

培養基組成分對高氏柴胡癒合組織增殖與柴胡皂苷含量之影響¹

陳威臣² 夏奇鈺² 葉茂生³ 曹進義² 蔡新聲^{4,5}

摘 要

陳威臣、夏奇鈺、葉茂生、曹進義、蔡新聲。2008。培養基組成分對高氏柴胡癒合組織增殖與柴胡皂苷含量之影響。台灣農業研究 57:119–132。

本研究利用高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang) 葉片癒合組織培養於添加 0.2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D) 之 1/2 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本培養基 (D2 培養基)，探討其他培養基組成分的添加對癒合組織增殖與柴胡皂苷 (saikosaponins) 含量之影響。在測試的培養基組成分中，除細胞分裂素 (cytokinins) 的添加對癒合組織生長有抑制作用外，其他培養基組成分及其濃度分別為 3% 蔗糖、0.9% 洋菜 (Difco Bacto-agar)、0.5 g/L 蛋白胨 (peptone)、0.5 g/L 水解酪蛋白 (casein hydrolysate) 與 100 mL/L 椰子汁 (coconut water) 對於癒合組織生長均有促進效果。將上述可促進癒合組織生長之影響因子配合不同濃度 MS 鹽類進行試驗結果顯示，癒合組織之增殖以 1/4× MS 與 1/2× MS 鹽類濃度較佳，但其繼代培養間隔時間以不超過 6 週為宜；上述 MS 鹽類濃度試驗所得癒合組織經高壓液相層析 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析結果顯示，以 1× MS 鹽類濃度培養之癒合組織具有較高之柴胡皂苷乾重含量。

關鍵詞：柴胡、藥用植物、細胞培養、二次代謝物、高壓液相層析。

前 言

柴胡 (Chai-Hu, *Bupleuri Radix*) 藥材列名神農本草經之草部上品，具有去腸胃中結氣、寒熱邪氣，更有推陳致新、久服輕身、明目益精等功能，於台灣、日本、韓國及中國等地區均有廣泛利用；中國藥典所列正品柴胡基原植物為繖形科 (Umbelliferae)、柴胡屬 (*Bupleurum*) 植

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2319 號。接受日期：97 年 6 月 20 日。
 2. 本所生物技術組助理研究員、副研究員、聘用人員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 3. 中興大學農藝學系教授。台灣 台中市。
 4. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 5. 通訊作者，電子郵件：hstsay@cyut.edu.tw；傳真機：(04) 23742371。

物之北柴胡 (*B. chinense* DC)，而日本則是以其原生之三島柴胡 (*B. falcatum* L.) 為正品柴胡 (Gan 1985; Hiraoka 1989; Pan *et al.* 2002; Tang & Eisenbrand 1992; Uomori & Tomita 1974)。柴胡根部所含柴胡皂苷 a、c 與 d (saikosaponin a, c, d; SSa, SSa, SSd) 為具有藥理生物活性的主要物質，現代藥理研究證實 SSa 與 SSd 具有優異的保肝、抗 B 型肝炎病毒、抗氧化、消炎與抑制癌細胞增生等效果 (Benito *et al.* 1998; Chiang *et al.* 2003; Yen *et al.* 1991; Yen *et al.* 2005; Wang *et al.* 2004, 2005; Hsu *et al.* 2004a, 2004b, 2004c)；而臺灣特有高氏柴胡 (*B. kanoi* Liu, Chao *et al.* Chuang) 其柴胡皂苷含量業經證實優於三島柴胡與北柴胡 (Yen *et al.* 1991; Yen *et al.* 2005)。

近年來，因自然環境逐漸遭受破壞，部分重要藥用植物已面臨嚴重之生存威脅；利用組培技術大量繁殖藥用植物細胞，進而運用科學方法提高其藥用二次代謝物之質與量，對於重要藥用成分生產具有相當貢獻 (Berlin 1988; Bourgaud *et al.* 2001; DiCosmo & Misawa 1995; Mulabagal *et al.* 2004; Nalawade *et al.* 2004; Sagare *et al.* 2000; Verpoorte 2002)。Chen *et al.* (2005) 研究結果顯示，培養 8 週高氏柴胡癒合組織之 SSa + SSa + SSd 含量即可達市售品 (北柴胡) 含量之 18.8%，因此值得進一步探討促進高氏柴胡癒合組織增殖的適當條件並提高其柴胡皂苷產量。

目前對於柴胡癒合組織誘導與增殖的報導並不多，僅有三島柴胡 (Hiraoka *et al.* 1986; Wang & Huang 1982) 的數篇報告；而高氏柴胡相關研究資料的建立則有待加強 (Chen *et al.* 2005)。本研究利用高氏柴胡組培苗葉片誘導癒合組織，選擇生長快速且質地優良癒合組織建立大量增殖系統，並利用 HPLC 法檢測各檢品之柴胡皂苷含量，將有助於後續高氏柴胡懸浮細胞培養之建立。

材料與方法

供試材料、培養基配製與培養條件

利用高氏柴胡組培苗 (Chen *et al.* 2004, 2006) 葉片片段進行癒合組織之誘導 (Chen *et al.* 2005)，所得癒合組織經 3-4 次 (每次 4-6 週) 繼代培養後，選取生長均一且質地細密之癒合組織進行後續試驗，繼代培養係將癒合組織培養於含半量 MS 無機鹽類與全量 MS 維生素 (1/2 MS)，並添加 0.2 mg/L 2,4-D、3%蔗糖及 0.9%洋菜之培養基 (D2 培養基)，而後以 D2 培養基配合不同培養基組成分進行癒合組織增殖試驗。培養容器為內含 10 mL 培養基之玻璃試管 (25 mm × 120 mm, Pyrex, 日本)，接種後癒合組織均置於 25 ± 1°C 恆溫、黑暗環境培養。癒合組織增殖試驗均採用 4 個重複，每重複培養 10 個 0.2 g 癒合組織。

培養基組成分對葉片癒合組織生長與增殖之影響

取約 0.2 g 癒合組織培養於 D2 培養基，並分別添加下列成分，包括細胞分裂素：0.5 與 1.0 mg/L N-糠基腺嘌呤 (N-furfuryladenine, kinetin, Sigma, 美國)；0.5 與 1.0 mg/L 苄基腺嘌呤 (N6-benzyladenine, BA, Sigma, 美國)，0、0.25、0.5、1、2 與 4 g/L 蛋白脲 (Merck, 美國)，0、0.25、0.5、1、2 與 4 g/L 水解酪蛋白 (Merck, 美國) 與 0、50、100 與 200 mL/L 椰子汁，上述試驗均採單一組成分因子進行試驗。蔗糖試驗為添加不同濃度蔗糖 (1.5、3、6 與 12%) 之 D2 培養基進行試驗，洋菜試驗係添加不同濃度 Difco Bacto-agar (0.6、0.9、1.2 與 1.5%) 與 3%蔗糖之 D2 培養基進行試驗，癒合組織經培養 8 週後調查鮮重，再以 45°C 烘乾 2 天後稱取乾重。

不同 MS 鹽類濃度培養基配合蛋白胨、水解酪蛋白與椰子汁對癒合組織生長與增殖之影響

取約 0.2 g 癒合組織培養於不同 MS 基本鹽類濃度 (1/4×、1/2×、1×及 2×) 培養基，並添加 0.2 mg/L 2,4-D、3%蔗糖、0.9% Difco Bacto-agar、0.5 g/L 蛋白胨、0.5 g/L 水解酪蛋白與 100 mL/L 椰子汁，於培養 2、4、6 與 8 週後分別調查癒合組織鮮重與乾重。烘乾後癒合組織並作為後續 HPLC 檢測其 SSa、SSc 與 SSd 含量之用。

柴胡檢品之柴胡皂苷含量分析

柴胡皂苷含量測定係利用 HPLC 方法 (Controller 600C Pump; Photodiode Array Detector 996; Autosampler 717^{plus}; Temperature Control Module II; In-Line Degasser AF; Millennium³² program, Waters, 美國)。柴胡檢品包括標準品 SSa 與 SSc (米山藥品工業株式會社, 日本) 及 SSd (和光純藥工業株式會社, 日本), 以及培養於上述不同 MS 鹽類濃度 (1/4×、1/2×、1×及 2×) 處理達 4 週之癒合組織。取標準品 SSa、SSc 及 SSd 以甲醇 (methanol, Merck, 美國) 溶解且稀釋製得 4 種不同濃度 (125、250、500 與 1000 mg/L) 溶液，並以 0.22 μm 濾膜 (Millipore, 日本) 過濾備用；將上述高氏柴胡癒合組織檢品乾燥並磨碎，以甲醇為溶劑經超音波洗淨器震盪 30 mins 後以濾紙過濾並收集濾液，殘渣再加入等量甲醇，重複萃取三次，合併三次濾液以真空減壓濃縮機 (EYELA, Model A-3S, 日本) 濃縮至乾，而後以適量甲醇將成分溶出，並以 0.22 μm 濾膜過濾備用。高壓液相層析法係採用 Chen *et al.* (2005) 之方法經修飾如下，在 35°C 下以氰化甲烷 (acetonitrile; ACN, Merck, 美國)：水 = 40:60/50:50/40:60 (v/v) 為流動相進行梯度洗提分析，流速 1 mL/min，紫外線檢定波長為 203 nm，用以分析各柴胡檢品之 SSa、SSc 與 SSd 含量。在上述層析條件下利用標準品溶液求得線性迴歸方程式及決定係數 (coefficient of determination, R²)。各高氏柴胡癒合組織檢品注射 10 μL 檢品濾液，每一檢品重複注射 3 次，並依上述線性迴歸方程式推算檢品中 SSa、SSc 及 SSd 的含量。柴胡皂苷含量則利用每次 10 μL 進樣，共三次進樣之平均進行分析。

資料統計與分析

試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體程式進行 ANOVA 變方分析後，若處理間差異顯著，則利用 Least Signification Difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異，並以 Sigmaplot 軟體繪圖。

結 果

培養基組成分對葉片癒合組織生長與增殖之影響

試驗結果顯示，添加 BA 與 kinetin 對癒合組織生長並無助益，所有處理無論鮮重或乾重均較對照組 (D2 培養基) 差，鮮重分別為 1.2–1.4 g，乾重則均小於 0.06 g，癒合組織培養於對照組之 D2 培養基達 8 週後的鮮、乾重分別為 1.6 g 與 0.06 g (圖 1A、圖 2A)。蔗糖試驗結果如圖 1B 與圖 2B 所示，3%處理之癒合組織生長最為旺盛，鮮、乾重均最高，分別可達 1.7 g 與 0.07 g，其次依序為 1.5%與 6%之處理，而 12%處理之鮮、乾重均最低，僅分別為 0.7 g 與 0.04 g。提高或降低洋菜濃度對於癒合組織生長並無幫助，雖 0.6%處理鮮重可達 1.7 g，但其乾重僅有 0.05 g，其餘 1.2%與 1.5%兩處理之鮮、乾重均較低，分別約為 1.3 g 與 0.05 g (圖 1C、圖 2C)。

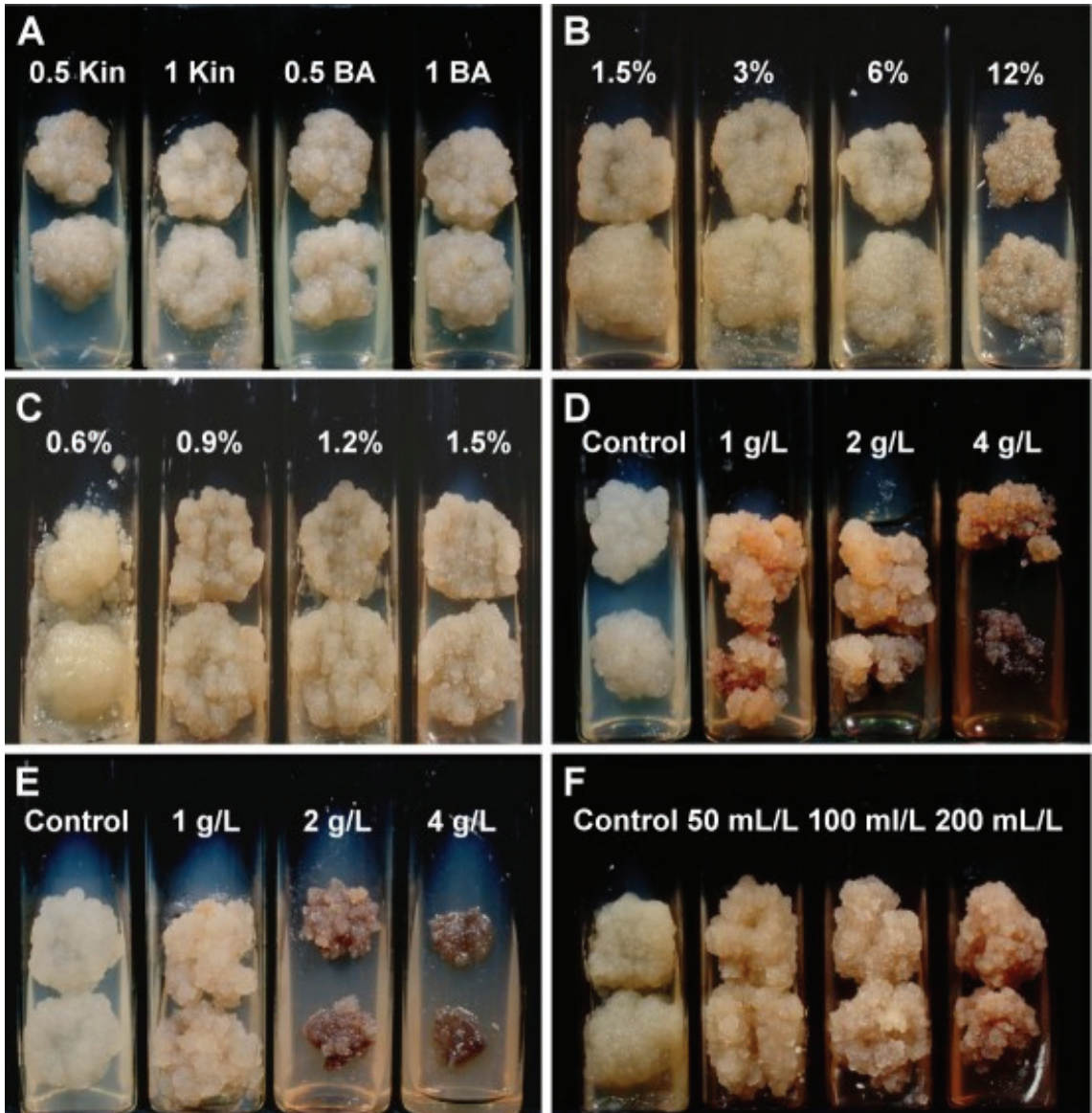


圖 1. 培養基組成對高氏柴胡癒合組織生長增殖之影響。基本培養基組成為含有 0.2 mg/L 2,4-D、0.3% 蔗糖與 0.9% 洋菜之 1/2 MS 固態培養基，分別添加下列各成分，包括 (A) kinetin (Kin) 與 BA (0.5、1 mg/L)；(B) 蔗糖 (1.5, 3, 6 與 12%)；(C) 洋菜 (0.6, 0.9, 1.2 與 1.5%)；(D) 蛋白胨 (0, 1, 2 與 4 g/L)；(E) 水解酪蛋白 (0, 1, 2 與 4 g/L)；(F) 椰子汁 (0, 50, 100 與 200 mL/L)。

Fig. 1. Callus growth of *Bupleurum kaoi* cultured on a half-strength MS salt medium supplemented with 0.3% sucrose, 0.9% Difco Bacto-agar, 0.2 mg/L 2,4-D as a basal medium. Additive components including: (A) kinetin (Kin) and BA (0.5, 1 mg/L); (B) sucrose (1.5, 3, 6 and 12%); (C) Difco Bacto-agar (0.6, 0.9, 1.2 and 1.5%); (D) peptone (0, 1, 2 and 4 g/L); (E) casein hydrolysate (0, 1, 2 and 4 g/L); and (F) coconut water (0, 50, 100 and 200 mL/L).

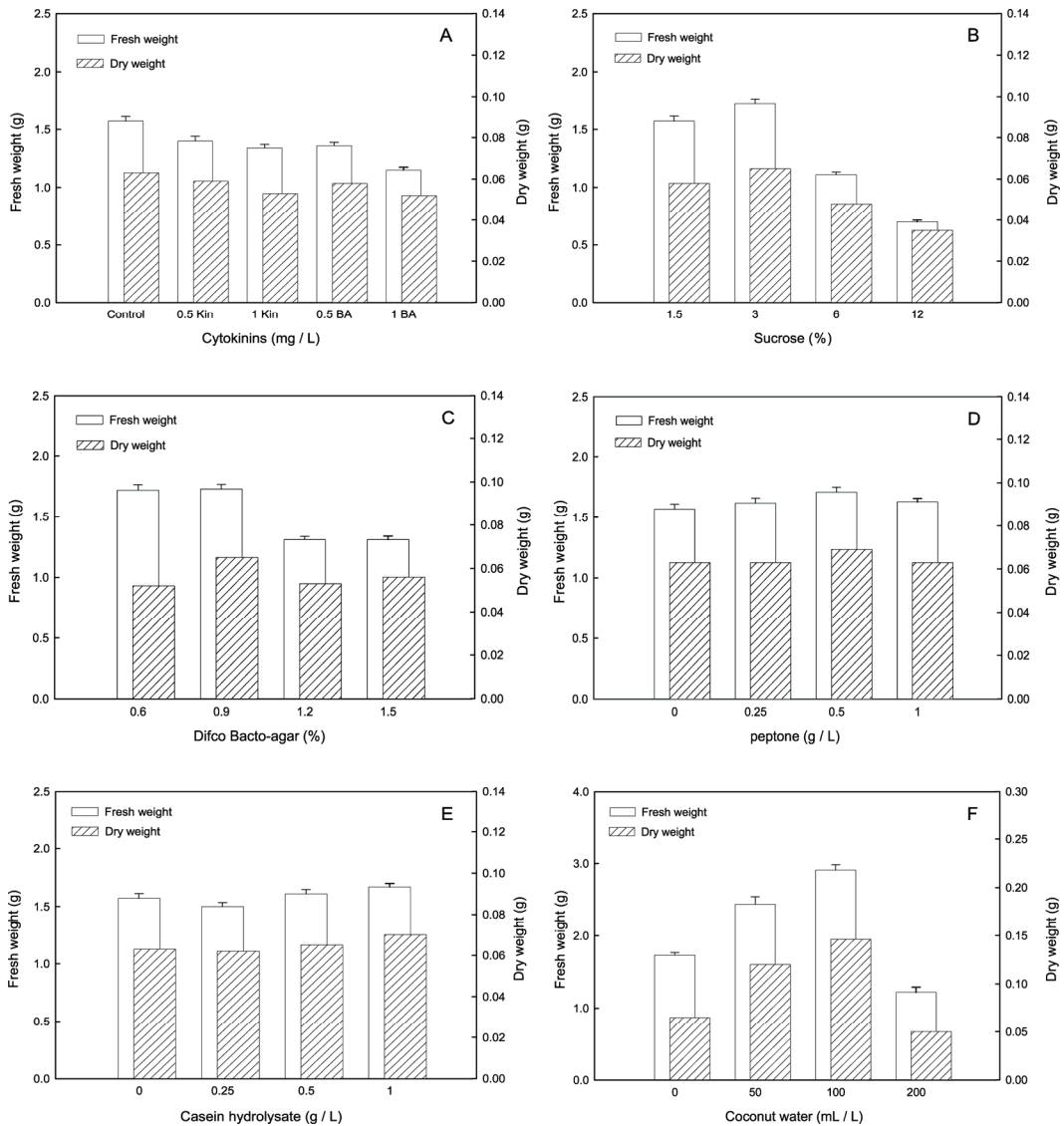


圖 2. 培養基組成對高氏柴胡癒合組織生長增殖之影響。基本培養基組成為含有 0.2 mg/L 2,4-D、0.3%蔗糖與 0.9%洋菜之 1/2 MS 固態培養基，分別添加下列各成分，包括 (A) kinetin (Kin) 與 BA (0.5、1 mg/L)；(B) 蔗糖 (1.5, 3, 6 與 12%)；(C) 洋菜 (0.6, 0.9, 1.2 與 1.5%)；(D) 蛋白胨 (0, 0.25, 0.5 與 1 g/L)；(E) 水解酪蛋白 (0, 0.25, 0.5 與 1 g/L)；(F) 椰子汁 (0, 50, 100 與 200 mL/L)。

Fig. 2. Influence of additive components on proliferation of *Bupleurum kaoi* callus. Callus cultured on a half-strength MS salt medium supplemented with 0.3% sucrose, 0.9% Difco Bacto-agar, 0.2 mg/L 2,4-D as a basal medium. Additive components including (A) kinetin (Kin) and BA (0.5, 1 mg/L); (B) sucrose (1.5, 3, 6 and 12%); (C) Difco Bacto-agar (0.6, 0.9, 1.2 and 1.5%); (D) peptone (0, 0.25, 0.5 and 1 g/L); (E) casein hydrolysate (0, 0.25, 0.5 and 1 g/L); and (F) coconut water (0, 50, 100 and 200 mL/L). Vertical bars indicate the standard error of mean.

蛋白脲試驗結果顯示，添加 1 g/L 蛋白脲之處理具有最佳的效果，培養 4 週後之鮮重與乾重分別可達 1.5 g 與 0.07 g，而 2–4 g/L 蛋白脲處理之癒合組織外觀已呈褐化現象，尤其是 4 g/L 處理已有部分癒合組織因嚴重褐化而死亡 (圖 1D)。進一步降低蛋白脲濃度 (0、0.25、0.5 與 1 g/L) 試驗之結果如圖 2D 所示，四個參試濃度中以 0.5 g/L 蛋白脲對於癒合組織生長最為有利，其鮮重與乾重可分別達到 1.7 g 與 0.07 g。

水解酪蛋白試驗則與蛋白脲試驗有著相同的趨勢，1 g/L 水解酪蛋白處理對癒合組織生長較佳，培養 4 週後之鮮重與乾重分別可達 1.6 g 與 0.08 g，而 2–4 g/L 水解酪蛋白處理癒合組織外觀呈現嚴重褐化，尤其是 4 g/L 之處理，全數褐化死亡 (圖 1E)。進一步降低水解酪蛋白濃度 (0、0.25、0.5 與 1 g/L) 試驗之結果如圖 2E 所示，四個參試濃度中雖以 1 g/L 水解酪蛋白對於癒合組織生長最為有利，其鮮重與乾重可分別達到 1.7 g 與 0.07 g，但部分癒合組織呈現嚴重褐化的現象，因此以鮮、乾重分別達 1.6 g 與 0.07 g 之 0.5 g/L 水解酪蛋白處理進行後續試驗較為適宜 (圖 2E)。

椰子汁試驗結果如圖 1F 與圖 2F 所示，以濃度 100 mL/L 處理之癒合組織生長最為旺盛，無論鮮重或乾重均最高，可達 2.9 g 與 0.15 g，其次為 50 mL/L 處理，而 200 mL/L 處理之癒合組織外觀呈褐化現象，且部分癒合組織因嚴重褐化而死亡。

不同 MS 鹽類濃度培養配合蛋白脲、水解酪蛋白與椰子汁對癒合組織生長與增殖之影響

癒合組織培養於含 0.2 mg/L 2,4-D 並配合 0.5 g/L 蛋白脲、0.5 g/L 水解酪蛋白與 100 mL/L 椰子汁之不同濃度 MS 培養基生長結果如圖 3 所示，培養 2 週後以 1/4× MS 與 1/2× MS 兩處理生長相當，其鮮、乾重分別約 0.8–0.9 g 與 0.06 g，而後依序為 1× MS 及 2× MS 處理。培養 4 週後則以 1/2× MS 處理生長最旺盛，其鮮、乾重分別達 2.2 g 與 0.1 g，2× MS 處理生長量鮮重最低約 1.6 g，而 1/4× MS 及 1× MS 處理之鮮重介於中間；乾重方面依序為 1/4× MS、2× MS 及 1× MS 處理。培養 6 週後以 1/4× MS、1/2× MS 及 1× MS 三處理生長相當，其鮮、乾重分別約 2.7–2.8 g 與 0.08 g，而 2× MS 處理雖鮮重較低，但乾重可達 0.09 g。培養 8 週後結果顯示，四種 MS 濃度處理之鮮重已無顯著差異，約 2.5–2.8 g，而乾重則以 2× MS 較高為 0.09 g，而其餘三種處理僅約 0.07g (圖 3)。

圖 4A–D 分別顯示癒合組織培養後第 2 週至第 8 週之生長情形。1/4× MS 與 1/2× MS 處理之癒合組織於培養後第 6 週即出現褐化現象 (圖 4E)，而後隨時間增加褐化愈為嚴重，若將褐化程度分成 0–5 級 (圖 4F)，則 1/4× MS 與 1/2× MS 處理之癒合組織褐化程度分別達約 3.7 及 2.3 (資料未列)，而 1× MS 與 2× MS 處理則仍呈現黃白色癒合組織。

柴胡檢品之柴胡皂苷乾重含量分析

上述試驗所得之癒合組織經 HPLC 分析結果如 (圖 5) 所示，四個 MS 鹽類濃度處理中，以 1× MS 處理癒合組織之 SSa + SSc + SSd 單位含量可達 0.247 mg/g 為最高，其次為 1/2× MS 處理之 0.176 mg/g，而 1/4× MS 與 2× MS 處理之癒合組織 SSa + SSc + SSd 單位含量最低，分別為 0.123 與 0.127 mg/g。其中 SSa 含量以 1× MS 處理較低為 0.066 mg/g，而 1/4× MS、1/2× MS 與 2× MS 處理之 SSa 含量相當，約為 0.084–0.1 mg/g。SSd 含量則以 1× MS 處理最高達 0.131 mg/g，分別為 1/2× MS 與 2× MS 處理之 5.7 與 14.5 倍，而 1/4× MS 處理則無法測得 SSd 成分。

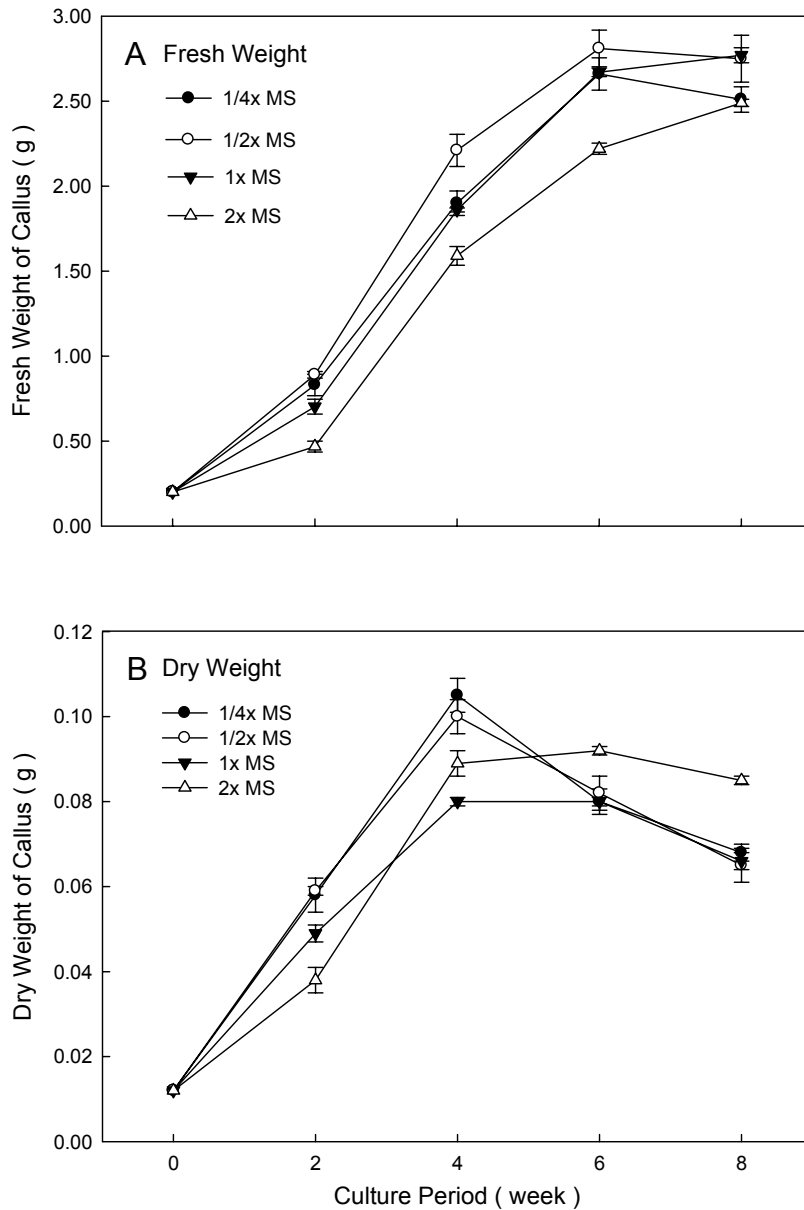


圖 3. 高氏柴胡癒合組織於不同 MS 基本鹽類濃度配合 0.2 mg/L 2,4-D、0.5 g/L 蛋白脲、0.5 g/L 水解酪蛋白與 100 mL/L 椰子汁培養基，每 2 週調查一次共 8 週時序培養所得癒合組織之 (A) 鮮重與 (B) 乾重。

Fig. 3. Time course study of various strength of MS salt medium on callus growth of *Bupleurum kaoui*. Callus cultured on the medium containing 0.2 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L peptone, 0.5 g/L casein hydrolysate and 100 mL/L coconut water. (A) Fresh weight and (B) dry weight was collected at a 2-week-interval for a total of 8 weeks of culture. Vertical bars indicate the standard error of mean.

討 論

生長良好之高氏柴胡癒合組織已可成功誘導，並可利用含有 0.2 mg/L 2,4-D 之 1/2 MS 培養基 (D2 培養基) 進行大量增殖 (Chen *et al.* 2005)。本研究採用 D2 培養基作為繼代培養之基本培養基，

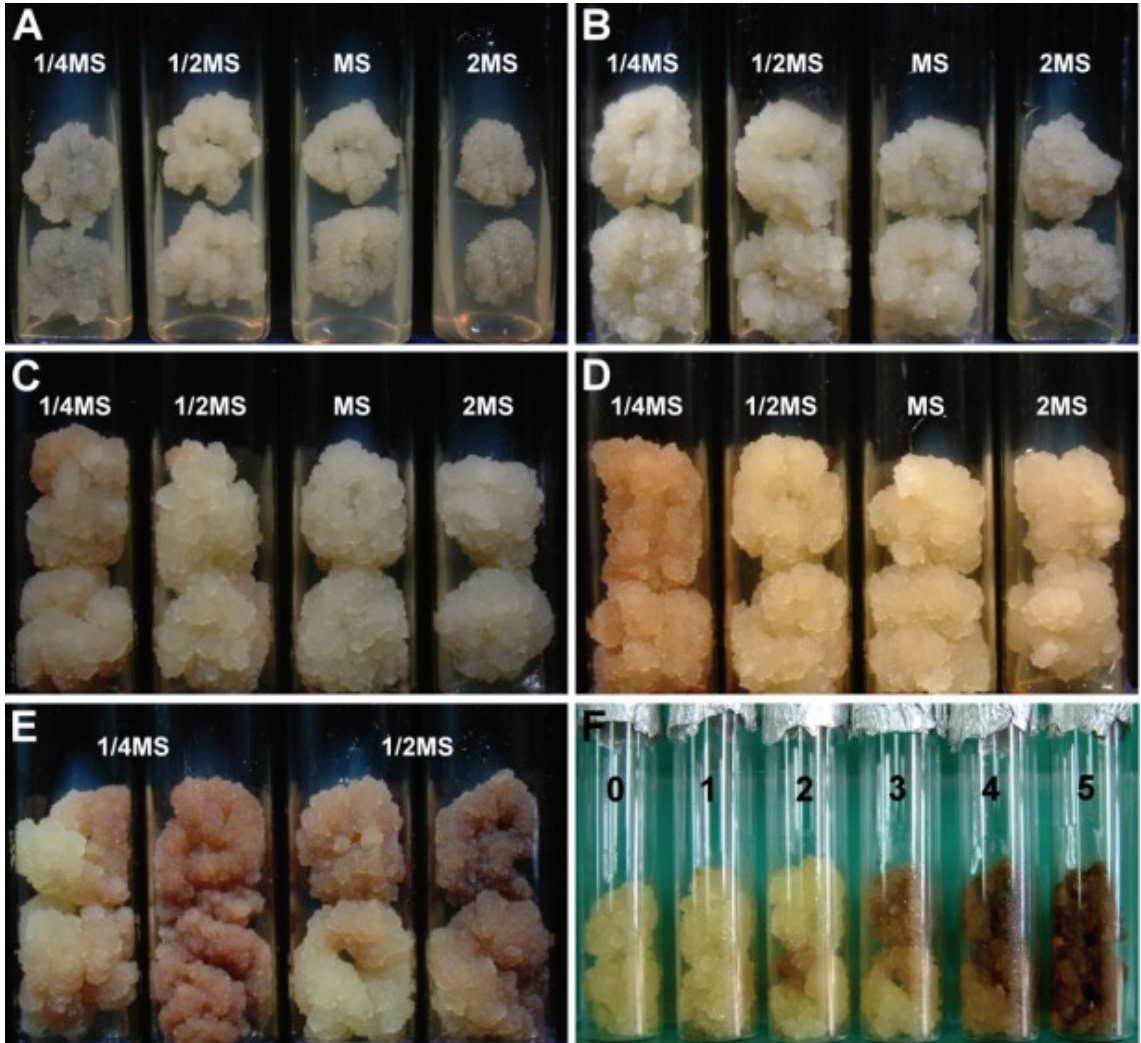


圖 4. 癒合組織培養於含 0.2 mg/L 2,4-D、0.5 g/L 蛋白腴、0.5 g/L 水解酪蛋白與 100 mL/L 椰子汁之 1/4× MS、1/2× MS、1× MS 與 2× MS 培養基達 (A) 2 週、(B) 4 週、(C) 6 週及 (D) 8 週之生長情形。(E) 癒合組織於 1/4 MS 與 1/2 MS 培養 6 週之褐化情形。(F) 癒合組織褐化程度分級之情形。

Fig. 4. Callus of *Bupleurum kanoi* grown on various strength of MS basal medium containing 0.2 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L peptone, 0.5 g/L casein hydrolysate and 100 mL/L coconut water for (A) 2 weeks; (B) 4 weeks; (C) 6 weeks; and (D) 8 weeks of culture. (E) Browning in callus cultured in 1/4× MS and 1/2× MS treatments for 6 weeks. (F) Callus were classified from 0 to 5 according to their increasing browning.

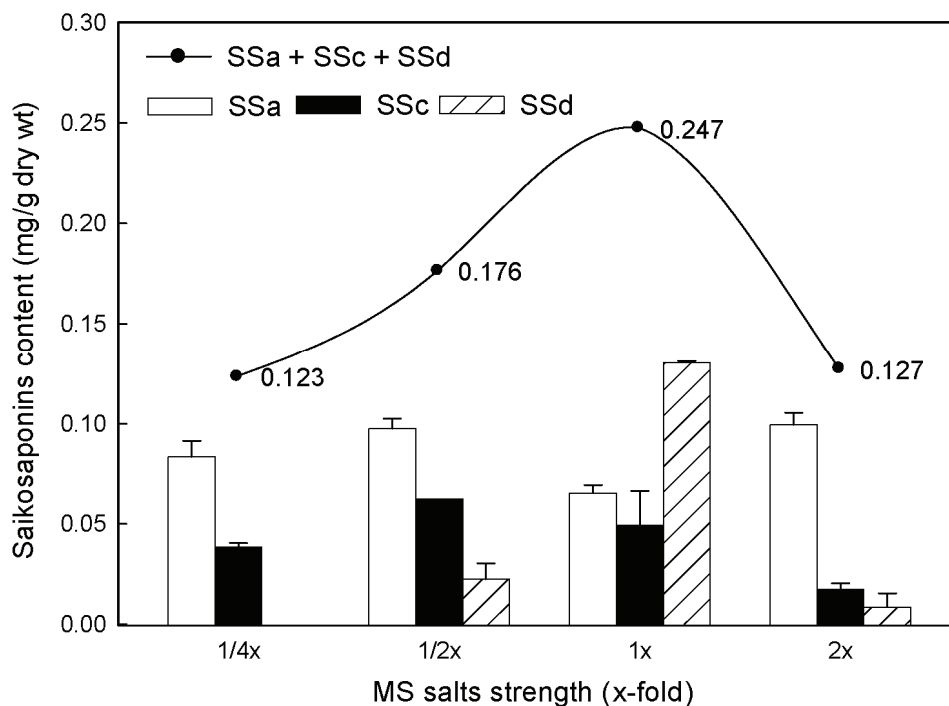


圖 5. 高氏柴胡癒合組織於添加 0.2 mg/L 2,4-D、0.5 g/L 蛋白脛、0.5 g/L 水解酪蛋白與 100 mL/L 椰子汁之不同 MS 基本鹽類濃度培養基，經 4 週培養後柴胡皂苷 (saikosaponins) 含量之情形。

Fig. 5. Saikosaponins content of *Bupleurum kaoi* callus grew on various strength of MS salt medium containing 0.2 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L peptone, 0.5 g/L casein hydrolysate and 100 mL/L coconut water for 4 weeks of culture. Vertical bars indicate the standard error of mean.

再添加不同培養基組成分進行試驗，探討各因子對癒合組織生長與增殖的影響。Chang *et al.* (1993) 以繖形科的臺灣白芷 (*Angelica dahurica* var. *formosana*) 葉柄做培植體，培養在含有 2,4-D 及 kinetin 的 MS 培養基中，可成功地誘導且增殖出質地優良之癒合組織；Zhang & Cheng (1989) 在同樣是繖形科的當歸 (*Angelica sinensis* (Oliv) Diels) 癒合組織誘導與增殖研究中，指出以 cytokinin 搭配 auxin 之效果比 auxin 單用的結果更佳。Xie *et al.* (1999) 於盾葉薯蕷 (*Dioscorea zingibernis* L.) 癒合組織試驗中亦顯示，培養基中添加 BA、kinetin 或 zeatin 均能有效促進其生長增殖。此外，cytokinin 具有促進細胞分裂與生長之生理作用，因此在促使癒合組織生長上頗具功效 (Gasper 1996; George 1993)。然而，本研究結果與 Zhang (2003) 於齒瓣延胡索 (*Corydalis remota* L.) 癒合組織增殖試驗結果相似，亦即添加 BA 與 kinetin 對癒合組織生長增殖並無促進作用，處理組之鮮重及乾重與對照處理相較並無顯著差異。

培養基中添加醣類主要為提供培植體生長所需的能量來源，並具有調節滲透壓潛勢 (osmotic potential) 的功能，通常以蔗糖為其主要之添加碳源 (George 1993)。本研究結果顯示 3% 蔗糖是較

適當的濃度，增加或降低蔗糖濃度並無法促進癒合組織之鮮重與乾重。洋菜是固體培養基最常使用的支持固定劑，含有多種成分不明但具有生理活性的物質，因此添加量的多寡常影響試驗研究的結果。Chang *et al.* (1993) 於臺灣白芷研究結果顯示，癒合組織培養在 0.9–1.2% Difco Bacto-agar 的培養基中，生長情況良好，尤以 1.2% 之處理濃度最佳；而 0.6 和 1.5% 濃度處理下生長較差。本試驗結果顯示高氏柴胡癒合組織在 0.9% Difco Bacto-agar 的培養基中生長最好，0.6% 濃度時癒合組織外觀呈水浸狀，且乾重較輕；1.5% 濃度癒合組織之鮮重與乾重均較低，其質地呈現塊狀構造且易於褐化，推測此結果應與培養基滲透壓之高低有關。

水解酪蛋白、蛋白胨與椰子汁為最常被添加於癒合組織生長培養基中的有機物質。適當濃度之水解酪蛋白可有利於齒瓣延胡索 (Zhang 2003) 與木瓜 (*Carica papaya* L.) (Hossain *et al.* 1993) 癒合組織之生長增殖。Chang *et al.* (1993) 的研究結果則顯示添加水解酪蛋白和椰子汁無益於臺灣白芷癒合組織的生長。本研究結果顯示添加水解酪蛋白、蛋白胨與椰子汁對高氏柴胡葉片來源癒合組織之生長均有益，但濃度過高時則癒合組織嚴重褐化死亡，因此建議有機添加物雖然有助於細胞生長，但使用之濃度會影響其效果。

基本鹽類濃度為影響癒合組織生長與增殖的重要因子，MS 鹽類為常用培養基組成，且調整其鹽類濃度 ($1/4 \times MS$ 或 $1/2 \times MS$) 可適用於相當廣泛的植物組織培養 (Murashige 1977)。本研究在測試其他添加因子對癒合組織生長之影響後，以各個因子之最適濃度配合不同濃度之 MS 鹽類培養基進行測試，結果顯示培養 4 週時之鮮、乾重均以 $1/2 \times MS$ 處理較佳，而培養 8 週後結果則顯示四種 MS 處理之癒合組織鮮重相當，但以 $2 \times MS$ 處理癒合組織乾重最高，而低鹽類濃度 ($1/4 \times MS$ 與 $1/2 \times MS$) 處理均呈現嚴重之癒合組織褐化現象 (圖 4E)。上述現象推測可能因為低鹽類濃度處理下，癒合組織初期生長較為快速，但培養後期因養分不足而導致癒合組織快速褐化死亡；此外低鹽類濃度 ($1/4 \times MS$ 與 $1/2 \times MS$) 處理在培養後 4 週之乾重已達到 0.1 g，而 $2 \times MS$ 處理於培養後期 (培養後 6–8 週) 之乾重亦僅達 0.085–0.090 g。高氏柴胡癒合組織以含有 0.2 mg/L 2,4-D、0.5 g/L 水解酪蛋白、0.5 g/L 蛋白胨、100 mL/L 椰子汁、3% 蔗糖與 0.9% 洋菜之 $1/4 \times MS$ 與 $1/2 \times MS$ 培養基培養，有利於癒合組織生長增殖及獲得細密呈黃白色癒合組織，但繼代培養時間須提早於培養後第 4–5 週進行，所得生長良好癒合組織有利於後續細胞懸浮培養系統的建立。

利用細胞懸浮培養方式生產植物有效二次代謝物，具有生長快速、全年生產，毋需受環境影響等優勢，尤其細胞生長週期較田間種植所需時間甚短，顯示其具有相當的發展潛力。本研究利用不同 MS 鹽類濃度配合適量 2,4-D、蛋白胨、水解酪蛋白與椰子汁之試驗所得之癒合組織經 HPLC 檢測柴胡皂苷含量如圖 5 結果顯示，以 $1 \times MS$ 處理所得癒合組織之柴胡皂苷 (SSa + SSc + SSd) 乾重含量為最高；若以 SSa + SSd 乾重含量或單純就 SSd 乾重含量而言，亦顯示 $1 \times MS$ 鹽類濃度處理效果較佳。因此據上述研究結果加以推論，高氏柴胡癒合組織培養可利用兩階段培養方式，亦即初期 (1–4 週) 以利於癒合組織生長增殖之較低 MS 鹽類濃度 ($1/4 \times MS$ 與 $1/2 \times MS$) 培養，而後期 (5–8 週) 以 $1 \times MS$ 鹽類濃度培養可促進柴胡皂苷的累積。

誌 謝

本研究承虎尾科技大學石麗仙博士對於 HPLC 成分分析相關技術之協助，特此申謝。

引用文獻 (Literature cited)

- Benito, P. B., M. J. A. Martínez, A. M. S. Sen, A. S. Gómez, L. F. Matellano, S. S. Contreras, and A. M. D. Lanza. 1998. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of saikosaponins. *Life Sci.* 13:1147–1156.
- Berlin, J. 1988. Formation of secondary metabolites in cultured plant cell and its impact on pharmacy. p.39–47. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 4 (Bajaj, Y. P. S. ed.) Springer-Verlag, New York.
- Bourgau, F., A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161:839–851.
- Chang, W. D., C. C. Chen, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1993. Study on tissue culture of *Angelica dahurica* var *formosana* I. callus induction and medium evaluation. *J. Agric. Res. China.* 42:253–264. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., F. S. Chueh, C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2005. Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on leaf callus induction, proliferation and saikosaponin formation of *in vitro* *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. *Crop, Environ. Bioin.* 2:39–49. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bupleurum kaoi*-a native endangered medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42:128–133.
- Chen, U. C., M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004. Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal herbs - *Bupleurum kaoi* by axillary bud culture. *J. Agric. Res. China* 53:27–38. (in Chinese with English abstract)
- Chiang, L. C., L. T. Ng, and C. C. Lin. 2003. Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Buplerum* species. *Planta Med.* 69:705–709.
- DiCosmo, F. and M. Misawa. 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotech. Adv.* 13:425–453.
- Gan, W. S. 1985. *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. Manual of medicinal plants in Taiwan. National Research Institute Chinese Medicine, Taipei. 651 pp. (in Chinese)
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 32:272–289.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*, Part 1. The Technology. England: Exegetics Ltd. 574 pp.
- Hiraoka, N. 1989. *Bupleurum falcatum* embryogenesis and the production of saikosapins. p.69–81. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 7 (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag, New York.

- Hiraoka, N., T. Kodama, and Y. Tomita. 1986. Selection of *Bupleurum falcatum* callus line produce anthocyanins in darkness. *J. Nat. Prod.* 49:470–474.
- Hossain, M., S. M. Rahman, R. Islam and O. I. Joarder. 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13:99–102.
- Hsu, Y. L., P. L. Kuo, L. C. Chiang, and C. C. Lin. 2004a. Involvement of p53, nuclear factor κ B and Fas/Fas ligand in induction of apoptosis and cell cycle arrest by saikosaponin d in human hepatoma cell lines. *Cancer Lett.* 213:213–221.
- Hsu, Y. L., P. L. Kuo, and C. C. Lin. 2004b. The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of saikosaponin d in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci.* 75:1231–1242.
- Hsu, Y. L., P. L. Kuo, T. C. Weng, M. H. Yen, L. C. Chiang, and C. C. Lin. 2004c. The antiproliferative activity of saponin-enriched fraction from *Bupleurum kaoi* is through fas-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol. Pharma. Bull.* 27:1112–1115.
- Mulabagal, V., C. Y. Lee, S. F. Lo, S. M. Nalawade, C. Y. Lin, and H. S. Tsay. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:1–22.
- Murashige, T. 1977. Plant cell and organ cultures as horticulture practices. *Acta Hortic.* 78:17–30.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:437–497.
- Nalawade, S. M. and H. S. Tsay. 2004. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40:143–154.
- Pan, S. L., Q. S. Shun, Q. M. Bo, and X. S. Bao. 2002. The Coloured Atlas of the Medicinal Plants from Genus *Bupleurum* in China. Shanghai Sci. Tech. Liter. Pub., China. 148 pp. (in Chinese)
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, and H. S. Tsay. 2000. Application of biotechnological tools in conservation and utilization of medical plant genetic resource. p.171–187. *in: The Proceeding of Agriculture of the New Century: Managing Bio-research and Bio-diversity.* College of Agriculture, National Taiwan Univ., Taiwan.
- Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. *Bupleurum* spp. p.223–232. *in: Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine.* Springer-Verlag, New York.
- Uomori, A., S. Seo, and Y. Tomita. 1974. Studies on the constituents in tissue cultures of *Bupleurum falactum* L. *Syoyakugaku Zasshi* 28:152–160.
- Verpoorte, R. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1:13–25.
- Wang, B. J., C. T. Liu, C. Y. Tseng, and Z. R. Yu. 2005. Antioxidant activity of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) fractionated by supercritical CO₂. *LWT-Food Sci. Technol.* 38:281–287.

- Wang, B. J., C. T. Liu, C. Y. Tseng, C. P. Wu, and Z. R. Yu. 2004. Hepatoprotective and antioxidant effect of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.* 42:609–617.
- Wang, P. J. and C. I. Huang. 1982. Production of saikosaponins by callus and redifferentiated organs of *Bupleurum falcatum* L. p.71–72. *in: Plant Tissue Culture* (Fujiwara, A., ed.) Maruzen, Tokyo.
- Xie, B. I., Y. H. He, and Z. J. Yi. 1999. Tissue culture and screening of high production clone line of *Dioscorea zingibernis*. *J. Central South For. Univ.* 19:17–21. (in Chinese with English abstract)
- Yen, M. H., C. C. Lin, C. H. Chuang, and S. Y. Liu. 1991. Evaluation of root quality of *Bupleurum* species by TLC scanner and the liver protective effects of "Xiao-chai-hu-tang" prepared using three different *Bupleurum* species. *J. Ethnopharma.* 34:155–165.
- Yen, M. H., T. C. Weng, S. Y. Liu, C. Y. Chai, and C. C. Lin. 2005. The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaoi*, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28:442–448.
- Zhang, D. X. 2003. Effects of culture environment on callus growth and dl-tetrahydro-palmatine content in cultures of *Corydalis remota*. *Bull. Bot. Res.* 23:86–90.
- Zhang, S. and K. C. Cheng. 1989. *Angelica sinensis* (Oliv) Diels: *In vitro* culture, regeneration, and the production of medicinal compounds. p.1–22. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7. Medicinal and aromatic plants II.* (Bajaj, Y. P. S. ed.) Springer-Verlag, New York.

Influence of Medium Components on Callus Proliferation and Saikosaponin Content of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang¹

Uei-Chern Chen², Chi-Ni Hsia², Mau-Shing Yeh³, Chin-Yi Tsao², and Hsin-Sheng Tsay^{4,5}

Abstract

Chen, U. C., C. N. Hsia, M. S. Yeh, C. Y. Tsao, and H. S. Tsay. 2008. Influence of medium components on callus proliferation and saikosaponin content of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:119–132.

Medium components and their best concentrations of cytokinin, sucrose, Difco Bacto-agar, peptone, casein hydrolysate, coconut water were separately tested for callus growth of *Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang. Saikosaponins production of callus tissues was monitored. A half-strength MS salt medium supplemented with 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was used as a basal medium (D2 medium) for callus growth. The results showed that additional N6-benzyladenine (BA) and N-furfuryladenine (kinetin) inhibited callus growth in all concentration tested in this study. Other than cytokinin, all factors could increase callus growth at a proper range of concentrations. It was concluded that 3% sucrose, 0.9% Difco Bacto-agar, 0.5 g/L peptone, 0.5 g/L casein hydrolysate, and 100 mL/L coconut water had the best effects on callus growth of *B. kaoi*. Various strengths of MS basal salts in combination with the aforementioned components at the best concentrations were further tested. Among four strengths of MS tested, half-strength MS treatment had the highest fresh and dry weight of callus growth after 4 weeks of culture. However, the highest saikosaponin a, c, d contents examined by high performance liquid chromatography (HPLC) was obtained from callus grown on the full-strength MS basal medium.

Key words: Bupleuri Radix, Medicinal plant, Cell culture, Secondary metabolite, High performance liquid chromatography.

-
1. Contribution No.2319 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: June 20, 2008.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Associate Researcher, Contract Employee, Biotechnology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
 3. Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.
 4. Professor, Graduate Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan.
 5. Corresponding author, e-mail: hstsay@cyut.edu.tw; Fax: (04)23742371.