

公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：120301e102

行政院農業委員會林務局九十五年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：953209

計畫名稱：**臺灣黃藥種原蒐集、基原鑑定、組織培養、生物
活性成分分析研究 (第1年/全程3年)**

(英文名稱) **Study on germplasm collection, gene-source
identification, tissue-culture and bio-active
ingredient analysis in *Phellodendron amurense* var.
wilsonii.**

計畫編號：95農科-12.3.1-務-e1(2)

全程計畫期間：95年1月1日至97年12月31日
本年計畫期間：95年1月1日至95年12月31日

計畫主持人：楊政川
執行機關：私立中國文化大學
合作機關：國立中國醫藥研究所

臺灣黃蘗種原蒐集、基原鑑定、組織培養、生物活性成分分析研究

楊政川、林雲蓮、林敏宜

摘要

台灣黃蘗無性繁殖技術平台之建立方面，採種作業於棲蘭山採集插穗一批800支，4個處理4個重複，4處理包括以IBA生長素0ppm、250ppm、100ppm、2000ppm，穗條於扦插後15天就有80%開始抽芽，35天後開始有部分穗條產生癒合組織，扦插後65天發根。臺灣產黃蘗生物活性及活性成分分析方面，黃蘗材料之酒精(水)萃取率，以尖石鄉秀巒山黃蘗16.3%最高，以HPLC分析Bererine，也是其最高。對血管舒張活性的影響：市售黃蘗與臺灣產黃蘗均有血管舒張作用而且其活性相當。黃蘗對肝臟星狀細胞TNF- α 誘發的NfkB luciferase reporter gene的表現亦具有抑制作用，兩者活性相當。在組織培養方面，以臺灣黃蘗芽體及未成熟胚培養，以未成熟胚效果較佳，液體懸浮培養在14天形成一個生長周期，在HPLC成份分析中，以尖石秀巒Bererine含量較高。

關鍵詞：台灣黃蘗、種原保存、代謝質體分析

Abstract

The establishment aspect of the *Phellodendron amurense* cloning technique platform, adopt to grow budding have 80% after staying the ChiLan mountain to collect to 800s, 4s treatment, 4 repetition, processings including to grow a plain 0 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 2000 ppm by IBA, 15 days to start drawing sprout, start the parts of scion produces callus after 35 days, the rooting after inserting for 65 days. Taiwan produces live and live composition of *Phellodendron amurense* living creature analysis aspect, the alcohol(water) of the *Phellodendron amurense* material extracts a rate, showing *Phellodendron amurense* of the Sioluan mountain 16.3% by Jianshish Township the most high, with HPLC analysis bererine, is also it is the most high. To afferent and comfortable piece the influence of the activity: does the city sell the *Phellodendron amurense* and Taiwan to produce *Phellodendron amurense* to all have an afferent and comfortable piece the

function and its activity rather The *Phellodendron amurense* also has a function of repress to the performance of the NfκB luciferase reporter gene that the liver star form cell TNF-αinducts, your activity is equal. In tissue culture, bud , and the immaturity embryo at the propagation aspect, the immaturity embryo result is better, the liquid suspension culture development to become a growth period on 14 days, showing the content of Sioluan bererine by Jianshih Township in the HPLC ingredient the analysis higher.

Key word : *Phellodendron amurense* var. *wilsonii*, Germplasm Conservation, Metabolomics Analysis.

計畫目的：台灣黃蘗(*Phellodendron amurense* Rupr. var. *wilsonii*)芸香科，黃蘗屬，臺灣特有變種(Endemic variety)，分布於拉拉山、鴛鴦湖、太平山、思源啞口、花蓮和平林道等地，海拔從1600公尺至2400公尺之暖溫帶森林中。一般而言，藥用植物之活性成份往往隨產地不同而有所差異，從台灣黃蘗之地理及海拔分布，以及其小蘗鹼含量從2.1%到3.1%，可知顯現出種源變異。由於藥用市場的需求，台灣黃蘗近年來遭非法砍伐或剝皮屢有所聞，因此本計劃目的之一，即為積極進行種源調查、蒐集、繁殖與保育，以利未來永續經營及利用這些珍貴的遺傳種質資源。

全程目標：完成臺灣黃蘗種原資料、基原鑑定技術、大量繁殖方法、生物活性成分分析以建立臺灣重要種原之保存、鑑定及開拓日後製藥之產業結合應用

分年度目標：

95年度：蒐集臺灣黃蘗種原、建立營養繁殖體系、黃柏對血管舒張活性調節作用及抗發炎之篩選模式

96年度：種子苗培育、組培苗細胞大量繁殖及不同產地及不同品種的黃柏其藥效及其化學成分的差異比較

97年度：種原及營養系綜合園之設置、DNA圖譜序列分析、二次代謝物產量分析

重要工作項目及實施方法：

1.種原調查與蒐集：由於台灣黃蘗多散生在林地，在進行野外種原品系之調查及蒐集時，擬

以單株母樹為初步選拔對象，即每一單株均加以標示編號及掛牌，同時採集果實種子與/或剪取一年生枝穗，帶回實驗室及苗圃，進行後續的育苗與扦插工

2.種原及營養系綜合園之設置：(1)種子苗培育與出栽 林業試驗所早年發展出來之種子休眠破除及播種育苗技術(胡&何,1982)可妥為引用，俟種子苗(seedlings)為一年生時，苗高約為35公分或以上，此時可出栽到綜合園內。由於變數因子有種原(產地)與單親家系/營養系，所以採二段式巢窩式試驗設計(李承輝,2004)，每一單親家系苗木(即每一單株母樹種子培育出的苗木)100株栽植在一方形試區，四重複，株行距1.5公尺 × 1.5公尺。(2)扦插苗培育試驗 如遇單株母樹當年不結實，則剪取一年生枝穗或根株萌孽進行扦插，培育插條苗(rooted cuttings)，似插條苗高達30公分以上，亦出栽到綜合園內，植栽設計亦把每一營養系(clone)插條苗100株栽在一方形試區，四重複，株行距1.5公尺 × 1.5公尺。

3.生物活性成分分析：(1)化學分析 A.化合物分離 由市售大陸黃柏分離黃柏的化學成分，以作為進行黃柏植物化學代謝質體分析 (Metabolomics analysis)的標準品。 B.比較大陸產及臺灣產黃柏的化學剖面分析(Chemical Profile) 利用薄層色層分析(TLC)及高效液相層析(HPLC)進行定性及定量分析,並且進一步用 LC-MS確認多標的化學成分。 C.比較高效液相層析和氫核磁共振光譜(¹H-NMR)分析 比較HPLC及¹H NMR 作為活性成分定量分析。 D.提供各種粗抽物或純化物供進行藥效分析 (2)藥理活性分析 A. 黃柏對離體大白鼠胸主動脈血管之舒張活性的調節作用 成年雄性Sprague-Dawley大白鼠，體重約260-380 g，斷頭犧牲後，迅速將胸主動脈剪下，置於新鮮配置的Krebs'溶液(內含NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, Dextrose 11.1 mM及CaCl₂ 2.5 mM)中，持續通入 95 % O₂ + 5 % CO₂ 之混合氣。將附著於血管壁周圍的脂肪及結締組織修剪乾淨後，把主動脈剪成 3 mm左右之血管環。[將血管環隨機分為內皮細胞完整(endothelium-intact)與去除內皮細胞(endothelium-denuded)(以棉棒輕微摩擦血管環內表面以除去內皮細胞)兩組。給予腎上腺性接受器致效劑phenylephrine (Sigma-Aldrich Chemical Co.; 產生80 %最大收縮之濃度)使血管環產生收縮，當收縮張力大於1 g以上時，表示血管環具有正常的收縮功能。當收縮達平穩後，加入acetylcholine，若血管環達90% 以上的舒張反應，表示血管環的內皮細胞完整。以兩根乙形白金絲固定於組織浴器，並連接張力轉換器(force displacement

transducer; Model FT-03, Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA), 懸掛在37°C Krebs'溶液中。並將等長收縮(isometric contraction) 之張力改變, 記錄於多功能生理記錄器(polygraph; Gould 3400S)及電腦。血管環給予1.8 g的被動張力, 每隔15分鐘更換一次Krebs'溶液, 待血管張力達到穩定後(約60分鐘), 以phenylephrine引起收縮, 當收縮達平穩之後, 給予累積濃度的黃柏萃取液, 觀察血管的舒張反應, 並比較各種來源之黃柏的舒張作用是否具有差異。

B. 黃柏對誘導型一氧化氮合成酶分析實驗 (A) 一氧化氮(NO)代謝產物的含量測定 將 Raw264.7細胞種於24-well培養盤, 12小時後以不含胎牛血清之培養液培養, 並且在第12小時時分別給予受試藥物。再經過12小時後以2%胎牛血清之培養液中培養, 並且給予 lipopolysaccharide (LPS)處理。經過72小時後, 收集上清液以進行NO之測定。NO的測定是以Griess反應進行呈色反應, 分別以兩種不同的溶液(1% sulfanilamide 及0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid)以1:1的比率混合, 再以與上清液同體積比率混合, 待反應穩定30分鐘後, 利用ELISA microplate reader, 在波長550 nm下, 進行吸光值測定與濃度的換算。本實驗以NaNO₂ (0~100uM)做一濃度標準檢量曲線。(B) 誘導型一氧化氮合成酶之基因表現 (RT-PCR, Real-time PCR) 對照組為給予2%胎牛血清之培養液; 而實驗組則含有受試藥物。經過培養以4°C的PBS輕微沖洗3次, 再以TRIzol (Invitrogen) 1ml/dish處理後, 將胞刮下以26G號針筒抽吸數次。將樣品置於室溫回溫5分鐘後, 加入 chloroform/TRIzol, 振搖後以12,000 g於4°C中離心15分鐘, 將含有RNA部分之上層水層取出。再以iospropyl alcohol TRIzol混合, 以12,000 g於4°C中離心10分鐘, 離心後取其沉澱物, 以75% ethanol/TRIzol沖洗後, 以7,000 g於4°C中離心, 離心後取其沉澱物再以75% ethanol沖洗。待ethanol揮發後, 以DEPC-H₂O回溶, 再以57°C加熱10分鐘。利用光譜分析儀以 OD₂₆₀、₂₈₀分析總核糖核酸(total RNA)的濃度及品質, 其Ratio必須為1.7~2.0之間。iNOS及DAPDH的引子的設計是參考Dulak 等學者的論文。RT-PCR實驗採用SuperScrip™ One-Step RT-PCR (Invitrogen)進行。總核糖核酸使用0.2 ug進行反應, RT部分條件為: 50°C, 30分鐘; 94°C, 2分鐘; PCR定為30個循環, 分別為: 94°C, 15秒; 55°C, 30秒; 68°C, 40秒; 最後以68°C, 7分鐘反應後, 在4°C下維持。實驗結果以 agarose/TBE buffer進行電泳。Real-time PCR實驗, LPS處理的時間為2.5, 6小時後, 採用與RT-PCR相同的方式純化總核糖

核酸，並且以上述的引子進行實驗。將總核糖核酸轉為cDNA後以LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green 1進行。cDNA分別以x1, x5, x25, x125, x625及不含cDNA的溶液進行相對定量的檢量線，以便求出iNOS及GAPDH之mRNA的表現量。(C) 細胞存活率的測定由於alamaBlue 試劑在氧化態時，可被存活的細胞吸收，並被粒腺體內的酵素還原。將細胞種在組織培養盤，加入alamaBlue 試劑(10%)，繼續培養3小時，用automatic microplate reader測波長570nm、595nm的吸光值及二者的差值。

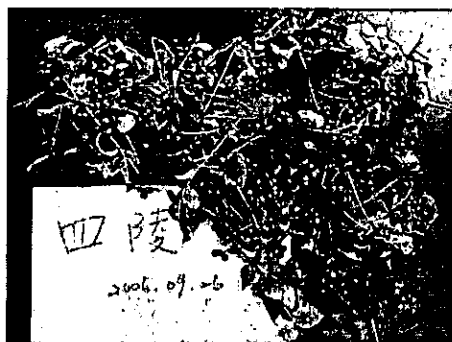
4.組織培養：(1)組培苗繁殖材料：臺灣黃蘗的新鮮芽體、未成熟胚。(1)表面消毒：將植株移至室內栽植，並兩天噴灑億力一次，持續十天。(2)無菌消毒：以稀釋0.1% 安期消毒液清洗五分鐘，再以70% 的酒精浸置一分鐘，後置於1% NaOCl (含1% (v/v) tween20) 消毒5分鐘(以上步驟使用超音波震盪器進行)，再以1% H₂O₂沖洗。(3)無菌播種：培養基於光照的環境下，25°C，取其未成熟胚及葉柄為培植體，置於WPM、MS修正培養基，並分別加1000mg/l casein hydrolysate(水解酪蛋白)、10% coconut milk(椰子汁) 3 % sucrose。(4)無菌苗：待無菌苗生長約10公分高，以塑膠袋保濕，進行馴化。(2)細胞株系大量培養 A.癒合組織誘導 (A)材料 採取組培苗枝條幼嫩部的葉片及莖部為材料，進行癒合組織誘導。(B)材料消毒 將葉片或芽體，以70%酒精浸泡，用蒸餾水清洗後，置於2%NaOCl 溶液，加一滴Tween 20，以超音波震動15~30分鐘，再經滅菌水沖洗後，切取適當培植體接種。(C)固體培養 以不同培養基配方設計材料接種後，置於25~27°C靜置培養。(D)細胞懸浮培養 取上述誘導出之0.5g胚性癒合組織，移至125ml三角錐型瓶中，加上50ml之液態培養液，培養液成分以WPM基礎培養液加上6種不同配方的植物生長調節劑組合，以促使其大量增殖，過5天後再用濾網過濾粗顆粒。約7-10天繼代培養一次(繼代時更換10ml培養液及上面懸浮破裂之細胞)，震盪器轉速110rpm培養。在培養過程中以SCV (sedimented cell volume) 法測其細胞生長曲線，調整細胞密度後，更換新鮮培養基，並利用光學顯微鏡觀察其細胞生長狀況。培養過程中每天量測細胞生長量，並取指數期細胞進行大量培養。(E)細胞放大培養 取125ml錐形瓶中生長分裂最旺盛之細胞約50ml (內含細胞鮮重約0.5g)，加新鮮培養液。每隔7-10天更換培養液。細胞懸浮培養則以水平迴轉式震盪器培養。待培養條件測試完成將細胞置入3L氣舉式 (air-lift) 生物反應器培養內含a. Air Compressor (Tokyo

RIRAKIKAI Co.,Ltd) b.pH Indicator DPD-3 (日製) c.DO Indicator Model-M1032 (日製) d.pH 電極 Broadley James Co., Ltd e.DO電極 Able Type 10AN (日製) f.pH電極 Broadley James Co., Ltdg.DO電極 Able Type 10AN (日製) (F)細胞培養過程持續監控二次代謝物產出，進行分析。 高效率液相層析儀：(high-performance liquid chromatography, HPLC) (1) 幫浦：Model PU-2080 (2) 管柱：C18 5 μ M 15 \times 4.6mm (3) 檢測器：Model UV-2075 (4) 分析軟體：ChromPass (Chromatography Data System) HPLC操作條件 (1) 管柱：C18 5 μ M 15 \times 4.6mm (2) 移動相：甲醇80% ， 水20% (3) 流速：1.0ml/min (4) PDA 波長範圍：254nm (5) Column oven：25 $^{\circ}$ C (6) 注射量：20 μ l 檢液 方法：(1)標準品儲備溶液之製備取小蘗鹼2mg 溶於2ml 甲醇 (methanol) 中，以0.45 μ m 濾膜過濾，配製含量為1mg/ml 之儲存標準品溶液。(2)檢品之製備將冷凍乾燥之凍乾試材置於研鉢中加入液態氮研磨成粉，秤取50 mg 試材粉末置於50 ml 離心管中，加入1 ml 甲醇，再加入10 ml 二氯甲烷及1 ml 二次水，以mixed vigorously 震盪5分鐘使細胞與溶媒均勻混合，再經2000rpm 離心，收集二氯甲烷；殘渣再加溶媒萃取一次，將經粹取之二氯甲烷合併，以0.45 μ m 濾膜過濾，再置於真空乾燥器以真空幫浦抽真空乾燥，將乾燥後所獲殘留物溶於1 ml 氯仿中，再以HPLC測定小蘗鹼之含量。

計畫執行結果：

一、種原調查與蒐集

目前已在新竹尖石秀巒、嘉義石棧、拉拉山、杉林溪、棲蘭山(神木園區)、棲蘭山(四陵)、太平山完成勘查及採取枝條及部份種子採集。



(圖 1)

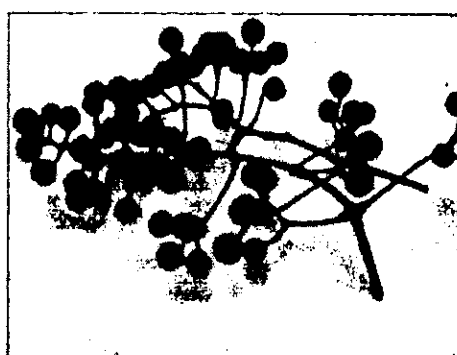


(圖 2)

棲蘭山(四陵)

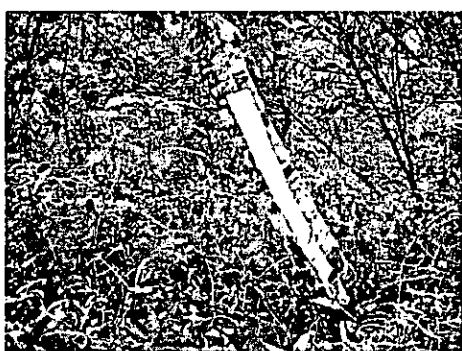


(圖 3)

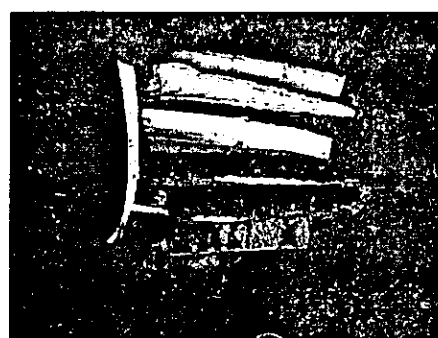


(圖 4)

新竹尖石秀巒



(圖 5)

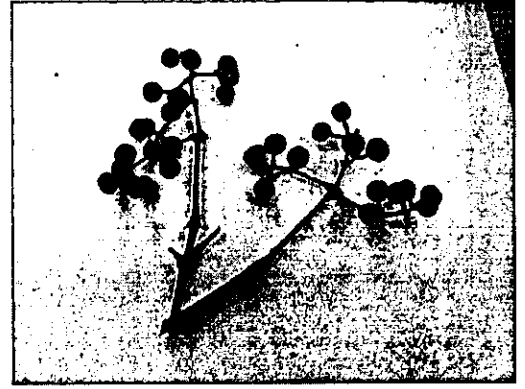


(圖 6)

嘉義石棧

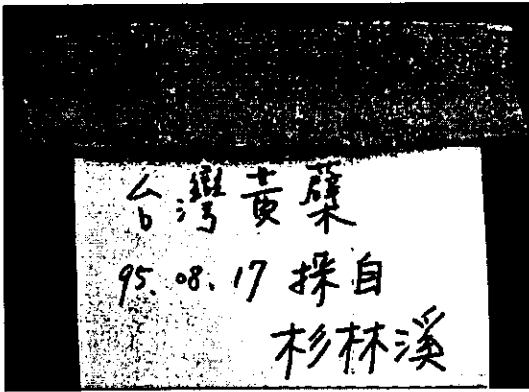


(圖 7)

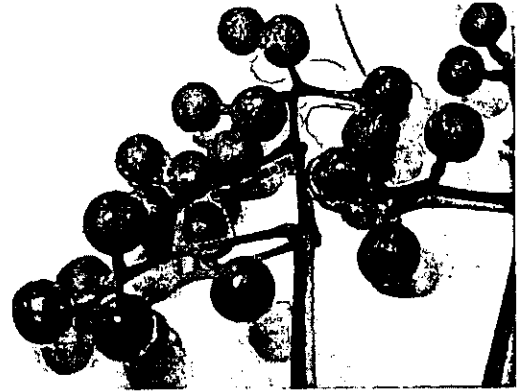


(圖 8)

拉拉山



(圖 9)



(圖 10)

杉林溪



(圖 11)



(圖 12)

棲蘭山(神木園區)

臺灣黃蘗勘查、採收紀錄(第一次)

採集地點	日期	品名	數量
新竹尖石秀巒	95/07/31	枝條	1500
		種子	3500
嘉義石棗	95/08/04	枝條	300
		種子	100
拉拉山	95/08/07	枝條	250
		種子	600
杉林溪	95/8/18	枝條	500
		種子	0
棲蘭山(神木園區)	95/08/24	枝條	450
		種子	0
棲蘭山(四陵)	95/08/24	枝條	700
		種子	800
太平山	95/08/29	枝條	800
		種子	2600

臺灣黃蘗採收紀錄(第二次)

採集地點	日期	品名	數量
新竹尖石秀巒	95/09/05	種子	7500
嘉義石棧	95/09/09	種子	6500
拉拉山	95/09/14	種子	7600
杉林溪	95/09/18	種子	8500
棲蘭山(神木園區)	95/09/20	種子	9500
棲蘭山(四陵)	95/09/24	種子	7000
太平山	95/09/30	種子	5600

臺灣黃蘗採收紀錄(第三次)

採集地點	日期	品名	數量
新竹尖石秀巒	95/10/01	種子	5500
嘉義石棹	95/10/09	種子	7500
拉拉山	95/10/12	種子	8000
杉林溪	95/10/15	種子	9000
棲蘭山(神木園區)	95/10/20	種子	6500
棲蘭山(四陵)	95/10/20	種子	6800
太平山	95/10/25	種子	6265

二、種原及營養系綜合園之設置

(一)、95 年 9 月 23 日：

- 1、配合池上原住民合作社採種作業於棲蘭山採集插穗一批 800 支(圖 13)，進行先驅試驗，初步之試驗設計共分為 4 個處理 4 個重複，4 處理包括以 IBA 生長素 0ppm、250ppm、1000ppm、2000ppm(圖 14)，每個處理為 50 支插穗，總計扦插穗數為 800 支。
- 2、所有穗條於修剪完成後以稀釋 1000 倍之億力殺菌劑先行浸泡 10 秒鐘後再進行扦插作業。(圖 15)。
- 3、介質以 2、3 號蛭石(1)芥蘭泥碳土(1)之比例加少許珍珠石充分攪拌後並保持其濕潤狀態，置於下鋪細紗網之塑膠籃內(圖 16)，並將塑膠籃整齊排列於上覆 70%遮光網之簡易溫室內，為考量其相對濕度，於扦插完成後再外加一上覆透明塑膠布之簡易隧道式溫室(圖 17)，將相對濕度控制在 95%左右。
- 4、自動噴灌之頻率為 60 分鐘噴灑 10 秒。
- 5、一般穗條於扦插後 15 天就有 80%開始抽芽(圖 18)，並於 35 天後開始有部分穗條產生癒合組織(圖 19)。
- 6、於扦插後 65 天全面檢查其發根情形如下表：

表 1. 臺灣黃蘗扦插後 65 天發根情形

	0ppm	250ppm	1000ppm	2000ppm
具癒合組織比率	36%	29%	43%	41%
發根率	0%	0%	0.5%	2%
枯死率	55%	61%	52%	50%

(二)、95年10月24日：

- 1、於太平山翠峰林道 5.6 K 處旁 10 公頃 18 年生人工造林地進行採穗，總計採集穗條 300 支，現地採穗之長度為 30 公分，採穗完成後以濕水苔包裹後以冷藏快遞寄返六龜處理。
- 2、將穗條修剪成 15 公分之長度，區分為頂芽及第二段兩種穗條，並分別依據前述之試驗設計及作業模式進行扦插處理。

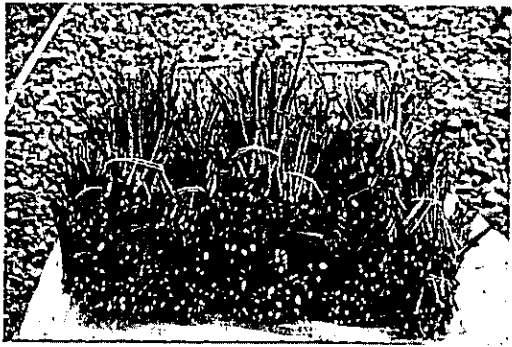


圖 13

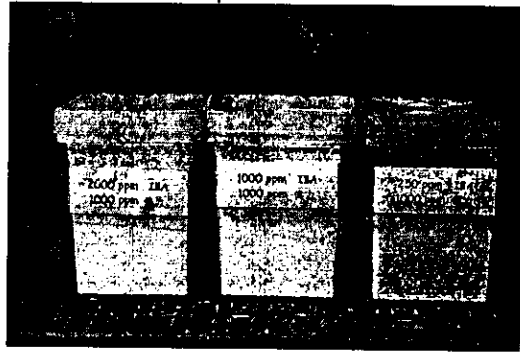


圖 14

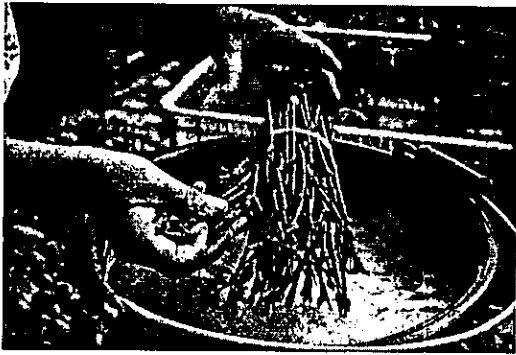


圖 15

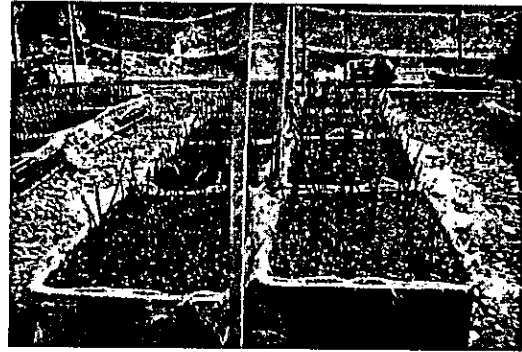


圖 16



圖 17



圖 18



圖 19



圖 20

三、生物活性成分分析

1. 藥材萃取;市售黃蘗及至臺灣各地採集的材料分別採自新竹尖石鄉秀巒山、嘉義石棧、杉林溪、棲蘭山神木區、太平山及日本黃蘗六批材料撥皮烘乾(60° C)後分別連續用酒精(2次)和 80%酒精(1次)萃取後混合濃縮,濃縮物分別依次用乙酸乙酯及正丁醇和水進行分割,將酒精(水)粗萃物進一步分割成乙酸乙酯及正丁醇和水三層。
2. 不同產地採集的黃蘗分別測其酒精(/水)萃取率,各萃取物進行 HPLC 分析。
3. 乾燥後酒精(水)粗萃物,乙酸乙酯及正丁醇和水進行血管舒張及對肝臟星狀細胞的細胞增生及細胞外基質的增生和肝臟星狀細胞的發炎相關基 TNF- 誘發的 NFkB luciferase reporter 基因的表現活性進行篩選。試驗結果如下:

4. 試驗結果:

(1) 萃取率分析

經萃取後,市售黃蘗片萃取率較高,其次為尖石、第三為太平山,其餘地區在 10% 以下。

表 2. 黃檗材料之酒精(水)萃取率: 萃取物乾重/黃檗片乾重

市售黃檗片	16.8%
尖石鄉秀巒山黃檗	16.3%
嘉義石棗黃檗	8.7%
杉林溪黃檗	8.8%
棲蘭山神木區黃檗	10.9%
太平山黃檗	12.9%
日本採黃檗	3.06%

(2)HPLC 分析

HPLC 管柱: Zorbax ODS 5 mM, 4.6 x 250 mm

Mobile phase: 0.1 M tartaric acid:acetonitril:MeOH:SDS =495:400:100:5 (v/v)

Detector: UV 345 nm

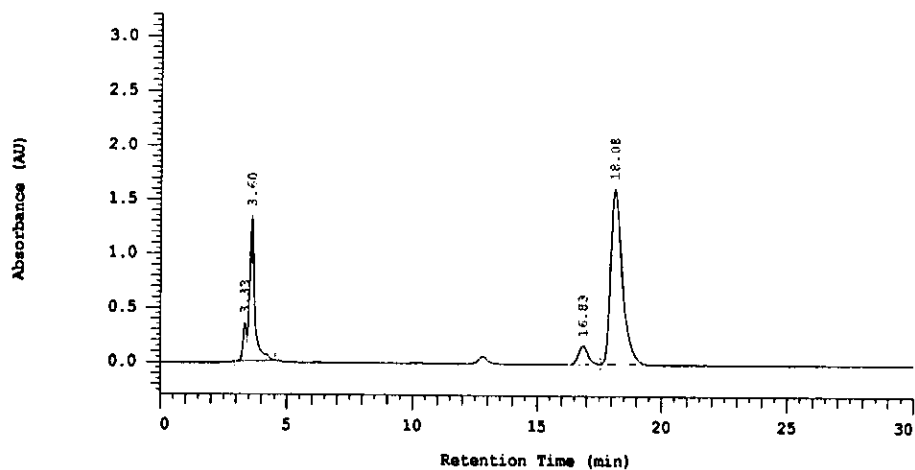


圖 21 HPLC 分析臺灣黃蘗內含 berberine 之檢定

Berberine 檢量線: $y=2E+09x +269110$; $R^2=0.9995$

表 3. 不同來源黃蘗材料所含的 berberine [berberine (g)/1g]

市售黃蘗片	0.0212 ± 0.0003
尖石鄉秀巒山黃蘗	0.0261 ± 0.0025
嘉義石棹黃蘗	0.0215 ± 0.0002
杉林溪黃蘗	0.0189 ± 0.0014
棲蘭山神木區黃蘗	0.0218 ± 0.0015
太平山黃蘗	0.0213 ± 0.0010

1.黃蘗對血管舒張活性的影響:市售黃蘗與臺灣產黃蘗均有血管舒張作用而且其活性相當。

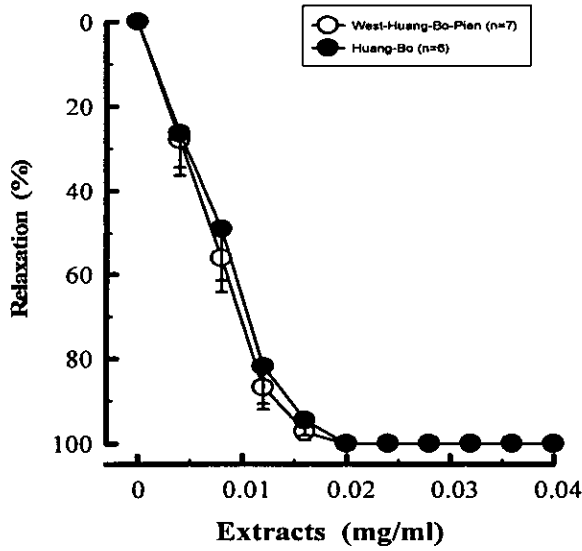


Fig. . Vasorelaxing effects of various extracts in endothelium-intact aortic rings precontracted with phenylephrine (0.3 μ M).

圖 22. 黃藥對血管舒張活性的影響

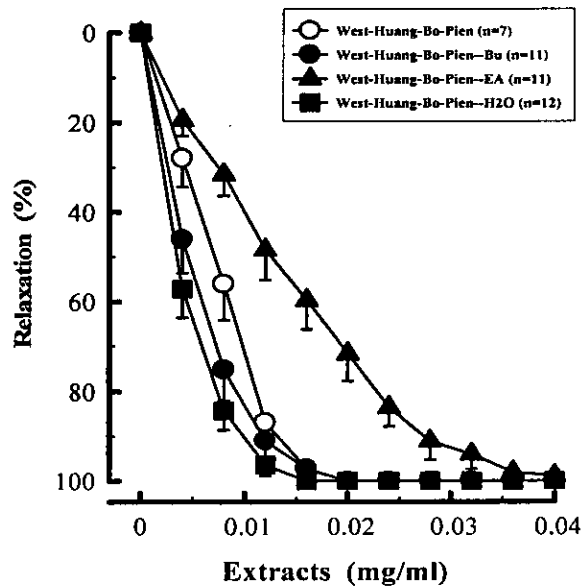


Fig. . Vasorelaxing effects of various extracts in endothelium-intact aortic rings precontracted with phenylephrine(0.3 μ M).

圖 23. 黃藥對血管舒張活性影響之活性化合物存在正丁醇和水層

由上圖比較市售黃藥(West-Huang-Bo-Pien)和尖石鄉黃藥對血管舒張活性兩者相當,由分割層比較主要活性化合物存在正丁醇和水層。

4. 台灣產黃蘗或市售黃蘗抑制肝臟星狀細胞 HSC-T6 細胞株的細胞增生(A)和(B)而且呈現劑量曲線關係, 臺灣產黃蘗採自秀巒山的黃蘗及市售黃蘗兩者的抑制活性相當; (C)黃蘗對肝臟星狀細胞 TNF- 誘發的 NfkB luciferase reporter gene 的表現亦具有抑制作用, 兩者活性相當。

(A)

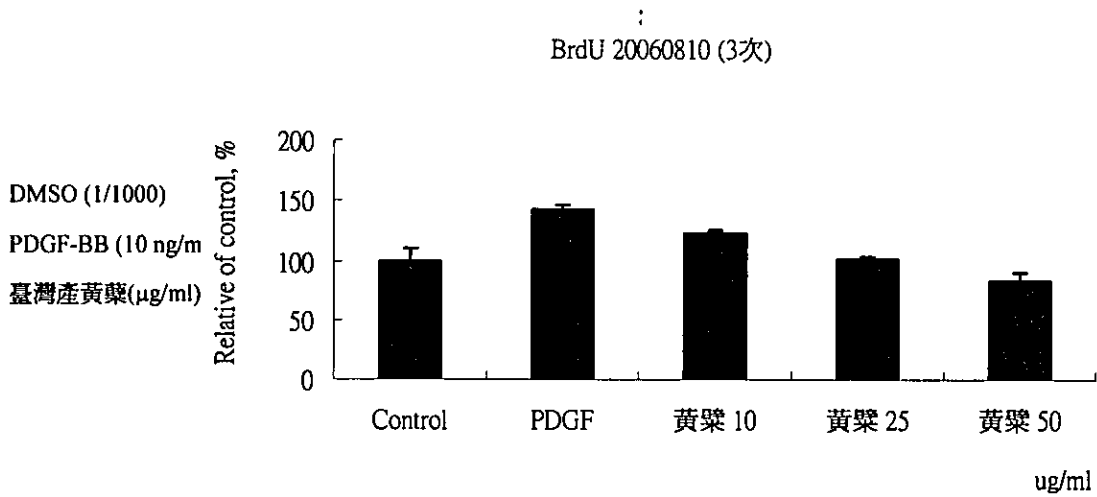


圖 24. 臺灣黃蘗抑制肝臟星狀細胞 HSC-T6 細胞株的細胞增生

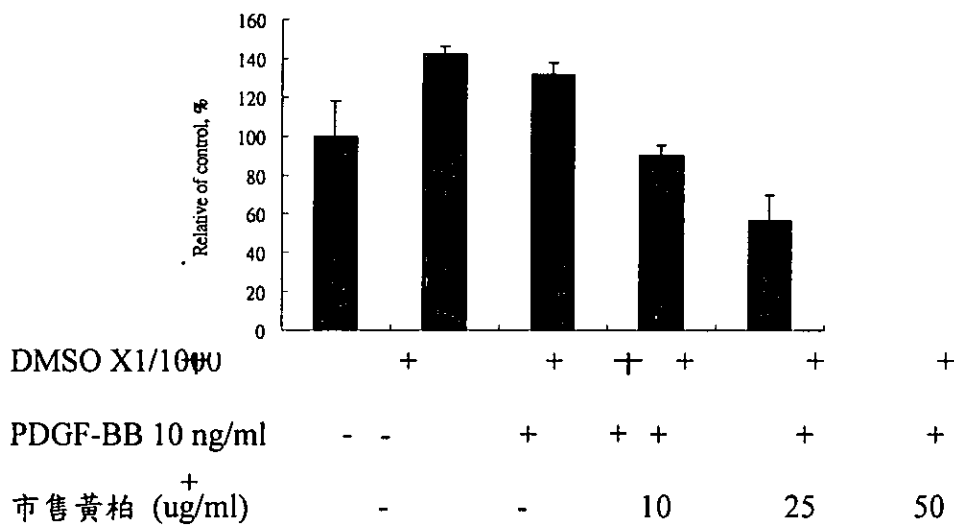


圖 25. 黃蘗抑制肝臟星狀細胞 HSC-T6 細胞株的細胞增生

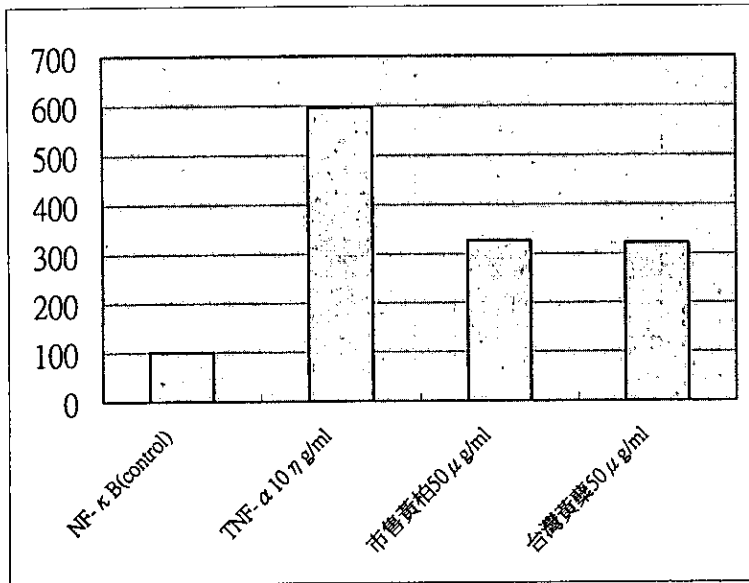


圖 26. 黃蘗對肝臟星狀細胞 TNF- 誘發的 NfκB luciferase reporter gene 的表現亦具有抑制作用

組織培養 1. 組織培養

取臺灣黃蘗之芽體及未成熟胚為培植體，分別接種於 WPM、MS 修正培養基並添加 NAA、BA、TDZ 不同濃度組合植物生長調節劑，培養 30 天後觀察，芽體對多芽體誘導狀況較為良好 (圖 27-29)，未成熟胚可誘導出子葉及小植株 (圖 30-32)，也因植物生長調節劑比例不同，誘導出白綠色癒傷組織 (圖 33-39)。培養基中有細胞分裂素時，有助於癒傷組織之誘導及形成，其中以添加 TDZ 之培養基誘導出的癒傷組織的胚原性細胞較多 (圖 35、37)。



圖 27



圖 28

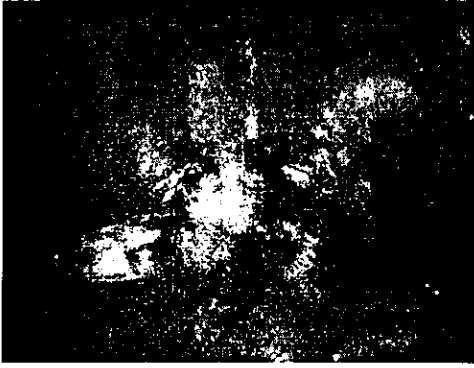


圖 29



圖 30



圖 31



圖 32



圖 33

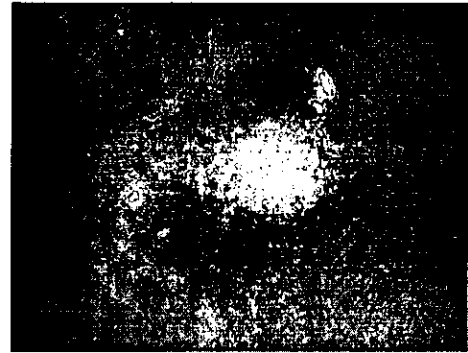


圖 34



圖 35



圖 36

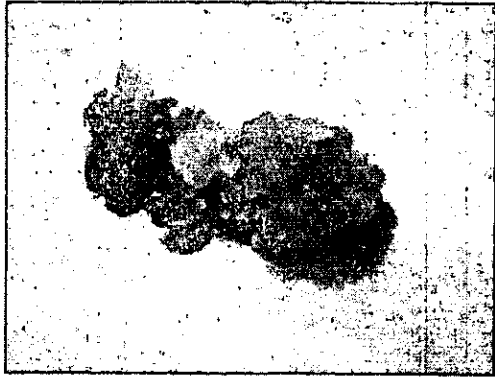


圖 37

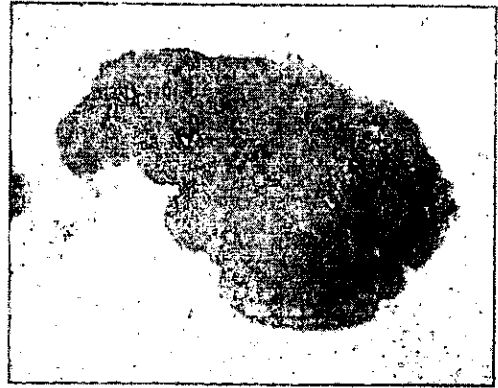


圖 38



圖 39

表4、臺灣黃蘗培植體，在MS固體培養基添加不同濃度之NAA與BA組合誘導癒傷組織之情況。

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	培植體 個數	Callus 誘發率(%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	15	0	-
1	1	15	87	++
2	2	15	100	+++
3	3	15	100	++
5	5	15	100	+
2	3	15	100	++
3	2	15	100	++
1	2	15	100	+++
2	1	15	100	++

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※每一組合五重複，每一處理三個培植體

表5、臺灣黃蘗培植體，在MS固體培養基添加不同濃度之NAA與TDZ組合誘導癒傷組織之情況。

NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)	培植體 個數	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
2	1	15	100	+++
1	2	15	100	++++
1	0.5	15	100	++
0.5	0.5	15	100	++
2	2	15	100	++++
1	5	15	100	++
1	1	15	100	+++
0	2	15	100	++
0	0	15	7	-

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※每一組合五重複，每一處理三個培植體

2.成份分析

將經過固體培養及液體懸浮培養的癒傷組織經過冷凍乾燥，保存收集細胞存於-20°C冰箱。樣品經萃取濃縮後，利用高效液相層析儀（high-performance liquid chromatography, HPLC）分析其有效成分含量。

在多種組合的生長調節劑（NAA、BA、TDZ）中，經由高效液相層析儀分析，在所有生長調節劑的組合中，以尖石秀巒未成熟胚在NAA與TDZ的組合有較明顯的 Bererine 含量，含量約 0.036 mg/ml（圖 40）。

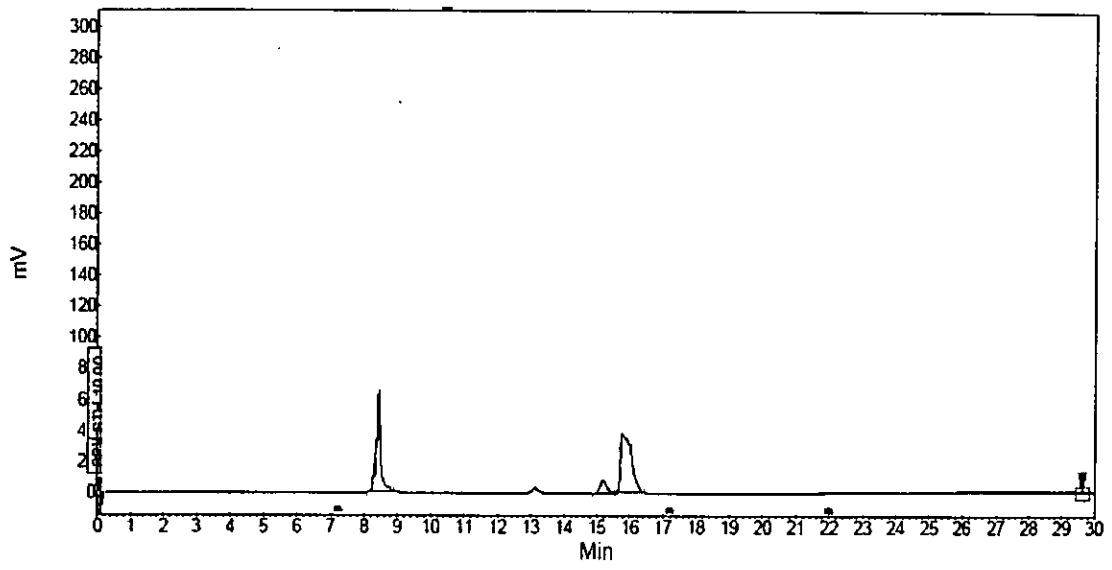


圖 40 HPLC 分析尖石未成熟胚在 NAA 與 TDZ 誘導之癒合組織之 Bererine 含量