

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：010201a125

## 行政院農業委員會九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動子計畫一  
：骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖(第2年/全程2年)**

(英文名稱) **The construction and improvement of Gu-Sui-Bu in factory faming system:Pharmacognostical identification and micropropagation of Gu-Sui-Bu**

計畫編號：**97農科-1.2.1-科-a1(25)**

全程計畫期間：**96年1月1日至97年12月31日**

本年計畫期間：**97年1月1日至97年12月31日**

計畫主持人：**郭昭麟**

執行機關：**私立中國醫藥大學**

合作機關：**私立朝陽科技大學、私立東海大學**



# 骨碎補類藥材產業化體系之建立及推動： 骨碎補類藥材基原鑑定及組織培養大量繁殖研究

郭昭麟<sup>1\*</sup>、陳忠川<sup>1</sup>、蔡新聲<sup>2</sup>、謝長奇<sup>3</sup>

中國醫藥大學 中藥資源學系<sup>1</sup>

朝陽科技大學 生物技術研究所<sup>2</sup>

東海大學 畜產與生物科技學系<sup>3</sup>

## 摘要

骨碎補為常用中藥之一，根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。主要治療腎虛腰痛、耳鳴耳聾、牙齒鬆動、跌撲閃挫、筋骨折傷；外治斑禿，白癜風等。骨碎補類藥材之來源植物應為水龍骨科(Polypodiaceae)植物槲蕨(*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)之根莖，經採集調查，發現台灣地區之骨碎補有水龍骨科 (Polypodiaceae) 槲蕨屬(*Drynaria* (BORY) J. SMITH)植物一種，槲蕨 (*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)，崖薑蕨屬(*Pseudodrynaria* (C. CHRISTENSEN) CHING)一種，崖薑蕨(*Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING)，骨碎補科(Davalliaceae)骨碎補屬(*Davallia* SMITH) 植物有三種，分別為：台灣骨碎補(大葉骨碎補) (*Davallia formosana* HAYATA (*Da. divaricata* BLUME))、海州骨碎補(*Davallia mariesii* MOORE ex BAKER)、闊葉骨碎補(*Davallia solida* (FORST) SWARTZ)以及骨碎補屬(*Humata* CAVANILLES)植物一種，杯狀蓋骨碎補(*Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN)等共計六種，常見的為槲蕨、崖薑蕨、大葉骨碎補及杯狀蓋骨碎補等四種。骨碎補不僅是常用中藥且為民間常用的青草藥，民間因此大量使用本藥材，造成臺灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，本研究之目的，針對常用及值得開發之槲蕨及台灣骨碎補(大葉骨碎補)兩種原，進行組織培養之大量繁殖及馴化栽培，提供大量繁殖所得的材料，作為研發、資源開發及產業的推廣。

中文關鍵詞：骨碎補、槲蕨、台灣骨碎補、大量繁殖、馴化栽培

## **The construction and improvement of Gu-Sui-Bu in factory farming system: Pharmacognostical identification and micropropagation of Gu-Sui-Bu**

Chao-Lin Kuo<sup>1\*</sup>, Chung-Chuan Chen<sup>1</sup>, Hsin-Sheng Tsay<sup>2</sup>, Chang-Chi Hsieh<sup>3</sup>

School of Chinese Medicine Resources, China Medical University<sup>1</sup>

Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology<sup>2</sup>

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University<sup>3</sup>

### **ABSTRACT**

Now Gusuibu has been used is one of the most usually in Chinese medicine, its rhizoma was used for invigorating the kidney and strengthen bones, restoring the tendon and alleviate pain, that cure for lambago due to asthenia of kidney, tinnitus and deafness, tooth-loose, sudden sprain and contusion due to trauma, sprain of extremities; ie., topical application is used for alopecia areata, seborrheic, etc. The botanical origin of rhizoma derivated of Gusuibu should be only incoulded the *Drynaria fortunei* (KUNZE) J. SMITH (fam. Polypodiaceae). Through collection, research and identification of Gusuibu in Taiwan, six species were found as *D. fortunei* (KUNZE) J. SMITH (fam. Polypodiaceae), *Pseudodrynaria coronans* (WALLICH) CHING (fam. Polypodiaceae), *Davallia formosana* HAYATA (*Da. divaricata* BLUME) (fam. Davalliaceae), *Da. mariesii* MOORE ex BAKER (fam. Davalliaceae), *Da. solida* (FORST) SWARTZ (fam. Davalliaceae) and *Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN (fam. Davalliaceae). Becase of the numerous marking plant resources and mass application of Gusuibu in Taiwan, populations of these kind of medicines were decreasing quickly. Due to the mass demand and application of alternates of different species, the excessive collection of wild medical plants was causing obviously. The objectives in this study are: to proceed the tissue culture, mass propagation and domestication of the two original species, *D. fortunei* and *Da. divaricata* , and use these mass propagation material for developing study, resource and yield promotion.

key words: Gusuibu, *D. fortunei*, *Da. formosana*, mass propagation, domestication

## 前言

骨碎補為常用中藥之一，始載於開寶本草，歷代以降諸家本草均有著錄。嘉祐本草引陳藏器本草拾遺云：『開元皇帝以其主傷折，補骨碎，故作此名耳』可知於唐代已經廣為應用，其根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。主要治療腎虛腰痛、耳鳴耳聾、牙齒鬆動、跌撲閃挫、筋骨折傷；外治斑禿，白癜風等。骨碎補類藥材之來源植物應為水龍骨科(Polypodiaceae)植物槲蕨(*Drynaria fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)之根莖，經採集調查，發現台灣地區之骨碎補有水龍骨科 (Polypodiaceae) 槲蕨屬(*Drynaria* (BORY) J. SMITH)植物一種，槲蕨 (*D. fortunei* (KUNTZE) J. SMITH)，崖薑蕨屬(*Pseudodrynaria* (C. CHRISTENSEN) CHING)一種，崖薑蕨(*P. coronans* (WALLICH) CHING)，骨碎補科(Davalliaceae)骨碎補屬(*Davallia* SMITH) 植物有三種，分別為：台灣骨碎補(大葉骨碎補) (*Da. formosana* HAYATA (*Da. divaricata* BLUME))、海州骨碎補(*Da. mariesii* MOORE ex BAKER)、闊葉骨碎補(*Da. solida* (FORST) SWARTZ)以及骨碎補屬(*Humata* CAVANILLES)植物一種，杯狀蓋骨碎補(*Humata griffithiana* (HOOKER) C. CHRISTENSEN)等共計六種，常見的有槲蕨、崖薑蕨、台灣骨碎補(大葉骨碎補)及杯狀蓋骨碎補等四種。骨碎補不僅是常用中藥且為民間常用的青草藥，民間因此大量使用本藥材，造成臺灣產骨碎補類藥材的族群迅速減少，在大量需求下，於是使用其不同品種等為代用品，造成野生藥用植物的濫採，本研究之目的，針對常用及值得開發之槲蕨及台灣骨碎補(大葉骨碎補)兩種原，進行組織培養之大量繁殖及馴化栽培之研究，提供大量繁殖所得的材料，作為研發、資源開發及產業的推廣。

## 研究目的

本計畫之目的進行槲蕨及台灣骨碎補(大葉骨碎補)兩原植物的組織培養大量繁殖及馴化栽培之研究，提供大量繁殖所得的材料，供給研發、資源開發及產業的推廣。此結果最終目的為建立骨碎補類藥材產業化之體系。本研究所建立的骨碎補類藥材之槲蕨及台灣骨碎補的組織培養繁殖系統，是從配子體開始到孢子體的大量繁殖，進而馴化栽培都很完備之量產體系，可進行進一步的開發及推廣。在產業應用面，具有進一步建立槲蕨及台灣骨碎補的優良農業種植規範(GAP; Good Agricultural Practice) 種苗來源的繁殖系統，量產大量種苗的產學合作之價值，如能將其產業化，將達提升台灣本土中草藥的產值最終目的。

## 文獻探討

骨碎補為常用中藥之一，始載於開寶本草，歷代以降諸家本草均有著錄。嘉祐本草(宋、掌禹錫等，1989)引陳藏器本草拾遺(唐、陳藏器，1988)云：『開元皇帝以其主傷折，補骨碎，故作此名耳』可知於唐代已經廣為應用。其根莖有補腎強骨、續筋止痛之效。中醫用於治療骨折、跌打損傷、促進骨質癒合。骨碎補藥材來源自古以來即相當複雜，有水龍骨科(Polypodiaceae)的槲蕨(*D. fortunei*)、崖薑蕨(*P. coronans*)，及骨碎補科(Davalliaceae)的大葉骨碎補(*Da. divaricata*)、海州骨碎補(*Da. mariesii*)、闊葉骨碎補(*Da. solida*)等(陳忠川，2001)。依據我國及大陸藥典的記載骨碎補正品應為槲蕨(Anonymous, 2005)。陳忠川等(2001)的調查指出台灣中藥店販賣之骨碎補皆為大葉骨碎補，中藥店的骨碎補主要來自大陸。近年來台灣對骨碎補的研究，雖指出基源是崖薑蕨(劉華昌，1999)或槲蕨(許秀蘊，2001)，都可能誤用大葉骨碎補(陳忠川，2001)。台灣三種骨碎補皆有，但以崖薑蕨最茂盛，最易採集，民間青草藥行以崖薑蕨為主，其次為台灣骨碎補(大葉骨碎補)。

文獻指出骨碎補能促進骨對鈣的吸收(Jeong *et al.*, 2005)、對小雞骨發育生長有顯著促進作用，及含有糖類成分(鄭虎占等人，1998)。如上述，寡糖類成分可促進腸道對鈣的吸收，此種作用對於成長中及去卵巢大鼠的骨質密度有明顯增強作用(Coudray *et al.*, 2003; Kruger *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2000; Zafar *et al.*, 2004)。在第一年的計畫，參照這些文獻，探討比

較三種骨碎補促進腸道鈣吸收的強弱，並且偵測盲腸的 pH 值及可溶性鈣含量，推測其是否有類似寡糖的作用。

劉華昌 (劉華昌, 1999) 的臨床評估指出崖薑蕨水抽取物對停經後骨質疏鬆的婦女有改善作用，增加骨質密度，對骨生成因子 (bone-specific alkaline phosphatase) 及尿中膠原蛋白成分有減少作用。大陸的文獻指出骨碎補對去卵巢大鼠引起骨小樑體積減少有明顯增加作用 (馬中書, 1999)。對細胞活性的研究，槲蕨能促進造骨細胞增生 (Chang et al., 2003; Jeong et al., 2005; Tang et al., 2004; Yin et al., 2004)，分化及礦化 (calcification) 作用。Liu et al. (2001) 指出槲蕨對造骨細胞沒有毒性，其抗氧化作用能保護造骨細胞不受過氧化氫的傷害。槲蕨能誘導破骨細胞凋亡 (Lin et al., 2002)，抑制破骨細胞活性 (Jeong et al., 2003; Sun et al., 2002, 2004) 及形成 (Yin et al., 2004)。在造骨細胞與破骨細胞共同培養的條件下，槲蕨對造骨細胞沒有影響，但抑制了破骨細胞的完整性 (Sun et al., 2003)。

槲蕨主要的成分是黃酮類，其中 naringin 被用來當作品質的指標 (Wang and Li, 1998; Zhou and Zhang, 1994)，故本計畫將於第二年 (96 年) 以 naringin 來評估其品質，除此之外，尚有 propylchalcones 及 flavan-3-ols 的成分被發現，這些成分含 naringin 對造骨細胞皆有增生作用 (Chang et al., 2003)。許秀蘊 (2001) 指出槲蕨中主要的活性成分為 (-)-epicatechin-3-O- $\beta$ -D-allopyranoside。由海州骨碎補分離出 epicatechin 類的成分 (Cui et al., 1992)。Naringin 雖有與 estrogen receptor 相關的報導 (Ratna and Simonelli 2002)，但對骨細胞的作用及機轉，乃至活體動物的抗骨質疏鬆作用，有關文獻相當缺乏。

由上述，綜觀中草藥之發展歷史，藥材之來源及使用常因朝代更替及區域習用而有同名異物或同物異名的情形，骨碎補類藥材，有關的藥典雖皆指名為槲蕨，但誤用混用普遍，未必真的使用槲蕨，故對其發展歷史及基原必須先釐清，確定研究材料之來源，有鑑於各來源物種所存在的開發潛力，故需綜合評估各品種間之差異，子計劃二已獲致的初步結果，其中槲蕨及台灣骨碎補 (大葉骨碎補) 效果極顯著，故本年度的實施要點，將針對槲蕨及台灣骨碎補 (大葉骨碎補) 此兩種本土種原大量繁殖 (Albaum HG. 1938., Camloh M., et al., 1992) 及栽培介質的探討 (王幸美等 1999, Lo et al., 2004)，以達國產骨碎補藥材自給自足之目的，並利用 95-96 年所建立的研究成果為基礎，進一步以組織培養來大量繁殖 (Tsay et al., 1989, 1998., Satish et al., 2003) 與復育。

蕨類的生活史中包括孢子體世代及配子體世代，只有孢子體經常被人類所使用 (因為野生配子體的不易取得及收集等因素)，而除了經由有性繁殖來獲得孢子體外，在蕨類研究上也發現約有 10% (還有更多未知的) 具有無配子生殖 (apogamy) 的特性 (Sheffield & Bell, 1987)，另外，孢子體再生也可透過無性繁殖的方式在 *in vivo* 和 *in vitro* 下進行增值，例如：*Platyserium* species (Hoshizaki, 1977; Hennen and Sheehan, 1978; Richards et al., 1983; Thentz and Moncousin, 1984; Wee, Kwa and Loh, 1992; Camloh, Gogala and Rode, 1994)，亦可經由根莖上的鱗片誘導獲得孢子體 (J. Ambrozic Dolinsek and M. Camloh, 1997)，在 95-96 年所完成建立大量繁殖的系統乃基於二階段配子生殖的過程，並且發現量化時間上仍然有改善空間，使其滿足對質量要求均一的中草藥發展及優質化，因此，本年度研究重點擬著眼於大量繁殖體系、馴化栽培的研究，以槲蕨及大葉骨碎補二種原植物為試驗主軸，建立組織培養大量繁殖體系、馴化栽培的研究及產業推廣。同時建立良好農業規範 GAP (Good Agricultural Practice) 種苗來源的大量繁殖系統，因應產業推廣所需。希能借由本計畫所建立的系統進行骨碎補類藥材槲蕨及大葉骨碎補二種原植物之量產，這些量產出來的材料，可以應用在進入產學合作時使用，亦可配合整個計畫的規劃進行值得開發的品種進行大量繁殖、馴化與復育。

## 研究方法

### (一) 材料

1. 槲蕨 (*D. fortunei*) 已建立之的配子體及孢子體之培植體。
2. 台灣骨碎補 (*Da. formosana*) 已建立之的配子體及孢子體之培植體。

### (二) 試藥

1. MS Medium
2. Plant Growth Regulator (BA, 2-4D, NAA)
3. Difco Agar
4. Gelrite gellan gum (Sigma<sup>®</sup>)
5. Potato
6. Sweet potato (台農 66 號)

### (三) 儀器

1. 照相機 (Nikon FM2)
2. 數位照相機 (Fiji S3PRO) 、Nikon Coolpix 4500, Japan
3. 數位照相機 (Nikon Coolpix 4500, Japan)
4. 顯微鏡 (Nikon ECLIPSE E400, Japan)
5. 顯微鏡 (Nikon photograph T-2)
6. 顯微測微計 (Erma 0.01mm Micrometer)
7. 立體顯微鏡 (Nikon SMZ-2T)
8. 蒸餾水製造器 (Branson 5200)
9. 電子天平 (OHAUS GALAXY<sup>TM</sup> 160)
10. 超音波振盪器 (SONOREX SUPER RK 1028 BH)
11. 紫外燈 (CAMAG universal UV lamp  $\lambda=254\text{nm}$  或  $366\text{nm}$ )
12. 全球定位系統 (Global Positioning System, eTrex<sup>®</sup>, 通常簡稱 GPS)
13. 無菌操作台 (Laminar flow)
14. 植物組織培養室 (Plant Tissue Culture Room)
15. 殺菌釜 (Autoclave)
16. 迴轉式恆溫震盪植物生長培養箱 (orbital shaking incubator)
17. pH meter
18. 高照度植物生長箱 (Illuminated Incubator)
19. 溫室 (Green house)
20. blue light (450 nm)
21. red light (660 nm)
22. far-red light (735 nm) or complete darkness
23. cool fluorescent tubes (光強度為  $38 \mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$ ) 白光光源
24. 電子顯微鏡 (JEOL-JSM-6330 F, Japan)

### (四) 方法

- 一、骨碎補類藥材之槲蕨 (*D. fortunei*)及台灣骨碎補 (*Da. formosana*)之植物組織培養大量繁殖繁殖體系的建立
- 二、骨碎補類藥材之槲蕨及台灣骨碎補孢子發芽及生長因子的研究  
在 1/2 X MS 可獲得最佳的孢子發芽率，因此以 1/2 X MS 為基礎鹽類進行不同

條件的探討。

1. 培養基不同酸鹼值 pH：3.7, 4.7, 5.7, 6.7, 7.7, 8.2, 8.7, 9.2 和 9.7 的探討；酸鹼值分別以 1N NaOH<sub>(aq)</sub> 或 1N HCl<sub>(aq)</sub> 調整。所有的培養基以 0.35% gelrite (Sigma-Aldrich, Inc., USA) 固化。接種完成的培養皿封上兩層的 parafilm 並放置在 25±1 °C 及光週期 16 / 8h light and dark 循環下的培養室進行培養。
2. 不同光譜性質：blue light (450 nm), red light (660 nm), far-red light (735 nm) or complete darkness；以 cool fluorescent tubes (光強度為 38 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) 為白光光源。試驗不同顏色光源時將培養皿放置在 LED-light plant growth chamber (900 FLED, Taiwan Hipoint Corporation, Taiwan) 並一樣控制在 25±1 °C 及光週期 16 / 8h light and dark。(註：LEDs 是一種 semiconductor diodes 其特色為當電激發時可射出單一波長的光。)
3. 不同條件培養之材料的顯微照相：樹蕨及台灣骨碎補孢子發芽及原葉體的顯微照相係採用顯微鏡 (Nikon ECLIPSE E400, Japan) 連接數位相機 (Nikon Coolpix 4500, Japan) 進行拍攝及紀錄。以掃描式電子顯微鏡 (JEOL-JSM-6330 F, Japan) 觀察前將原葉體樣本以液態氮進行冷凍然後再直接進行觀察，探討其植株的發育情形。

### 三、不同栽培介質對於樹蕨及大葉骨碎補孢子體形成的影響

移植白光下生長五個月的原葉體到含有三種不同組合介質的塑膠穴盤進行試驗。三種不同組合介質分別為：1. Tree fern trunk fiber mix (TFTF Mix)；2. TFTF Mix : Peat moss (1:1)；3. Peat moss。TFTF mix 及 Peat moss (Klassman Potgrond H, William Sinclair Horticulture Ltd. England) 購自台中裕觀園藝材料行。每 5 克的原葉體移植到含有介質的穴洞 (直徑 6 cm) 中並培養於溫室並每天灑水一次。建立最好的繁殖體系，作為大量繁殖優質種源的依據。

### 四、溫室的大量繁殖，建立植株大量繁殖體系及馴化栽培的繁殖系統

將無菌培養所得的植株，移植至小盆栽中，先於生長箱中馴化，待其生長穩定後，再移至大溫室 (由新社種苗場提供)，再進一步探討並建立馴化栽培之大量繁殖體系，將模擬植株的原生長環境，將植株繁殖於蛇木板上，誘導植株形成，粗且長的材料，供為藥材的來源，達成本計畫馴化與移植、大量繁殖及原棲習地復育之目的。

1. 培植體之消毒：取樹蕨、及台灣骨碎補 (大葉骨碎補) 等二種，植株葉片上的孢子為培植體，以清水沖洗乾淨後，先浸泡於 70% 酒精消毒 30 秒後，再以 1% 次氯酸鈉溶液 (每 100 mL 含 tween20 兩滴) 於超音波震盪器進行表面消毒 15~20 分鐘，移至無菌操作臺經無菌水洗滌 3 次後，置於無菌培養皿上取出孢子，放置於培養基中待長出配子體，再利用其配子體之植株，交配繁殖為孢子體之植株進行大量繁殖。
2. 培養基的配製：以 MS (Murashige & Skoog, 1962) 無機鹽類及有機成分為基本配方，添加 3 % 蔗糖及 0.9 % Difco agar (或 0.4% Gelrite)，配合 NAA (α-naphthaleneacetic acid)、2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)、BA (6-benzyladenine)、kinetin 等各類植物生長調節劑，培養基加入 agar 前先用 1N NaOH<sub>(aq)</sub> 及 HCl<sub>(aq)</sub> 將 pH 值調至 5.70 ± 0.01，然後以 121°C、15 lb/in<sup>2</sup> (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) 進行高壓滅菌 15 分鐘後，擺成斜面冷卻備用。
3. 培養環境：接種後，將材料置於 25 ± 1°C 之恆溫、黑暗或照光 (固體培養：光量 100 μE/m<sup>2</sup>s，光波長 350~800 nm；液體培養：光量 10 μE/m<sup>2</sup>s) 下培養。
4. 接種方式：以試管為培養容器，內含 10 ml 培養基，每支試管接種二片含有孢子

之葉片。接種後培養於  $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、黑暗或光強  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ，每日照光 14 小時，相對濕度為 75% 的平面迴轉式震盪器或培養室。

5. 配子體大量繁殖體系：由已建立的配子體為材料，接種於不添加或添加 0.5~2 mg/L BA 或 kintein 之 1/2 MS 固體培養基，經 30 天後調查生長情形，所獲得的結果再進行大量繁殖體系的探討。
6. 植株之誘導及大量繁殖體系：由無菌孢子所獲得的配子體，接種於不添加或添加 1~8% 的馬鈴薯泥、1~8% 的蕃薯泥、0.5~2 mg/L BA 或 kintein 之 1/2 MS 固體培養基，經 30 天後調查植株的誘導率，所獲得的植株再進行大量繁殖體系的探討。
7. 植株大量繁殖體系：進行透氣試驗，比較其生長情形。
8. 建立植株大量繁殖體系之馴化：將無菌培養所得的配子體植株，先於植物生長箱中馴化，培養一個月後再移至溫室中，進一步探討建立馴化之大量繁殖體系。



## 結果與討論

1. 完成槲蕨及台灣骨碎補（大葉骨碎補）等二種原植物之採集、生態習性調查及鑑定，有助於骨碎補類藥材與原植物種源的鑑別及大量繁殖條件的建立。槲蕨為水龍骨科 (Polypodiaceae) 植物，具二型葉，一回羽裂複葉，根莖扁圓形較小被暗黃色毛，葉脈明顯，孢子囊分布於網紋中，無孢膜；其根莖組織可由散生外韌形維管束形態及排列扁橢圓形大小略約相同的特徵來判別。台灣骨碎補（大葉骨碎補），為骨碎補科 (Davalliaceae) 植物，四或五羽裂複葉，根莖類圓形略大，被棕黃色毛，孢子囊分布於小脈頂端，具孢膜；可由其根莖形態、被毛顏色及孢膜的有無作為鑑別之依據；其根莖組織可由散生外韌形維管束形態及排列為圓形中間呈雙凹形，中間維管束大而明顯來判別，如圖1-6。調查結果如下：  
① 槲蕨：新竹縣橫山鄉內彎山區、臺中縣新社鄉及谷關地區、南投縣杉林溪及鹿谷鄉山區、花蓮縣綠水合流步道及砂卡檔步道、臺東縣都蘭山；  
② 台灣骨碎補：南投縣杉林溪及鹿谷鄉山區、台東縣霧台鄉山區、都蘭山、新竹縣竹東鎮清泉溫泉及屏東縣墾丁大尖山。
2. 完成槲蕨及台灣骨碎補等二種原之原葉體大量繁殖體系之試驗，並獲得良好的成果，其結果以 pH 7.7，1/2MS，2 % sucrose，白光照射培養為最佳條件，其孢子可在7天內發芽，以不對稱的方式進行細胞分裂，形成假根及原絲體細胞，約2個月後原葉體成熟，如圖7-8。同時進行原葉體在瓶內大量繁殖及自然交配誘導孢子體之初探，探討基本鹽類、酸鹼值、不同光線對其生長的影響，結果為可同時於瓶內大量繁殖及自然交配誘導孢子體，如圖9-10。
3. 槲蕨及台灣骨碎補等二種原之原葉體，可於瓶內原葉體可經由體細胞分化出二次原葉體而增殖而大量繁殖，如圖9-10。
4. 完成槲蕨及台灣骨碎補等二種原之原葉體於瓶內大量繁殖及自然交配誘導孢子體之試驗，探討基本鹽類、酸鹼值、不同光線對其生長及繁殖的影響，結果為原葉體可於瓶內大量繁殖及同時可自然交配誘導孢子體，並可大量繁殖，以 pH 7.7, 1/2MS及pH 5.7 1/2MS 添加 4% 馬鈴薯泥，於白光下培養為最佳條件，已達成建立大量繁殖體系之計畫目的，如圖9-12。
5. 槲蕨及台灣骨碎補等二種原之植株，由原葉體於無菌培養及馴化移殖發育為孢子體試驗，試驗結果良好，並進行馴化及移殖栽培於溫室的大量繁殖體系之探討，如圖13-14，已獲得計畫所需之種苗，並已進一步進行其大量繁殖，如圖15-18。移植到溫室生長的原葉體，以培養在Peat moss介質的穴洞可獲得最多孢子體幼苗。孢子體在溫室生長五個月後生形成根莖，10個月後長出收集葉。整個幼苗量化可在一年完成，已達成建立大量繁殖體系之計畫目的，未來將朝提供產業化大量繁殖種苗，建立骨碎補類藥材產業化之體系的目的進行。
6. 配合子計畫二，將建立之槲蕨及台灣骨碎補等的大量繁殖系統之溫室栽培，本研究已協調農委會新社種苗場協助，目前大量繁殖由其協助進行，未來將可量產大量的種苗及成株，對達成建立骨碎補類藥材產業化之體系與復育之最終目的，有極大幫助。

## 計畫成果自評

本研究已完成台灣本土最常用且最具價值的骨碎補類藥材之槲蕨及台灣骨碎補（大葉骨碎補）等二種原植物之採集、生態習性調查及鑑定，將有助於骨碎補類藥材與原植物種源的鑑別及大量繁殖條件的建立。槲蕨為水龍骨科 (Polypodiaceae)植物，具二型葉，一回羽裂複葉，根莖扁圓形較小被暗黃色毛，葉脈明顯，孢子囊分布於網紋中，無孢膜；其根莖組織可由散生外韌形維管束形態及排列扁橢圓形大小略約相同的特徵來判別。台灣骨碎補，為骨碎補科 (Davalliaceae)植物，四或五羽裂複葉，根莖類圓形略大，被棕黃色毛，孢子囊分布於小脈頂端，具孢膜；可由其根莖形態、被毛顏色及孢膜的有無作為鑑別之依據；其根莖組織可由散生外韌形維管束形態及排列為圓形中間呈雙凹形，中間維管束大而明顯來判別，作為鑑別之依據。並完成槲蕨及台灣骨碎補由原葉體於無菌培養及馴化移殖發育為孢子體試驗，探討基本鹽類、酸鹼值、不同光線對其生長及繁殖的影響，已獲良好結果，同時進行之馴化並移殖栽培於溫室之大量繁殖體系之探討，已可獲得大量種苗。槲蕨及台灣骨碎補等二種原之植株，由原葉體於無菌培養及馴化移殖發育為孢子體，並進行馴化及移殖栽培於溫室的大量繁殖體系的程序中，移植到溫室生長的原葉體，以培養在 Peat moss 介質的穴洞可獲得最多孢子體幼苗。孢子體在溫室生長五個月後生形成根莖，10 個月後長出收集葉。整個幼苗量化可在一年完成，已達成建立大量繁殖體系之計畫目的，未來將朝提供產業化大量繁殖種苗，建立骨碎補類藥材產業化之體系的目的進行。本研究已協調農委會新社種苗場協助，目前大量繁殖由其協助進行，未來將可量產大量的種苗及成株，對達成建立骨碎補類藥材產業化之體系與復育之最終目的，有極大幫助。將有助於提供農民或業界大量繁殖之推廣，達成國產骨碎補藥材自給自足之目的。

計畫歷年結果及執行成果已分別刊登於 SCI 論文雜誌：(1)In vitro cellular & developmental biology. Plant : journal of the Tissue Culture Association : In Vitro Culture of *Drynaria fortunei*, A Fern Species Source of Chinese Medicine 'Gu-sui-bu'. (2007) 43:133–139。 (2) *Botanical Studies*. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as 'Gu-Sui-Bu'.. (2007) 48:397–406。結合兩年的成果於(1)2007 台灣藥學會年會暨學術研討會中以壁報論文發表：『Pharmacognostical identification and micropropagation of Gu-Sui-Bu ( I )』；(2)The 23<sup>rd</sup> Symposium on Natural Products 中以壁報論文發表：『The identification of Taiwan *Drynaria* spp. based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA』 (2008.09.20-21) 。以上成果，除可作為進一步開發保健食品的參考外，亦有利於業界之應用與學術價值。





圖1. 槲蕨之野生植株  
Fig.1 A wild plant of *D. fortunei*



圖2. 台灣骨碎補之野生植株  
Fig.2 A wild plant of *Da. formosana*



圖3. 槲蕨之不具胞膜孢子，散佈著生  
Fig.5 Non-indusiate spore of *D. fortunei*



圖4. 台灣骨碎補之具胞膜孢子，著生葉尖  
Fig.7 Indusiate spore of *Da. formosana*



圖5. 槲蕨根莖之弱擴大圖  
Fig.13 Amplify of rhizoma of *D. fortunei*



圖6. 台灣骨碎補根莖之弱擴大圖  
Fig.15 Amplify of rhizoma of *Da. formosana*



圖7. 槲蕨原葉體之大量繁殖  
Fig.7 The mass propagation of prothallia of *D. fortunei*



圖8. 台灣骨碎補原葉體之大量繁殖  
Fig.14 The mass propagation of prothallia of *Da. formosana*





圖9. 槲蕨原葉體大量繁殖培養中自然交配獲得之孢子體

Fig.9 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *D. fortunei*



圖10. 台灣骨碎補原葉體大量繁殖培養中自然交配獲得之孢子體

Fig.10 The mass propagation of prothallia and production of *Da. formosana*



圖11. 槲蕨原葉體於培養室中大量繁殖

Fig.11 The mass propagation of prothallia of *D. fortunei* in culture room



圖12. 台灣骨碎補原葉體之大量繁殖

Fig.12 The mass propagation of prothallia of *Da. formosana* in culture room



圖13. 槲蕨大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體（三個月）

Fig.13 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant and cultivating in growth chamber. (three month)



圖14. 台灣骨碎補大量繁殖之原葉體馴化移植栽培於生長箱中獲得之孢子體（六個月）

Fig.14 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant and cultivating in growth chamber. (six month)





圖 15. 槲蕨大量繁殖之原葉體馴化移殖栽培於生長箱中獲得之孢子體 (三個月)

Fig.15 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *D. fortunei* by taming transplant and cultivating in growth chamber.(three month)



圖 16. 台灣骨碎補大量繁殖之原葉體馴化移殖栽培於生長箱中獲得之孢子體 (六個月)

Fig.16 The mass propagation of prothallia and production of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant and cultivating in growth chamber. (six month)



圖 17. 槲蕨馴化移殖至小盆栽置於生長箱中栽培，並初步移殖於溫室大量繁殖

Fig.17 The mass propagation of greenhouse of sporophytes of *D. fortunei* by taming transplant in small pots and cultivating in growth chamber



圖 18. 台灣骨碎補馴化移殖至小盆栽置於生長箱中栽培，並初步移殖於溫室大量繁殖

Fig.18 The mass propagation of greenhouse of sporophytes of *Da. formosana* by taming transplant in small pots and cultivating in growth chamber







圖 19. 槲蕨馴化移植溫室生長情形  
Fig.19 The growth of *D. fortunei* by taming  
transplant in small pots and greenhouse



圖 20. 台灣骨碎補馴化移植溫室生長情形  
Fig.20 The growth of *Da. formosana* by taming  
transplant in small pots and greenhouse

## 參考文獻

- 宋、掌禹錫等奉敕撰，那琦、謝文全、李一宏重輯：嘉祐補註神農本草，中國醫藥學院中國藥學研究所，台中 1989；p.108。
- 唐、陳藏器原著，那琦、謝文全、林麗玲重輯：重輯本草拾遺，華夏文獻出版社，台中 1988；p.113。
- 陳忠川。2001。台灣市售骨碎補藥材之生藥學研究。行政院衛生署九十年度科技研究發展計畫委託研究報告。
- 許秀蘊 骨碎補之類黃鹼素對骨細胞活性影響之評估。行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告，2001。
- 高秀雲、葉德銘。2003。脆鐵線蕨孢子無菌撒播繁殖體系之建立。台灣林業科學 18(1): 33-42。
- 王幸美、葉德銘、李晔。1999。試管內培養基成分與無土介質對鐵線蕨孢子發芽與原葉體生長及配子體發育之影響，中華農藝；45：353-360。
- 劉華昌。1999。傳統骨科中藥材骨碎補對骨母細胞之生理活性研究。行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫委託研究報告。
- 劉華昌 傳統中藥材骨碎補臨床療效之研究。GRB
- 鄭虎占 董澤宏 余靖 中藥現代研究與應用。學苑出版社，北京，1999，第四卷，pp.3328。
- 馬中書、王蕊、邱明才、李玉坤、鄭方道 張鑫 四種補腎中藥對去卵巢大鼠骨質疏松骨形態的作用。中華婦產科雜誌 1999；34：82-85。
- Albaum HG. 1938 Normal growth, regeneration, and adventitious outgrowth formation in fern prothallia. *Am J Bot*; 25: 124-133
- Anonymous. 2005. Pharmacopoeia Commission of People Republic of China (ChPC), Vol.1., Chemical Industry Press, China. Pp: 179-180.
- Asaka, I., I. Ii, M. Hirotsu, Y. Asada, T. Yoshikawa, and T. Furuya. 1994. Mass production of ginseng (*Panax ginseng*) embryoids on media containing high concentrations of sugar. *Planta Med.* 60: 146-148.
- Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of germplasm of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer-Verlag, Berlin, pp. 419-434.
- Brown, J.P. and R. G. Josse. 2002. clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Canadian Medical Association Journal.* 2002; 167(Suppl):S1-34.
- Camloh M, Gogala N .1992 *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophyte. *Sci Hortic.* 51: 343-346.
- Camloh, M., N.Gogala and J. Rode. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum* *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 56: 257-266.
- Chang, W. C. and Y. I. Hsing. 1980. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root-derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Theor. Appl. Genet.* 57: 133-135.
- Chang, E.J., W. J. Lee, S. H. Cho and S. W. Choi. 2003. Proliferative effects of flavan-3-ol and propylarginidins from rhizomes of *Drynaria fortunei* on MCF-7 and osteoblastic cells. *Arch. Pharm. Res.* 26:620-630.
- Chen, C. H. and J. C. Wang. 1999. Revision of the genus *Gentiana* L. (Gentianaceae) in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 9-38.
- Chen, C. C., W. T. Chang, Y. S. Chang, and H. S. Tsay. 1994. Studies on the tissue culture of *Angelica dahurica* var. *formosana* II. Establishment of cell suspension culture and evaluation of cultural conditions. *J. Chinese Medicine* 5: 123-134. (in Chinese)
- Choi, Y. E., J. W. Kim, and E. S. Yoon. 1999. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann. Bot.* 83: 309-314.
- Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, and K. T. Choi. 1998. Regenerative ability of

- somatic single and multiple embryos from cotyledons of *Korean ginseng* on hormone-free medium. *Plant Cell Rep.* 17: 544-551.
- Coudray, C., J. C. Tressol, E. Gueux and Y. Rayssiguier. 2003. Effect of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur. J. Nutr.* 42:91-98.
- Cui, C. B., Y. Tezuka, T. Kikuchi, H. Nakano, T. Tamaoki and J. H. Park. 1992. Constituents of fern, *Davallia mariesii* Moore. II. Identification and <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectra of procyanidin B-5, epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin, and epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin-(4 beta-6)-epicatechin. *Chem. Pharm. Bull.* 40:889-898.
- Fay, M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:1-4.
- Feijoo, M. C. and I. Iglesias. 1998. Multiplication of an endangered plant: *Gentiana lutea* L. subsp. *Aurantiaca* Lainz, using *in vitro* culture. *Plant Tiss. Cult. Bio.* 4: 87-94.
- Fu, R.Z., J. Wang, Y. R. Sun and P. C. Shaw. 1998. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots. *Biotechniques.* 25:796-8, 800-1.
- Hennen, G. R. and T. J. Sheehan. 1978. *In vitro* propagation of *Platycerium stemaria* (Beauvois) Desv. *Hort science* 13: 245.
- Hiraoka, N. and M. Oyanagi. 1988. *In vitro* propagation of *Glehnia littoralis* from shoot-tips. *Plant Cell Rep.* 7: 39-42.
- Hoshizaki, J. H. 1977. Staghorn ferns today and tomorrow. *Gardens Bulletin.* 30: 13-15.
- Hu, Q., S. B. Andersen and L. N. Hansen. 1999. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in *Isatis indigotica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 155-157.
- Huang, W. W., C. C. Cheng, F. T. Yeh and H. S. Tsay. 1993. Tuber culture of *Dioscorea doryophora* Hance I. Callus induction from different source organs and the measurement of diosgenin content. *China Medical College J.* 2: 151-160.
- Huang, C. L., M. T. Hsieh, W. C. Hsieh, A. P. Sagare and H. S. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an ethnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf- and inflorescence-node explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 220-224.
- Dolinsek, J. A. and M. Camloh. 1997. Gametophytic and sporophytic regeneration from bud scales of the fern *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *in vitro*. *Annals of Botany* 80: 23-28, 1997.
- Jeong, J. C., S. K. Kang, J. W. Lee, C. H. Youn, C. W. Jeong, H. M. Kim, Y. C. Lee, Y. C. Chang and C. H. Kim. 2003. Inhibition of *Drynariae* rhizome extracts on bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts. *Int. Immunopharmacol.* 3:1685-1697.
- Jeong, J. C., J. W. Lee, C. H. Yoon, Y. C. Lee, K. H. Chung, M. G. Kim and C. H. Kim. 2005. Stimulative effects of *Drynariae* rhizome extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Ethnopharma.* 96:489-495.
- Kalu, D. K. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 15:175-192.
- Kang, Q. S. and S. S. Hou. 1993. Recent advances in the research on the natural antitumor drug taxol. *Natural Prod. Res. Dev.* 5: 61-68.
- Kelly, O., S. Cusack, C. Jewell and K. D. Cashman. 2003. The effect of polyunsaturated acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young rats. *Br. J. Nutr.* 90:743-750.
- Kitamura, Y., H. Miura, and M. Sugii. 1989. Plant regeneration from callus cultures of *Swertia pseudochinensis*. *Shoyakugaku Zasshi* 43:256-258.
- Kondo, Y., F. Takano, and H. Hojo. 1994. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice. *Planta Med.* 60: 414-416.
- Kruger, M.C., K. E. Brown, G. Collett, L. Layton and L. M. Schollum. 2003. The effect of



- fructooligosaccharide with various degree of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Exp. Biol. Med* 228:683-688.
- Kubota, S., T. Kato and K. Yoneda. 1993. The effect of the concentration of fertilizer application and the physico-chemical properties of sphagnum moss and clay pots on the growth of *Phalaenopsis*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 62: 601-609.
- Lin, C.Y., J. S. Sun, S. Y. Sheu, F. H. Lin, Y. J. Wang and L. T. Chen. 2002. The effect of Chinese medicine on bone cell activities. *Am. J. Chin. Med.* 30:271-285.
- Liu, H. C., R. M. Chen, W. C. Jian and Y. L. Lin. 2001. Cytotoxic and antioxidant effects of the water extracts of the traditional Chinese herb gusibu (*Drynaria fortunei*) on rat osteoblasts. *J. Formos. Med. Assoc.* 100: 383-388.
- Liu, S. Y., H. S. Tsay, H. C. Huang, M. F. Hu, and C. C. Yeh. 1987. Comparison on growth characteristics and nutrient composition between plants of *Anoectochilus* species from mass vegetative propagation by tissue culture techniques. *J. Agric. Res. China* 36: 357-366.
- Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113.
- Lo, S. F., Nalawade S. M., Kao C.L., Chen C. L. and Tsay H. S. 2004 *In Vitro* Propagation by Asymbiotic Seed Germination and 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity Studies of Tissue Culture Raised Plants of Three Medicinally Important Species of *Dendrobium*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(5) 731-735
- Lopez, H.W., C. Coudray, M. A. Levrat-Verny, C. Feillet-Coudray, C. Demigne and C. Remesy. 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11:500-508.
- Ratna, W. N. and J. A. Simonelli. 2002. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences* 70:1577-1589.
- Miura, Y. and M. Tabata. 1986. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Foeniculum vulgare*. *Plant Cell Rep.* 5: 310-313.
- Meng, Y. L., Y. P. Gao, and J. F. Jia. 1996. Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis*. *Plant Cell Rep.* 16: 88-91.
- Richards, J. H., Z. Beck and A. M. Hirsch. 1983. Structural investigations of asexual reproduction in *Nephrolepis exaltata* and *Platyserium bifurcatum*. *American journal of botany* 70: 993-1001.
- Satish M.N., Abhay P.S., Lee C.Y., Kao C.L., and Tsay H.S. 2003 Studies on tissue culture Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44:79-98.
- Sheffield, E. and P. R. Bell. 1987. Current studies of the pteridophyte life cycle. *Bot. Rev.* 53: 442-490.
- Sun, J.S., C.Y.Lin, G. C. Dong, S.Y. Sheu, F. H. Lin, L. T. Chen and Y. J.Wang. 2002. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) on bone cell activities. *Biomaterials.* 23:3377-3385.
- Sun, J. S., G. C. Dong, C. Y. Lin, S. Y. Sheu, F. H. Lin, L. T. Chen, H. S. Chang and Y. J. Wang. 2003. The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J. Sm) immobilized modified calcium hydrogenphosphate on bone cell activities. *Biomaterials.* 24:873-882.
- Tang, Q., L. L. Chen and J. Yan. 2004. Effects of traditional Chinese medicine *Drynaria fortunei* J. Smith on promoting the proliferation, differentiation and calcification of mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* .29:164-168.
- Tanimoto, H., M. Mori, M. Motok, K. Toru, M. Kadowaki and T. Noguchi. 2001. Natto mucilage containing poly- $\gamma$ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 516-521.
- Thentz, M. and C. Moncousin. 1984. Micropropagation in vitro development *Platyserium*

- bifurcatum* (Cav.) C.Chr. *Revue Horticole Suisse* 57: 293-297.
- Tsay, H. S., T. G. Gau and C. C. Chen. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8: 450-454.
- Tsay, H. S. and H. L. Huang. 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-derived suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Plant Cell Rep.* 17: 670-674.
- Walkey, D. G. A. and K. A. Matthews. 1979. Rapid clonal propagation of rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) from meristem-tips in tissue culture. *Plant Sci. Lett.* 14:287-290.
- Wang, Y. and J. Li. 1998. Qualitative identification and quantitative determination of naringin in rhizome *Drynariae* by TLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* .23:685-686.
- Wang, Y. T. 1995. Medium and fertilization affect performance of potted *Dendrobium* and *Phalaenopsis*. *Hort. Technol.* 5: 234-237.
- Wang, Y.T. 1998. Impact of salinity and media on growth and flowering of a hybrid *Phalaenopsis* orchid. *HortSci.* 33: 247-250.
- Wee, Y.C., S. H. Kwa and C. S. Loh. 1992. Production of sporophytes from *Platyserium coronarium* and *P. ridleyi* frond strips and rhizome pieces culture *in vitro*. *American fern journal* 82: 75-79.
- Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca. 1993. Taxus callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 181-193.
- Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca. 1994. Taxus cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol. *J. Plant Physiol.* 144: 183-188.
- Yin, J., Y. Tezuka, K. Kouda, Q. L. Tran, T. Miyahara and Y. Chen. 2004. Kadota S. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol. Phar., Bull.* 27:583-586.
- Zatar, T.A., C. M. Weaver, Y. Zhao, B. R. Martin and M. E. Wastney. 2004. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 134:399-402.
- Zhou, F. R. and Z. Q. Zhang. 1994. Quality evaluation of 3 kinds of rhizome *Drynariae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19:261-263.