

編號：CCMP94-RD-014

虎杖大量繁殖及品質鑑定之研究

關甫仁

亞洲大學

摘 要

虎杖 (*Polygoni Cuspidati Rhizoma*) 為中醫臨床上風濕痺痛之常用中藥，其所含化學成分有大黃素、大黃素甲醚等蒽醌類化合物及白藜蘆醇等活性成分，現代藥理學研究亦顯示具有顯著的鎮咳、降壓、抗菌、抗病毒、降血脂及抑制血小板凝集等作用，其甚具經濟價值。因此本計畫針對省產虎杖植物之保存與開發利用等相關研究之進行。

台灣土地已過度開發，虎杖野生資源日益減少，且通生長於低海拔的根莖較生長於高海拔的根莖結實，在栽培時，宜選擇適當之土壤、氣候等條件適合場地繁殖。為了開發虎杖藥材的資源利用及品質穩定，利用植物組織培養具有育種及大量繁殖之功能，利用植物組織培養技術，可短時間內獲得大量繁殖植物的特性，取代傳統育種，提昇虎杖品質的良好方法，並快速生產虎杖之二次代謝產物。

外界所採集的虎杖植物，經由 TLC 及 HPLC 針對虎杖所含大黃素量多寡，篩選品質較佳的虎杖植物，進行本研究的計畫。虎杖芽體以含有 1.5 mg/L BA 及 0.5 mg/L NAA 之 MS 培養基培養 60 天後，可產生 4.8 個不定芽。若改以液體與固體交替培養方式，對所誘導二次不定芽，可獲得 13 個不定芽。將芽體以含 5% sucrose 之 MS 培養基培養 60 天後可得良好根系，以此方式可建立虎杖之快速繁殖途徑。虎杖由根部所誘導之癒合組織，經暗培養 45 天後，以含 MS 基本鹽類 1 mg/L 2,4-D 與 0.2 mg/L kinetin 組合對癒合組織生長，可獲得最佳癒合組織平均鮮重為 70 mg，有助於建立優良之懸浮細胞系，藉此提升二次代謝物之產量。

關鍵詞：虎杖、植物組織培養、大黃素

Number: CCMP94-RD-014

Studies on the Clonal Propagation and Evaluation of the Quality of *Polygonum Cuspidatum* SIEB. et ZUCC.

Fu-Shin Chueh

Asia University

ABSTRACT

Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. (Huzhang in Chinese) is a kind of traditional Chinese medicinal herb commonly used for the treatment of rheumatic fever. The major components of *P.cuspidatum* including emodin, physcion and resveratrol etc. The roots of the *P. cuspidatum* are used as an atherosclerosis, and other medical ailments, such as coughs, asthma, hypertension, and cancer. So this project makes use of to wait for the related research to the conservancy and development that the province produces the plant of *P. cuspidatum*.

For the sake of the using of resource and quality that develop the *P. cuspidatum* medicine material the stability, the function that make use of the plant propagation to has to teach to grow and breed in great quantities, makes use of the plant propagation technique, can a short time inside the characteristic that acquire to breed the plant in great quantities, replace the tradition to teach the kind, promote the good method of the *P. cuspidatum* quality, and the fast production *P. cuspidatum* of metabolize the outcome two times.

The *P. cuspidatum* plant through the TLC and the HPLC with the greatly better *P. cuspidatum* plant of the sieving quality, carry on the project of this research. A simple protocol for *in vitro* mass propagation of *P. cuspidatum* has been developed. Multiple shoot was multiplied by subculturing on MS medium

supplemented with 0.5 mg/L NAA and 1.5mg/L BA. The shoots were multiplied by change to replace to foster the way with the liquid and the solid. Shoots were rooted on MS basal medium with 5% sucrose supplemented with various auxins. Shoots rooted on growth regulator with medium were transferred to soil: vermiculite mixture and acclimatized in the growth chamber. The roots of *P. cuspidatum* were cultured on a medium containing MS medium with 1 mg/L 2,4-D and the 0.2 mgs/L kinetin of inducing callus. The best callus to match the organization equally fresh and heavy for 70 mg, contribute to the establishment good suspension cell department.

Keywords : Polygonum cuspidatum, plant tissue culture, emodin

壹、前言

生物多樣性提供人類民生必需之物資、藥物和工業原料以及農林漁牧品種改良的基因庫，也為人類提供穩定水文、調節氣候、促進養分循環以及維持物種演化等重要功能。其研究就是要闡明與了解生物多樣性的組成、分佈、結構和功能，並運用上述知識應用於生物多樣性的永續利用與挽救生物多樣性，以達到改善人類生活的大目標⁽¹⁾。

從十九世紀末分析技術的進步開始，到二十世紀中葉後有機化學、分子生物領域的快速進展，人類逐漸瞭解古來相傳的生物有效成分究竟為何，甚至進一步地將這些有效成分作為模擬藍本，以人工的方式大量合成、使用。但因抗藥性微生物的增加、合成物的副作用與新疾病的產生，使得前世紀尋得的化合物藍本已不敷需求，加以環境與保育概念的推廣，更令人們開始思考天然資源及生物多樣性的維持與永續經營⁽²⁾。

國內高山林立，羣峰疊起，從中央山脈、雪山山脈、玉山山脈、阿里山山脈及臺東山脈，由於特殊的地理環境及海洋氣候的調節下，蘊育多種本土性藥用植物，例如石斛具有極高的藥用價值和觀賞價值，其對心血管、消化和呼吸系統、眼科等疾病有明顯治療作用⁽³⁾。然而這些本土性藥用植物長期以來，在人們大量的搜訪，採擷下，使得族群與分佈日漸萎縮，而形成稀有植物。當植物繁殖能力，追不上人類的需求，自然數目便日益減少，更形珍貴。

美國的NCI亦曾根據中國民間傳說自喜樹(*Camptotheca acuminata* DENCE)分離camptothecin並證實能殺滅多種腫瘤細胞，惟毒性太強，但以此為藍本之衍生物如CPT-11, topotecan等則顯示具相當開發潛力^(4, 5)。利用現代生物技術，配合組合化學及自動化設備，與民族植物學或生物多樣性研究的幫助，可容易達成快速大量之篩選。

常用中藥「虎杖」為蓼科多年生草本植物虎杖*Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUCC.的乾燥根莖和根，又名「土三七」、「活血龍」，時珍云：「杖言其莖，虎言其斑也。故又名斑杖。性味苦、寒。主入肝、膽、肺經。」自古應用於祛風、利濕、破淤及通經方面⁽⁶⁾。根據文獻記載虎杖含有大黃素、大黃素甲醚等蒽醌類化合物及白藜蘆醇等活性成分，近幾年來間多位大陸學者指出虎杖中所含之白藜蘆醇苷具有降壓、降血脂及抑制血小板凝集等作用。虎杖的煎劑有抗菌、抗病毒、抗腫瘤等作用，其甚具

經濟價值⁽⁷⁻¹³⁾。

大陸學者對不同產地之虎杖進行成分上的評估，發現其含量有所不同，故穩定品質是虎杖藥材的首要條件⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。利用組織及細胞培養可有效的進行資源保護及快速繁殖珍稀藥用植物，是時下頗為熱門且實用的生物技術⁽¹⁷⁻²⁰⁾。因此，本研究為配合行政院衛生署落實中藥品質管制之政策，擬先經由基原鑑定及活性成分分析，篩選品質較佳之虎杖材料進行大量繁殖的研究，故希望藉由植物組織培養方式生產品質穩定之虎杖藥材，佐以科學化之藥理研究成果，使其得以進軍國際舞台。

貳、材料與方法

一、實驗材料

本研究使用之虎杖 (*Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUCC.) 植株，係採自台灣山區，經 TLC 及 HPLC 成分分析後篩選高含量大黃素之植株，作為本試驗之材料 (Fig.1-2)。

二、實驗方法

(一) 虎杖所含大黃素成分分析

1. 儀器

(1) 薄層層析 (TLC) 板：Silica gel 60 F254.

(2) 高效液相層析儀 (HPLC)

a. Waters™ 2695 型 Pump。

b. Waters™ 2996 controller Photodiode array detector。

c. Empower chromatography manager。

d. 層析柱 (column): 使用 Inertsil ODS-3 (5 μ m 4.6 x 250 mm) 前端加上管柱 (pre-column) 以濾除雜質。

2. 方法

(1) 利用薄層層析法進行虎杖材料定性試驗

在薄層層析板上分別點上虎杖標準品 (大黃素)、藥材及植株溶液，以 hexane : ethyl acetate : formic acid (15 : 5 : 1) 展開，在 366nm 波長紫外光下觀察斑點。

(2) 利用高效液相層析法進行虎杖材料定量試驗

a. 標準品之製備

稱取 emodin 之標準品 10mg，分別溶於 10mL 甲醇中，以 0.45 μ m (Nalgene® , New York, USA) 濾膜過濾，

為含量 1mg/mL 之母液，供 HPLC 偵測 emodin 含量之用。

b. 檢品之製備

材料經冷凍乾燥後，各稱取 2g，以 10mL 甲醇經超音波震盪萃取 20 分鐘，收集濾液，重複萃取三次，合併濾液，並以減壓濃縮方式將濾液濃縮至乾，再以 3mL 甲醇溶出，並以 0.45 μ m 濾膜過濾，供 HPLC 偵測 emodin 含量之用。

(3) 高效液相層析法之偵測條件

a. 流動相 MeOH/0.1% Phosphoric acid solution=90/10。

b. 流速：1mL/min。

c. 檢測波長：PDA 280-450nm。

(4) 標準曲線之繪製

取 emodin 之標準品，分別精確配製 1、0.5、0.25、0.125、0.0625mg/mL 等 5 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 10 μ L 注入 HPLC 分析，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。其迴歸方程式如下：

$$Y=20141199X + 201571.8 \quad r = 0.999954$$

利用此迴歸方程式，以波峰面積求出 emodin 之含量。

(5) 檢品之測定

將上述各種不同虎杖的檢品，以前述檢品的製備方法與分析條件，每次自動定量注射 10 μ L 注入 HPLC 分析，並用外標準法計算 emodin 之含量。

(二) 虎杖之組織培養

1. 培養基之製備

(1) 固體培養基之製備

固體培養基主要以 MS 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 0.5N 的 NaOH 或 HCl，將 pH 值調至 5.7 ± 0.1 ，以 121°C 、 15 lb/in^2 (1.05kg/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) 液體培養基之製備

液體培養基之配製步驟同固體培養基，僅不添加入凝膠物質並將 pH 值調為 5.2 ± 0.1 。

2. 培植體之消毒

野生虎杖植株以清水洗淨，於 70% 乙醇中浸泡 1 分鐘，再以 0.5% 次氯酸鈉（每 50mL 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。將虎杖不同部位之培植體，培養於含有 1mg/L BA、3% 蔗糖及 0.9% 凝膠 (Difco agar)， $\text{pH}=5.7\pm 0.1$ 之 MS (Murashige and Skoog, 1962) 基本鹽類固體培養基中，誘導出大量芽體，經繼代培養後可生產大量的組織培養苗，供本研究探討各種不同因素影響之用。

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（固體培養：光量 $100\mu\text{E/m}^2\text{s}$ ，光波長 350-800nm）。

4. 癒合組織之誘導

以虎杖無菌苗之根、莖及葉為培植體，培養於含有 Auxins 之 MS 培養基中誘導癒合組織，以供本試驗探討各種影響癒合組織生長的因子。

5. 組織培養苗之健化

將具有強健根系的組織培養苗自試管中取出，用清水洗淨、去除培養基後，以稀釋 1000 倍的億力浸泡 1 分鐘，隨即移植於滅菌過的栽培介質（以各種不同比例的壤土、蛭石及泥炭土組合而成）中，將植盆置於生長箱 [$20/16^{\circ}\text{C}$ (日/夜)，16

小時光照〕條件下，每天澆一次水以保持濕度，30 天後調查移植植株之存活率。

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。

參、結果

一、虎杖芽體培養之大量繁殖

(一) BA 濃度對虎杖誘導不定芽之影響

取虎杖植株腋芽進行無菌接種於含有 BA 之固體培養基內，作為繁殖材料，再將這些材料培養於不同組成之培養基，進行為期 60 天的調查。本試驗首先探討 BA 濃度的影響，由表 1 顯示，不含 BA 之培植體，節間較長約 4 公分，枝條顯得柔弱。芽體數隨 BA 濃度增加而增加，但 BA 濃度增加易造成培植體有白化趨勢，由此項結果可知虎杖芽體大量繁殖於含 BA 1.5 ppm 的培養基為宜。

(二) 基本鹽類對虎杖誘導不定芽之影響

探討 MS、B₅、N₆ 不同基本鹽類對大量繁殖虎杖芽體的試驗中，由發現 MS、B₅、N₆ 的基本鹽類對虎杖芽體數的影響不大，但對表 2 培植體的生長方面有明顯異差，B₅ 培養基易造成玻璃質化，N₆ 培養基則易導致芽體白化，故試驗結果顯示 MS 基本鹽類較適宜其生長。

(三) MS 濃度對虎杖誘導不定芽之影響

虎杖之不定芽培養於含 1/4X、1/2X、1X 及 2X 等 4 種不同濃度之 MS 培養基中，培養 60 天後，觀察其芽體增殖的情形，結果如表 3 顯示，1X 之 MS 培養基中的不定芽正達生長高峰期，約可形成 4.7 個芽體；1/2X 之 MS 培養基中芽體有生長緩慢之傾向；而 1/4X 及 2X 之 MS 培養基所誘導不定芽體約 0.6-0.8 個，且芽體極易褐化。

(四) 蔗糖濃度對虎杖誘導不定芽之影響

虎杖之不定芽培養於含 0、1、3、5 及 7 等不同蔗糖濃度之培養基，培養 60 天後，觀察其芽體增殖的情形，結果如表 4 顯示，當以蔗糖濃度為 3% 時，不定芽數約為 4.7 個，且芽體生長健壯；蔗糖濃度過高或過低均對芽體數目及生長有不利的現象。

(五) 培養狀態對虎杖誘導不定芽之影響

在液、固體交替培養以大量繁殖虎杖芽體的試驗中，試驗結果顯示在表 5、6，以開始於液體培養後的 14 天後，再轉移至固體培養基之處理對芽體繁殖及生長較為有利。此一試驗結果建議長時間之液體方式培養對繁殖虎杖芽體數目雖有助益，但使芽體產生嚴重玻璃質化情形，而固體培養所得之芽體則少有玻璃質化發生。

二、虎杖不定芽之發根

(一) NAA 濃度對虎杖不定芽發根之影響

虎杖之不定芽培養於 NAA 等不同濃度之 MS 基本鹽類培養基中，30 天後，觀察其不定芽發根之影響，結果如表 7 顯示，添加 1mg/L NAA 以上之培養基可獲得較多之根數，但隨 NAA 濃度增加，其根部有癒合組織形成，會造成健化處理上的困難。因此，不定芽之發根仍以添加 1mg/L NAA 之培養基為佳。

(二) 蔗糖濃度對不定芽發根之影響

虎杖之不定芽培養於含不同濃度蔗糖之 MS 培養基內，30 天後，觀察不定芽發根之情形，結果如表 8 顯示，3% 及 5% 蔗糖均有促進不定芽發根及增加根長度的作用，其中以 5% 蔗糖濃度效果最佳。

(三) 不同混合介質對虎杖植株移植存活率之影響

本試驗取根長及根數大約相等之試管苗種植於三種培養土中，每天澆水以維持濕度，並三天噴一次 1/10 MS，30 天後，觀察存活率。結果如表 9 顯示，小苗種植於不同比例混合之壤土、泥炭土及蛭石等植材中，以壤土：蛭石（1：1）混合之培養土，移植存活率 73% 最高。

三、癒合組織之誘導及生長

將虎杖之葉片、莖段及根三部分，分別培養於含各種生長調節劑組合之 MS 基本鹽類培養基中，觀察其誘導癒合組織的情形。

(一) 虎杖之葉片、莖段及根對誘導癒合組織之影響

取虎杖葉片、莖段及根約 0.5cm 大小，培養於含 2mg/L 2,4-D 之 MS 培養基中，45 天後觀察葉片、莖段及根誘導癒合組織形成之能力，結果如表 10 顯示，根對誘導癒合組織的能力較葉片及莖段佳，可獲得 93% 誘導率，癒合組織平均鮮重為 63mg 為最佳。

(二) 植物生長調節劑對虎杖癒合組織之影響

取虎杖癒合組織約 0.5cm 大小，培養於含不同 auxin 之 MS 培養基中，45 天後觀察癒合組織生長之能力，結果如表 11 顯示，2,4-D 對癒合組織生長的能力較 NAA 佳，當癒合組織培養於 1 mg/L 之 2,4-D 濃度時，可獲得癒合組織平均鮮重約為 70mg 為最佳。

肆、討論

在大量繁殖的系統中，尋找培植體穩定生長是最重要的工作，我們可從培植體生長勢與時間的關係，以此決定繼代培養進行的時間。本研究以虎杖為供試材料，取腋芽培養於固體培養基中，利用不同的培養基調查芽體數目與生長狀況的關係，如各表所示。培養時間在 60 天左右，不定芽數目增加有限。

Cytokinin 為細胞分裂素，其功能之一為打破頂芽優勢促進側芽生長。組織培養上常用的種類有 BA、zeatin、2ip 及 kinetin 四種，其中以 kinetin 的生理活性最弱。本研究即採用 cytokinin 中之 BA，測試其對芽體繁殖的影響，結果如 Table 1，以 BA 1-2ppm 最適合虎杖芽體的繁殖。古等學者指出，在康乃馨莖頂培養時，培養基中添加 BA 易使芽體產生玻璃質化，且 BA 濃度越高玻璃質化的情形也越嚴重。Leshem 指出 cytokinin 在植物體發生玻璃質化上，似乎是一個“primary facto”。因此，在大量繁殖虎杖芽體時，如何避免芽體產生玻璃質化應是另一個值得研究的問題⁽²¹⁾。

鹽類種類及濃度、蔗糖等條件，對不定芽數繁殖及生長的影響很大。George and Sherrington 指出高濃度鹽類常抑制培植體之分化，而當鹽類濃度減半或更低時，發根效果較佳⁽²²⁾。糖是培養基中含量最多的有機物質，主要功能為提供植物生長所需之碳源及調節滲透壓。蔗糖濃度在芽體開花及發根間的一及二次效應均顯著。由此得知，隨著蔗糖濃度的提高，芽體開花及發根的比例亦會提高，但若濃度過高時，便會抑制芽體生長。因此本研究以 MS、B5 及 N6 為基本配方，探討其濃度與蔗糖濃度對虎杖不定芽生長的影響，Table 2、3 及 4 顯示 MS 基本鹽類中添加 1.5ppm BA，0.2ppm NAA 並配合 3% 的蔗糖在不定芽數及生長上有較穩定的生長勢。顯示鹽類、蔗糖濃度的高低與芽體的生長有密切的關係。

有效的將液體培養基和固體培養基交互使用，常使微體繁殖法得到斐然的成果。Tsay 等學者以固體培養基和液體培養基交互應用，可使半夏芽體維持旺盛的活力⁽²⁰⁾。許等學者亦指出柴胡台農 1 號芽體（約 2-3 個芽體）培養於液體培養基中，1 個月後芽數可增加為原來的 13 倍，較固體培養基效果好。本研究以虎杖單芽（長度約 5mm）為材料，先在液體培養基中培養 14 天後再移至固體培養基繼續培養。Table 5、6 顯示，先在液體培養基中培養 14 天後再移至固體培養基中繼續培養，

對虎杖不定芽體的增生較為有利，而單以固體培養基培養所得到的芽數較少。此外，本試驗亦發現以單芽開始培養於液體培養基中似乎不利於芽體生長，而且液體培養的時間越久芽體發生玻璃質化的情形也越嚴重，褐化及死亡的比例亦高，推論其原因應是以單芽進行液體培養時，可能因芽體尚小因而沉浸在培養基中，阻礙了氣體交換所造成的結果。所以，若以單芽繁殖時，芽體應先在固體培養基中培養一段時間後，俟產生較多不定芽時再轉移至液體培養基培養，對芽體增生較為有益。

伍、結論與建議

本計畫進行省產虎杖大量繁殖及品質鑑定之研究，利用大黃素以作為組織培養研究中活性指標成分選擇之依據。將採集的虎杖植株經由無菌苗的建立，將芽體培養於含 1.5mg/L BA、0.5mg/L NAA、3% sucrose 之 MS 培養基，在液、固體交替培養下培養，可形成 13 個芽體，可獲得最佳生長勢。進而將不定芽以含 5% sucrose 之 MS 培養基培養，經 60 天後，可得良好根系，有助於組織苗之健化處理 (Fig.3)。

在癒合組織方面，取虎杖根部所誘導之癒合組織，培養於含不同濃度 2,4-D 之 MS 培養基中，經暗培養 45 天後，觀察其產生之癒合組織之鮮重，結果顯示，以 1mg/L 2,4-D 與 0.2mg/L kinetin 組合對癒合組織生長，可獲得癒合組織平均鮮重為 70mg 為最佳。

本計畫成功建立虎杖快速繁殖之條件，並能有效提升其藥理活性成分 emodin 之含量，期能有助於省產虎杖藥材之保育與開發應用。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-014 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、圖表



Fig.1 虎杖原植物及市售虎杖藥材

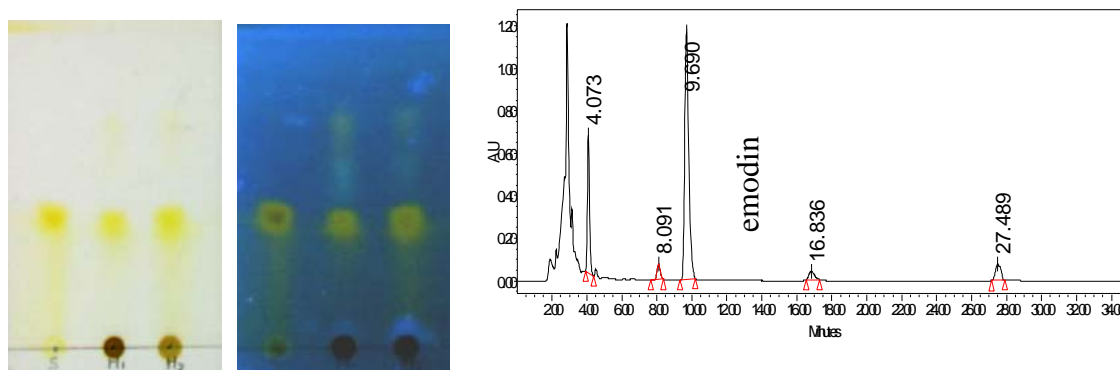


Fig.2 虎杖植株之 TLC 及 HPLC 層析圖譜

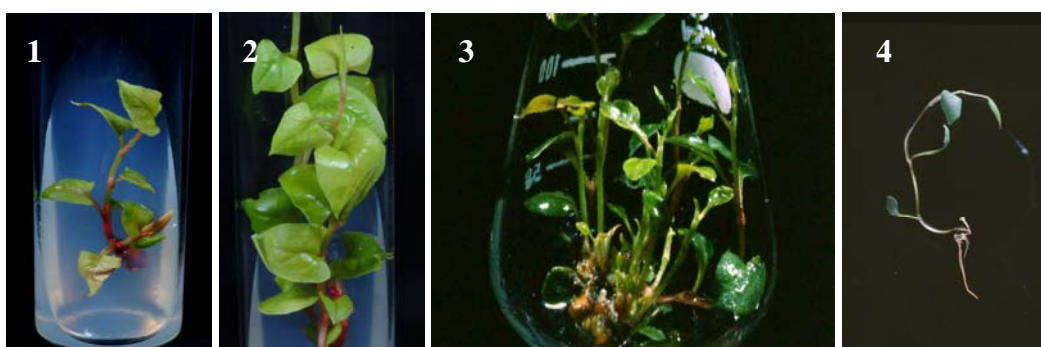


Fig.3 虎杖芽體大量繁殖

1. 虎杖芽體由腋芽初誘導生長情形
2. 虎杖不定芽培養於固體培養基生長情形
3. 虎杖不定芽培養於液體培養基生長情形
4. 虎杖不定芽發根情形
5. 虎杖組培苗健化處理

表 1 BA 濃度對虎杖誘導不定芽之影響¹

MS salts with BA NAA (mg/L)	No. of Shoot produced	shoot fresh weight (mg)	growth state distance of node (cm)
0 0	1.3 ^{d2}	158 ^c	4
0.5 0.5	2.4 ^c	231 ^b	2.5
1 0.5	3.8 ^b	230 ^b	2
1.5 0.5	4.7 ^a	249 ^b	1.5
2 0.5	4.5 ^a	291 ^a	1
4 0.5	4.2 ^a	231 ^b	0.5

¹ Culture medium : MS salt with 3% Sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 60days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 2 基本鹽類對虎杖誘導不定芽之影響¹

basal medium	No. of shoot produced	Shoot fresh weight (mg)	growth state distance of node (cm)
MS	4.7 ^{a2}	249 ^a	1.5
B ₅	4.5 ^a	222 ^a	2
N ₆	4.2 ^a	246 ^a	2.5

¹ Culture medium : 1.5ppm BA,0.5ppm NAA with 3% Sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 60days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 3 MS 濃度對虎杖誘導不定芽之影響¹

MS salts strength	No. of shoot produced	Shoot fresh weight (mg)	growth state explant turned to brown (%)
1/4 MS	0.6 ^{b2}	18 ^b	58
1/2 MS	4.7 ^a	241 ^a	0
1 MS	4.7 ^a	249 ^a	0
2 MS	0.8 ^b	16 ^b	78

¹ Culture medium : 1.5ppm BA ,0.5ppm NAA with 3% Sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 60days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 4 蔗糖濃度對虎杖誘導不定芽之影響¹

sucrose concentration (%)	No. of shoot produced	Shoot of fresh weight (mg)
0	0 ^{c2}	4 ^c
1	1.2 ^b	83 ^b
3	4.7 ^a	249 ^a
5	4.6 ^a	233 ^a
7	4.5 ^a	231 ^a

¹ Culture medium : MS salt with 1.5ppm BA, 0.5ppm NAA and 0.9% Difco agar. Culture duration : 60days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 5 Agar 濃度對虎杖誘導不定芽之影響¹

Agar concentration	No. of shoot produced	Shoot of fresh weight (mg)
Difco agar (0.9%)	4.7 ^{a2}	249 ^a
Gelrite (0.3%)	4.9 ^a	155 ^b
Difco agar (0.45%) + Gelrite (0.15%)	3.4 ^b	195 ^b

¹ Culture medium : MS salt with 1.5ppm BA, 0.5ppm NAA and 3% Sucrose. Culture duration : 60days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 6 培養方式對虎杖誘導不定芽之影響¹

media state	No. of shoot produced	growth state D.I. (cm)
solid	4.7 ^{c3}	0.16
liquid	13 ^a	0.10
liquid→solid ²	10 ^a	0.10 → 0.15
solid→liquid ²	8.3 ^b	0.14 → 0.15

¹ Culture medium : MS salt with 1.5ppm BA, 0.5ppm NAA and 3% Sucrose. Culture duration : 60days

² liquid medium transform to solide medium or solide medium transform liquid to medium : 14days

³ Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

表 7 NAA 濃度對虎杖不定芽發根之影響¹

NAA oncentration (mg/L)	Average length of roots (cm)	Average inside diameter of roots (cm)
0	0.58 ^{d2}	0.01 ^c
0.5	1.30 ^c	0.03 ^b
1	2.73 ^a	0.15 ^a
2	2.26 ^b	0.05 ^{b3}
4	2.20 ^b	0.14 ^{a3}

¹ Culture medium : MS salt with 3% Sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 30days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

³ Callus formation at the cut end of shoot along with rooting.

表 8 蔗糖濃度對虎杖不定芽發根之影響¹

sucrose concentration (%)	Average length of roots (cm)	Average inside diameter of roots (cm)
1	0.30 ^c	0.03 ^b
3	2.73 ^a	0.15 ^a
5	2.84 ^a	0.17 ^a
7	1.16 ^b	0.11 ^{ab3}

¹ Culture medium : MS salt with NAA 1mg/L and 0.9% Difco agar. Culture duration : 30days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test.

³ Callus formation at the cut end of shoot along with rooting.

表 9 不同混合介質對虎杖植株移植存活率之影響¹

Soil- mixture components*			No. of plants transplanted	Survived plants ²	
Soil	Vermiculite	Peat moss		No.	%
1	0	0	30	0	0 ^g
1	1	0	30	22	73 ^a
1	0	1	30	11	36 ^c
1	1	1	30	13	43 ^b
0	1	0	30	5	17 ^d
0	1	1	30	6	20 ^d
0	0	1	30	3	10 ^e

¹ Soil-mixture components were mixed by volume

² Data collected from in vitro plants which have been transplanted for 30days.

表 10 虎杖之葉片、莖段及根對誘導癒合組織之影響¹

Explant source	Callus formation (%)	Callus fresh wt.(mg/culture)
Stem	17 ^{c2}	21 ^b
Leaf	46 ^b	23 ^b
Root	93 ^a	63 ^a

¹ Medium composition was MS salts with 2,4-D 2mg/L,3% sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 45days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test

表 11 植物生長調節劑對虎杖癒合組織之影響¹

Basal medium with - mg/L -	Fresh weight - mg/callus-	
2,4-D	0	10 ^{e2}
	1	70 ^a
	2	67 ^a
	4	36 ^c
NAA	1	22 ^d
	2	41 ^b
	4	48 ^b

¹ Medium composition was MS salts with 3% sucrose and 0.9% Difco agar. Culture duration : 45days

² Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level by LSD (least significant difference) test

柒、參考文獻

1. Courier, K. eds. Global Biodiversity Strategy. (全球生物多樣性策略) Guidelines for action to save, study, and use earth's biotic wealth sustainably and equitably. WRI. IUCN and UNEP. 1992.
2. Zhao W, Ye Q, Tan X, et al: Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. J. Nat. Prod. 2001; 64(9): 1196-200.
3. Chen S., Li Y., Wu Y, et al: Effect of *Dendrobium nobile* Lindl. on gastric acid secretion, serum gastrin and plasma somatostatin concentration. . Zhong guo Zhong Yao Za Zhi. 1995; 20(3): 181-21.
4. Li YF, Zhang R: Reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitation of the lactone and carboxylate forms of the novel natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin in biological fluids and tissues. J. Chrom B 1996; 686(2): 257-65.
5. Shibata Y, Takiguchi H, Tamura K, et al: Stimulation of interleukin-1 beta-converting enzyme activity during growth inhibition by CPT-11 in the human myeloid leukemia cell line K562. Biochemical & Molecular Medicine 1996; 57(1): 25-30.
6. 袁昌齊：天然藥物資源開發利用，南京，江蘇科學技術出版社，2000：0217-22。
7. 劉青玲：虎杖的臨床藥理藥效探討。實用醫技雜誌 1997；4（2）：125-6。
8. Yang F, Zhang T, Ito Y: Large-scale separation of resveratrol, anthraglycoside A and anthraglycoside B from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. J Chrom A 2001; 919(2): 443-8.
9. Lee YC, Kim JD, Kim HM, et al: Inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* water extract (PCWE) and its component resveratrol on acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase activity for cholesteryl ester synthesis in HepG2 cells. Vascular Pharmacology 2004; 40(6): 279-84.

10. Wang S, Zheng Z, Weng Y et al: Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sciences* 2004; 74(20): 2467-248.
11. Kong LD, Cai Y, Huang WW et al: Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *J Ethnopharm* 2000; 73(1) 199-207.
12. 黃遠芬、李蓓蓓、羅霄山：虎杖及其有效成分藥理研究進展。廣東藥學 2000；10(6)：13-5。
13. 韓繼武、寧登科：虎杖藥理作用研究進展。中國藥業 2001；10(8)：55-6。
14. 張喜云：虎杖的化學成分、藥理作用與提取分離。天津藥學 1999；11(3)：13-4。
15. 郭金鳳、崔一民、趙俠等：薄層層析法鑑別虎杖中的成分。中國藥事 1997；11(1)：52-3。
16. 袁珂、楊中漢、殷鵬輝等：虎杖提取物的生產工藝優化及質量檢測。中國現代應用藥學雜誌 2000；17(6)：444-6。
17. 蘇遠志、楊瑞森、高建元：利用植物組織培養二級代謝產物。Bioindustry 1990；1(1): 1-14。
18. Hiraoka N, Kodama T, Tomita Y : In vitro propagation of *Bupleurm falcatum*. *Jap. J. Pharmacol* 1983; 37(1): 62-67.
19. Nishioka I : Clonal multiplication of medicinal plant by tissue culture. *Jap. J. Pharmacol* 1988; 42(1): 1-11.
20. Tsay HS, Gan TG, Chen CC : Rapid clonal propagation of *Pinella ternata* by tissue culture. *Plant Cell Rep* 1989; 8: 450-454.
21. 古新梅、蔡新聲：培養基組成分對康乃馨試管苗玻璃質化的影響。中華農業研究 1994；43：51-92。
22. George EF, Sherrington PD : Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Eastern Press, Reading, Berks. England 1984: 125-330.