

公開
 密件、不公開

執行機構(計畫)識別碼:050101F221

行政院農業委員會 96 年度科技計畫研究報告

資訊庫編號:

計畫名稱：骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動：
骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖研究(II)
(第2年/全程3年)

The construction and improvement of Gu-Sui-Bu in factory
faming system: Pharmacognostical identification and
micropropagation of Gu-Sui-Bu (II)

計畫編號：96 農科-1.2.1-科-a1(19)

全程計畫期間：95 年 01 月 01 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間：96 年 01 月 01 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：郭昭麟、陳忠川、謝長奇等 3 員 (人)

計畫參與人員：林子超、張宏祺、張君儀、李佩珊、張婷翔、趙 葳、
陳運捷、李瑋婷、黃聰傑、莊兆祺、賴致誼

執行機關：中國醫藥大學中藥資源學系

合作機關：

中 華 民 國 九 十 六 年 十 二 月 三 十 一 日

農委會補助研究期末報告書

計畫主管機關 農委會

計畫執行機關 中國醫藥大學

計畫名稱 骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動子計畫一：
骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖(第1年/全
程1年)

國科會
審議編號

96210117丙010201a115

農委會
計畫編號

96農科-1.2.1-科-a1(19)



九十六年度農委會科技計畫期末摘要報告

骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動子計畫一：骨碎補類藥材基原 鑑定及組織培養大量繁殖

審議編號：96210117丙010201a115

農委會計畫編號：96農科-1.2.1-科-a1(19)

主管機關：農委會

執行單位：中國醫藥大學

計畫主持人：郭昭麟

聯絡人：郭昭麟

電話號碼：04-22053366 ext5202

傳真號碼：04-22070439

期程：96年1月1日

至96年12月31日

經費：全程 800 仟元

96年度 800 仟元

執行情形：

執行進度：	預定%	實際%	比較
當年	100.0	100.0	0.0
全程	100.0	100.0	0.0
經費支用：	預定(仟元)	實際(仟元)	支用率%
當年	800	800	100.0
全程	800	800	100.0

報告頁數：0

使用語言：中文

全文處理方式：可立即對外提供參考

中文關鍵詞：骨碎補；槲蕨；崖薑蕨；大葉骨碎補；大量繁殖；

英文關鍵詞：Gusuibu；*Drynaria fortunei*；*Pseudodrynaria coronans*；*Davallia Divaricata*；Mass Propagation

研究人員：

中文姓名	英文姓名
郭昭麟	Chao-Lin Kuo
陳忠川	Chung-Chuan Chen
謝長奇	Chang-Chi Hsieh

中文摘要：

骨碎補為常用中藥之一，根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。主要治療腎虛腰痛、耳鳴耳聾、牙齒鬆動、跌撲閃挫、筋骨折傷等。



骨碎補不僅是常用中藥且為民間常用的青草藥，民間因此大量使用本藥材，造成臺灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，本研究之目的：一、鑑別其真偽與來源植物，利用顯微鏡解剖其植物及藥材，觀察其內部構造，粉末特徵繪圖，敘述植物藥材內部，粉末組織之內容；二、進行槲蕨、崖薑蕨及大葉骨碎補藥用植物的組織培養，提供大量繁殖所需之種苗。

英文摘要：

Now Gusuibu has been used is one of the most usually in Chinese medicine, its rhizoma was used for invigorating the kidney and strengthen bones, restoring the tendon and alleviate pain, that cure for lambago due to asthenia of kidney, tinnitus and deafness, tooth-loose, sudden sprain and contusion due to trauma, sprain of extremities; ie., topical application is used for alopecia areata, seborrheic, etc. The botanical origin of rhizoma derivated of Gusuibu should be only incoulded the *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SMITH (fam. Polypodiaceae). Through collection, research and identification of Gusuibu in Taiwan, six species were found as *D. fortunei* (KUNZE) J. SMITH (fam. Polypodiaceae), *Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING (fam. Polypodiaceae), *Davallia divaricata* BLUME (fam. Davalliaceae), *Davallia mariesii* MOORE ex BAKER (fam. Davalliaceae), *Davallia solida* (FORST) SWARTZ (fam. Davalliaceae) and *Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN (fam. Davalliaceae).

Because of the numerous marking plant resources and mass application of Gusuibu in Taiwan, populations of these kind of medicines were decreasing quickly. Due to the mass demand and application of alternates of different species, the excessive collection of wild medical plants was causing obviously. The objectives in this study are: 1. To identify the true and false plant resources by using microscope, to dissect the medical plants, to observe the inside structure, to draw the picture of powdery character, to describe the contents of inside and powdery tissue. 2. To proceed the tissue-culture of the medical plants of *D. fortunei*, *P. coronans*, *D. divaricata*, etc, for the demand of seedling of mass propagation.

成果產出表：

科技論文篇數			技術移轉			研究報告 0 篇		
發表地點 ----- 類型	國內	國外	類型	項數	經費	技術創新 0 項		
期刊 論文	1 篇	0 篇	國外 引進	0 項	0 千元	技術服務 0 項		
研討會 論文	1 篇	0 篇	移轉 國外	0 項	0 千元	專利權 (核准)	國內	0 項
							國外	0 項
專著	0 篇	0 篇	移轉 企業	0 項	0 千元	著作權 (核准)	國內	1 項
							國外	0 項

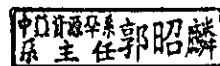


檢討與建議：

建立之槲蕨及大葉骨碎補的大量繁殖系統之溫室栽培，本研究室並無適當的地點繁殖，已協調台中縣農委會新社種苗場協助，未來將可量產大量的種苗及成株，對達成建立骨碎補類藥材產業化之體系與復育之最終目的，有極大幫助。

主辦專家簽章

單位主管簽章



■公開
□密件、不公開

執行機構(計畫)識別碼:050101F221

行政院農業委員會 96 年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：

計畫名稱：骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動：
骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖研究(Ⅱ)
(第2年/全程3年)

The construction and improvement of Gu-Sui-Bu in factory
faming system: Pharmacognostical identification and
micropropagation of Gu-Sui-Bu (Ⅱ)

計畫編號：96 農科-1.2.1-科-a1(19)

全程計畫期間：95 年 01 月 01 日至 97 年 12 月 31 日

本年計畫期間：96 年 01 月 01 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：郭昭麟、陳忠川、謝長奇等 3 員 (人)

計畫參與人員：林子超、張宏祺、張君儀、李佩珊、張婷翔、趙 葳、
陳運捷、李瑋婷、黃聰傑、莊兆祺、賴致誼

執行機關：中國醫藥大學中藥資源學系

合作機關：

中 華 民 國 九 十 六 年 十 二 月 三 十 一 日

骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動： 骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖研究(II)

郭昭麟^{1*}、謝長奇²、陳忠川¹
中國醫藥大學 中藥資源學系¹
東海大學 畜產與生物科技學系²

摘要

骨碎補為常用中藥之一，根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。主要治療腎虛腰痛、耳鳴耳聾、牙齒鬆動、跌撲閃挫、筋骨折傷；外治斑禿，白癜風等。骨碎補類藥材之來源植物應為水龍骨科(Polypodiaceae)植物槲蕨(*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)之根莖，經採集調查，發現台灣地區之骨碎補有水龍骨科 (Polypodiaceae) 槲蕨屬(*Drynaria* (BORY) J. SMITH)植物一種，槲蕨 (*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)，崖薑蕨屬(*Pseudodrynaria* (C. CHRISTENSEN) CHING)一種，崖薑蕨(*Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING)，骨碎補科(Davalliaceae)骨碎補屬(*Davallia* SMITH) 植物有三種，分別為：大葉骨碎補(*Davallia formosana* BLUME)、海州骨碎補(*Davallia mariesii* MOORE ex BAKER)、闊葉骨碎補(*Davallia solida* (FORST) SWARTZ)以及骨碎補屬(*Humata* CAVANILLES)植物一種，杯狀蓋骨碎補(*Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN)等共計六種，常用的為槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種。

骨碎補是常用中藥且為民間常用的青草藥，民間因此大量使用本藥材，造成台灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，本研究之目的：一、鑑別骨碎補類藥材的真偽與來源植物，以生藥鑑別方法進行原植物藥用部位及藥材之鑑定，首先進行外部形態的鑑別，再利用顯微鏡解剖觀察其內部組織構造，敘述植物藥材外部形態與內部組織之內容，建立其鑑別數位圖譜；二、進行槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等，藥用植物的組織培養，提供大量繁殖所需之種苗。

中文關鍵詞：骨碎補、槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補、杯狀蓋骨碎補、大量繁殖

The construction and improvement of Gu-Sui-Bu in factory farming system: Pharmacognostical identification and micropropagation of Gu-Sui-Bu (II)

Kuo Chao-Lin^{1*}, Chueh Fu-Shin², Chen Chung-Chuan¹

School of Chinese Medicine Resources, China Medical University¹

Graduate Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, China Medical University²

ABSTRACT

Now Gu-sui-bu has been used is one of the most usually in Chinese medicine, its rhizoma was used for invigorating the kidney and strengthen bones, restoring the tendon and alleviate pain, that cure for lambago due to asthenia of kidney, tinnitus and deafness, tooth-loose, sudden sprain and contusion due to trauma, sprain of extremities

ie., topical application is used for alopecia areata, seborrheic, etc. The botanical origin of rhizoma derivated of Gusuibu should be only incoulded the *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SMITH (fam. Polypodiaceae). Through collection, research and identification of Gu-sui-bu in Taiwan, four species were found as *D. fortunei*, *Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING (fam. Polypodiaceae), *Davallia formosana* BLUME, *Davallia mariesii* MOORE ex BAKER, *Davallia solida* (FORST) SWARTZ and *Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN (fam. Davalliaceae) .

Becase of the numerous marking plant resources and mass application of Gusuibu in Taiwan, populations of these kind of medicines were decreasing quickly. Due to the mass demand and application of alternates of different species, the excessive collection of wild medical plants was causing obviously. The objectives in this study are: 1. To identify the true and false plant resources by using microscope, to dissect the medical plants, to observe the inside structure, to draw the picture of powdery character, to describe the contents of inside and powdery tissue. 2. To proceed the tissue-culture of the medical plants of *D. fortunei*, *P. coronans*, *Da. formosana*, and *H. griffithiana* etc, for the demand of seedling of mass propagation.

key words: Gu-sui-bu, *Drynaria fortunei*, *Pseudodrynaria coronans*, *Davallia formosana*, *Humata griffithiana*, mass propagation

前言

骨碎補類藥材為常用中藥之一，始載於開寶本草，歷代以降諸家本草均有著錄。嘉祐本草引陳藏器本草拾遺云：『開元皇帝以其主傷折，補骨碎，故作此名耳』可知於唐代已經廣為應用。其根莖有補腎強骨、續筋止痛之效；主要治療腎虛腰痛、耳鳴耳聾、牙齒鬆動、跌撲閃挫、筋骨折傷；外治斑禿，白癜風等。近年來藥理實驗證明本類藥材具有促進骨損傷癒合的作用、促進動物骨質密度等療效，民間因此大量使用本藥材，造成台灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，因此本研究進行槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補藥用植物的組織培養，提供大量繁殖所需之種苗。進而避免同屬之植物因濫採而造成野生植物的生態破壞。上述結果亦可提供農民或業界參與大量繁殖槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補之機會，達到國產骨碎補藥材自給自足之目的。

骨碎補類藥材之來源植物應為水龍骨科 (Polypodiaceae) 植物槲蕨 (*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH) 之根莖，然市售商品來源植物種類繁多，經初步調查，發現台灣地區市售之骨碎補類藥材常用的有水龍骨科槲蕨 (*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)、崖薑蕨 (*Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING)，骨碎補科 (Davalliaceae) 大葉骨碎補 (*Davallia formosana* BLUME) 等三種 (陳忠川, 2001)，雖已有學者曾進行其基原鑑定之研究，但對其生態習性並無進一步的探討；骨碎補屬於蕨類植物在組織培養方面，目前研究並不多，故本研究進行台灣產骨碎補類藥材來源植物之生態習性的調查及其真偽鑑別並建立其鑑定圖譜，同時進行植物組織培養大量繁殖之研究 (高秀雲等, 2003)。

研究目的

骨碎補不僅是常用中藥且為民間常用的青草藥，民間因此大量使用本藥材，造成台灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，本研究之目的：(一)利用植物外部形態及內部組織構造之特徵鑑別來源植物，槲蕨 (*D. fortunei*)、崖薑蕨 (*P. coronan*)，及骨碎補科 (Davalliaceae) 之大葉骨碎補 (*Da. formosana*)、杯狀蓋骨碎補 (*H. griffithiana*) 等，建立其數位鑑別圖譜作為鑑定之依據；(二)進行槲蕨 (*D. fortunei*)、崖薑蕨 (*P. coronan*)，及骨碎補科 (Davalliaceae) 之大葉骨碎補 (*Da. formosana*)、杯狀蓋骨碎補 (*H. griffithiana*) 等四種植物的組織培養並進行馴化移植之探討，提供產業化大量繁殖所需之種苗，建立以組織培養量產特定值得開發的骨碎補藥材資源。最終目的為建立骨碎補類藥材產業化之體系。

文獻探討

骨碎補為常用中藥之一，其根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。中醫用於治療骨折、跌打損傷、促進骨質癒合。骨碎補藥材來源自古以來即相當複雜，有水龍骨科 (Polypodiaceae) 的槲蕨 (*Dr. fortunei*)、崖薑蕨 (*P. coronans*)，及骨碎補科 (Davalliaceae) 的大葉骨碎補 (*Da. divaricata*)、海州骨碎補 (*Da. mariesii*)、闊葉骨碎補 (*Da. solida*) 等 (陳忠川, 2001)。依據我國及大陸藥典的記載骨碎補正品應為槲蕨 (Anonymous, 2005)。陳忠川等 (2001) 的調查指出台灣中藥店販賣之骨碎補皆為大葉骨碎補，中藥店的骨碎補主要來自大陸。近年來台灣對骨碎補的研究，雖指出基原是崖薑蕨 (劉華昌, 1999) 或槲蕨 (許秀蘊, 2001)，都可能誤用大葉骨碎補 (陳忠川, 2001)。台灣三種骨碎補皆有，但以崖薑蕨最茂盛，最易採集，民間青草藥行以崖薑蕨為主，其次為大葉骨碎補。

文獻指出骨碎補能促進骨對鈣的吸收 (Jeong *et al.*, 2005)、對小雞骨發育生長有顯著促進作用，及含有糖類成分 (鄭虎占等人, 1998)。如上述，寡糖類成分可促進腸道對鈣的吸收，此種作用對於成長中及去卵巢大鼠的骨質密度有明顯增強作用 (Coudray *et al.*, 2003; Kruger *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2000; Zafar *et al.*, 2004)。在第一年的計畫，參照這些文獻，探討比

較三種骨碎補促進腸道鈣吸收的強弱，並且偵測盲腸的 pH 值及可溶性鈣含量，推測其是否有類似寡糖的作用。

劉華昌 (劉華昌, 1999) 的臨床評估指出崖薑蕨水抽取物對停經後骨質疏鬆的婦女有改善作用，增加骨質密度，對骨生成因子 (bone-specific alkaline phosphatase) 及尿中膠原蛋白成分有減少作用。大陸的文獻指出骨碎補對去卵巢大鼠引起骨小樑體積減少有明顯增加作用 (馬中書, 1999)。對細胞活性的研究，槲蕨能促進造骨細胞增生 (Chang et al., 2003; Jeong et al., 2005; Tang et al., 2004; Yin et al., 2004)，分化及礦化 (calcification) 作用。Liu et al. (2001) 指出槲蕨對造骨細胞沒有毒性，其抗氧化作用能保護造骨細胞不受過氧化氫的傷害。槲蕨能誘導破骨細胞凋亡 (Lin et al., 2002)，抑制破骨細胞活性 (Jeong et al., 2003; Sun et al., 2002, 2004) 及形成 (Yin et al., 2004)。在造骨細胞與破骨細胞共同培養的條件下，槲蕨對造骨細胞沒有影響，但抑制了破骨細胞的完整性 (Sun et al., 2003)。

槲蕨主要的成分是黃酮類，其中 naringin 被用來當作品質的指標 (Wang and Li, 1998; Zhou and Zhang, 1994)，故本計畫將於第二年 (96 年) 以 naringin 來評估其品質，除此之外，尚有 propylargenonidins 及 flavan-3-ols 的成分被發現，這些成分含 naringin 對造骨細胞皆有增生作用 (Chang et al., 2003)。許秀蘊 (2001) 指出槲蕨中主要的活性成分為 (-)-epicatechin-3-O- β -D-allopyranoside。由海州骨碎補分離出 epicatechin 類的成分 (Cui et al., 1992)。Naringin 雖有與 estrogen receptor 相關的報導 (Ratna and Simonelli 2002)，但對骨細胞的作用及機轉，乃至活體動物的抗骨質疏鬆作用，有關文獻相當缺乏。

研究方法

一、常用骨碎補藥材之基原鑑定及植物組織培養大量繁殖

(一) 材料

1. 槲蕨 (*D. fortunei*) 已建立之的配子體之培植體、具近成熟孢子葉及根莖。
2. 崖薑蕨 (*P. coronans*) 已建立之的配子體之培植體、具近成熟孢子葉及根莖。
3. 大葉骨碎補 (*Da. formosana*) 已建立之的配子體之培植體、具近成熟孢子葉及根莖。
4. 杯狀骨碎補 (*H. griffithiana*) 已建立之的配子體之培植體、具近成熟孢子葉及根莖。

(二) 試藥

1. sundan III solution
2. chloral hydrate solution
3. hydrochloric acid
4. phloroglucinol solution
5. glycerin : alcohol : water (1 : 1 : 1)
6. glycerin : water (1 : 1)
7. potassium hydroxide (50%)
8. ferric chloride reagent
9. iodine test solution
10. fast green FCF
11. potassium chlorate
12. safranin
13. acetomethyl green
14. methyl green
15. acidic fuchsin
16. MS Medium
17. Plant Growth Regulator (BA, 2-4D, NAA)
18. Difco Agar

19. Gelrite gellan gum (Sigma®)
20. Potato
21. Sweet potato (台農 66 號)

(三) 儀器

1. 照相機 (Nikon FM2)
2. 數位照相機 (Fiji S3PRO)
3. 顯微鏡 (Nikon photograph T-2)
4. 顯微鏡 (Olympus CH2)
5. 立體顯微鏡 (Nikon SMZ-2T)
6. 顯微測微計 (Erma 0.01mm Micrometer)
7. 描繪器 (Olympus BH2-DA drawing attachment)
8. 蒸餾水製造器 (Branson 5200)
9. 電子天平 (OHAUS GALAXY™ 160)
10. 超音波振盪器 (SONOREX SUPER RK 1028 BH)
11. 紫外燈 (CAMAG universal UV lamp $\lambda=254\text{nm}$ 或 366nm)
12. 全球定位系統 (Global Positioning System, eTrex®, 通常簡稱 GPS)
13. 無菌操作台 (Laminar flow)
14. 植物組織培養室 (Plant Tissue Culture Room)
15. 殺菌釜 (Autoclave)
16. 迴轉式恆溫震盪植物生長培養箱 (orbital shaking incubator)
17. pH meter
18. 高照度植物生長箱 (Illuminated Incubator)
19. 溫室 (Green house)

(四) 方法

1. 基原鑑定：

將各地如南投縣溪頭、嘉義縣達邦、花蓮縣天祥錐路古道、台中縣鳶嘴至稍來山步道及屏東縣里龍山等採集之骨碎補原植物，先比較其外部形態；內部之組織鑑別，則先將根莖陰乾，將其與市售品，利用徒手切片法進行橫切、放射性縱切、切線性縱切等，並置檢體於載玻片上，先以 Chloral hydrate solution 清除細胞內容物後，再滴加各種不同化學染劑，例如 5% Phloroglucinol-alcohol 與 12N HCl 進行木化反應，或滴加 Sudan III 進行木栓化反應等，最後以 Glycerin : Water (1 : 1) 混合溶液將檢品封鎖，蓋上蓋玻片，然後置於顯微鏡下觀察，先用低倍鏡頭檢查檢品之弱擴大圖，再用高倍鏡觀察內部組織之特徵，利用顯微鏡之攝影成數位影像或描繪器描繪各組織並製成數位影像，作為鑑別及鑑定的依據。

2. 植物組織培養：

- (1) 培植體之消毒：取槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種，植株葉片上的孢子為培植體，以清水沖洗乾淨後，先浸泡於 70% 酒精消毒 30 秒後，再以 1% 次氯酸鈉溶液 (每 100 mL 含 tween20 兩滴) 於超音波震盪器進行表面消毒 15~20 分鐘，移至無菌操作臺經無菌水洗滌 3 次後，置於無菌培養皿上取出孢子，放置於培養基中待長出配子體，再利用其配子體之植株，交配繁殖為孢子體之植株進行大量繁殖。
- (2) 培養基的配製：以 MS (Murashige & Skoog, 1962) 無機鹽類及有機成分為基本配方，添加 3% 蔗糖及 0.9% Difco agar (或 0.4% Gelrite)，配合 NAA (α -naphthaleneacetic acid)、2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)、BA (6-benzyladenine)、kinetin 等各類植物生長調

節劑，培養基加入 agar 前先用 1N NaOH_(aq)及 HCl_(aq)將 pH 值調至 5.70 ± 0.01 ，然後以 121°C 、 15 lb/in^2 (1.05 kg/cm^2) 進行高壓滅菌 15 分鐘後，擺成斜面冷卻備用。

- (3)培養環境：接種後，將材料置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 之恆溫、黑暗或照光（固體培養：光量 $100 \mu\text{E/m}^2\text{s}$ ，光波長 350~800 nm；液體培養：光量 $10 \mu\text{E/m}^2\text{s}$ ）下培養。
- (4)接種方式：以試管為培養容器，內含 10 ml 培養基，每支試管接種二片含有孢子之葉片。接種後培養於 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、黑暗或光強 $100 \mu\text{E/m}^2\text{s}$ ，每日照光 14 小時，相對濕度為 75 % 的平面迴轉式震盪器或培養室。
- (5)植株之誘導及大量繁殖體系：由無菌孢子所獲得的配子體，接種於不添加或添加 1~8% 的馬鈴薯泥、1~8% 的蕃薯泥、0.5~2 mg/L BA 或 kintein 之 1/2 MS 固體培養基，經 30 天後調查植株的誘導率，所獲得的植株再進行大量繁殖體系的探討。
- (6)植株大量繁殖體系：進行透氣試驗，比較其生長情形。
- (7)建立植株大量繁殖體系之馴化：將無菌培養所得的配子體植株，先於植物生長箱中馴化，培養一個月後再移至溫室中，進一步探討建立馴化之大量繁殖體系。

結果與討論

1. 完成槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種原植物之採集、生態習性調查及鑑定，有助於骨碎補類藥材與原植物種源的鑑別及大量繁殖條件的建立。槲蕨具二型葉一回羽裂複葉，根莖扁圓形較小被暗黃色毛；崖薑蕨葉基部膨大呈類心型，一至二回羽裂複葉，根莖類圓形粗大，嫩根莖被金黃色毛易剝落；均屬於水龍骨科 (Polypodiaceae)，葉脈明顯，孢子囊分布於網紋中，無孢膜。大葉骨碎補四或五羽裂複葉，根莖類圓形略大，被棕黃色毛，杯狀蓋骨碎補三回羽狀複葉，根莖類圓形較細小，淡黃~灰白色毛，屬骨碎補科 (Davalliaceae)，孢子囊分布於小脈頂端，具孢膜；可由其根莖形態、被毛顏色及孢膜的有無作為鑑別之依據，如圖1-8；其根莖組織可由散生外韌形維管束形態及排列來區別。調查結果如下：**①槲蕨**：臺北市石牌軍艦岩、芝山岩、臺中縣石崗鄉、谷關地區、南投縣溪頭、新竹縣內灣山區、花蓮縣綠水合流步道、砂卡槽步道及臺東縣都蘭山；**②崖薑蕨**：臺北市芝山岩、嘉義縣奮起湖山區、南投縣溪頭、杉林溪、信義鄉、苗栗縣馬拉邦山山區及臺東縣都蘭山；**③大葉骨碎補**：台東縣霧台鄉山區、都蘭山、新竹縣竹東鎮清泉溫泉及屏東縣墾丁大尖山；**④杯狀蓋骨碎補**臺中縣新社鄉、鷹嵩嘴山至稍來山、南投縣杉林溪、梅峰台灣大學山地農場、霧社及新竹縣竹東鎮清泉溫泉。
2. 完成槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補之原葉體大量繁殖體系之試驗，並獲得良好的成果，其結果以 pH 7.7 1/2MS 為最佳條件，如圖9-12。同時進行原葉體誘導孢子體試驗，其結果以 pH 5.7 1/2MS 添加 4% 馬鈴薯泥為最佳條件，已達成建立大量繁殖體系之計畫目的，圖13-16。
3. 槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種植株之根莖誘導孢子體之大量繁殖條件，以含 0.2 ppm BA 較好，雖有初步結果，但繁殖數量不如預期，仍有探討的空間，如圖17-20，將進一步評估其它條件，目前已進行試驗中。
4. 槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎及杯狀蓋骨碎補等四種植株，由原葉體於無菌培養及馴化移殖發育為孢子體試驗，已獲良好結果，並進行馴化及移殖栽培於溫室的大量繁殖體系之初探，已獲得一定量種苗，將進一步進行其大量繁殖，如圖21-24。將朝提供產業化大量繁殖種苗，建立骨碎補類藥材產業化之體系的目的進行。
5. 計畫執行採集之骨碎補類材料，進行其抗氧化的評估及探討，其結果已投稿並刊登 *Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as 'Gu-Sui-Bu'*. H.C. Chang & D. C. Agrawal & C.L. Kuo & J.L. Wen & C.C. Chen & H.S. Tsay *Botanical Studies*. (2007) 48: 397-406. 可作為進一步開發保健食品的參考。
6. 配合子計畫二，將建立之槲蕨、崖薑蕨及大葉骨碎補等的大量繁殖系統之溫室栽培，本研究室並無適當的地點繁殖，已協調農委會新社種苗場協助，未來將可量產大量的種苗及成株，對達成建立骨碎補類藥材產業化之體系與復育之最終目的，有極大幫助。

計畫成果自評

本研究已完成槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種原植物之採集、生態習性調查及鑑定，有助於骨碎補類藥材與原植物種源的鑑別及大量繁殖條件的建立。槲蕨具二型葉一回羽裂複葉，根莖扁圓形較小被暗黃色毛，孢子囊散佈；崖薑蕨葉基部膨大呈類心型，一至二回羽裂複葉，根莖類圓形粗大，嫩根莖被金黃色毛易剝落，孢子囊排列呈線形；均屬於水龍骨科 (Polypodiaceae)，葉脈明顯，孢子囊分布於網紋中，無孢膜。大葉骨碎補四或五羽裂複葉，根莖類圓形略大，被棕黃色毛；杯狀蓋骨碎補三回羽狀複葉，根莖類圓形較細小，淡黃~灰白色毛，屬骨碎補科 (Davalliaceae)，孢子囊分布於小脈頂端，具孢膜；可由其根莖形態、被毛顏色及孢膜的有無作為鑑別之依據。並完成槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補由原葉體於無菌培養及馴化移殖發育為孢子體試驗，已獲良好結果，同時進行之馴化並移殖栽培於溫室之大量繁殖體系之探討，已可獲得大量種苗，將有助於提供農民或業界大量繁殖之推廣，達成國產骨碎補藥材自給自足之目的。

計畫執行採集之骨碎補類材料，進行其抗氧化的評估及探討，其結果已投稿並刊登：『Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as 'Gu-Sui-Bu'. H.C. Chang & D. C. Agrawal & C.L. Kuo & J.L. Wen & C.C. Chen & H.S. Tsay *Botanical Studies*. (2007) 48: 397-406.』。結合第一年的成果於2007台灣藥學會年會暨學術研討會中以壁報發表：『Pharmacognostical identification and micropropagation of Gu-Sui-Bu (I)』。以上成果，除可作為進一步開發保健食品的參考外，亦有利於業界之應用與學術價值。



圖1. 槲蕨之野生植株
Fig.1 A wild plant of *D. fortunei*



圖2. 崖薑蕨之野生植株
Fig.2 A wild plant of *P. coronans*



圖3. 大葉骨碎補之野生植株
Fig.3 A wild plant of *Da. divaricata*

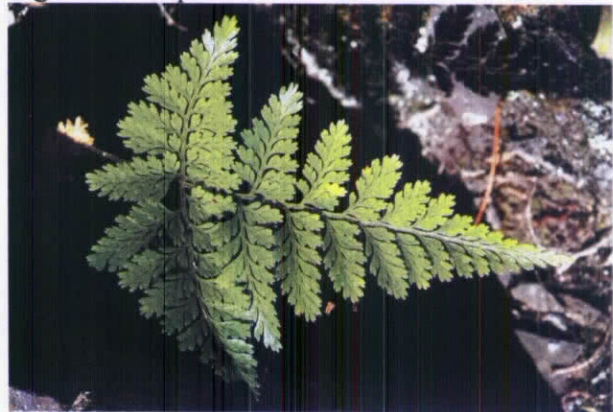


圖4. 杯狀蓋骨碎補之野生植株
Fig.4 A wild plant of *H. griffithiana*

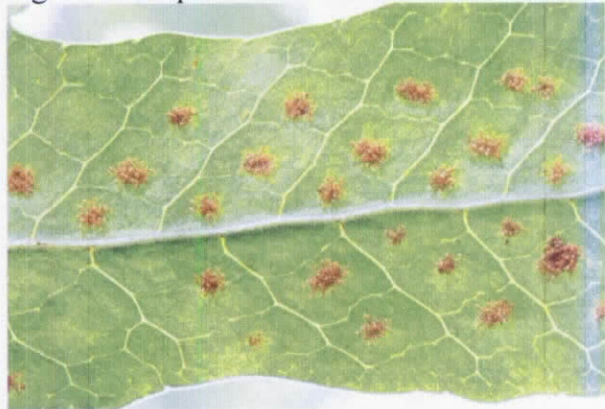


圖5. 槲蕨之不具胞膜孢子，散佈
Fig.5 Non-indusiate spore of *D. fortunei*

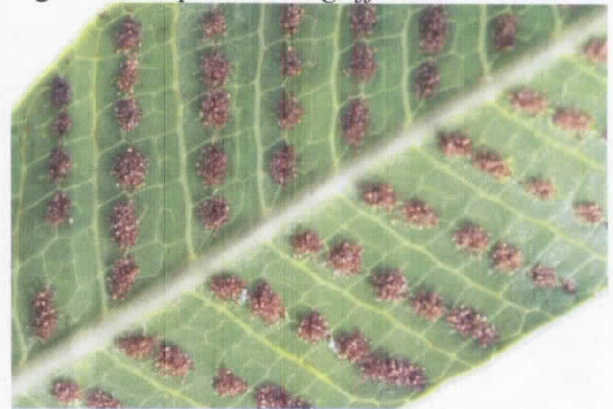


圖6. 崖薑蕨之不具胞膜孢子，排列呈線形
Fig.6 Non-indusiate spore of *P. coronans*



圖7. 大葉骨碎補之具胞膜孢子
Fig.7 Indusiate spore of *Da. formosana*



圖8. 杯狀蓋骨碎補之具胞膜孢子
Fig.8 Indusiate spore of *H. griffithiana*



圖9. 槲蕨之根莖
Fig.9 Rhizoma of *D. fortunei*



圖10. 崖薑蕨之根莖
Fig.10 Rhizoma of *P. coronans*



圖11. 大葉骨碎補之根莖
Fig.11 Rhizoma of *Da. formosana*



圖12. 杯狀蓋骨碎補之根莖
Fig.12 Rhizoma of *H. griffithiana*



圖13. 槲蕨根莖之弱擴大圖
Fig.13 Amplify of rhizoma of *D. fortunei*

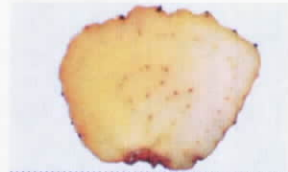


圖14. 崖薑蕨根莖之弱擴大圖
Fig.14 Amplify of rhizoma *P. coronans*



圖15. 大葉骨碎補根莖之弱擴大圖
Fig.15 Amplify of rhizoma of *Da. formosana*



圖16. 杯狀蓋骨碎補根莖之弱擴大圖
Fig.16 Amplify of rhizoma of *H. griffithiana*



圖17. 槲蕨原葉體大量繁殖的培養中獲得之孢子體
Fig.17 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *D. fortunei*

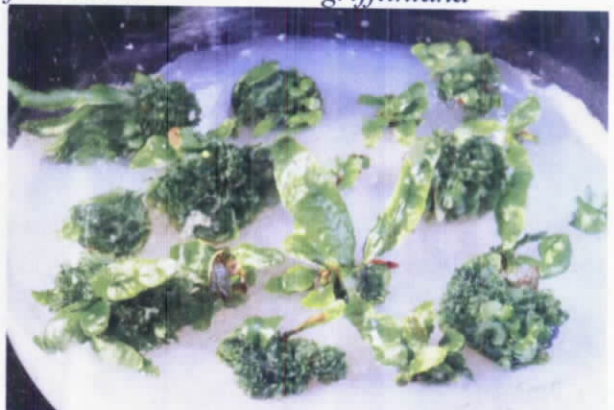


圖18. 崖薑蕨原葉體大量繁殖的培養中獲得之孢子體
Fig.18 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *P. coronans*



圖19. 大葉骨碎補原葉體大量繁殖的培養中獲得之孢子體
Fig.15 The mass propagation of prothallia and production of *Da. formosana*



圖20. 杯狀蓋骨碎補原葉體大量繁殖的培養中獲得之孢子體
Fig.16 The mass propagation of prothallia and production of *H. griffithiana*



圖21. 槲蕨大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體

Fig.25 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *D. fortunei* by taming transplant and cultivating in growth chamber.



圖22. 崖薑蕨大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體

Fig.26 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *P. coronans* by taming transplant and cultivating in growth chamber.



圖23. 大葉骨碎補大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體

Fig.23 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant and cultivating in growth chamber



圖24. 杯狀蓋骨碎補大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體

Fig.24 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *H. griffithiana* by taming transplant and cultivating in growth chamber.



圖25. 槲蕨孢子體無菌培養六個月發育為成株及其根莖

Fig.25 Sporophytes of the *D. fortunei* cultivating six month growth for plant and the rhizome in a sterilized medium.



圖26. 崖薑孢子體無菌培養六個月發育為成株及其根莖

Fig.26 Sporophytes of the *P. coronans* cultivating six month growth for plant and the rhizome in a sterilized medium.



圖27. 大葉骨碎補孢子體無菌培養六個月發育為成株及其根莖

Fig.27 Sporophytes of the *Da. formosana* cultivating six month growth for plant and the rhizome in a sterilized medium.



圖28. 杯蓋狀骨碎補孢子體無菌培養六個月發育為成株及其根莖

Fig.28 Sporophytes of the *H. griffithiana* cultivating six month growth for plant and the rhizome in a sterilized medium.



圖 29. 槲蕨馴化移殖至小盆栽置於生長箱中栽培，並初步移殖於溫室大量繁殖

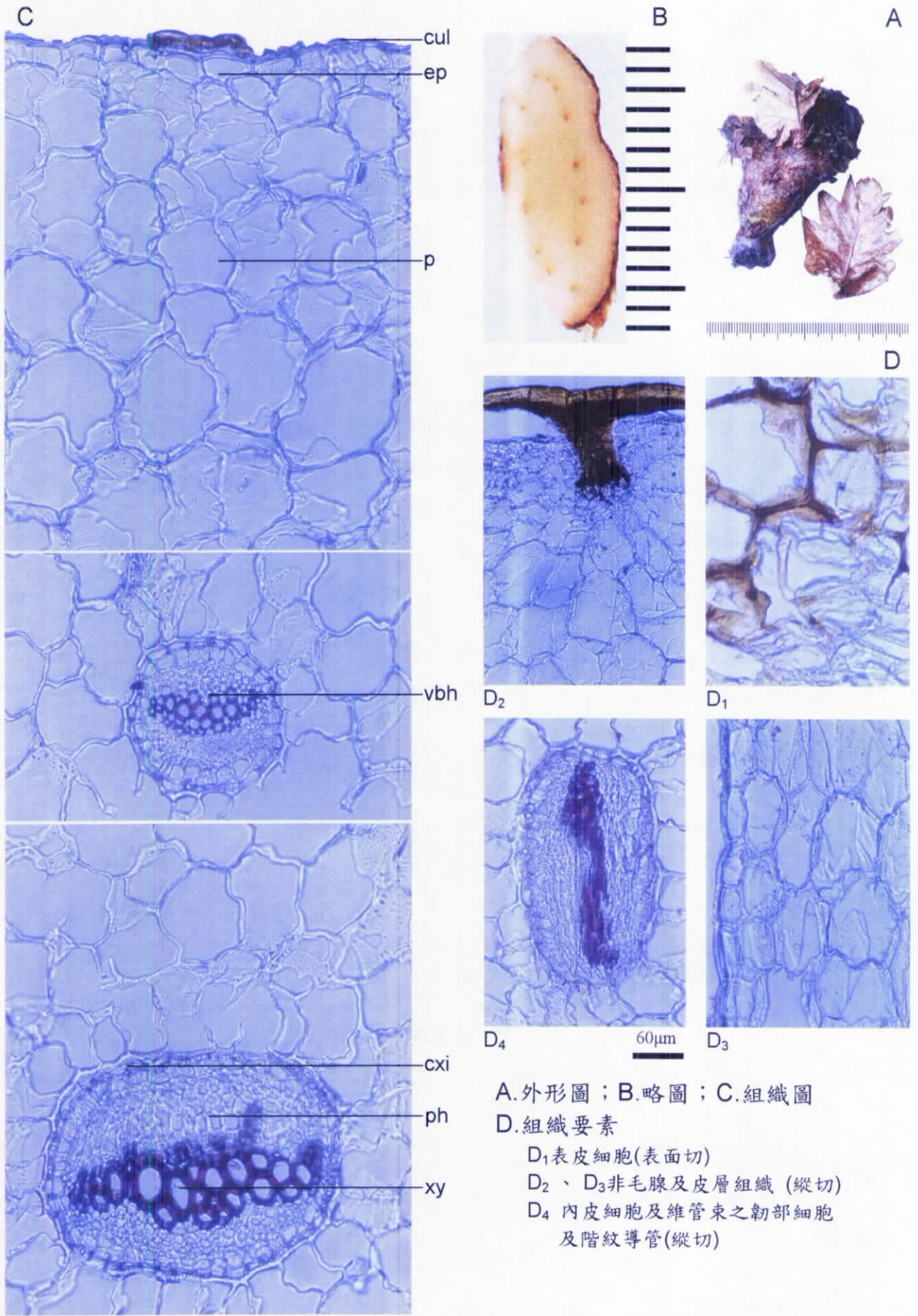
Fig.29 The mass propagation of greenhouse of sporophytes of *D. fortunei* by taming transplant in small pots and cultivating in growth chamber



圖 30. 大葉骨碎補馴化移殖至小盆栽置於生長箱中栽培，並初步移殖於溫室大量繁殖

Fig.30 The mass propagation of greenhouse of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant in small pots and cultivating in growth chamber



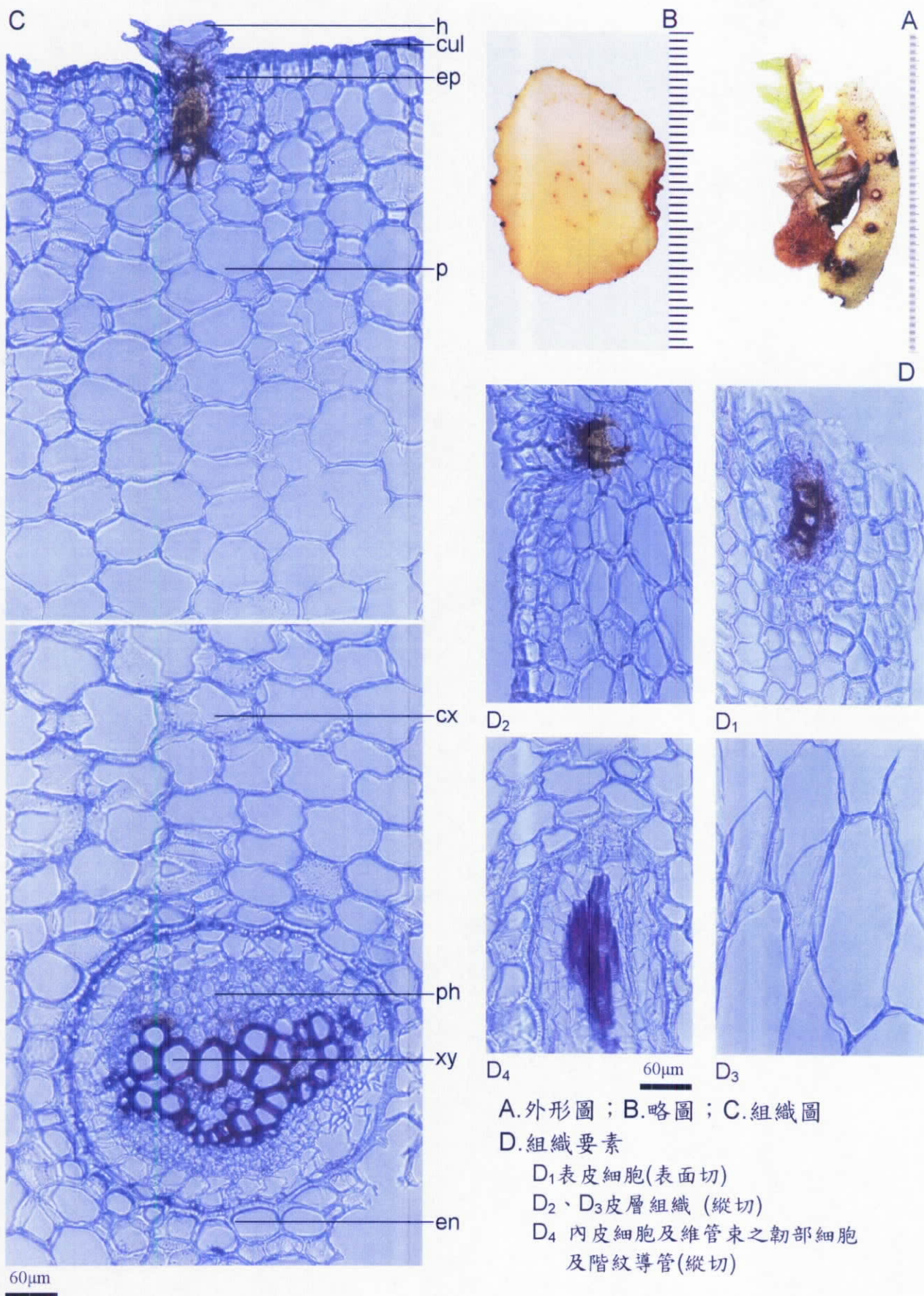


A. 外形圖；B. 略圖；C. 組織圖

D. 組織要素

- D₁ 表皮細胞(表面切)
- D₂、D₃ 非毛腺及皮層組織(縱切)
- D₄ 內皮細胞及維管束之韌部細胞及階紋導管(縱切)

圖31. 槲蕨 (*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH) 根莖組織圖



A. 外形圖；B. 略圖；C. 組織圖

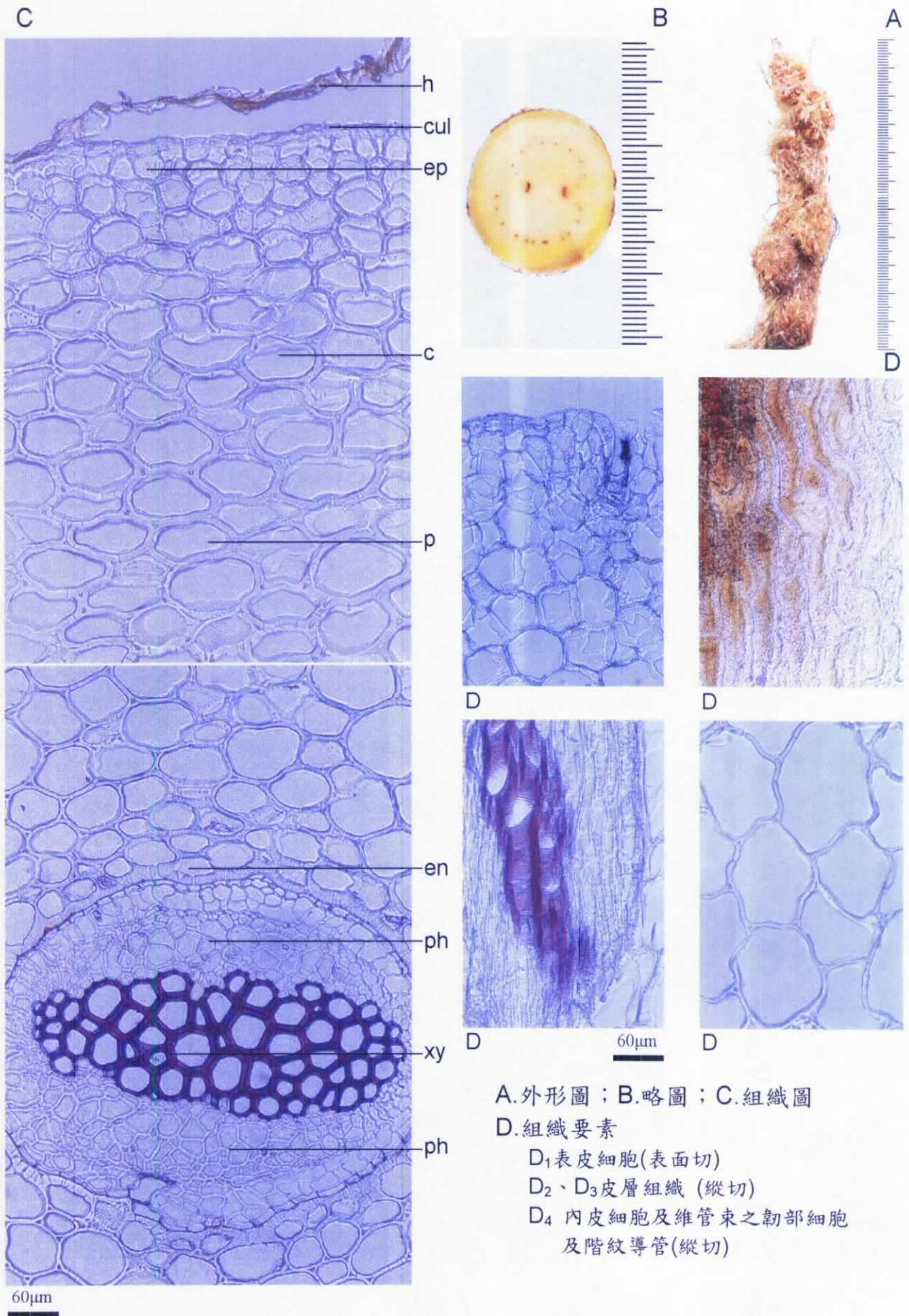
D. 組織要素

D₁ 表皮細胞(表面切)

D₂、D₃ 皮層組織 (縱切)

D₄ 內皮細胞及維管束之韌部細胞
及階紋導管(縱切)

圖32. 崖薑蕨(*Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING) 根莖組織圖



A.外形圖；B.略圖；C.組織圖

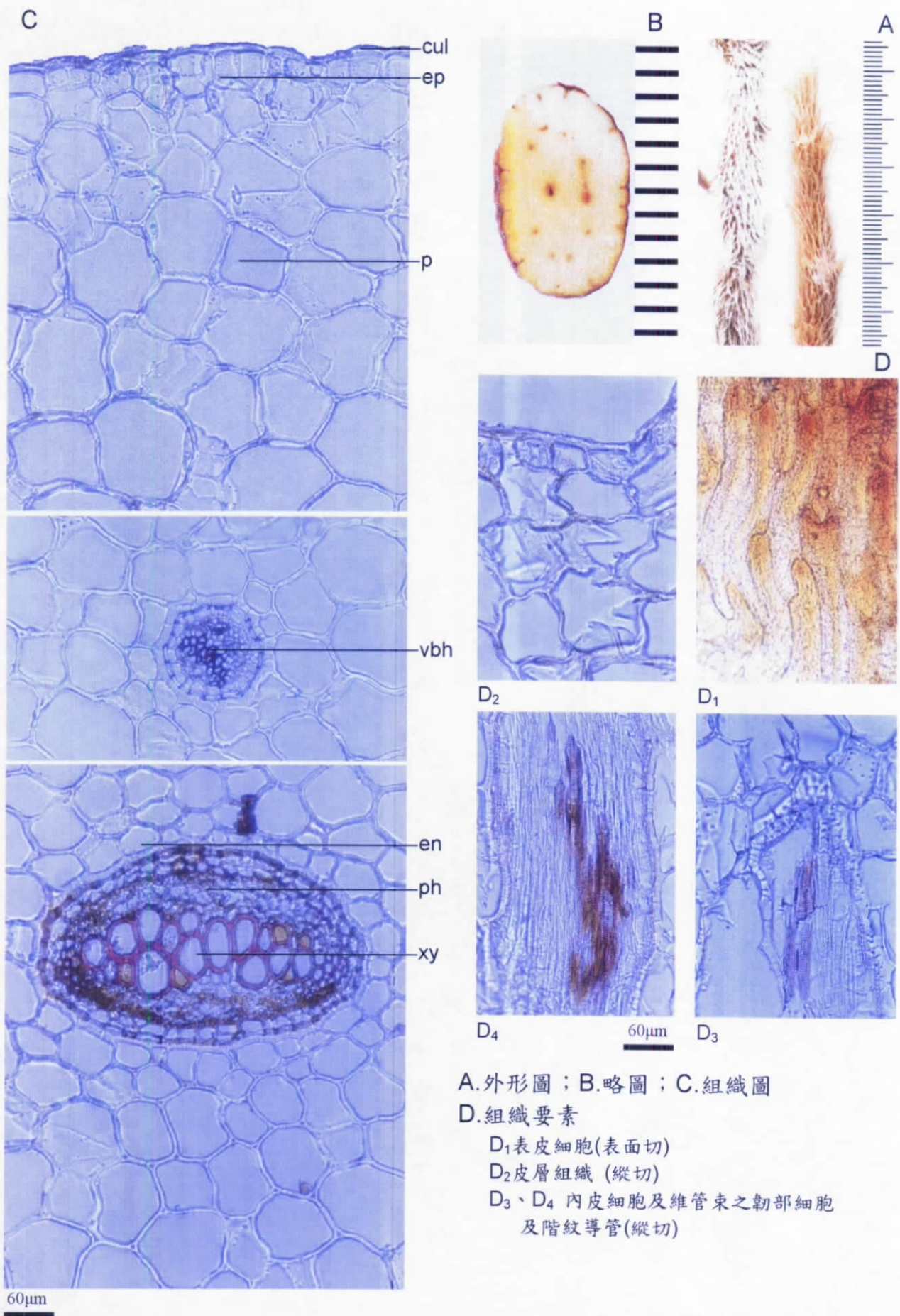
D.組織要素

D₁表皮細胞(表面切)

D₂、D₃皮層組織(縱切)

D₄ 內皮細胞及維管束之韌部細胞
及階紋導管(縱切)

圖33. 大葉骨碎補 (*Davallia formosana* BLUME) 根莖組織圖



A.外形圖；B.略圖；C.組織圖

D.組織要素

D₁表皮細胞(表面切)

D₂皮層組織(縱切)

D₃、D₄ 內皮細胞及維管束之韌部細胞
及階紋導管(縱切)

圖34.杯狀蓋骨碎補(*Humata griffithiana* C. CHRISTENSEN)根莖組織圖

參考文獻

- 馬中書、王蕊、邱明才、李玉坤、鄭方道 張鑫 四種補腎中藥對去卵巢大鼠骨質疏鬆骨形態的作用。中華婦產科雜誌 1999；34：82-85。
- 高秀雲、葉德銘 2003。脆鐵線蕨孢子無菌撒播繁殖體系之建立。台灣林業科學 18(1): 33-42。
- 許秀蘊 骨碎補之類黃鹼素對骨細胞活性影響之評估。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告，2001。
- 陳忠川 2001。台灣市售骨碎補藥材之生藥學研究。行政院衛生署九十年度科技研究發展計畫委託研究報告。
- 劉華昌 1999。傳統骨科中藥材骨碎補對骨母細胞之生理活性研究。行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫委託研究報告。
- 鄭虎占、董澤宏、余靖 中藥現代研究與應用。學苑出版社，北京，1999，第四卷，pp.3328。
- Anonymous. 2005. Pharmacopoeia Commission of People Republic of China (ChPC), Vol.1., Chemical Industry Press, China, 179-180.
- Asaka, I., I. Ii, M. Hirofani, Y. Asada, T. Yoshikawa, and T. Furuya. 1994. Mass production of ginseng (*Panax ginseng*) embryoids on media containing high concentrations of sugar. *Planta Med.* 60: 146-148.
- Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of germplasm of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer-Verlag, Berlin, pp. 419-434.
- Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Canadian Medical Association Journal.* 167(Suppl):S1-34.
- Camloh M, Gogala N, Rode J. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum* in vitro. *Scientia Horticulturae* 56: 257-266.
- Chang, W. C. and Y. I. Hsing. 1980. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Theor. Appl. Genet.* 57: 133-135.
- Chang EJ, Lee WJ, Cho SH, Choi SW. 2003. Proliferative effects of flavan-3-ol and propelargonidins from rhizomes of *Drynaria fortunei* on MCF-7 and osteoblastic cells. *Arch. Pharm. Res.* 26:620-630.
- Chen, C. H. and J. C. Wang. 1999. Revision of the genus *Gentiana* L. (Gentianaceae) in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 9-38.
- Chen, C. C., W. T. Chang, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1994. Studies on the tissue culture of *Angelica dahurica* var. *formosana* II. Establishment of cell suspension culture and evaluation of cultural conditions. *J. Chinese Medicine* 5: 123-134. (in Chinese)
- Choi, Y. E., J. W. Kim, and E. S. Yoon. 1999. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann. Bot.* 83: 309-314.
- Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, and K. T. Choi. 1998. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of *Korean ginseng* on hormone-free medium. *Plant Cell Rep.* 17: 544-551.
- Coudray C, tressol JC, gueux E, Rayssiguier Y. 2003. Effect of inulin-type fructants of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur. J. Nutr.* 42:91-98.
- Cui CB, Tezuka Y, Kikuchi T, Nakano H, Tamaoki T, park JH. 1992. Constituents of fern, *Davallia mariesii* Moore. II. Identification and ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectra of procyanidin B-5, epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin, and epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin. *Chem. Pharm. Bull.* 40:889-898.
- Fay, M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:1-4.

- Feijoo, M. C. and I. Iglesias. 1998. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. *Aurantiaca* Lainz, using in vitro culture. *Plant Tiss. Cult. Bio.* 4: 87-94.
- Fu RZ, Wang J, Sun YR, Shaw PC. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots. *Biotechniques.* 1998 Nov;25(5):796-8, 800-1.
- Hennen GR, Sheehan TJ. 1978. *In vitro* propagation of *Platyserium stemaria* (Beauvois) Desv. *Hort science* 13: 245.
- Hiraoka, N. and M. Oyanagi. 1988. *In vitro* propagation of *Glehnia littoralis* from shoot-tips. *Plant Cell Rep.* 7: 39-42.
- Hoshizaki JH. 1977. Staghorn ferns today and tomorrow. *Gardens Bulletin.* 30: 13-15.
- Hu, Q., S. B. Andersen, and L. N. Hansen. 1999. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in *Isatis indigotica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 155-157.
- Huang, W. W., C. C. Cheng, F. T. Yeh, and H. S. Tsay. 1993. Tuber culture of *Dioscorea doryophora* Hance I. Callus induction from different source organs and the measurement of diosgenin content. *China Medical College J.* 2: 151-160.
- Huang, C. L., M. T. Hsieh, W. C. Hsieh, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf- and inflorescence-node explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 220-224.
- J. Ambrozic Dolinsek, M. Camloh. 1997. Gametophytic and sporophytic regeneration from bud scales of the fern *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. *in vitro.* *Annals of Botany* 80: 23-28, 1997.
- Jeong JC, Kang SK, Lee JW, Youn CH, Jeong CW, Kim HM, Lee YC, Chang YC, Kim CH. 2003. Inhibition of *Drynariae* rhizome extracts on bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts. *Int. Immunopharmacol.* 3:1685-1697.
- Jeong JC, Lee JW, Yoon CH, Lee YC, Chung KH, Kim MG, Kim CH. 2005. Stimulative effects of *Drynariae* rhizome extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Ethnopharma.* 96:489-495.
- Kalu DK. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15:175-192.
- Kang, Q. S. and S. S. Hou. 1993. Recent advances in the research on the natural antitumor drug taxol. *Natural Prod. Res. Dev.* 5: 61-68.
- Kelly O, Cusack S, Jewell C, Cashman KD. 2003. The effect of polyunsaturated acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young rats. *Br. J. Nutr.* 90:743-750.
- Kitamura, Y., H. Miura, and M. Sugii. 1989. Plant regeneration from callus cultures of *Swertia pseudochinensis*. *Shoyakugaku Zasshi* 43:256-258.
- Kondo, Y., F. Takano, and H. Hojo. 1994. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice. *Planta Med.* 60: 414-416.
- Kruger MC, Brown KE, Collett G, Layton L, Schollum LM. 2003. The effect of fructooligosaccharide with various degree of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp. Biol. Med* 228:683-688.
- Lin CY, Sun JS, Sheu SY, Lin FH, Wang YJ, Chen LT. 2002. The effect of Chinese medicine on bone cell activities. *Am. J. Chin. Med.* 30:271-285.
- Liu HC, Chen RM, Jian WC, Lin YL. 2001. Cytotoxic and antioxidant effects of the water extracts of the traditional Chinese herb gusibu (*Drynaria fortunei*) on rat osteoblasts. *J. Formos. Med. Assoc.* 100: 383-388.
- Liu, S. Y., H. S. Tsay, H. C. Huang, M. F. Hu, and C. C. Yeh. 1987. Comparison on growth characteristics and nutrient composition between plants of *Anoectochilus* species from mass vegetative propagation by tissue culture techniques. *J. Agric. Res. China* 36: 357-366.
- Litchfield JT, Wilcoxon F: 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113.

- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, demigne C, Remesy C. 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11:500-508.
- Ratna WN, Simonelli JA. 2002. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences* 70:1577-1589.
- Miura, Y. and M. Tabata. 1986. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Foeniculum vulgare*. *Plant Cell Rep.* 5: 310-313.
- Meng, Y. L., Y. P. Gao, and J. F. Jia. 1996. Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis*. *Plant Cell Rep.* 16: 88-91.
- Richards JH, Beck Z, Hirsch AM. 1983. Structural investigations of asexual reproduction in *Nephrolepis exaltata* and *Platyserium bifurcatum*. *American journal of botany* 70: 993-1001.
- Sheffield E & Bell PR. 1987. Current studies of the pteridophyte life cycle. *Bot. Rev.* 53: 442-490.
- Sun JS, Lin CY, Dong GC, Sheu SY, Lin FH, Chen LT, Wang YJ. 2002. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) on bone cell activities. *Biomaterials* 23:3377-3385.
- Sun JS, Dong GC, Lin CY, Sheu SY, Lin FH, Chen LT, Chang WHS, Wang YJ. 2003. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) immobilized modified calcium hydrogenphosphate on bone cell activities. *Biomaterials.* 24:873-882.
- Tang Q, Chen LL, Yan J. 2004. Effects of traditional Chinese medicine *Drynaria fortunei* J. Smith on promoting the proliferation, differentiation and calcification of mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 29:164-168.
- Tanimoto H, Mori M, Motok M, Toru K, Kadowaki M, Noguchi T. 2001. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 516-521.
- Thentz M, Moncousin C. 1984. Micropropagation in vitro development *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *Revue Horticole Suisse* 57: 293-297.
- Tsay, H. S., T. G. Gau, and C. C. Chen. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8: 450-454.
- Tsay, H. S. and H. L. 1998. Huang. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-derived suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Plant Cell Rep.* 17: 670-674.
- Walkey, D. G. A. and K. A. Matthews. 1979. Rapid clonal propagation of rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) from meristem-tips in tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 14:287-290.
- Wang Y, Li J. 1998. Qualitative identification and quantitative determination of naringin in rhizome *Drynariae* by TLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 23:685-686.
- Wee YC, Kwa SH, Loh CS. 1992. Production of sporophytes from *Platyserium coronarium* and *P. ridleyi* frond strips and rhizome pieces culture *in vitro*. *American fern journal* 82: 75-79.
- Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca. 1993. Taxus callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 181-193.
- Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca. 1994. Taxus cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol. *J. Plant Physiol.* 144: 183-188.
- Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Tran QL, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. 2004. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol. Phar., Bull.* 27:583-586.
- Zatar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME. 2004. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 134:399-402.
- Zhou FR, Zhang ZQ. 1994. Quality evaluation of 3 kinds of rhizome *Drynariae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19:261-263.