.* 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⁽¹⁶⁶⁾。本試驗結果顯示，暗培養的甘草癒合組織生長較好，光照培養下的癒合組織呈現綠色且有褐化現象。

常用的基礎培養基有 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⁽⁸²⁾。2002 年郭指出延胡索 (*Corydalis yanhusuo*) 癒合組織以全量 MS 基本鹽類培養基培養最適宜⁽⁷⁾。本試驗結果亦顯示甘草癒合組織以全量 MS 基本鹽類培養基培養生長較佳。

醣類添加的目的與供給能量及維持滲透壓有關，對不同醣類的需求則與植物種類有關。1942 年 Gautheret 指出培養基中以添加蔗糖為最佳碳源，葡萄糖及麥芽糖次之⁽¹⁶⁷⁾。1996 年陳亦指出蔗糖對雙鋸齒葉玄參 (*Scrophularia yoachimurae*) 的癒合組織生長較有利⁽¹⁶⁸⁾。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^(169,170)。本試驗以蔗糖為碳源對甘草癒合組織之生長最佳，其中以 3% 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，試驗所得結果與上述學者相類似。

組織培養常加入凝膠物質使培養基固化，gelrite 與 agar 即為一般常用之凝膠物，而這些物質為含有許多不明成分之生理活性物質，因此添加的種類與濃度會影響植物生長結果。1989 年 Morimoto 指出，提高 gellam gum 或 agarose 的濃度，雖然降低了 *Croton sublyratiun* 癒合組織的生長速率，但卻可以促進 phytosterol 的生成⁽¹⁷¹⁾。1997 年劉指出竹葉柴胡癒合組織在 0.9% agar 濃度培養基培養中生長最好⁽³⁾。本試驗以添加 gelrite 為凝膠物的培養基對甘草癒合組織之生長最佳，而濃度在 0.3-0.4% 的 gelrite 癒合組織之生長情形無顯著差異。

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的關係；1973 年 Ohira 等認為水稻癒合組織培養，在 pH 值為 6 左右時生長快速⁽¹⁷²⁾。1997 年陳指出葛癒合組織生長與增值較適於在培養基之 pH 值小於或等於 5.7 中培養⁽⁴⁾。本試驗發現 pH 值在 5.7 時甘草癒合組織生長良好，過高或過低均不利生長。

植物的生長與分化受到本身內源性賀爾蒙影響，因此植物組織培養常藉由植物生長調節劑來達到特殊目的。1988 年 Zhang et al. 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⁽¹⁷³⁾。1992 年張等學者對條葉龍膽誘導癒合組織的研究，提出以根部作為培植體，培養於 B₅ 培養基及 0.5 mg/l 2,4-D 之生長調節劑下，有助於癒合組織生長與增殖⁽¹⁷⁴⁾。1997 年 Nayak et al. 指出石斛蘭屬 *Dendrobium aphyllum* 及 *D. moschatum* 培養於 MS 基本培養基，添加

4.5 μ M(1ppm) TDZ 的濃度，可使一個芽體增殖為 36~40 個芽體⁽¹⁷⁵⁾。2000 年闕指出臺灣龍膽所誘導的癒合組織繼代培養於 1 mg/l NAA 與 0.2 mg /l kinetin 組合之 MS 培養基，45 天後可獲得細胞質地較為鬆軟之癒合組織⁽⁵⁾。本試驗以添加 0.5 mg/l 2,4-D 搭配 0.5 或 1.0 mg/l BA 對甘草癒合組織生長與增殖較好，且癒合組織細胞質地較為鬆軟，適合作為懸浮細胞培養。

椰子汁 (coconut milk, CM)、水解酪蛋白 (casein hydrolysate, CH) 及蛋白凍 (peptone) 為最常加入癒合組織生長培養基中的三種有機添加物。1981 年 Kerbauy and Handro 發現於培養基中添加 15 % 椰子汁，可使 *Cattleya epidendrum* 之未成熟胚發育成芽球⁽¹⁷⁶⁾。1982 年 Bajaja *et al.* 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⁽¹⁷⁷⁾。1995 年劉及張亦指出 500 mg/l CH 對西洋參之癒合組織生長有促進的效果⁽¹⁷⁸⁾。2000 年吳指出添加 (1,2,3,4 g/l) peptone 的培養基有助於馬兜鈴癒合組織之生長⁽¹⁷⁹⁾。本試驗顯示添加椰子汁及 peptone 其濃度越高褐化情況越嚴重且不利生長，而添加 250 mg/l CH 有利於生長，但當其濃度越高褐化情況越明顯且不利生長。

綜合上述，甘草癒合組織之生長與繼代培養適宜的培養基組合為全量的 MS 基礎鹽類添加 3 % sucrose、0.5 mg/l 2,4-D、0.5 或 1.0 mg/l BA、0.35 % gelrite 及 pH 5.7 \pm 0.1 之培養基，以黑暗及 25 \pm 1 $^{\circ}$ C 之恆溫下培養，會得到鬆軟且呈淡黃色的癒合組織，可供其它試驗之用。

三、 甘草癒合組織成分之測定

1997 年陳指出雖然以 B₅ 培養基測得之 daidzein 及 puerarin 之含量皆高於 MS 培養基些許，然而就褐化而言，MS 培養基較不易使葛之癒合組織褐化⁽⁴⁾。1990 年 Ikata and Itokawa 指出 3 % glucose 或 3 % maltose 對 *Coptis* 生產 berberine 的效果比 3 % sucrose 好⁽¹⁸⁰⁾。1990 年蘇等指出利用培養基 pH 值之改變，使細胞將空泡內代謝物釋出以利於抽取，能促使植物細胞二次代謝物釋出，以利工業化大量生產⁽⁶⁾。1980 年 Sharp *et al.* 報導降低 auxin 之濃度，有助於二次代謝物生成⁽¹⁸¹⁾；但 1985 年 Misawa 卻指出高濃度 2,4-D 較有利於 *Dioscorea deltoidea* 細胞形成 diosgenin⁽¹⁸²⁾。此與植物種類與成分不同，auxin 類植物生長調節劑表現出不同的調節作用。1991 年張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⁽¹⁸³⁾。2002 年郭指出水解酪蛋白(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無助益⁽⁷⁾。

1999 年蔡指出添加 (1,2,4 g/l) peptone 的培養基有助於 schizandrin 的生成⁽¹⁸⁴⁾。

1990 年 Hayashi *et al.* 指出從光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra.*) 細胞懸浮培養的細胞中分離出與 18 β -glycyrrhetic acid 相似的兩種成分，然而甘草中的主要成分 glycyrrhizin 未偵測到⁽¹⁸⁵⁾。2000 年 Wei Li 指出從光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra.*) 毛狀根培養中產生高量的黃酮類成分，但是在多數甘草品種中含有的 glycyrrhizin 並未偵測到⁽¹⁸⁶⁾。本試驗結果與上述前人相似，甘草癒合組織以 HPLC 進行測定，沒有 glycyrrhizin 之成分。然而，從圖譜中觀察到有兩個波峰 (peak A 與 peak B) 其 UV 圖譜顯示可能為 saponins 類的成分，值得做更進一步之研究與分析 (Fig. 36)。

第四章 結論

本研究進行甘草癒合組織之誘導、癒合組織之培養及其成分 glycyrrhizin 之測定，希望藉由此研究提供國內開發甘草大量繁殖及其二次代謝產物研究之參考。茲將試驗結果摘錄如下：

一、 甘草癒合組織之誘導

以甘草葉片為培植體，培養於含有 0.5 mg/L BA 及 1.0 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中，在黑暗下培養，經 30 天後葉片漸漸變黑褐色及捲曲，並由葉脈及葉片邊緣長出癒合組織。

以甘草無菌苗之根為培植體，培養於含有 0.5 mg/L BA 及 0.5 mg/L 2,4-D 之 MS 固體培養基中，誘導培養 30 天後根部漸漸膨大且長出黃綠色癒合組織。

二、 甘草癒合組織之培養

甘草癒合組織之生長與繼代培養適宜的培養基組合為全量的 MS 基礎鹽類添加 3 % sucrose、0.5 mg/l 2,4-D、0.5 或 1.0 mg/l BA、0.35 % gelrite 及 pH 5.7±0.1 之培養基，以黑暗及 25 ± 1 °C 之恆溫下培養，會得到鬆軟且呈淡黃色的癒合組織。

三、 甘草癒合組織成分之測定

甘草葉片誘導出之癒合組織，培養於不同條件下經 HPLC 測試結果並無 glycyrrhizin 成分。又以甘草無菌苗根部誘導之癒合組織為對照組，癒合組織亦無 glycyrrhizin 成分。