

第三節 討論

一、馬兜鈴癒合組織之誘導

植物組織培養，最常用的基本培養基為 MS (Murashige & Skoog, 1962) 基本鹽類⁽¹⁰²⁾。Gibberellins (GA) 具有促進植物生長、種子發芽及打破種子休眠的作用。Agnihotri Abha & Jafannathan (1990) 報導 GA₃ 可提高 *Brassica nigra* 的癒合組織產生擬胚化能力。Ghosh & Sen (1991) 指出 GA₃ 可使 *Asparagus cooperi* 的體胚成熟⁽¹²⁷⁾。本試驗將馬兜鈴種子分別接種於 MS 基本培養基與含有 1mg/l GA₃ 之 MS 培養基中，經一星期後，皆長出植物體，且在含有 1mg/l GA₃ 長出的植物體較佳。

植物生長調節劑是誘導癒合組織形成的重要因素之一。Gu (1982) 將當歸 (*Angelica sinensis* Diels.) 的葉柄，接種於含有 2,4-D 的培養基上，成功地誘導出癒合組織⁽¹⁶⁷⁾。Shoyama et al. (1987) 指出 1mg/l 2,4-D 可誘導竹節人參 (*Panax japonicas*) 形成癒合組織⁽¹⁶⁸⁾。Skoog and Miller (1957) 提出 auxin / cytokinin 比例增高時，有利於根與癒合組織之形成⁽¹²⁶⁾。Zhang et al. (1986) 在當歸癒合組織的誘導中指出，cytokinin 與 auxin 配合使用，效果比單用 auxin 的結果更好。孟與賈 (1995) 指出 0.5 mg/l BA 與 2 mg/l 2,4-D 配合使用，可使秦九子葉及下胚軸的癒合組織誘導率達 100%⁽¹⁶⁹⁾。戴 (1996) 亦指出將黃蘗葉柄培養於含 2 mg/l 2,4-D 與 1 mg/l BA 的培養基中，其癒合組織之誘導率達 92.5%⁽¹⁶⁰⁾。本試驗分別切取根、莖與葉，在含 2 mg/l NAA 及 0.5 mg/l BA 培養基中培養，可得透明淡黃色的癒合組織，而葉的部分呈現褐化現象。

二、馬兜鈴癒合組織之生長與繼代繁殖

一般人認為癒合組織生長在暗處較有利，但亦有人認為光處理與暗處理差異不大。Nigra et al. (1989) 指出暗處理對於 *Solanum eleagnifalim* 的癒合組織生長良好，但光照對 solasodine 的生成較有利。而 Yazaki and Okada (1989) 在 *Cornus officinalis* 的細胞培養中報導，光照雖有助於細胞生長，但對於 tannin 的生成有抑制作用⁽¹⁷⁰⁾。Mantell et al. (1978) 指出 *Dioscorea alata* 及 *D. rotundata* 小苗之形成率，在 16 小時光照下是 12 小時之 4 倍，但在癒合組織形成方面則 12 小時較 16 小時光照佳⁽¹⁵⁶⁾。林 (1998) 指出光

照與黑暗對延胡索癒合組織生長並無差異⁽⁷⁵⁾。本試驗亦顯示光照與黑暗兩種培養環境對馬兜鈴癒合組織生長並無差異，但光照之癒合組織部分呈現淡綠色。

培養基的好壞直接影響到細胞培養的效果，一般常用的基本培養基為 MS (Murashige & Skoog, 1962)，其無機鹽類離子濃度較高，為較穩定的離子平衡溶液。黃 (1997) 報導海芙蓉不定芽的誘導，以二倍量之 MS 鹽類為基本培養基最好，誘導率可達 87.5%⁽¹⁷¹⁾。劉 (1998) 指出 1/2 MS 對大葉桑寄生癒合組織生長最有利⁽¹⁷²⁾。本研究將馬兜鈴癒合組織培養於不同 MS 鹽類濃度培養基中，發現過高或過低鹽類濃度對癒合組織生長皆造成抑制，故最適合馬兜鈴癒合組織生長之鹽類濃度為全量 MS。

Yeh *et al.* (1984) 報導糖是培養基中含量最多之有機物質，主要功能為提供植物生長所需碳源及調節滲透壓。醣類濃度太低可能造成碳源不夠而無法生長；濃度太高則可能導致滲透壓太大而致植株無法生長。Minocha and Halperin (1974) 指出朝鮮薊的癒合組織生長以蔗糖為碳源最好⁽¹⁷³⁾。陳 (1996) 亦指出蔗糖對雙鋸齒葉玄參 (*Scrophularia yoshimurae*) 的癒合組織生長較有利，但葡萄糖對 *S. yoshimurae* 之主要成分 harpagoside 的生合成較好⁽¹⁷⁴⁾。本試驗結果顯示，以 3% 的蔗糖對馬兜鈴癒合組織生長最佳。

水解酪蛋白 (casein hydrolysate, CH) 和椰子汁 (coconut milk, CM) 是最常加入癒合組織生長培養基中的二種有機添加物，CH 主要成份為 18 種氨基酸。CM 為椰子種子之胚乳內腔液汁，含有類似 cytokinin 物質，養分豐富且複雜。兩者皆可促進靜止細胞之有絲分裂。Hossain *et al.* (1993) 指出 100 mg/l CH 可促進木瓜 (*Carica papaya*) 癒合組織之生長⁽¹⁰⁸⁾。劉及張 (1995) 亦指出 500 mg/l CH 對於西洋參的癒合組織有促進生長的作用⁽¹⁷⁵⁾。Kerbaui and Handro (1981) 報導 15% CM 可使 *Cattleya epidendrum* 之未成熟胚發育成芽球⁽¹³⁵⁾。劉 (1998) 亦指出添加 20% CM 可促進大葉桑寄生癒合組織之生長⁽¹⁷²⁾。本試驗顯示添加 750mg/l 以上的 CH 對於馬兜鈴癒合組織之生長有抑制作用；而 10% CM 對於馬兜鈴癒合組織則有防止褐化的作用。

三、馬兜鈴癒合組織藥用成分之含量

Yazaki and Okada (1989) 在 *Cornus officinalis* 的細胞培養中報導，光照雖有助於細胞生長，但對於 tannin 的生成有抑制作用⁽¹⁷⁰⁾。但本試驗顯示光照處理含有 aristolochic acid É，而暗處理則含有 aristolochic acid 。

一般常用於植物組織培養的培養基為 MS 基本鹽類培養基，而 MS 培養基的濃度不同，不僅對植物生長有一定的影響，對於次級代謝物的產生也有影響。王 (1995) 報導三島柴胡培養於不同濃度 MS 培養基，柴胡皂甘 A 含量以 4 MS 組最高，柴胡皂甘 C 含量以 1/4 MS 組最高，柴胡皂甘 D 含量則以 2 MS 組最高⁽⁴⁰⁾。本試驗結果顯示，aristolochic acid É 以 1/4 MS 為基本培養基所誘導的馬兜鈴癒合組織產量最高。

Auxin 類與 Cytokinin 類植物生長調節劑，不但在癒合組織的培養上扮演著重要的角色，且對二次代謝物的產生具有一定程度的影響。Misawa (1985) 指出高濃度的 2,4-D 有利於 *Dioscorea deltoidea* 細胞生成 diosgenin⁽¹⁷⁶⁾。Ikuta *et al.* (1982) 報導添加 BA 對 *Thalictrum minus* 生合成 berberine 的效果較添加 Kinetin 為佳。張 (1991) 指出台灣白芷在不同濃度的 2,4-D 及 NAA 培養，以不添加任何 auxin 培養基之 imperatorin 含量最高⁽¹⁴³⁾。方和侯 (1992) 報導 IAA 可顯著促進紫草之紫草素的合成，但以 2,4-D 代替 IAA 時，則無紫草素之形成⁽¹⁷⁷⁾。本試驗顯示馬兜鈴癒合組織，在含 2 mg/l NAA 之 MS 培養基分別添加 1 mg/l BA、1 mg/l kinetin 與 1 mg/l zeatin 含有 aristolochic acid É，但卻無 aristolochic acid 的產生。

綜合上述試驗結果，可發現 aristolochic acid É 與 的含量並不多，且均不是在癒合組織最適合培養的環境下產生。Mantell & Smith (1983) 指出，有利於植物細胞迅速生長的培養基，通常不利於誘導二次代謝物的形成，而限制快速的細胞分裂，導致指數生長較早停止，保持持久的減速和靜止期的培養條件，反而常導致培養細胞中的二次代謝物生合成和累積。張 (1991) 指出改變培養基中氮源比例，以 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 2 : 1$ 來培養白芷癒合組織，可提高 imperatorin 產量二倍多，但細胞生長卻最差。羅與劉 (1994) 指出在培養基中加入 25ppm 的醋酸鈉，可顯著提高絞股藍癒合組織的生長速率，但對皂甘含量和產率增加不明顯⁽¹⁷⁸⁾。影響二次代謝物生合成的原因很多，是否因培養時間、培養基種類或添加前趨物等因素所影響，則有待進一步之研究。

四、馬兜鈴細胞懸浮培養

在細胞懸浮培養中，選擇生長快速及有效成分高之癒合組織是取得成功的先決條件。一般認為 auxin 具有維持懸浮細胞均勻分散與分裂增殖的重要角色。Zenk *et al.*(1975)指出 *Morinda citrifolia* 的細胞懸浮培養，2,4-D 會強烈抑制 anthraquinone 的生合成。Sharp *et al.* (1980) 報導高濃度 auxin 類植物生長調節劑，不但可抑制體胚形成，且可促進細胞均勻分散及快速生長⁽¹⁷⁹⁾。Hatanaka *et al.* (1991) 報導 *Coffea canephora* 的葉片必須培養於含 2,4-D 之培養基以抑制體胚形成⁽¹⁸⁰⁾。本試驗利用 PCV 法測定懸浮細胞在培養期間體積生長之變化。結果顯示與上述學者之研究類似，以添加 0.5mg/l 2,4-D 液體培養基之懸浮細胞增殖最快且細胞形狀均勻，而添加 IBA 或 NAA 之懸浮細胞顆粒較大且細胞形狀不均勻。本研究將馬兜鈴細胞懸浮培養五週後，以 HPLC 測定 aristolochic acid 與 之含量，發現 1 mg/l NAA 之處理含 aristolochic acid (1.14 μ g/g dry wt)，如圖 36 所示。其他處理則均不含 aristolochic acid 與 。

培養初體積會影響馬兜鈴細胞懸浮培養之生長。Yamamoto and Yamada (1986) 報導 *Rauwolfia serpentina* 之細胞懸浮培養，不同細胞接種量對於生長曲線及 reserpine 的生成有關。較少的接種量比大之接種量其生長比率較好，但 reserpine 的含量卻以接種量大者為多⁽⁴¹⁾。並認為高密度之細胞培養，易因培養基養分的快速耗盡與細胞間的相互作用所傷害⁽⁷²⁾。而 Ammirato (1983) 指出低密度之懸浮細胞，較有利於體胚生長及成熟，不利於細胞增殖⁽¹⁸¹⁾。林 (1998) 指出初體積 1ml 延胡索懸浮細胞生長情形最佳⁽⁷⁵⁾。本試驗結果顯示，初體積為 0.5ml 之馬兜鈴懸浮細胞，生長情形最為理想。

懸浮細胞振盪速率會影響細胞與培養基之養分接觸與空氣交換率。Steward *et al.* (1958) 報導振盪速率會影響胡蘿蔔細胞生長，轉速快則懸浮細胞生長較為旺盛，轉速慢則細胞生長較遲緩而有助於細胞進一步分化成體胚⁽¹⁸²⁾。一般細胞懸浮培養之振盪速率約在 60-150 rpm 之間。林 (1998) 指出 80 rpm 最適合延胡索懸浮細胞培養⁽⁷⁵⁾。本試驗結果顯示，轉速為 120 rpm 平面迴轉式振盪器最適合馬兜鈴懸浮細胞培養。

Reinert *et al.* (1958) 報導光線可影響胡蘿蔔懸浮細胞之生長，弱光源 (300 lux) 有益細胞增殖，而光線太強 (3000 lux) 則抑制細胞生長⁽¹⁸³⁾。Kreis *et al.* (1990) 指出 *Digitalis lanata* 之細胞懸浮培養是在弱光下建立的。林 (1998) 指出 10 μ mol/m²s 光照較適宜延胡索懸浮細胞生長⁽⁷⁵⁾。本試驗結

果顯示，以光量 200 lux 培養最適合馬兜鈴懸浮細胞生長。

具有分生組織之培植體在適量 auxin 的培養基中可形成癒合組織；而利用癒合組織建立細胞懸浮培養，已成為今日許多學者的研究方向，原因不外乎細胞懸浮培養生長迅速，除可提供育種及原生質分離的材料外，利用細胞懸浮培養生產大量醫藥用二次代謝產物，更為製藥界提供新路程。馬兜鈴自古即為重要藥材，具有良好止咳化痰功能，而近年來文獻指出其中所含的 aristolochic acid 具抗癌作用，頗具研究價值，因此如何從植物細胞培養生產大量之二次代謝產物，有待進一步之研究。