

八角蓮癒傷組織之誘導與鬼臼素之檢測

陳靜怡¹ 李昆達^{1*} 劉祖惠² 劉文雄¹

¹ 國立臺灣大學微生物與生化學研究所

² 財團法人生物技術開發中心

（接受刊載日期：中華民國九十三年七月九日）

八角蓮 (*Podophyllum pleianthum*) 為台灣民間治療毒蛇咬傷與跌打損傷之傳統草藥，並含有重要抗腫瘤成分—鬼臼素。由於八角蓮生長緩慢並受到大量採集，在台灣已瀕臨絕種。本研究之目的，在利用八角蓮無菌植株為材料，探討癒傷組織之誘導條件，並檢測癒傷組織是否含有鬼臼素。結果顯示，於含有 2-3 mg/L 2,4-D 之 B5 基礎培養基，可使根部培植體產生癒傷組織，其誘導率為 30%；而以 10-15 mg/L NAA 取代 2,4-D，則可促進來自莖部（含莖頂）之培植體產生癒傷組織，誘導率可達 90%。將誘導所得之癒傷組織經冷凍乾燥與甲醇萃取處理後進行 HPLC 分析檢測，發現由根部誘導生成之癒傷組織含有鬼臼素。此成分之停滯時間 (10.1 分鐘) 及 UV 吸收光譜，與鬼臼素標準品一致。

關鍵字：八角蓮，鬼臼素，癒傷組織。

Callus Induction of *Podophyllum pleianthum* Hance and the Detection of Podophyllotoxin

Chin-Yi Chen¹, Kung-Ta Lee^{1*}, Tsu-Hwie Liu² and Wen-Hsiung Liu¹

¹The Graduate Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

²Develop Center for Biotechnology, Taipei, Taiwan

(Accepted for publication: July 9, 2004)

Podophyllum pleianthum Hance has been traditionally used in Taiwan for healing snake bitten and wounds. It is also valuable for containing podophyllotoxin—an precursor of effective anti-tumor agents treated in clinical medicine. Due to slow-growing habit and over-collection, *P. pleianthum* is rare from its natural habitation. We report here the results of callus induction of *P. pleianthum* from different parts of regenerated plantlet. Our data revealed that solid medium containing B5 salts with 2-3 mg/L 2,4-D was essential for root callus formation, but the induction rate was as low as 30%. When presence of 10-15 mg/L NAA, it was more effective than 2,4-D for initiating callus from stems of *P. pleianthum*, and the induction rate reached 90%. Methanol extraction of callus derived from different parts of *P. pleianthum* was further analyzed by HPLC (equipped with a photodiode array detector) for podophyllotoxin detection. A metabolite, extracted from root-induced callus, appeared at the same time (10.1 min) with the same UV absorption spectra as authentic podophyllotoxin was observed.

Key words: *Podophyllum pleianthum*, Podophyllotoxin, Callus induction.

前言

八角蓮 (*Podophyllum pleianthum* Hance) 為多年生雙子葉肉質草本植物，分佈地為台灣中北部海拔約 1,000 至 2,500 公尺間之山區谷地與山坡地。尤其是林下陰涼與溼度較高處。越往北分佈海拔愈低。台北附近之陽明山與大屯山

區、宜蘭太平山、中部溪頭等地方，均有採集的記錄⁽¹⁾。八角蓮的根莖橫走，具有鬚根，葉枯萎脫落後，根莖上會留下凹陷的痕跡。八角蓮其葉長、寬各約 20-30 公分，形似荷葉，葉緣具有 6-10 尖裂，裂片為寬三角狀卵型，呈現鋸齒狀，葉柄長約 20 公分。每年四、五月間，於葉柄分岔處會長出 3-8 枚或更多的花，為紫

* Corresponding author. E-mail: ktleee@ntu.edu.tw

紅色、下垂並具有細長柄，苞片與萼片各六枚，萼片為暗紫紅色、花瓣狀，花瓣為黃褐色，細小、基部有密腺、漿果橢圓形⁽²⁾。

鬼臼素(podophyllotoxin)於1962年從八角蓮萃取液中分離而得⁽³⁾，並有研究顯示其具有抑制癌細胞分裂的能力⁽⁴⁾，其作用機制為停止細胞微小管(microtubule)之形成，但是細胞仍可繼續進行微小管的去聚合作用(depolymerization)，使得兩者間的平衡被破壞，導致細胞停留在細胞分裂的中期。鬼臼素雖是細胞有絲分裂之抑制劑，且具有顯著之抗癌活性，但以其毒性大、副作用大，並不適合臨床上直接使用⁽⁵⁾。然其衍生物，如 etoposide 與 teniposide (圖一)，卻已經成為睪丸癌、肺癌與白血病的治療用藥^(6,7)。因此，鬼臼素之生產仍具有產業價值。而關於鬼臼素之生產方法，由於化學全合成法受制於合成步驟多、中間產物之立體旋光結構複雜不易分離，因而影響其最終合成效率。所以，目前鬼臼素之供應，仍以 *Podophyllum hexandrum* Royle 之根與根莖(rhizome)為原料，經傳統之萃取法為主⁽⁸⁾。

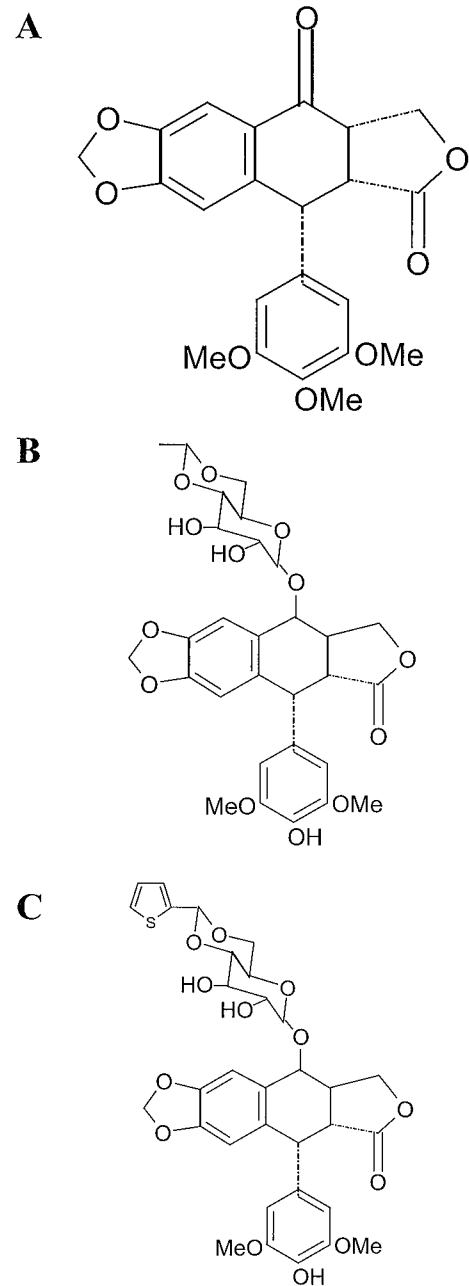
鬼臼素在化學結構上屬於木脂素(lignan)。Davin 等人⁽⁹⁾以 *Forsythia* spp. 為材料進行木脂素之生合成路徑研究，認為木脂素是以 phenylpropanoid pathway 形成的 coniferyl alcohol 或其它 hydroxycinnamoyl alcohols 為起始基質，經 radical-forming enzyme 催化，將兩分子的 coniferyl alcohol 或 hydroxycinnamoyl alcohols 聚合成具有光學活性之 pinoresinol，接著再經由兩個連續的還原反應生成 matairesinol。然而，如何由 matairesinol 生合成鬼臼素，其詳細路徑目前尚未完全了解。

植物細胞培養技術被認為是獲取鬼臼素之重要途徑之一⁽¹⁰⁾，目前已被成功建立具有鬼臼素生合成能力的植物懸浮細胞株包括 *Callitris drummondii*⁽¹¹⁾、*Linum album*⁽¹²⁾、*Linum nodiflorum*⁽¹³⁾ 與 *Podophyllum hexandrum*⁽¹⁴⁾ 等，八角蓮 (*P. pleianthum* Hance) 則尚未有相關之報導。雖然曾有八角蓮組織培養之研究⁽¹⁾，但卻缺乏對其鬼臼素含量之探討。本研究之目的，是利用八角蓮無菌植株進行癒傷組織之誘導及鬼臼素檢測之研究，希望能夠建立供鬼臼素生合成與生產研究用八角蓮懸浮細胞系統。

材 料 與 方 法

一、無菌植株之再生與培養

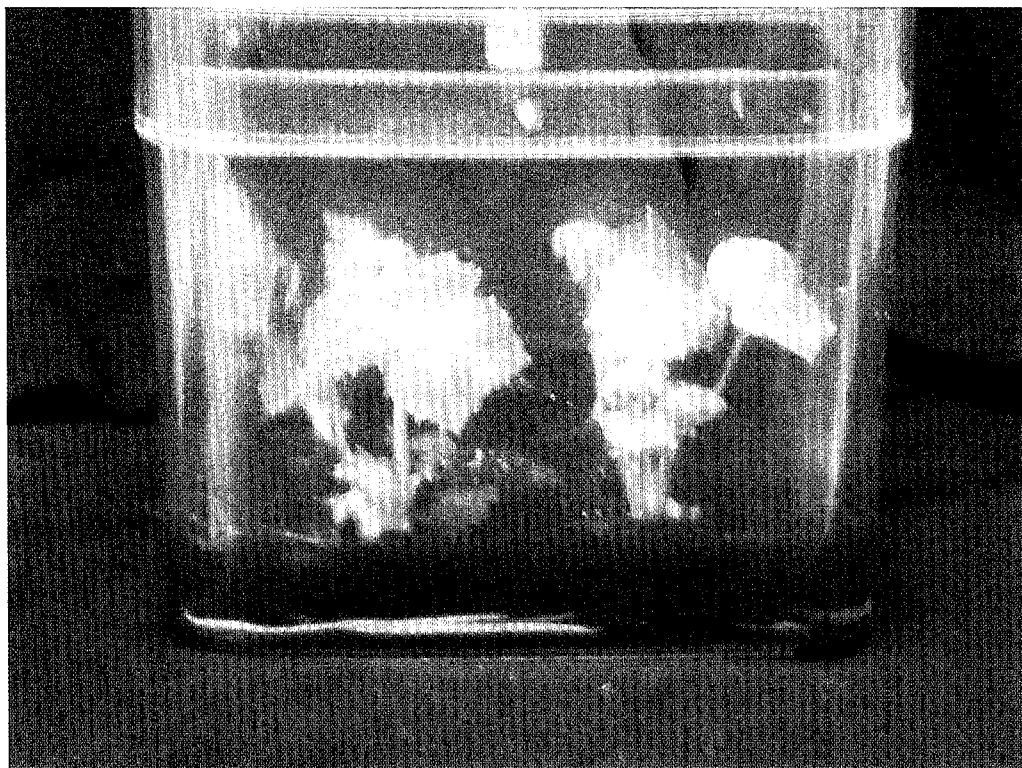
八角蓮野生植株於 2000 年夏天在花蓮山



圖一 鬼臼素 (A) 與其衍生物 etoposide (B)、teniposide (C) 之結構式

Fig. 1. Structure of podophyllotoxin (A), etoposide (B) and teniposide (C).

區採得，並種植於盆栽中。依 Chuang 和 Chang 之方法^(15,16)，取八角蓮未成熟果實內之種子，經表面消毒後，培養於 B5 培養基⁽¹⁷⁾，並添加 2,4-D (1 mg/L) 與 kinetin (0.1 mg/L) 以產生癒傷組織，並再生體胚。再將體胚培養於不含生長素(auxin)而含有 1 mg/L BA (benzyladenine) 的培養基中以促進體胚之生長與發芽。形成無菌植株後，每三個月進行分切與繼代培養，以作為後續試驗之材料(圖二)。繼代培養基是以 B5



圖二 八角蓮無菌植株
Fig. 2. Plantlet of *P. pleianthum* Hance.

培養基為基礎，並含有 3%蔗糖、0.1%活性碳及 0.7%瓊脂(agar)。培養條件為 25℃，每日照光 16 小時，光強度為 1610 Lux。

二、癒傷組織之誘導

將無菌植株切出葉、葉柄、莖部(含莖頂)和根部四部分，並分切成約 0.3 cm × 0.3 cm 大小之培植體後，分別置於固態培養基上進行癒傷組織之誘導。固態培養基之成分則依基礎成分(B5或是MS)搭配不同種類與濃度之植物生長調節劑(同時使用 2,4-D 與 kinetin、單獨使用 2,4-D，以及同時使用 NAA 與 kinetin)加以配製。癒傷組織誘導溫度為 25℃，並依光照不同分為弱光與黑暗兩種，弱光之強度為 300 Lux，光照時間為 16 小時。於誘導期間定時觀察癒傷組織之誘導情形，40 天後並計算其誘導率。誘導所得之癒傷組織，每 30 天更新培養於與誘導相同之培養基以進行繼代培養。

三、鬼臼素之萃取與分析

對於無菌植株不同部位之鬼臼素含量測定，為從無菌植株分別切出葉、葉柄與根部三

部位，經液態氮磨碎後進行冷凍乾燥處理。樣品之分析方法如下：秤取 40 mg 乾燥樣品並加入 3.0 mL 80%甲醇水溶液，於超音波處理器中振盪 30 分鐘進行萃取，再經 10,000 × g 離心 10 分鐘後以 0.45 μm 濾膜過濾，以 HPLC 分析，並與鬼臼素標準品相比對。HPLC 分析條件如下：移動相成分與組成比例為氰甲烷：水 = 2：3，流速為 1.0 mL/min，分析管柱為 Hypersil HS C-18 之不鏽鋼管柱(250 × 4.6 mm)，偵測器為 photodiode array (Shimadzu, SPD-M10A, Tokyo, Japan)。

關於癒傷組織中鬼臼素之測定，分別將誘導自八角蓮不同部位所得之癒傷組織經液態氮磨碎與冷凍乾燥處理後，稱取 100 mg 之乾燥樣品經前述相同之處理方法於 HPLC 系統與鬼臼素標準品進行分析與比對。

結果與討論

一、癒傷組織之誘導

影響癒傷組織誘導的主要因子包括：培植體來源之部位、誘導基礎培養基的種類、植物生長調節劑的種類與濃度，及照光與否等。目

前，被報導具有鬼臼素生合成能力的植物癒傷組織之誘導材料包括北美 *Podophyllum peltatum* 的根莖(rhizome)⁽¹⁸⁾、印度 *P. hexandrum* 的根部⁽¹⁹⁾、*Juniperus chinensis* 的葉片⁽²⁰⁾等。誘導培養用基礎培養基主要組成爲 MS 或 B5，常用植物生長調節劑則爲 naththalene acetic acid (NAA) 或 2,4-dichlorophen oxyacetic acid (2,4-D)⁽³⁾。本研究因此針對前述因子對八角蓮癒傷組織之誘導影響進行探討，過程中使用無菌植株爲材料進行癒傷組織之誘導，如此可以不必經過殺菌處理，對提升誘導率有直接之幫助。

首先對培植體來源之部位與癒傷組織誘導能力進行瞭解。將八角蓮無菌植株所分切出之葉、葉柄、莖部(含莖頂)和根部四部分之組織片段，分別培養於含有 1 mg/L 2,4-D 與 0.1 mg/L kinetin 之 B5 固態培養基。培養條件爲 25 ℃ 每日光照(300 Lux) 16 小時，以觀察不同來源之培植體在相同培養基上癒傷組織的誘導情形。經過 40 天的誘導培養，誘導結果如表一所示。其中以從莖部(含莖頂)組織來源的八個培植體表現最佳均能保持綠色，並都能夠生成較多量且爲淡黃色之癒傷組織。而分別由葉與葉柄組織作爲培植體者，雖發生膨大現象，卻無法生成癒傷組織。而根部來源者，雖經四個月以上之誘導與繼代培養，僅有部分培植體長出不定根，仍未見癒傷組織之生成。從莖部(含莖頂)來的培植體所以具有較佳誘導率之原因，推測可能與莖頂爲細胞分裂旺盛之組織，所以較易生成癒傷組織有關⁽²¹⁾。

MS 與 B5 均屬植物組織培養常用的基礎培養基，二者較大之差異在於所含巨量元素中氮源的種類與比例以及維生素 thiamine 之濃度。MS 培養基中無機鹽類濃度爲 93.41 mM，是各種培

養基中含量最高者，其 $[\text{NH}_4^+] : [\text{NO}_3^-] = 1 : 1.91$ ，而 B5 培養基之無機鹽類含量則較 MS 低，且其氮源比例 $[\text{NH}_4^+] : [\text{NO}_3^-] = 1 : 14.63$ 。B5 培養基之 thiamine 濃度爲 10 mg/L，爲 MS 培養基含量之 100 倍。本研究接著以莖部(含莖頂)爲培植體材料，探討 B5 與 MS 兩種基礎培養基對癒傷組織誘導之影響。所添加植物生長調節劑爲 1 mg/L 2,4-D，或是同時含有 1 mg/L 2,4-D 與 0.1 mg/L kinetin 者，培養條件爲 25 ℃、每天光照(300 Lux) 16 小時。經過 40 天之誘導培養，由表二可知，無論是否含有 kinetin，B5 培養基的誘導效果都較 MS 佳，而添加 0.1 mg/L kinetin 具明顯提升誘導癒傷組織之效果。結果亦顯示，B5 基礎培養基中較低之無機鹽類含量與較高之 thiamine 濃度，對分裂旺盛之莖部組織生成癒傷組織有促進之作用。而單獨使用 1 mg/L 2,4-D 只可觀察到培植體的膨大現象，若共同使用 1 mg/L 2,4-D 與 0.1 mg/L kinetin 則可有效生成癒傷組織。

植物荷爾蒙在植物的生長、發育扮演重要的角色，其種類、濃度及不同植物荷爾蒙間搭配使用之比率，都會對植物生理造成影響。由於前述結果顯示添加 0.1 mg/L kinetin 可明顯提升八角蓮癒傷組織之誘導率，本研究接著進行植物生長調節劑對八角蓮癒傷組織誘導影響之探討。以莖部(含莖頂)爲培植體材料，B5 基礎培養基爲主成分，培養條件爲 25 ℃，光線爲弱光(300 Lux)光照 16 小時，或是黑暗誘導。首先使用之培養基爲添加 1 mg/L 2,4-D，並搭配不同濃度之 kinetin (0.1、0.2 或 0.5 mg/L)。經 40 天培養結果顯示(表三)，於黑暗誘導處理下，以搭配 0.1 mg/L kinetin 者具最佳誘導效果，誘導率爲 81.8%，而搭配的 kinetin 增加

表一 八角蓮不同部位對癒傷組織誘導之影響

Table 1. Callus induction of different part of *P. pleianthum* Hance

Materials	Growth ¹	% (conformed number /inoculated number)	
Leaf	+/- ²	95	(42/45)
	-	5	(2/45)
Leaf stalk	+/-	100	(8/8)
Shoot tip	++	100	(8/8)
Root	-	100	(21/21)

1 Growth medium: B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L kinetin.

2 - : Explant browning.

+/- : Explants remain green, some reveal sign of cell proliferation.

++ : Explants show callus formation.

+++ : Explants remain green with mass callus formation.

表二 基礎培養基對癒傷組織誘導之影響
Table 2. Effects of basal medium on callus induction

		% (conformed number /inoculated number)			
Growth		BD1K0.1 ¹	MD1K0.1 ²	BD1 ³	MD1 ⁴
Shoot tip	— ⁵	0	21 (3/15)	0	53.3 (16/30)
	+/-	0	66 (10/15)	100 (13/13)	46.7 (14/30)
	+	0	13 (2/15)	0	0
	++	100 (8/8)	0	0	0

- 1 B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L kinetin.
2 MS basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L kinetin.
3 B5 basal medium and 1 mg/L 2,4-D.
4 MS basal medium and 1 mg/L 2,4-D.
5 — : Explant browning.
+/- : Explants remain green, some reveal sign of cell proliferation.
+ : Explants show callus formation.
++ : Explants remain green with mass callus formation.

表三 Kinetin 及光度對莖部癒傷組織誘導之影響
Table 3. Effects of kinetin and light intensity on callus induction

		% (conformed number /inoculated number)		
Growth		BD1K0.1 ¹	BD1K0.2 ²	BD1K0.5 ³
Low light intensity	— ⁴	6.1 (2/33)	0	57.1 (24/42)
	+/-	57.6 (19/33)	54.5 (18/33)	14.3 (6/42)
	+	12.1 (4/33)	45.5 (15/33)	28.6 (12/42)
	++	24.2 (8/33)	0	0
Dark	—	0	21.4 (3/14)	28.6 (4/14)
	+/-	18.2 (4/22)	28.6 (4/14)	35.7 (5/14)
	+	81.8 (18/22)	50.0 (7/14)	35.7 (5/14)
	++	0	0	0

- 1 B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L kinetin.
2 B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.2 mg/L kinetin.
3 B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.5 mg/L kinetin.
4 — : Explant browning.
+/- : Explants remain green, some reveal sign of cell proliferation.
+ : Explants show callus formation.
++ : Explants remain green with mass callus formation.

為 0.2 與 0.5 mg/L 時，誘導率分別降低為 50.0 與 35.7%。而弱光處理者，則以搭配有 0.2 mg/L kinetin 培養基者為最佳，其誘導率為 45.5%，而當 kinetin 濃度提升至 0.5 mg/L，誘導率則降至 28.6%。綜合上述結果，癒傷組織誘導效率顯然以黑暗環境較弱光佳。以 NAA 取代 2,4-D 對癒傷組織誘導效率之影響，由表四得知，在黑暗處理下添加 1 mg/L 2,4-D 與 0.1 mg/L kinetin 對癒傷組織之誘導率為 36.3%（為“++”與

“+”二者之和），以 10 mg/L NAA 取代 2,4-D 則可達 90.9%，但當 NAA 使用量達 15 mg/L 則反降至 27.3%。而在 16 小時弱光處理下，10、15 mg/L NAA 之誘導率分別為 56.0 與 50.0%，二者相差不大，但仍較 2,4-D 高。上述結果顯示，莖部培植體於黑暗處理下誘導癒傷組織，對 NAA 濃度之感受性與弱光環境有所不同。
在根部癒傷組織誘導率之試驗顯示，根部培植體不適於培養在同時含有 1 mg/L 2,4-D 與

表四 Auxin 及光度對莖部癒傷組織誘導之影響
Table 4. Effects of auxin and light intensity on callus induction

		% (conformed number /inoculated number)		
		BD1K0.1 ¹	BN10K0.1 ²	BN15K0.1 ³
Low light intensity	— ⁴	6.1 (2/33)	9.1 (2/22)	27.3 (6/22)
	+/-	57.6 (19/33)	40.9 (9/22)	22.7 (5/22)
	+	12.1 (4/33)	33.3 (6/22)	50.0 (11/22)
	++	24.2 (8/33)	22.7 (5/22)	0
Dark	—	0	0	0
	+/-	18.2 (4/22)	9.1 (2/22)	72.7 (16/22)
	+	81.8 (18/22)	72.7 (16/22)	9.1 (2/22)
	++	0	18.2 (4/22)	18.2 (4/22)

1 B5 basal medium, 1 mg/L 2,4-D, and 0.1 mg/L kinetin.

2 B5 basal medium, 10 mg/L NAA, and 0.2 mg/L kinetin.

3 B5 basal medium, 15 mg/L NAA, and 0.5 mg/L kinetin.

4 — : Explant browning.

+/- : Explants remain green, some reveal sign of cell proliferation.

+: Explants show callus formation.

++ : Explants remain green with mass callus formation.

表五 根部癒傷組織之誘導
Table 5. Callus induction from root

		BD2A ¹	BD3A ²
		Growth % (conformed number /inoculated number)	Growth % (conformed number /inoculated number)
Low light intensity	— ³	53.8 (7/12)	— 45.1 (28/62)
	+/-	38.5 (5/12)	+/- 45.1 (28/62)
	+	0	+ 9.8 (6/62)
	++	0	++ 0
Dark	—	44.8 (56/125)	— 37.5 (6/16)
	+/-	38.4 (48/125)	— 31.3 (5/16)
	+	12.0 (15/125)	+/- 31.3 (5/16)
	++	4.8 (6/125)	+ 0

1 B5 basal medium, 2 mg/L 2,4-D, and 1 g activated carbon.

2 B5 basal medium, 3 mg/L 2,4-D, and 1 g activated carbon.

3 — : Explant browning.

+/- : Explants remain green, some reveal sign of cell proliferation.

+: Explants show callus formation.

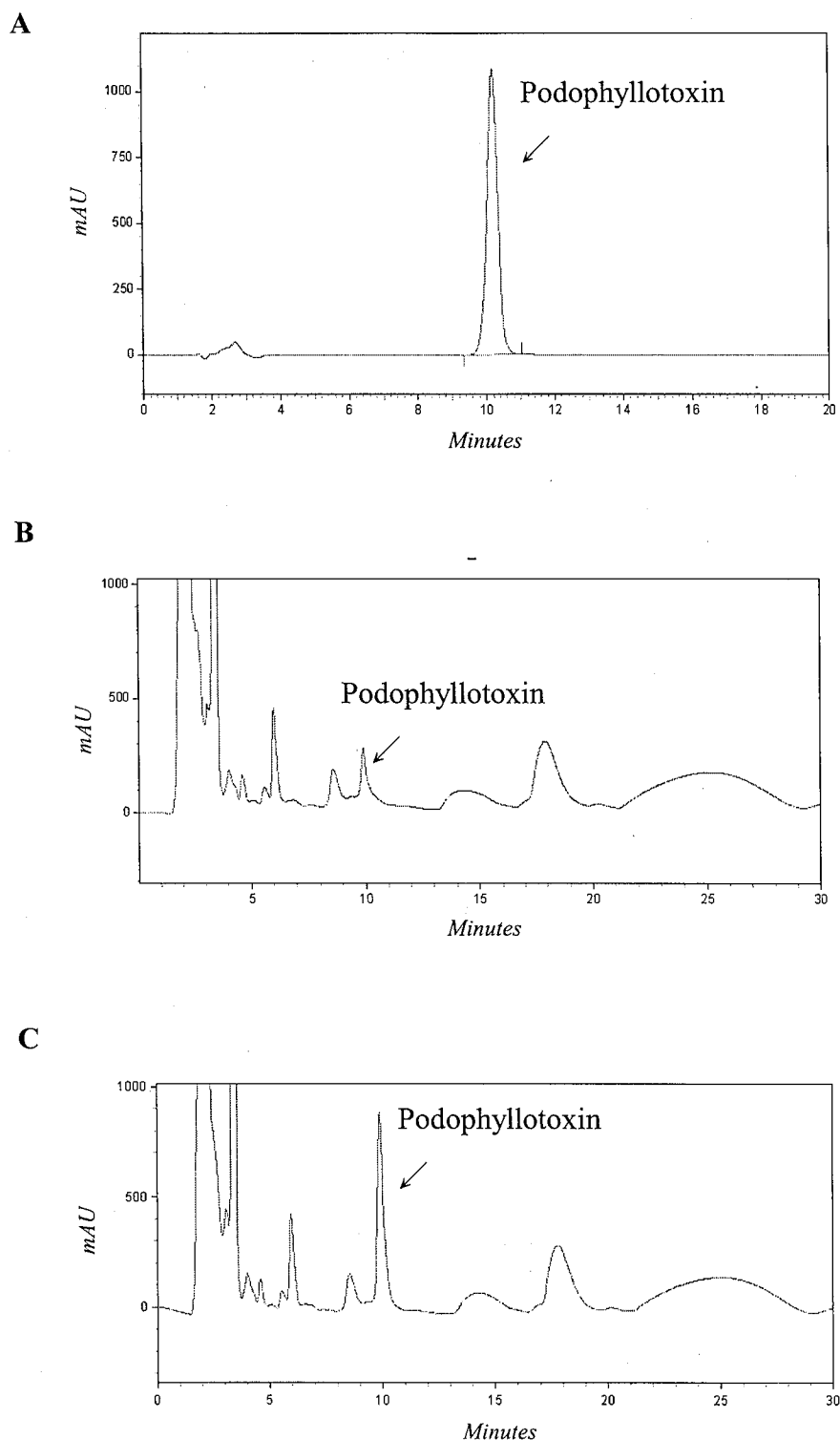
++ : Explants remain green with mass callus formation.

0.1 mg/L kinetin 之培養基中(表一), 因此, 另將其培養於含有 2 或 3 mg/L 2,4-D, 及 1 g/L 活性碳之 B5 培養基中, 以進行癒傷組織之誘導。結果顯示(表五), 經過 40 天之黑暗誘導, 2 與 3 mg/L 2,4-D 之培養基都可觀察到癒傷組織之出現, 誘導率分別為 16.8 與 31.3%, 而 16 小時弱光之誘導率則更低。僅有 3 mg/L 者有 9.8% 外, 2 mg/L 者並未有癒傷組織生成。與莖部(含

莖頂)組織比較, 根部組織之癒傷組織誘導率明顯偏低。綜合試驗結果, 無論以莖部或是根部為培植體, 在所嘗試的培養基與誘導條件下中, 黑暗誘導結果皆優於弱光誘導。

二、癒合組織之鬼臼素萃取與鑑定

文獻記載從植株萃取鬼臼素的溶劑包括



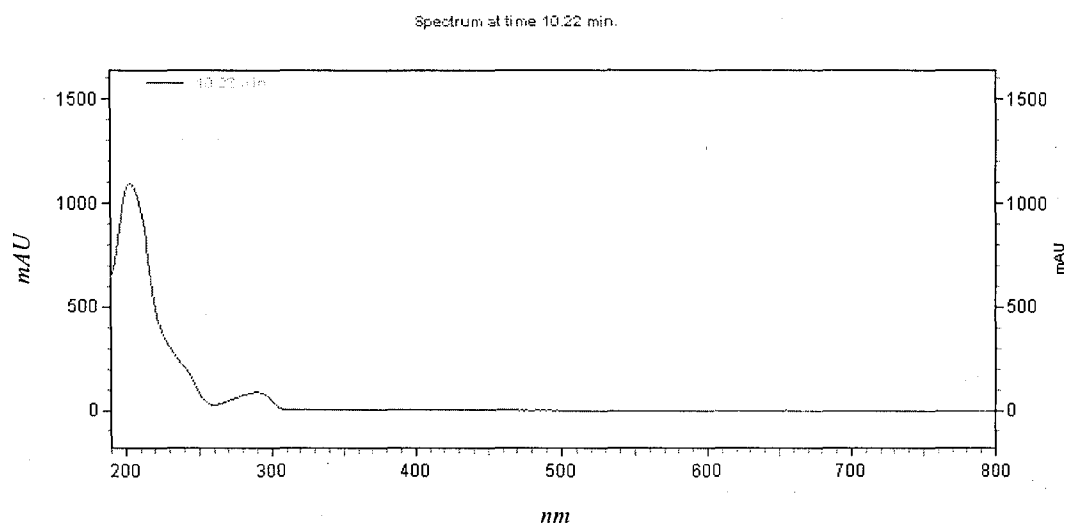
圖三 鬼臼素標準品 (A)、根部癒傷組織甲醇抽出液 (B) 及二者混合 (C) 之 HPLC 分析圖 (205 nm)
 Fig. 3. HPLC chromatogram (at 205 nm absorption) of authentic podophyllotoxin (A), extract of root-induced callus (B), and the mixture of both (C).

甲醇、乙醇、丙酮、氯仿、石油醚、乙醚與二氯二烷，並使用超音波振盪器或 Soxhlet 抽出器進行抽出處理^(22, 23)。從迪化街不同商家分別購入市售八角蓮藥材(皆屬根莖部)，作為鬼臼

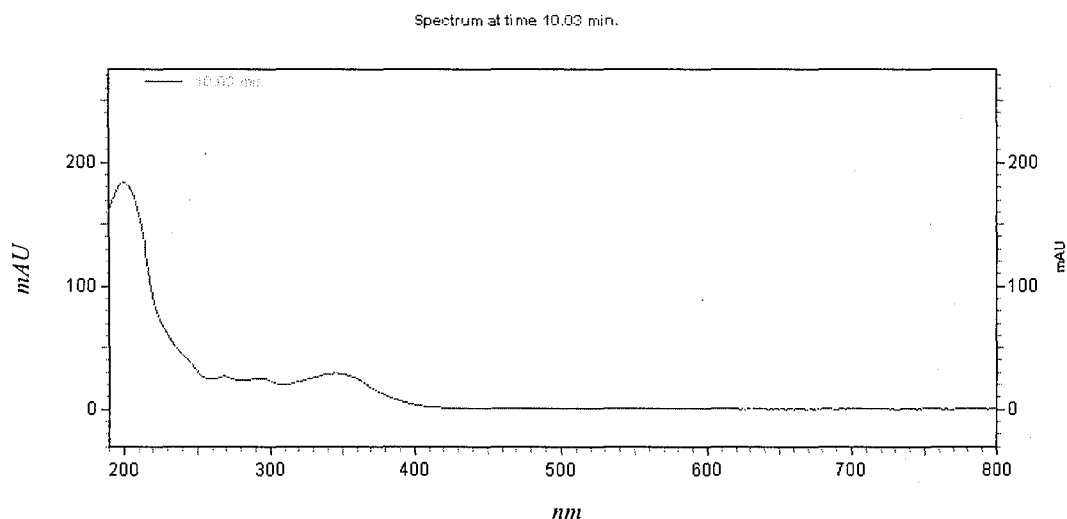
素萃取、分析之材料。在預備試驗中發現，以 80% 甲醇水溶液作為萃取溶劑並配合超音波振盪 30 分鐘，具最高之鬼臼素萃取效果。

研究顯示，鬼臼素 HPLC 定量分析，多使用

A



B



圖四 鬼臼素標準品 (A)，與根部癒傷組織代謝物 (B) 之紫外光吸收光譜

Fig. 4. Ultraviolet absorption spectrum of authentic podophyllotoxin (A) and the metabolite in root-induced callus (B).

逆向層析 C-18 管柱，而移動相之溶劑組成則有所不同，包括固定⁽²⁴⁾及梯度溶劑系統⁽²⁵⁾。本研究將 Heyenga 等人⁽²⁴⁾所使用之移動相組成進一步修改為氰甲烷：水 = 2：3 (v/v)，如此可以快速且有效分析鬼臼素成分。結果顯示，前述所購入得市售八角蓮藥材之鬼臼素含量為 0.81-2.47% (乾重)。而分切培養的無菌植株，其葉、葉柄與根部之鬼臼素含量分別為 0.01-0.65、0.05-0.55 與 0.26-1.04% 皆含有鬼臼素，其中以根部含量較高。根據 Camilo 等人⁽²⁶⁾報導指出，*P. peltatum* 之野生植株，其葉部鬼臼素含量約為 1.1%。

此外，將具有快速增殖能力之八角蓮癒傷

組織進行冷凍乾燥處理與鬼臼素萃取與比對分析。分析樣品之材料包括誘導自莖部(含莖頂)，分別培養於 1 mg/L 2,4-D 加 0.1 mg/L kinetin 與 10 mg/L NAA 加 0.1 mg/L kinetin 之培養基，及誘導自根部並培養於 2 mg/L 2,4-D/黑暗下培養基之癒傷組織。圖三之 HPLC 結果顯示，由根部誘導生成且培養於含有 2 mg/L 2,4-D B5 培養基之癒傷組織甲醇萃取液，含有與鬼臼素標準品相同停滯時間(10.1 分鐘)之成分。進一步將鬼臼素標準品與萃取液混合後進行 HPLC 分析，確認二者波峰合而為一。經與標準品鬼臼素的 UV 吸收光譜進行比對，二者相當一致，最大吸

收波峰為 205 nm (圖四)。根部癒傷組織之鬼臼素含量為 0.04-0.08%。而誘導自莖部(含莖頂)之癒傷組織，在測定的範圍內，則無法偵測出鬼臼素之存在。

本研究結果顯示，八角蓮不同部位組織對不同誘導環境具不同感受能力，對癒傷組織誘導能力也有所不同，而且所產生之癒傷組織對鬼臼素之生合成能力也不同。具鬼臼素生產能力之印度 *P. hexandrum* 懸浮細胞，也是誘導自根部組織⁽¹⁹⁾。

謝

誌

本研究承行政院農委會經費補助 [91 農科-3.1.1-糧-Z3(6)] 始得完成，謹此誌謝。

參 考 文 獻

- (1) 莊孟晉：八角蓮與鹿角蕨的組織培養。國立台灣大學園藝研究所碩士論文，台北，台灣 (1986)。
- (2) 邱年永：藥用植物栽培法。大學圖書公司，台北，台灣 (1973)。
- (3) S. Shibata, T. Murata and M. Fujita: On the constituents of rhizome and roots of *Podophyllum pleianthum* Hance. *Yakugaku Zasshi*, **82**: 777-779 (1962).
- (4) F. C. Chang, C. Chiang and V. N. Aiyar: Isopropodophyllone from *Podophyllum pleianthum*. *Phytochemistry*, **14**: 1440 (1975).
- (5) M. Petersen and A. W. Alfermann: The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**: 135-142 (2001).
- (6) Z. Q. Xia, M. A. Costa, J. Proctor, B. D. Laurence and G. L. Norman: Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry*, **55**: 537-549 (2000).
- (7) R. M. Moraes-Cerderia, J. C. L. Burandt, J. K. Bastos, N. P. D. Nanayakkara and J. D. McChesney: In vitro propagation of *Podophyllum peltatum*. *Planta Med.*, **64**: 42-45 (1998).
- (8) E. Bedir, I. Khan and R. M. Moraes: Bioprospecting for podophyllotoxin. In: *Trends in New Crops and New Uses* (J. Janick and A. Whipkey eds), pp. 545-549. ASHS Press, Alexandria, VA, USA (2002).
- (9) L. B. Davin, H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen and N. G. Lewis: Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, **275**: 362-366 (1997).
- (10) C. Camilo, R. M. Moraes, F. E. Dayan and D. Ferreira: Molecules of interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry*, **54**: 115-120 (2000).
- (11) W. Van Uden, N. Pras and T. M. Malingre: The accumulation of podophyllotoxin- β -D-glucoside by cell suspension cultures derived from the conifer *Callitris drummondii*. *Plant Cell Rep.*, **9**: 257-260 (1990).
- (12) U. Empt, A. W. Alfermann, N. Pras and M. Petersen: The use of plant cell cultures for the production of podophyllotoxin and related lignans. *J. Appl. Bot.*, **74**: 145-150 (2000).
- (13) B. Konuklugil, T. J. Schmidt and A. W. Alfermann: Accumulation of aryltetralin lactone lignans in cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Planta Med.*, **65**: 587-588 (1999).
- (14) W. Van Uden, N. Pras, E. M. Vossebeld, J. N. M. Mol and T. M. Malingre: Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* Royle. *Plant Cell Rep.*, **8**: 165-168 (1989).
- (15) M. J. Chuang and W. C. Chang: Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus culture derived from immature seeds and mature zygotic embryos of *Dysosma pleiantha* (Hance) Woodson. *Plant Cell Rep.*, **6**: 484-485 (1987).
- (16) M. J. Chuang and W. C. Chang: Embryoid formation and plant regeneration in callus culture derived from vegetative tissue of *Dysosma pleiantha* (Hance) Woodson. *J. Plant Physiol.*, **128**: 279-183 (1987).
- (17) O. L. Gamborg, R. A. Miller and K. Ojima: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, **50**: 151-158 (1968).
- (18) P. G. Kadkade: Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*. *Plant Sci. Lett.*, **25**: 107-115 (1982).
- (19) S. Chattopadhyay, R. S. Mehra, A. K. Srivastava, S. S. Bhojwani and V. S. Bisaria: Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**: 541-546 (2003).
- (20) T. Muranaka, M. Miyata, K. Ito and S. Tachibana: Production of podophyllotoxin in *Juniperus chinensis* callus cultures treated with oligosaccharides and a biogenetic precursor. *Phytochemistry*, **49**: 491-496.
- (21) N. Hiraoka, T. Kodama and Y. Tomita: In vitro propagation of *Bupleurum falcatum*. *Jpn. J. Pharm.*, **37**: 62-67 (1983).
- (22) 俞培忠、姚莉勻、王麗平：HPLC 法分離和測定山荷葉中的鬼臼素。藥物分析雜誌，**19**: 35-37 (1999)。
- (23) 周金娥、王麗平、余自成、郁人海、徐春祥：高效液相色譜法分析廣西八角蓮中的鬼臼素。哈爾濱醫科大學學報，**30**: 355-357 (1996)。
- (24) A. G. Heyenga, J. A. Lucas and P. M. Dewick: Production of tumour-inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Plant Cell Rep.*, **9**: 382-385 (1990).
- (25) Y. H. Chio, J. Y. Kim, J. H. Ryu, K. P. Yoo, Y. S. Chang and J. Kim: Supercritical carbon dioxide extraction of podophyllotoxin from *Dysosma pleiantha* roots. *Plant Med.*, **64**: 482-483 (1998).
- (26) C. Camilo, E. D. Franck, G. Markus, A. K. Ikhlas, R. Agnes, L. B. J. Charles and M. M. Rita: High yield of podophyllotoxin from leaves of *Podophyllum peltatum* by in situ conversion of podophyllotoxin 4-O- β -D-glucopyranoside. *Planta Med.*, **67**: 97-99 (2001).