

國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士論文

Submitted in partial fulfillment of the requirements
for the Degree of Master of Science
in the School of Forestry and Resource Conservation
National Taiwan University

指導教授：王亞男 教授

Advisor : Dr.Ya-Nan Wang

喜樹組織培養與喜樹鹼誘導之研究

Studies on the tissue Cultures of
Camptotheca acuminata Decaisne
and Camptothecin induce

研究生：周宏祈

By : Hong-Chyi Jhou

中華民國九十四年六月
June, 2005

目錄

目錄.....	I
表目錄.....	II
圖目錄.....	V
中文摘要.....	VI
英文摘要.....	VII
縮寫字.....	VIII
壹、前言.....	1
貳、前人研究.....	2
一、喜樹之分布、形態及藥理成分.....	2
二、植物二次代謝物.....	6
三、植物組織培養生產二次代謝物.....	8
參、材料與方法.....	16
一、材料.....	16
二、方法.....	16
三、喜樹癒合組織之喜樹鹼測定.....	21
肆、結果與討論.....	24
一、喜樹組織養.....	24
二、喜樹鹼成份測定.....	33
伍、結論.....	61
陸、參考文獻.....	63
柒、照片.....	67
捌、附錄.....	81

表目錄

表一、利用植物組織或器官生產喜樹鹼-----	4
表二、細胞分化與否對生物鹼產率之影響-----	10
表三、光照與不同基礎培養基處理之組合表-----	18
表四、MS 培養基添加 NAA 與 BA 不同濃度之組合表-----	18
表五、MS 培養基添加 2,4-D 與 Kinetin 不同濃度之組合表-----	19
表六、MS 培養基添加 IBA 與 BA 不同濃度之組合表-----	19
表七、MS 培養基添加 Picloram 與 Kinetin 不同濃度之組合表-----	20
表八、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果-----	25
表九、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 Kinetin，在光照環境中進行癒合組織誘導結果-----	26
表十、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 IBA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果-----	27
表十一、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 Picloram 與 Kinetin，在光照環境中進行癒合組織誘導結果-----	28
表十二、喜樹胚培養在 NAA 與 BA 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表-----	29
表十三、喜樹胚培養在 2,4-D 與 Kinetin 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表-----	29
表十四、喜樹胚培養在 IBA 與 BA 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表-----	29
表十五、喜樹胚培養在 Picloram 與 Kinetin 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表-----	30
表十六、喜樹胚不同濃度 IBA 與 BA 0.5 mg/l 處理之芽體增殖結果-----	31
表十七、喜樹胚不同濃度 IBA 處理之根誘導結果-----	32
表十八、不同濃度 NAA 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表-----	38
表十九、不同濃度 NAA 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表-----	38
表二十、不同濃度 NAA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表-----	39
表二十一、不同濃度 NAA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表-----	39
表二十二、不同濃度 2,4-D 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分	

析表	
表二十三、不同濃度 2,4-D 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	41
表二十四、不同濃度 2,4-D 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表	41
表二十五、不同濃度 2,4-D 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	42
表二十六、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	42
表二十七、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	44
表二十八、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表	44
表二十九、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	45
表三十、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	45
表三十一、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	47
表三十二、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表	47
表三十三、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	48
表三十四、不同濃度水楊酸對喜樹細胞生長影響之變方分析表	48
表三十五、不同濃度水楊酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	51
表三十六、不同濃度水楊酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	51
表三十七、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹細胞生長影響之變方分析表	52
表三十八、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	54
表三十九、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之	54

鄧肯氏新多變域測驗結果表	-----55
表四十、不同濃度茉莉酸對喜樹細胞生長影響之變方分析表	-----57
表四十一、不同濃度茉莉酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	-----57
表四十二、不同濃度茉莉酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	-----58
表四十三、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹細胞生長影響之變方分析表	-----60
表四十四、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表	-----60
表四十五、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹細胞生產 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表	-----60

圖目錄

圖一、二次代謝物合成路徑圖-----	7
圖二、誘發劑對植物之影響-----	15
圖三、喜樹癒合組織在 MS 添加 2mg/l 液態培養基中，不同細胞接種量之懸浮培養生長曲線-----	33
圖四、喜樹鹼標準品之高效液層析圖-----	34
圖五、10-羥基喜樹鹼標準品之高效液層析圖-----	34
圖六、喜樹植物體之高效液層析圖-----	35
圖七、喜樹癒合組織之高效液層析圖-----	35
圖八、喜樹不同部位喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量-----	36
圖九、不同濃度 NAA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響----	37
圖十、不同濃度 2,4-D 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響----	40
圖十一、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響----	43
圖十二、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響-----	46
圖十三、不同基礎培養基及光照與否對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響-----	49
圖十四、添加不同濃度水楊酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響-----	51
圖十五、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響-----	54
圖十六、不同濃度茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響-----	57
圖十七、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響-----	59

中文摘要

喜樹 (*Camptotheca acuminata* Decaisne) 富含 camptothecin 與 10-Hydroxycamptothecin 等生物鹼成分。根據臨床研究報告指出，已證實其肺癌、乳癌及子宮頸癌具有一定程度之療效。

以胚為培植體誘導癒合組織結果顯示：胚在 MS 基礎培養基中添加 IBA 0.5mg/l 與 BA 4mg/l、Picloram 0.5mg/l 與 Kinetin 4mg/l、NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 及單獨添加 NAA 1mg/l 之處理下，可以得到較佳的癒合組織生長，其中以 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 此組合所誘導出癒合組織較為鬆軟且生長快速，可作為懸浮培養試驗的材料。在多芽體誘導方面，以 MS 基礎培養基添加 IBA 0.5 mg/l 與 BA 0.5mg/l 的誘導效果最佳。根的誘導則以 MS 基礎培養基添加 IBA 2 mg/l 效果最佳。

利用已建立喜樹癒合組織細胞懸浮培養系統，選擇水楊酸、幾丁質、茉莉酸、甲基茉莉酸等四種誘發劑，來探討其對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼生產的影響。添加 100 μ M 水楊酸於 MS 液態培養基中，經 7 天培養後 10-羥基喜樹鹼產量 887.49 μ g/g。而加入幾丁質懸浮液 2、3ml/25ml 至 MS 液態培養基中時，10-羥基喜樹鹼含量分別可達 2579.48 μ g/g 及 2502.70 μ g/g 效果較佳。另外茉莉酸濃度為 100 μ M 10-羥基喜樹鹼之含量可達 10246 μ g/g，為四種誘發劑當中效果最為顯著。而當甲基茉莉酸濃度為 200 μ M 時，10-羥基喜樹鹼之含量可達 3836.59 μ g/g。

Abstract

The *Camptotheca acuminata* Decaisne has many alkaloids, including camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin. According to clinical researches proved, it can resist lung, breast and uterine cervical cancers.

The results show callus were induced from embryo *in vitro* as follow: embryos of MS culture to join 0.5 mg/l NAA with 0.5 mg/l IBA and 4 mg/l BA 、 0.5mg/l Picloram and 4mg/l Kinetin can obtain the best growth result. The 4 mg/l NAA and BA 2mg/l this combination could induce embryos callus, this callus was the best growth result and soft, and this callus were used as materials for suspension culture among that treatment. Multiple buds occurred on MS medium containing 0.5 mg/l IBA and 0.5mg/l BA can to obtain the best result. Adventitious root occurred on MS medium containing 2 mg/l IBA can to obtain the best result.

The objective of this study used *Camptotheca acuminata* Decaisne callus cell suspension culture system, select salicylic acid, chitin and jasmonic acid, methyl jasmonate were tested. To added the salicylic acid 100 μ M can increased the 10-Hydroxycamptothecine content, after a week the 10-Hydroxycamptothecine content was 887.49 μ g/g. To added the chitin 2 ml/25ml and 3 ml/25ml to MS culture could increased the 10-Hydroxycamptothecine content was 579.48 μ g/g and 2502.70 μ g/g. To added the jasmonic acid 100 μ M can increased the 10-Hydroxycamptothecine content, after a week the 10-Hydroxycamptothecine content was 10246 μ g/g, for four elicitor in the presence of all effect was the most remarkable. When methyl jasmonate concentration to arrive 200 μ M , 10-Hydroxycamptothecine content was 3836.59 μ g/g.

縮寫字

(Abbreviation)

2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
ANOVA	Analysis of variance
BA	6-benzylaminopurine
C	chitin
CPT	camptothecin
CPT-10	10-Hydroxycamptothecin
DCW	dry cell weight
DMSO	dimethyl sulfoxide
DS	Delfel-Smith medium(Delfel <i>et al.</i> , 1980)
HPLC	high-performance liquid chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butyric acid
JA	jasmonic acid
LS MEAN	Least squares means
MJ	methyl jasmonate
MS	Murashiga and Skoog (1962)
NAA	1-naphthalene acetic acid
NN	Nitsch and Nitsch medium(1969)
PAL	phenylalanine ammonia lyase
PCV	packed cell volume
SA	salicylic acid

壹、前言

二次代謝物以往被認為是一種對人類無用的產物，然而經過研究及試驗，才發現它可應用於醫藥、香料、色素及食品添加物及殺蟲殺菌等，才漸漸受到人類的重視，以醫藥為例，取自植物者約佔 1/4，目前推估二次代謝物產值在全球市場超過百億美元。然而許多植物有用的二次代謝產物需要在特殊的環境下栽培，或因植物體本身生長非常緩慢，不易大量取得。此外植物二次代謝產物大多都為同分異構鏡射分子（Chiral molecules），不容易以一般的化學方法合成，有些雖能以化學方法合成也多不敷成本。利用植物細胞培養生產二次代謝產物，提供了可靠、可全年生產的來源、避免受地區、緯度、氣候、季節、土壤污染、病蟲害的威脅等因素影響，造成品質不定而難以掌控的狀況。故多年來，採用植物細胞培養來產生二次代謝產物，被認為是一種可大量生產之技術。然大多數植物細胞培養，其二次代謝物含量不高，或無法產生所需的成分，因此可藉由篩選優良細胞系、或植物生長調節劑的調控、培養基的組成、誘導物質的使用、培養環境的改變及基因工程的應用等等方式，來促進植物細胞生產大量或特殊之二次代謝物(蘇遠志等,1990)。

喜樹原產於中國大陸，根、樹皮、葉及果實均有抗癌之效，另外亦具散結、化瘀、清熱、解毒、殺蟲之效。1966 年 Wall 等人從中分離得到喜樹鹼。喜樹鹼在臨床上應用於治療胃癌、膀胱癌、白血病等，但有血尿及尿頻等副作用。10-羥基喜樹鹼用於治療肝癌、頭頸部腫瘤，副作用遠比喜樹鹼低（楊千瑩,2001）。

而為獲得其中有效成分，必須大量採集根、莖、葉、果實，除需耗費大量土地來種植之外，也易受到地區、緯度、氣候、季節、土壤污染、病蟲害的威脅等因素影響，造成品質不定而難以掌控的狀況。如果利用人工合成方式來生產這些化合物，需要經過許多步驟才能合成，並不符合經濟效益。因此，經由喜樹組織培養來生產喜樹鹼，或許可取代傳統栽植或化學合成這兩種方式，來生產喜樹鹼。

由於二次代謝物的生產機制極為複雜，有許多機制目前仍不清楚，但一般而言，二次代謝物通常受到逆境壓力時被誘導，因此良好的生長與二次代謝物的生產通常不能兼顧，但亦有例外的情況。因此採用不同植物生長調節劑與誘導劑，探討影響細胞生長及二次代謝物生產之因子，以期建立一套由喜樹癒合組織生產喜樹鹼的生產系統。

貳、前人研究

一、樹之分布、形態及藥理成分

喜樹 (*Camptotheca acuminata* Decaisne)，為旱蓮科旱蓮屬植物，原產中國，分布長江流域及南部、西南部地區，並多栽植。台灣地區最早於 1948 年由滕詠廷氏從杭州引入，供實驗或觀賞性栽植 (邱年永、張光雄,1992)。

喜樹為落葉性喬木。樹幹通直，樹皮灰色，幼枝及葉柄長帶紫紅色。葉互生，柄長 1~2 cm，葉片卵形至長橢圓形，長 10~25 cm，寬 5~12 cm，基部廣楔形，先端短尖形，全緣或微波緣，背面披短柔毛。花單性同株，多數簇生成頭狀花序，雌花序頂生，雄花序腋生。小花無梗，花冠綠白色。苞片 3 枚，披短毛。花萼杯狀先端 5 裂，花瓣 5 枚，外面密生毛。雄花具雄蕊 10 枚，2 輪。雌花子房下位，花柱 2~3 裂。瘦果窄矩圓形，若直條香蕉，長 2~2.5 cm，花柱宿存。花期 6~8 月。果期 9~11 月 (邱年永和張光雄,1992；劉業經等,1994)。

喜樹全株含喜樹鹼 (Camptothecine)。此外根尚含喜樹次鹼 (Venoterpine)，3,3',4-三甲基鄰沒食子酸 (3,3',4-tri-o-methylgallic acid)，穀固醇 (Sicosterol)， β -穀固醇 (β -sicosterol)。而幹材尚含羟基喜樹鹼 (Hydroxycamptothecine)，甲基喜樹鹼 (Methoxycamptothecine)。葉子另尚含沒食子酸 (gallic acid)，山奈酚 (Kacmpferol)，三葉草素，槲皮素。果實尚含去氧喜樹鹼 (Deoxycamptothecine)，白樺脂酸 (Betulic acid)，喜樹果鹼 (vincoside-lactam) 及多種甲基鞣花酸類成分 (邱年永、張光雄,1992)。

Camptothecine 為生物鹼類之化合物，最早是 Wall 從喜樹中分離而來 (Wall, 1966)，於喜樹 (*Camptotheca acuminata*)、白花蛇根草 (*Ophiorrhiza pumila*) 及青脆枝 (*Nothapodytes fetida*) 等植物中皆含有 Camptothecine。1957 年 Jonathan 發現喜樹之葉萃取物具高度的抗癌活性。Camptothecine 應用於臨床試驗如消化系統腫瘤，黑色素瘤等之治療並有部分成效，在臨床上已證明對數種具有很少或無化療敏感度之固體癌有顯著抗腫瘤活性，包括非小細胞癌，子宮頸癌，大腸癌。另外，它對其他具有化療敏感度之腫瘤亦有相當效果，如卵巢癌，小細胞肺癌 (邱年永和張光雄,1992；楊千瑩,200)。

10-Hydroxycamptothecine 為 Camptothecine 之天然衍生物，其第 10 位碳原子的氫被羟基取代。10-Hydroxycamptothecine 多累積在成熟種子、萌發的子葉、幼嫩的真葉等幼嫩組織中，隨組織進一步發育和成熟，其含量會快速減少，成熟組織含量極少 (Zu, 2003)。可選擇性地抑制拓撲異構酶 (Topoisomerase) 干擾 DNA 的複製，與其他常用的抗癌藥無交叉耐藥性，因而對耐藥性腫瘤有效。10-Hydroxycamptothecine 的抗癌作用相當於 Camptothecine 的 30 倍，主要用於消化系統癌症；胃癌、食道癌、結腸癌、直腸癌、肝癌等；對口腔及膀胱癌也有較好療效；對惡性葡萄胎，絨毛膜上

皮膚癌、肺癌、白血病，牛皮癬，疣，及血吸蟲病引起的肝脾腫大等也具有一定的療效。

最早利用喜樹組織培養生產喜樹鹼為 1974 年的 Sakato 和 Misawa 以莖為材料，培養於 MS 添加 2,4-D 0.5mg/l 及 Kinetin 0.1mg/l 誘導癒合組織含有 $2.54 \times 10^{-4}\%$ 喜樹鹼 (Sakato *et al.*, 1974)，1991 年 Sudo 等以 MS 添加 NAA 培養喜樹無菌苗含有 0.1% 喜樹鹼 (Sudo *et al.*, 1991)，1992 年 Van-Hengel 等則利用 MS 基礎培養基添加 NAA 4 mg/l 進行喜樹細胞懸浮培養來生產喜樹鹼 (Van-Hengel *et al.*, 1992)，1997 年 Wiedenfeld 等以喜樹胚為材料於 MS 培養基進行無菌苗栽植跟誘導癒合組織可獲得 0.086~0.236% 喜樹鹼及微量~0.08% 10-羥基喜樹鹼。另外亦有用青脆枝及白花蛇根草來生產喜樹鹼及 9-羥基喜樹鹼 (表一)。

表一、利用植物組織或器官培養生產喜樹鹼(改自 Wiedenfeld, 1997)

Space	Plant material	Media and growth regulators (mg/l)	Alkaloids detected	Content(%) (drt weight)	Ref.
	cell	MS+2, 4-D(0.1)+Kinetin(3)	C [*]	0.254×10 ⁻⁴	Sakato, <i>et al.</i> (1974)
<i>Camptotheca acuminata</i>	suspension culture				
	cell	MS+NAA(4)	C [*]	4×10 ⁻³	Van-Hengel <i>et al.</i> (1992)
<i>Camptotheca acuminata</i>	suspension culture				Van-Hengel <i>et al.</i> (1994)
	plantlets	MS+NAA(0.1 μ M)	C [*]	0.1	
<i>Camptotheca acuminata</i>					Sudo <i>et al.</i> (1991)
	callus Vp ^{***}	MS+NAA(4)+BA(2)	C [*] H [*]	0.232 0.08	Wiedenfeld <i>et al.</i> (1997)
	callus Vp ^{***}	DS+NAA(10)+Kinetin(1) ^{**}	C [*] H [*]	0.236 0.08	
	callus Vp ^{***}	MS+IBA(0.05)+IBA(0.05)	C [*] H [*]	0.199 0.01	
	shoots Vp ^{***}	MS+IBA(0.05)+BA(0.05)	C [*] H [*]	0.199 0.01	
<i>Camptotheca acuminata</i>	callus VIp ^{***}	DS+NAA(10)+Kinetin(1) ^{**}	C [*] H [*]	0.228 0.021	
	callus VIIp ^{***}	MS+NAA(4)+BA(2)	C [*] H [*]	0.204 trace	
	leaves of plantlets VIIp ^{***}	NN+IBA(0.5)+Kinetin(0.1) ^{**}	C [*] H [*]	0.086 trace	
	plantlets VIIp ^{***}	NN+IBA(0.5)+Kinetin(0.1) ^{**}	C [*] H [*]	0.119 trace	
	callus VIIp ^{***}	MS+NAA(10)+kinetin(1)	C [*] H [*]	0.149 trace	

※ C : Camptothecin、H : 10-hydroxyc、M : 9-methoxyc

※※ NN : Nitsch and Nitsch medium、DS : Delfel-Smith medium

※※※ Vp、Vip、VIIp

	plantlets	MS+NAA(0.1)+kinetin(1)	C [※]	trace	
<i>Nothapodytes foetida</i>			M [※]	0.7×10 ⁻³	Roja <i>et al.</i> (1994)
	callus	MS+2,4-D(2)+BA(1)	C [※]	trace	
			M [※]	0.1×10 ⁻³	
<i>Nothapodytes foetida</i>	callus	MS+ Picloram(2)+BA(1)	C [※]	5.044×10 ⁻³	楊千瑩 (2001)
			M [※]	1.011×10 ⁻³	
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	callus	MS+ Picloram(2)	C [※]	trace	Kitajima <i>et al.</i> (1998)
			M [※]	1	
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	callus induction	MS+ Picloram(2)	C [※]	9.5×10 ⁻⁴	Giddi and Shuler (2000)
	seed		M [※]	trace	
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	callus induction	MS+ NAA(2)	C [※]	3.5	Fulzele <i>et al.</i> (2001)
	shoot		M [※]	2.6	

※ C : Camptothecin 、H : 10-hydroxyc 、M : 9-methoxyc

二、植物二次代謝物

植物生長時會合成一些生長、生存不可或缺的物質，且為全部植物體所共有，此稱為一次代謝物，此類物質包含了碳水化合物、蛋白質、脂肪酸、核酸等；然而植物在生長過程中，也會合成一些化學構造複雜，非所有植物體或植物細胞均具有，且其功能不明確，而對植物生長、生存並沒有直接的關係，此類物質統稱為二次代謝物，此類物質則包含了萜類、黃酮類、皂素、配糖體、酚類、生物鹼等等。

二次代謝物以往被認為是一種對人類無用的產物，然而經過研究及試驗，才發現它可應用於醫藥、香料、色素及食品添加物及殺蟲殺菌等，才漸漸受到人類的重視，以醫藥為例，取自植物者約佔 1/4，目前推估二次代謝物產值在全球市場超過百億美元。然而許多植物有用的二次代謝產物需要在特殊的環境下栽培，或因植物體本身生長非常緩慢，不易大量取得。此外植物二次代謝產物大多都為同分異構鏡射分子(Chiral molecules)，不容易以一般的化學方法合成，有些雖能以化學方法合成也多不敷成本。利用植物細胞培養生產二次代謝產物，提供了可靠、可全年生產的來源、避免受地區、緯度、氣候、季節、土壤污染、病蟲害的威脅等因素影響，造成品質不定而難以掌控的狀況。故多年來，採用植物細胞培養來產生二次代謝產物，被認為是一種可大量生產之技術。然大多數植物細胞培養，其二次代謝物含量不高，或無法產生所需的成分，因此可藉由篩選優良細胞系、或植物生長調節劑的調控、培養基的組成、誘導物質的使用、培養環境的改變及基因工程的應用等等方式，來促進植物細胞生產大量或特殊之二次代謝物。

植物二次代謝物的生合成包含下列三大路徑：

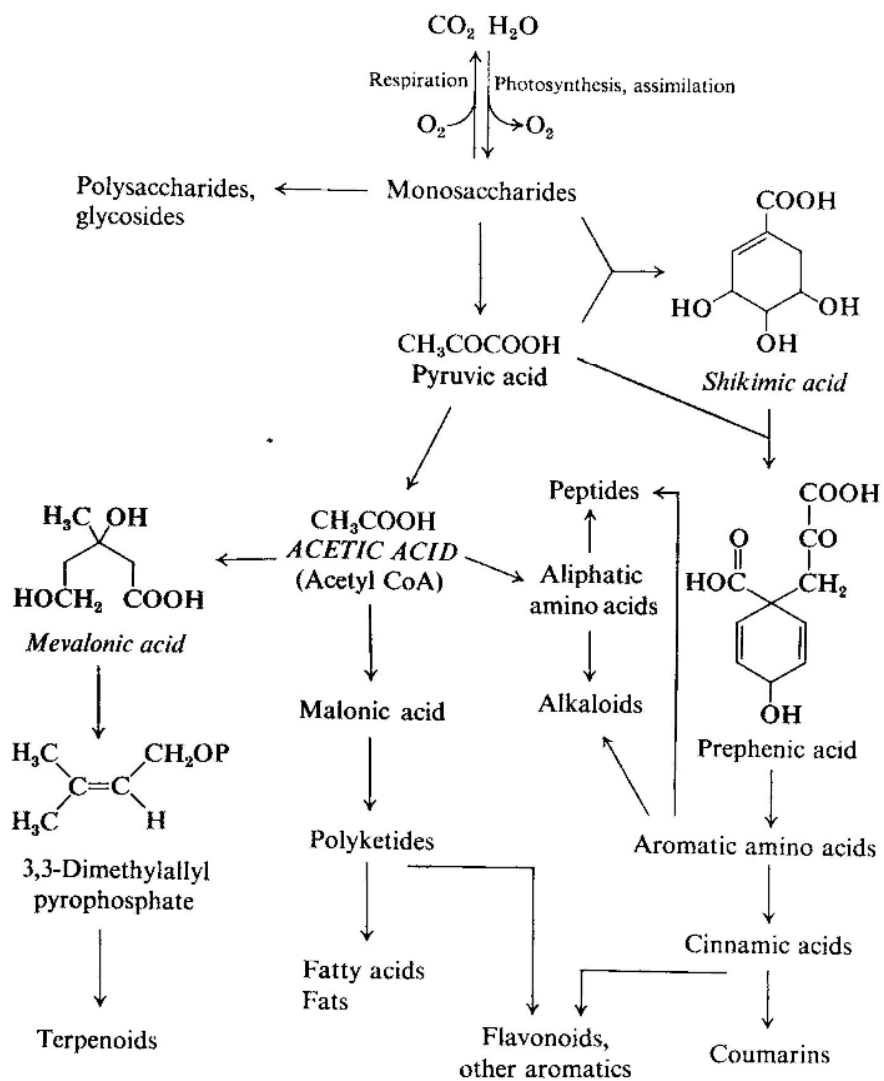
(一) shikimic acid pathway

(二) polyketide pathway

(三) mevalonic acid pathway

上述三大路徑之名稱來由自三種重要的中間產物，分別是 shikimic acid、polyketide 及 mevalonic acid。一次代謝物方面如：醣類(polysaccharides)，經由單醣(monosaccharides)轉變而來；蛋白質(peptides)，來自 shikimic acid 及乙酸(acetic acid)；脂肪(fats)，來自 polyketides。

至於其他的二次代謝物方面，萜類(terpenoids) 經由 mevalonic acid，脂肪酸(fatty acids) 經由 polyketides，黃酮類(flavonoids)及部份芳香族化合物(aromatics)來自 shikimic acid 及 polyketides，香豆素(coumarins) 經由 shikimic acid，生物鹼(alkaloids)來自 shikimic acid 及乙酸 (Torsell,1983) (圖一)。



圖一、二次代謝物生合成路徑圖 (Torrsell, 1983)

三、植物組織培養生產二次代謝物

(一) 高產率培植體的篩選

為使植物組織培養生產有用代謝物之效率提高，有用物質高生產株的篩選確立，是非常重要之工作。

篩選工作主要有：高目標成分植物個體選拔、變異之誘導、使細胞組織均一化、找出簡便迅速之目標物質檢定方法。

一般而言高生產株的篩選方法，可分成優良細胞株選拔、分化組織選拔兩大類，分別介紹如下：

1、優良細胞株選拔

對於二次代謝物的生產，細胞本身是否具備有高特定代謝物產量的合成能力，為決定此程序是否具有發展潛能的一大要件。雖然植物體本身有合成二次代謝物的能力，但不一定表示由植物體誘導的癒合組織或懸浮細胞亦具有相同的合成能力。所以我們必須先做篩選的工作，篩選的方法可以從簡單的細胞外觀，如：顏色及形態的不同，或進一步分析其二次代謝物的含量及對特殊環境的耐受性來作為篩選的根據。

除了篩選出高產率的細胞系外，對於懸浮細胞，亦應考慮其細胞顆粒是否細緻、均勻，因植物細胞有集塊的現象，不僅影響養份的傳遞，尤其在反應器操作上，對攪拌、取樣及輸送等皆有不利的影響，故獲得均勻之懸浮細胞，亦為篩選時所應加以考慮的。

以 *Taxus chinensis* 不同細胞株其 taxoids 的含量最高與最低相差高達 40 倍以上，故經由優良細胞株選拔找出高產率的細胞株為二次代謝物生產非常重要工作。

2、分化組織選拔

植物之莖、葉、不定根或毛狀根等分化組織亦可仿高產率細胞株選拔方式找出生長快速、高產率的生產株，且較細胞培養易篩選出安定之高產率生產株。

以毛狀根為例，首先，將含 Ri 質體之農桿菌 (*A. rhizogenes*) 接種至植物體上，待毛狀根誘發後，把毛狀根之尖端切下，移入不含植物生長調節劑之培養基中培養，選出生長快速之毛狀根，再將其根尖切下移入同樣之培養基培養，反覆數次可獲得無需植物生長調節劑也能快速增殖之毛狀根；之後，再將增殖快速之毛狀根移入含抗生素之培養基以去除農桿菌，待取得無菌之毛狀根後，再反覆切下根尖大量增殖建立不同之毛狀根系，而後將從不同毛狀根系利用 HPLC、TLC、GC 等儀器分析，即可篩選出高產量目標物的毛狀根系，如此就可獲得生長快速、高產量之毛狀根系。

（二）影響二次代謝物生產之因素

影響二次代謝物的合成及產量的因素有很多，如植物細胞本身的特性或培養基的組成，如：碳源、氮源、磷酸鹽、微量元素、維他命、植物生長調節劑及前驅物；外在環境：如，光、溫度、pH、及通氣條件；固定化、接種密度、生長速率、代謝路徑及酵素活性的調節、誘導作用等。爲了能提高產物的產量，可針對上訴幾種因素加以交互調整應用。

1.材料

（1）分化情形

依生產二次代謝物的植物培養形式，可略分爲細胞培養及器官培養兩大類；細胞培養是由植物組織或器官，因植物生長調節劑之逆分化作用，產生癒合組織而建立，是由未分化之細胞或細胞團所組成，具有生長快速之優點，加上因其形態與微生物相似，故可參考微生物發酵操作之技術與經驗，因此，早期植物生產二次代謝物的研究，多以細胞培養爲之，但生長過於快速加上植物生長調節劑刺激故其突變性甚高，因而無法精準掌控產物品質與產量，故一般細胞培養每 1-2 年即須重新建立系統；此外，許多二次代謝物須在分化組織內才能生產或累積，在細胞培養中含量極低或根本沒有，器官培養則與細胞培養相反，它具有生化與形態的分化，因此產物與原植株相似，但器官培養的建立較細胞培養困難，而且生長緩慢，加上不易大規模培養，故器官培養形式較常在高價值之二次代謝物的生產（表二）。

（2）細胞組織年齡

一般二次代謝產物量通常與細胞生長天數有關，甚至與添加前趨物或誘發劑的最佳期間有關，所以細胞懸浮培養生長曲線的建立不可或缺。

一般細胞生長曲線可分爲遲滯期(lag phase)、對數增殖期(logarithmic growth phase)、生長靜止期(stationary phase)、死亡期(death phase)，而不同的培植體、培養基種類與細胞接種密度，均會影響生長曲線和各生長期的長短，若能預先了解則有助於細胞組織的培養及二次代謝產物的生產。二次代謝產物與細胞生長關係有下列情形：

- A.細胞生長時二次代謝產物含量低或無，直到生長靜止期、死滅期，才達到最大值。
- B.二次代謝產物會隨細胞生長而增加。
- C.二次代謝產物增加會較細胞生長稍延遲。

二次代謝產物的合成時期，會隨植物種類、產物種類而有所變化，而大多數，細胞內二次代謝物累積量最高時期通常出現在生長靜止期。

表二、細胞分化與否對生物鹼產率之影響（田中秀夫等,1992）

植 物	培養方法	alkaloid 含量 [%DW]			文 獻
		scopolamine	hyoscyamine	總含量	
<i>Atropa belladonna</i>	C	0.0004	0.00024		Eapen, <i>et al.</i> (1978)
	R	0.014	0.13		Hashimoto & Yamada (1986)
	R	0.08	0.55		Jung & Tepfer (1987)
	HR	0.024	0.37		Kamada, <i>et al.</i> (1986)
	HR	0.09	0.95		Jung & Tepfer (1987)
<i>Datura innoxia</i>	C	—	—	0.002-0.018	Konoshima, <i>et al.</i> (1970)
	R	0.04	0.23		Hashimoto & Yamada (1986)
	HR	0.024	0.22		Knopp, <i>et al.</i> (1988)
<i>Datura stramonium</i>	C	—	—	0.008-0.018	Konoshima, <i>et al.</i> (1970)
	R	nd	0.26		Hashimoto & Yamada (1986)
	HR	—	0.3		Payne, <i>et al.</i> (1987)
	HR	0.013	0.4		Knopp, <i>et al.</i> (1988)
<i>Duboisia leichhardtii</i>	C	nd	nd		Kagei, <i>et al.</i> (1980)
	C	0.0005*	0.002*		Yamada & Endo (1984)
	R	0.37	0.16		Yamada & Endo (1984)
	R	0.29	0.17		Hashimoto & Yamada (1986)
	HR	1.8	0.41		Mano, <i>et al.</i> (1989)
<i>Hyoscyamus muticus</i>	C	—	—	0.000-0.0067	Koul, <i>et al.</i> (1983)
	C	0.0028	—		Fankhauser, <i>et al.</i> (1986)
	R	0.163	0.084		Hashimoto & Yamada (1986)
	HR	—	0.4-0.5		Flores & Filner (1985)
<i>Hyoscyamus niger</i>	C	0.002	0.01		Yamada & Hashimoto (1982)
	C	0.005	0.08		Sato, <i>et al.</i> (1982)
	R	0.12-0.30	0.04-0.08		Hashimoto & Yamada (1983)
	R	0.11-0.21	0.019-0.024		Hashimoto, <i>et al.</i> (1986)
	HR	0.00-0.13	0.01-0.32		Knopp, <i>et al.</i> (1988)
<i>Scopolia japonica</i>	C	—	—	0.006	Konoshima, <i>et al.</i> (1967)
	HR	0.1-0.3	0.5-0.65		Mano, <i>et al.</i> (1986)

* C：癒合組織 R：不定根 HR：毛狀根

2.基因轉殖材料

因植物二次代謝物生產過程中會受到各種基因或酵素調控之影響而導致產物量的多寡、及產物的種類產生變化，故可藉由基因操縱去改變二次代謝物之合成途徑，進而提高目標產物的產率或產生所需的目標產物。基因操縱主要是藉由下述方法促進產物的合成：

(1)引入構造基因，加強重要合成路徑中的酵素作用。

(2)改變調節基因，調控整體酵素的作用。

以銀杏為例若利用農桿菌（A4）感染，進行基因轉殖，將會改變產物的合成途徑，使各種產物的合成量發生變化（Dominique *et al.*,1997）。

3.環境

一般用於細胞生長的培養基，對於二次代謝物的誘導，功效不大，因此許多研究乃嘗試改變培養基配方，結果發展了誘導二次代謝物、提高二次代謝物產量的「誘導介質」或「生產介質」；這些「誘導介質」或「生產介質」應用於「二階段」策略的「生產階段」，成效顯著，其中影響最大的因子有植物生長調節劑、無機鹽類、碳源、pH、光照與溫度等。將其影響之環境因素分別說明如下：

(1)光

光照的強度、時間與波長範圍均可影響二次代謝物之生產，其中尤以對色素之生產影響最明顯；許多研究顯示一些關鍵酵素的活化與光照息息相關，但也有些系統在黑暗處理時，二次代謝物產量較高(田蔚城,1996)。

Sato *et al.*,(1996)研究顯示光照能誘導草莓的癒合組織生產花青素，而黑暗處理則無花青素的生成，推論其原因可能是光照會增加 PAL（phenylalanine ammonia lyase,PAL）的活性而使花青素大量合成。

(2)溫度

溫度對生長或生產皆很重要，一般最適條件在 10℃到 30℃之間，因種類不同而異；但對某些系統，冷處理或熱處理卻可能有極佳之效果。

以三尖杉（*Cephalotaxus fortune*）癒合組織生產 harringtonine 與 homoharringtonine 為例，發現低溫（10℃）會使的 harringtonine 與 homoharringtonine 的產量達到最高，但會抑制癒合組織的生長；反之，在 25℃環境中培養癒合組織可獲最佳之生長，不過 harringtonine 與 homoharringtonine 的產量僅低溫環境培養的 1/8 (Zhange *et al.*,1998)。

此外何時開始變溫亦會影響產物的產量，以 *Taxus chinensis* 為例，在培養的第 14 天變溫處理產物的產量會高於對照組或在其它時間進行變溫處理 (Choi *et al.*,2000)。

(3)pH

培養基的 pH 值可影響植物二次代謝物的生成速率、產物種類及其在細胞內之累積或外釋；細胞內 pH 值通常並不隨外在 pH 的變化而改變，但外在 pH 值太高 (>7.5) 或太低 (<4.5) 時，胞內 pH 值，尤其液泡內的 pH 將受影響，許多胞內酵素活性也因此而改變，進而影響二次代謝產物之生產 (Ohana *et al.*,1992)。pH 值對二次代謝物在細胞內之累積或外釋的影響，主要由於二次代謝物存在形式之改變，例如植物鹼在酸性的液泡中以陽離子之形式存在，不易穿透過細胞膜，故利於胞內累積，若 pH 值上升，則中性植物鹼分子形成，有助於穿過胞膜而外釋，故不利累積在胞內 (Renaudin *et al.*,1985)。 *Taxus brevifolia* 培養過程中若能將 pH 調控在 6.5 左右則可提高 taxol 產量，但若將 pH 調高則將不利細胞生長與 taxol 的生產 (Collins-Pavao *et al.*,1996)。

4.培養基

(1)無機鹽類

各種無機鹽類中，以氮源及磷鹽對二次代謝物之影響最大；培養基中磷鹽減少時，多種植物培養的生長均受抑制，而其二次代謝物則可因此被有效誘發；突然增加磷鹽的供給，對某些植物培養的二次代謝物亦具誘發作用。常用的氮源包含 NO_3^- 及 NH_4^+ 等不同形式，實驗發現其供應的形式與總濃度皆對二次代謝物有影響，但結果則隨植物種類不同而異。以銀杏為例添加 1.25mM 的磷酸鉀有利於 Ginkgolide B 的產生 (苗迺蕙,1998)。

另外無機鹽類中的鉀、鈣、鎂、硫等離子亦會影響二次代謝物的生產。

(2)碳源（醣類）

碳源主要來自醣類，醣類另能提供能量與具調節滲透壓之功能。常用的醣類有蔗糖、果糖、葡萄糖、麥芽糖等。不同碳源會影響植物細胞培養時二次代謝物的生成。

蔗糖是植物組織培養最常用的碳源，它對二次代謝物的產量有明顯影響，通常提高其濃度可以增加產量；若以葡萄糖為碳源，則產物的種類及含量均可能改變，在某些系統中，二次代謝物甚至只在含葡萄糖的條件下才可能產生。

不同碳源對二次代謝產物，如銀杏生產銀杏內酯，在培養基添加 2% 蔗

糖時銀杏內酯產量會達 61.9mg/gDCW(Dry cell weight)高於添加 1% 葡萄糖 56.9 mg/g DCW。至於不同滲透壓對二次代謝物影響，如 *Taxus chinensis* 在添加 6% 蔗糖的培養基其產物的量會高於添加 3% 蔗糖培養基，但若以蔗糖加甘露醇或山梨醇來調控滲透壓使其與 6% 蔗糖滲透壓相同，則添加 6% 蔗糖其產物的產量依然最高，不過其產物的產量若與添加 3% 蔗糖相比則還是較高，這表示提高滲透壓有利於二次代謝物生產，但碳源若不足則還是不利於二次代謝物生產 (Kim *et al.*, 2001)。

(3)植物生長調節劑

植物生長調節劑中，以生長素類 (auxin) 對植物培養的二次代謝物影響最大，它們通常對二次代謝物有抑制作用，其中尤以 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 為最 (Morris *et al.*, 1985)，推測原因可能為 2,4-D 促進 phenylalanine 轉變成其它 amino acids，使得 phenylalanine 減少，而改變整個代謝途徑的走向，以花青素為例，phenylalanine 在苯基丙酸類路徑中經由 PAL 啟動產生 4-coumaroyl CoA，而 4-coumaroyl CoA 為花青素之前驅物，故 phenylalanine 減少會連帶使花青素合成量減少 (Makunga *et al.*, 1997)。早期細胞培養的產物含量極低，主要原因即為 2,4-D 被廣泛使用；另一類常用的植物生長調節劑—細胞分裂素 (cytokinins) 對二次代謝物的影響不如 auxins 那麼強烈，但仍須仔細調控使用，以減少干擾。

(4)誘引物質

經由「誘發劑」(elicitor)之刺激，是目前最有效的二次代謝物之誘發機制，在某些系統裏，經由「誘發劑」的誘導後，二次代謝物的產率可提高 40 倍之多 (Eilert *et al.*, 1986)。所謂「誘發劑」，廣義而言乃泛指能夠誘導植物細胞中一種或幾種反應，並形成植物過敏反應 (hypersensitive reaction, HR) 的分子。誘發劑能改變二次代謝途徑通量和反應速率，進而提高二次代謝物的產量，依其來源而分，有生物性誘發劑 (biotic elicitor) 及非生物性誘發劑 (abiotic elicitor) 兩大類。無論生物性或非生物性誘發劑，其鑑定與分離，皆須藉助生物檢驗，實際操作時，則以受測物質對下列常見的二次代謝物表徵的誘發能力為測量標準：

A.植物抗毒素 (phytoalexin) 之生成與累積：

植物抗毒素是植物受外來刺激 (如病原菌之侵襲) 時產生的低分子量物質，其生成與二次代謝物的誘發息息相關，而人們對其了解、研究亦較深入，許多由真菌類或豆類、菸草等植物而來的「誘發劑」，皆是藉由監測其植物抗毒素的誘發能力，而得以被分離出來。植物抗毒素活性的增強可能與特定基因在轉錄階段之活化有關 (Scheel, 1990)，因此，它亦被廣泛應用於基因-訊號關係的研究。

B.生長抑制劑之生成：

二次代謝物之誘發常與植物的防禦系統相關，當受到外來侵擾時，植物細胞會分泌許多分解酵素，以抑制入侵病菌的生長，其中較重要的有 chitinases， β -glucanases 及一些氧化劑，如 H_2O_2 等(Apostol *et al.*,1988)，因此可作為誘引物質誘發能力測量標準。

C.植物細胞壁之變化：

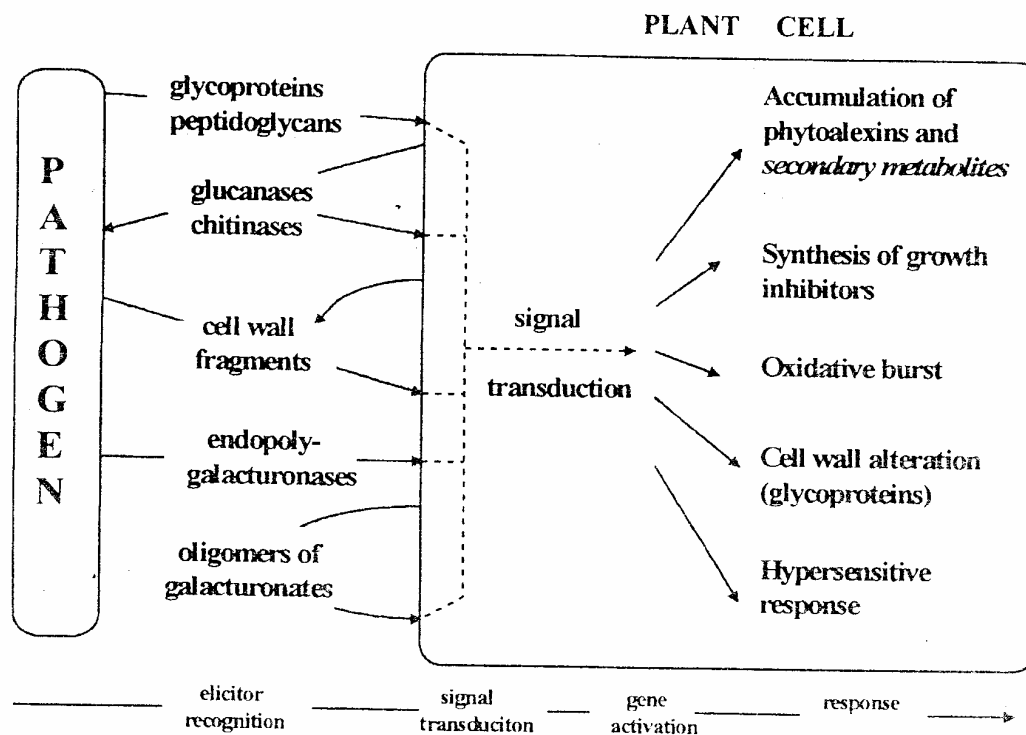
植物細胞在受到外來侵擾後，細胞壁會有各種物質附著沈積，以強化其抵抗能力，常見的有 extensin(一種 hydroxyproline-rich glycoproteins)，callose(一種 β -1,3-glucan)及 lignins(Ho,1994)，以此亦可顯示其誘發能力。

D.植物組織的過敏反應(Hypersensitive Response, HR)：

在很多情況下，植物的局部組織受到外來侵擾後，鄰近的細胞會迅速死亡，以防止入侵病菌的進一步擴散，這種現象稱為過敏反應。Bailey(1982)認為這是由於受侵擾的組織會散發特有的訊號物質，誘發鄰近細胞的產生二次代謝物，此乃大量的抑制劑產生所致。

根據上述二次代謝物之表徵，許多「誘發劑」已被鑑定、分離出來，目前已知的生物性誘發劑，有自真菌細胞壁分離的 β -1,3 及 β -1,6 寡糖，各種醣蛋白、蛋白聚醣、一些病原菌產生的毒性物質，植物細胞壁分解後產生的 galacturonic acid oligomers、conidia chitosan oligomers、polygalacturanase，及從酵母分解而來的 glucan、cellulase 等。以 *Taxus chinensis* 為例，添加真菌抽出物有利 taxol 的生產，若合併水楊酸(salicylic acid)更可提高 taxol 產量(Yu *et al.*,2001)，另外添加茉莉酸或甲基茉莉酸亦有利於多種二次代謝物的誘發(Johan *et al.*,2001)；非生物性的誘發劑包括 oxalate、cupric sulfate、重金屬離子、polyamines、organic osmolytes 及 canadyl sulfate 等。在利用 *Taxus chinensis* 生產 taxol 過程中添加鑷離子(La^{3+})雖不利於細胞生長，但將有助於 taxol 的合成，並可使 taxol 釋放至培養基中，如此將有利於細胞與產物的分離(Wang *et al.*,1999)。

生物性誘發劑中，由病原菌分泌者稱為外生性誘發劑(exogenous elicitor)，而由植物細胞本身產生者，稱為內生性誘發劑(endogenous elicitor)。在自然界中，外生性誘發劑之侵擾，可誘使植物體釋放大量的內生性誘發劑，因而放大了植物防禦系統的誘發訊號，植物細胞群藉此得以自保，而二次代謝作用亦於同時旺盛進行(圖二)。據研究顯示，在「誘發劑」刺激後，植物生物質量的累積即呈停頓，而代謝流向明顯改變(Ho,1994)，這些現象提供了代謝工程研究的良好工具，也是未來發展之希望所繫。



圖二、誘發劑對植物所引起的生理生化反應（田蔚城,1996）

參、材料與方法

一、材料

2001-2004 年 10、11 月採自台灣大學校總區森林環境暨資源系館、地質系、作物標本園所採得喜樹種子，去除種皮(seed coat)及內種皮(tegmen)取其長約 1.5cm 的胚進行培養。

二、方法

(一) 表面消毒

喜樹種子，以安期消毒液【Anticeptol solution 成分: Benzelthyonium chloride U.S.P 10%(w/v)、Alkyl arylpolyther alcohol 10%(w/v)】稀釋五百倍清洗，然後於 70%酒精浸泡 30 秒，而後以次氯酸鈉(NaOCl)消毒，並置於超音波震盪器震盪 10 分鐘，最後以無菌水沖洗 3 次。

(二) 培養基

培養基的配製為，先於二次蒸餾水加入各種基礎培養基的巨量、微量無機鹽類，以及不同的有機物質之儲存液。完全混合後，再添加蔗糖及植物生長調節劑(NAA、2,4-D、IBA、Picloram、BA、Kinetin)，並定積。以 1N 及 0.1N 的 NaOH 或 HCl 調整 pH 值(5.6)後，添加 0.7%之 Difco agar 作為支持物，以微波爐將 agar 煮溶後，分瓶封裝(125ml 三角錐型瓶裝入 50ml 培養基)。置入高壓高溫殺菌釜以 121°C 1.2kg/cm²之高壓高溫殺菌 10 分鐘，靜置至冷卻、凝固後使用。不同基礎培養基及培養基之各種植物生長調節劑處理如下

1. 固體培養

(1) 不同基礎培養基試驗

將胚接種於 MS(Murashiga and Skoog 1962)、WPM (Loyd and McCown 1980)、B5(Gamborg *et al.*, 1968)等不同基礎培養基，並添加 4 mg/l NAA, 2 mg/l BA。

(2) 不同種類及濃度植物生長調節劑試驗

以胚為培植體培養於 MS 基礎培養基添加不同植物生長調節劑組合

NAA:0、1、2、4、6 mg/l, BA:0、0.5、1、2、4 mg/l

2,4-D:0、0.5、1、2、4 mg/l, Kinetin:0、0.5、1、2、4 mg/l

IBA:0.1、0.5、1、2、4 mg/l, BA:0、0.5、1、2、4 mg/l

Picloram:0.1、0.5、1、2、4 mg/l, Kinetin:0、0.5、1、2、4 mg/l

2.液態培養

以 MS 為基礎液態培養基，添加 NAA 2 mg/l 蔗糖 2%，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 25ml。接種不同濃度(0.5g/25ml、1g/25ml、2g/25ml、4g/25ml)細胞。

3.添加誘發劑

(1) 誘發劑之配置

A. 膠態幾丁質(chitin)之配置

將 5g 幾丁質粉末在 50ml 去離子水中研磨，讓幾丁質懸浮於水中，緩慢加入 100ml 濃硫酸溶解（10℃環境下），離心去除不溶解雜質，將離心所得黏稠溶液緩慢滴入 900ml 去離子水，再利用透析膜進行透析，待透析到溶液 pH 調整為 5-6 為止，並以氯化鋇檢測是否殘留硫酸根。最後以去離子水調成 0.3%（w/w）懸浮液，以 121℃，15 分鐘殺菌備用（參閱蔡建欣,1997）。

B. 水楊酸(salicylic acid)

以 95%酒精溶解水楊酸，再以去離子水配置成 1000mg/l 溶液，以 0.45 μ m 過濾膜過濾備用。

C. 茉莉酸(Jasmonic acid)

以 95%酒精溶解茉莉酸，再以去離子水配置成 1000mg/l 溶液，以 0.45 μ m 過濾膜過濾備用。

D. 甲基茉莉酸(methyl jasmonate)

以 95%酒精溶解甲基茉莉酸，再以去離子水配置成 1000mg/l 溶液，以 0.45 μ m 過濾膜過濾備用。

(2) 不同濃度誘發劑

於接種第七天分別加入 4 種誘發劑調整成下述濃度，

膠態幾丁質 3%（w/w）懸浮液：添加 1、2、3 ml/25ml

水楊酸：調整濃度為 50 μ M、100 μ M、200 μ M

茉莉酸：調整濃度為 50 μ M、100 μ M、200 μ M

甲基茉莉酸：調整濃度為 50 μ M、100 μ M、200 μ M

在培養時每天測定其細胞生長情形並於第 14 天測定喜樹鹼生產情形，以上試驗均為三重複。

(三) 培養環境

1. 固體培養環境

培養室溫度為 25±1℃恆溫，光照強度約為 25 μ E/m²/s，光週期 16 小時。暗培養則於同一環境下，另以暗室培養之。

2. 液態培養

培養環境條件者同固體培養環境，以水平迴轉式震盪器震盪培養，轉速 80rpm。

(四) 試驗項目

1. 癒合組織誘導

使用下列不同基礎培養基及光照、植物生長調節劑濃度組合之培養基，每一培養基中置入 3 個培植體，並在培植體表面以解剖刀進行創傷處理，以促進癒合組織的形成。經過 1 個月的培養後，觀察所產生癒合組織的種類及形態，並紀錄產生癒合組織之培植體個數，進行癒合組織誘導率之計算。試驗組合列表如（表二～表六）

表二、光照與不同基礎培養基處理之組合表

光照與否	不同基礎培養基		
	MS	WPM	B ₅
光照	LMS	LWPM	LB ₅
黑暗	DMS	DWPM	DB ₅

表三、MS 培養基添加不同濃度 NAA 與 BA 之組合表

培養基代號		NAA(mg/l)				
		0	1	2	4	6
BA (mg/l)	0	BN1	BN2	BN3	BN4	BN5
	0.5	BN6	BN7	BN8	BN9	BN10
	1	BN11	BN12	BN13	BN14	BN15
	2	BN16	BN17	BN18	BN19	BN20
	4	BN21	BN22	BN23	BN24	BN25

表四、MS 培養基添加不同濃度 2,4-D 與 Kinetin 之組合表

培養基代號		2,4-D(mg/l)				
		0	0.5	1	2	4
Kinetin (mg/l)	0.1	KD1	KD2	KD3	KD4	KD5
	0.5	KD6	KD7	KD8	KD9	KD10
	1	KD11	KD12	KD13	KD14	KD15
	2	KD16	KD17	KD18	KD19	KD20
	4	KD21	KD22	KD23	KD24	KD25

表五、MS 培養基添加不同濃度 IBA 與 BA 之組合表

培養基代號		IBA (mg/l)				
		0.1	0.5	1	2	4
BA (mg/l)	0	BIBA1	BIBA2	BIBA3	BIBA4	BIBA5
	0.5	BIBA6	BIBA7	BIBA8	BIBA9	BIBA10
	1	BIBA11	BIBA12	BIBA13	BIBA14	BIBA15
	2	BIBA16	BIBA17	BIBA18	BIBA19	BIBA20
	4	BIBA21	BIBA22	BIBA23	BIBA24	BIBA25

表六、MS 培養基添加不同濃度 Picloram 與 Kinetin 之組合表

培養基代號		Picloram (mg/l)				
		0.1	0.5	1	2	4
Kinetin (mg/l)	0	KP1	KP2	KP3	KP4	KP5
	0.5	KP6	KP7	KP8	KP9	KP10
	1	KP11	KP12	KP13	KP14	KP15
	2	KP16	KP17	KP18	KP19	KP20
	4	KP21	KP22	KP23	KP24	KP25

2. 多芽體誘導試驗

以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度 IBA 搭配 BA 0.5 mg/l，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 50ml。每瓶置入 3 個培植體待 30 天後，觀察並記錄其芽體增殖情形。

3. 根誘導試驗

以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度 IBA，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 50ml。每瓶置入 3 個培植體待 30 天後，觀察並記錄根誘導情形。

4. 懸浮細胞培養接種濃度試驗

以 MS 為基礎液態培養基，添加 NAA2 mg/l 蔗糖 2%，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 25ml。選取生長良好的懸浮細胞，以無菌尼龍網 30-60 目(mesh) 過篩去除大顆粒細胞團，秤取 0.5、1、2、4g，置於含 25ml 液態培養基之 125 錐形瓶中進行培養。每天測量一次，觀察並記錄其細胞沈降體積 (Packed Cell Volume, PCV) 的變化。

5. 添加不同誘發劑試驗

於 MS 液態培養基 (含 NAA2 mg/l 蔗糖 2%) 添加上述不同誘發劑，以 125ml 三角瓶分裝，每瓶 25ml。選取生長良好的懸浮細胞，以無菌尼龍網 30-60 目(mesh)(0.56X0.42mm) 過篩去除大顆粒細胞團，秤取 5g，置於液態培養基中進行培養。待第 7 天添加不同不同濃度之誘發劑，第 14 天取出，測定癒合組織生長量及喜樹鹼生產情形。

(五) 乾重稱量

取新鮮細胞，以冷凍乾燥機進行凍乾，凍乾 72 小時後，取出測其重量。

(六) 統計分析

本試驗以完全隨機設計(Complete Randomized Design)，進行變異數分析(Analysis of Variance)，如處理間達顯著水準($\alpha=0.05$)，再使用鄧肯氏新多變域檢定法(Duncan's new multiple range test)比較。

(七) 形態及組織觀察

1. 解剖顯微鏡觀察法

在培養的過程中，以 Nikon 解剖顯微鏡觀察外表形態並紀錄照相。

2. 塗抹法

自培養基中取少許不同形態之癒合組織，置於載玻片上，加 1-2 滴液態培養基，於光學顯微鏡下觀察細胞形態，並照像紀錄。

三、喜樹癒合組織喜樹鹼測定

(一) 材料

1、喜樹根、莖、葉

取栽培 2 年生之喜樹小苗，分別取其根、莖、葉，置於冷凍乾燥機中凍乾 72 時，取出研磨成粉末備用。

2、癒合組織檢體

選取生長量較佳、活力較好之癒合組織以下述不同處理，所得之細胞進行分析。

(1)以 MS、WPM、B5 培養基添加 4 mg/l NAA 及 2 mg/l BA，於光照或黑暗環境培養之喜樹癒合組織。

(2)以 MS 培養基添加不同植物生長調節劑，於光照環境培養之癒合組織。

A、以 MS 培養基添加 0、1、2、4、6 mg/l NAA 及 2 mg/l BA 之喜樹癒合組織。

B、以 MS 培養基添加 0、0.5、1、2、4 mg/l 2,4-D 及 0.5 mg/l Kinetin 之喜樹癒合組織。

C、以 MS 培養基添加 0.1、0.5、1、2、4 mg/l IBA 及 2 mg/l BA 之喜樹癒合組織

D、以 MS 培養基添加 0.1、0.5、1、2、4 mg/l Picloram 及 2 mg/l Kinetin 之喜樹癒合組織。

(3)懸浮培養添加不同誘導劑，於光照環境培養之癒合組織

A、以 MS 液態培養基(含 2 mg/l NAA，2%蔗糖)添加 0、50、100、200 μ M 水楊酸之喜樹癒合組織。

B、以 MS 液態培養基(含 2 mg/l NAA，2%蔗糖)添加 0、50、100、200 μ M 茉莉酸之喜樹癒合組織。

C、以 MS 液態培養基(含 2 mg/1 NAA，2%蔗糖)添加 0、50、100、200 μ M 甲基茉莉酸之喜樹癒合組織。

D、以 MS 液態培養基(含 2 mg/1 NAA，2%蔗糖)添加 0、1、2、3ml/25ml 3% (w/w) 膠態幾丁質懸浮液之喜樹癒合組織。

3、試藥

(1)喜樹鹼標準品

A、Camptothecin (CPT)：Sigma chemical co. USA

B、10-Hydroxycamptothecin (CPT-10)：Sigma chemical co. USA

(2)有機溶媒

A、Methanol：Merck chemical co. Germany (HPLC grade)

B、Dichloromethane：Merck chemical co. Germany (HPLC grade)

C、Chloroform：Merck chemical co. Germany (HPLC grade)

4、其他試驗材料

0.45 μ m 過濾膜

(二)儀器

1.冷凍乾造機：KINGMECH FD-3 (KINGMECH, ROC)

2.離心機：SIGMA 302 CENTRIFUGE (SIGMA, USA)

3.桌上型震盪器：Thermolyne Test Tube Maxi-Mix II (Thermolyne, USA)

4.真空乾燥器(desiccators)

5.真空幫浦 Waters DDA-U152-AA (Waters, USA)

6.高效能液相層析儀：(high-performance liquid chromatography, HPLC)

(1)Pump：Agilent 1100 Series Pumping Systems (Agilent, USA)

(2)Column：Monitor C18 5 μ M 15×4.6mm (Column engineering, USA)

(3)分析軟體：Agilent Chromatography Data System (Agilent, USA)

7.HPLC 積分儀：HP 3394 (Agilent, USA)

8.HPLC 偵測器：Agilent 1100 Series Multiple Wavelength Detector (Agilent, USA)

(三)方法

1.標準品備製

精確秤取喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼分別溶於甲醇及 DMSO 中，配置成一系列不同濃度之溶液，依序如下：

CPT 高濃度為 1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100mg/l

CPT 低濃度為 0.078125、0.15625、0.3125、0.625、1.25、2.5mg/l

CPT-10 高濃度為 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80mg/l

CPT-10 低濃度為 0.078125、0.15625、0.3125、0.625、1.25、2.5mg/l

經 0.45 μ m 濾膜過濾後為標準曲線之溶液，各取 20 μ l 注入 HPLC 進行分

析。以標準品之波峰面積比（y 軸）和標準品之濃度（x 軸）進行線性回歸，製作檢量線，並求得檢量線之方程式 $y=ax+b$ 與相關係數 R^2

2. 檢品備製(修改自 Hengel *et al.*, 1992)

以冷凍乾燥機將細胞或植物體凍乾，取凍乾試材置於研鉢中加入液態氮研磨成粉末，秤取 50mg 試材粉末置於 100ml 離心管中，加入 2ml 甲醇，再加入 20ml 二氯甲烷及 18ml 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，收集其二氯甲烷；殘渣再加溶媒萃取一次，將經萃取二氯甲烷合併，以 $0.45\ \mu\text{m}$ 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 1ml 氯仿中，再以 HPLC 測定其喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量。

3、高效液相層析法操作條件

- (1) 管柱：Monitor C18 $5\ \mu\text{M}$ 15×4.6mm
- (2) 移動相：氘甲烷 25%，水 75%
- (3) 流速：1.0ml/min
- (4) PDA 波長範圍：254nm
- (5) Column oven：25°C
- (6) 注射量：20 μl 檢液

4、濃度計算

由於標準品溶液中均含有已知濃度的標準品，利用 HPLC 所得波峰面積為縱座標，成份濃度為橫座標繪製一回歸檢量直線，求其回歸方程式如下：

$$\text{CPT 高濃度 } y = 83.104x - 1.6612 \quad R^2 = 1$$

$$\text{CPT 低濃度 } y = 79.928x + 7.056 \quad R^2 = 0.9984$$

$$\text{CPT-10 高濃度 } y = 54.382x + 43.785 \quad R^2 = 0.9995$$

$$\text{CPT-10 低濃度 } y = 117.2x - 0.1535 \quad R^2 = 1$$

結果顯示各成份之濃度與波峰面積具有良好的線性關係，故可利用此四回歸方程式，以波峰面積求出 camptothecin 和 10-Hydroxycamptothecin 之含量。計算分析波峰面積，進而換算得知檢液中各成份之含量。

5、統計分析

試驗結果以完全隨機設計(Complete Randomized Design)，進行多變異數分析(Analysis of Variance)，如處理間達顯著水準($\alpha=0.05$)，在使用鄧肯氏新多變域檢定法(Duncan's new multiple range test)比較。

肆、結果與討論

一、喜樹組織培養

(一) 癒合組織誘導與生長

使用表(表、二~表、六)配方之培養基，每一培養基放入 3 個培植體進行癒合組織之誘導。經觀察，約 14 天後，於切口處會逐漸有癒合組織的形成。

而不同基本培養基及植物生長調節劑組合，對喜樹癒合組織形成天數影響並不明顯，均可在接種 14 天後，誘導形成癒合組織。

癒合組織誘導率方面，以有形成與未形成癒合組織之培植體個數，來計算癒合組織誘導率，結果顯示：除空白培養基及低濃度之 IBA (0.1~0.5mg/l) 無法誘導癒合組織外(照片 1.)，其餘均可誘導獲得癒合組織。但不添加 auxin 類的植物生長調節劑，僅使用 cytokinin 亦能誘導出癒合組織，但培植體會逐漸褐化死亡；而 auxin 濃度過高癒合組織生長狀況不佳，本研究所採用的四種 auxin 以 NAA、IBA、Picloram 較有利喜樹癒合組織生長，2,4-D 則效果較差(表七~表十)。

在適當的 auxin 與 cytokinin 組合下，細胞生長快速，且外觀成紅色或綠色；反之若不適當則生長緩慢，外觀偏黃色。

在不同的植物生長調節劑組合中，培植體經培養 30 天後，以 ANOVA 測驗其顯著性，統計結果顯示：不論是何種組合之 auxin 類對細胞生長量均有顯著差異，而 cytokinin 方面除與 2,4-D 搭配使用之 Kinetin 未達顯著差異外，其餘組合亦有顯著差異。另外不同 auxin 與 cytokinin 組合對細胞生長量均有明顯交感效應存在，故再以 LS MEAN (Least Squares Means) 進行比較：結果顯示 NAA 與 BA 組合時，較佳為使用 NAA 1 mg/l 與 BA 0 mg/l 可獲得乾重細胞 0.1754g (表十一)(照片 2.~10.)。2,4-D 與 Kinetin 搭配時，則最佳組合為 2,4-D 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 可得 0.0402 g 乾重細胞(照片 11.~16.)。IBA 與 BA 組合(表十二)(照片 17.~27.)。以 IBA 0.5 mg/l，BA 4 mg/l 可獲 0.2935 g 乾重細胞(表十三)。Picloram 與 Kinetin 組合，Picloram 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 可獲 0.1958 g 乾重細胞(表十四)(照片 28.~34.)。

以 MS、WPM、B₅ 為基礎培養基，添加 NAA 4 mg/l，BA 2 mg/l，每一培養放入 3 個喜樹胚，分別置於光照及黑暗中進行培養，培養 45 天後來比較不同培養基及光照與否對喜樹癒合組織誘導率、生長量之影響。結果顯示不論何種基礎培養基對喜樹癒合組織誘導無顯著差異但生長具顯差異；而光照與否對誘導率亦無影響，但對喜樹癒合組織生長則有顯著影響，光照環境下細胞乾重可達 0.5822g，黑暗中培養則僅有 0.5233 g。此外不同基礎培養基及光照與否彼此間有極顯著交感效應存在，經 LS MEAN 進行比較，以使用 B₅ 基礎培養基在黑暗環境下可獲乾重細胞 0.630g，MS 基礎培養基搭配光照環境次之，可得乾重細胞 0.6166g。而就外觀來觀察光照處理下所誘導之癒合組織會產生紅、綠、黃、白，疏鬆較脆之癒合組織，暗處理之癒合組織多為黃、白色濕軟緊密之癒合組織(照

片 35.~40.照片 47.~49.)。

表八、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 NAA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	培植體 個數	鮮重 (g)	乾重 (g)	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0	15	0.1779	0.0154	0	-
	0.5	15	0.6376	0.0692	86	GW+
	1	15	0.7492	0.0635	53	GW+
	2	15	0.6816	0.0651	67	GW+
	4	15	0.5336	0.0529	47	GW+
1	0	15	2.3926	0.1754	100	YW++
	0.5	15	2.4446	0.1636	100	RYW++
	1	15	1.8161	0.1285	100	GRW++
	2	15	1.4000	0.0989	100	GYW++
	4	15	0.2260	0.0270	86	GYW+
2	0	15	0.3920	0.0425	67	GR+
	0.5	15	2.3594	0.1665	100	GR+
	1	15	1.7300	0.1197	93	GR++
	2	15	1.8388	0.0404	86	GR++
	4	15	0.6857	0.0514	100	G++
4	0	15	0.4526	0.0391	80	YW+
	0.5	15	2.3246	0.1637	100	GR++
	1	15	2.0690	0.0444	100	GR+++
	2	15	0.7639	0.0664	100	GR++
	4	15	0.5255	0.0426	100	G++
6	0	15	0.2940	0.0161	100	G+
	0.5	15	0.5539	0.0416	100	GR++
	1	15	0.9776	0.0705	100	GR++
	2	15	1.0338	0.0870	86	GR+
	4	15	0.3425	0.0243	86	YW+

※G：綠色癒合組織 R：紅色癒合組織 Y：黃色癒合組織 W：白色癒合組織

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 3 個培植體，重複五次）

表九、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 2,4-D 與 Kinetin，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	培植體 個數	鮮重 (g)	乾重 (g)	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0	0.1	15	0.1536	0.0184	7	W+
	0.5	15	0.2915	0.0349	53	YW+
	1	15	0.2857	0.0357	67	W+
	2	15	0.1481	0.0166	86	W+
	4	15	0.4273	0.0288	100	W+
0.5	0.1	15	0.2224	0.0199	100	W+
	0.5	15	0.1931	0.0184	100	RY+
	1	15	0.3685	0.0262	100	YW+
	2	15	0.3410	0.0289	73	YW+
	4	15	0.5585	0.0402	80	YW+
1	0.1	15	0.2161	0.0200	53	YW+
	0.5	15	0.1982	0.0178	100	YW+
	1	15	0.1201	0.0100	100	YW+
	2	15	0.2010	0.0168	100	YW+
	4	15	0.1386	0.0090	100	YW+
2	0.1	15	0.1216	0.0116	67	YW+
	0.5	15	0.1869	0.0140	93	YW+
	1	15	0.1504	0.0117	87	YW+
	2	15	0.1135	0.0085	87	YW+
	4	15	0.1313	0.0102	100	YW+
4	0.1	15	0.0497	0.0050	33	YW+
	0.5	15	0.1114	0.0097	100	YW+
	1	15	0.1113	0.0082	80	YW+
	2	15	0.3378	0.0370	100	YW+
	4	15	0.1257	0.0096	100	YW+

※G：綠色癒合組織 R：紅色癒合組織 Y：黃色癒合組織 W：白色癒合組織

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶）

表十、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 IBA 與 BA，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

IBA (mg/l)	BA (mg/l)	培植體 個數	鮮重 (g)	乾重 (g)	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0.1	0	15	0.0575	0.0043	-	-
	0.5	15	1.139	0.0854	100	GW+
	1	15	2.6581	0.1994	100	GRW+++
	2	15	1.5061	0.1130	100	GRW++++
	4	15	2.4549	0.1841	60	GW+
0.5	0	15	0.2947	0.0221	-	-
	0.5	15	1.0551	0.0791	100	GW+
	1	15	2.4068	0.1805	100	GW++
	2	15	1.5744	0.1181	100	GRW+
	4	15	3.9132	0.2935	100	GRW+++
1	0	15	0.4875	0.0366	33	GW+
	0.5	15	3.605	0.2704	100	GRW++++
	1	15	1.5464	0.1160	100	GRW++++
	2	15	1.1258	0.0844	100	GW++++
	4	15	0.7936	0.0595	100	GW++++
2	0	15	1.3669	0.1025	33	GW+
	0.5	15	1.0636	0.0798	100	GW++
	1	15	1.3293	0.0997	100	GRW+++
	2	15	1.8615	0.1396	100	GW+++
	4	15	2.6393	0.1979	100	GW+
4	0	15	0.5068	0.0380	60	YW+
	0.5	15	0.8870	0.0665	100	GW+
	1	15	1.8310	0.1373	100	GRW+++
	2	15	0.5863	0.0440	100	GRW++
	4	15	1.8715	0.1496	100	GW+++

※G：綠色癒合組織 R：紅色癒合組織 Y：黃色癒合組織 W：白色癒合組織

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶）

表十一、以喜樹胚為培植體，在 MS 培養基中添加不同濃度之 Picloram 與 Kinetin，在光照環境中進行癒合組織誘導結果。

Picloram (mg/l)	Kinetin (mg/l)	培植體 個數	鮮重 (g)	乾重 (g)	Callus 誘發率 (%)	生長狀況 (30 天後)
0.1	0.1	15	1.2109	0.0908	100	GRW+
	0.5	15	1.5244	0.1143	100	GR++
	1	15	2.1177	0.1588	100	GR+
	2	15	1.3807	0.1036	100	GR++
	4	15	1.8986	0.1424	100	GR+++
0.5	0	15	0.3202	0.0240	100	GR+
	0.5	15	0.2555	0.0192	100	GR++
	1	15	1.4568	0.1093	100	RY+++
	2	15	1.1111	0.0833	100	GR++
	4	15	2.6103	0.1958	100	GR+++
1	0	15	0.3524	0.0264	100	GR+
	0.5	15	0.5416	0.0406	100	GR++
	1	15	0.4961	0.0372	100	RY+
	2	15	0.7014	0.0526	100	GR++
	4	15	0.569	0.0427	100	GR+
2	0	15	0.1543	0.0116	100	YW +
	0.5	15	0.2723	0.0204	100	YW +
	1	15	0.4066	0.0305	100	YW +
	2	15	0.2689	0.0202	100	YW +
	4	15	0.3917	0.0294	100	YW +
4	0	15	0.3146	0.0236	100	YW +
	0.5	15	0.2128	0.0160	100	YW +
	1	15	0.296	0.0222	87	YW+
	2	15	0.3475	0.0261	100	YW +
	4	15	0.5420	0.0407	100	YW+

※G：綠色癒合組織 R：紅色癒合組織 Y：黃色癒合組織 W：白色癒合組織

※++++~+，-：代表極多量至極少量

※（每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶）

表十二、喜樹胚培養在 NAA 與 BA 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
NAA	4	0.01205081	95.33	<.0001
BA	4	0.01416228	112.03	<.0001
NAA×BA	16	0.00463833	36.69	<.0001
Error	50	0.00012641		
Corrected Total	74			

※ 每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶

表十三、喜樹胚培養在 2,4-D 與 Kinetin 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
2,4-D	4	0.00084886	19.14	<.0001
Kinetin	4	0.00008602	1.94	0.1184
2,4-D×Kinetin	16	0.00024484	5.52	<.0001
Error	50	0.00004435		
Corrected Total	74			

※每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶

表十四、喜樹胚培養在 IBA 與 BA 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
IBA	4	0.0053274	14.97	<.0001
BA	4	0.03966866	111.49	<.0001
IBA×BA	16	0.01303663	36.64	<.0001
Error	50	0.0003558		
Corrected Total	74			

※每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶

表十五、喜樹胚培養在 Picloram 與 Kinetin 組合之 MS 培養基中生物量乾重之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Picloram	4	0.02821113	586.4	<.0001
Kinetin	4	0.00743803	154.61	<.0001
Picloram× Kinetin	16	0.00282589	58.74	<.0001
Error	50	0.00004811		
Corrected Total	74			

※每一處理 3 個培植體，共計 5 瓶

(二) 多芽體誘導

Liu 等(Liu *et al.*, 2001)將喜樹莖頂及帶節莖段培養於 B₅ 添加 BA 8.9 μ M 可誘得 2.25±0.48 個芽體，但其以喜樹胚為材料培養於 B₅ 添加 BA 0~17.8 μ M 無法誘得多芽體。

而本試驗以喜樹胚為材料，並且以添加不同濃度 IBA 搭配 BA 0.5 mg/l 之 MS 培養基進行多芽體之誘導。經 30 天培養後，結果以 IBA0.5 mg/l 與 BA0.5 mg/l 組合效果最佳，每個培植體平均可誘導得 8.93 個芽體，若再提高 IBA 濃度則所獲芽體數量開始減少，當 IBA 濃度提高至 4 mg/l 則不再有多芽體形成（表十五）（照片 41.~44.）。

表十六、喜樹胚在 MS 培養基添加不同濃度 IBA 與 BA 0.5 mg/l 處理之芽體增殖結果。

Duncan Grouping*	植物生長調節劑		培植體數目	芽體總數**	單一培植體 平均產芽數***
B	IBA0.1		15	78	5.20±1.31
A	IBA0.5		15	134	8.93±8.64
B	IBA1	BA0.5	15	92	6.13±1.98
C	IBA2		15	46	3.07±0.64
D	IBA4		15	0	0.00±0.00

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理 3 個培植體，共計 5 瓶。

***單一培植體平均產芽數 = 芽體總數 ÷ 培植體數目。

(二) 根誘導

以喜樹胚為材料，以添加不同濃度 IBA 之 MS 培養基進行根之誘導。經 30 天培養，結果以 IBA 2 mg/l 誘導根效果較佳，每個培植體可獲得 19 條根，而當濃度高於 4 mg/l 時則效果開始變差（表十六）（照片 45.~46.）。

另外在預備試驗時發現單獨使用 NAA 1 mg/l 亦可誘導不定根的形成，平均每個培植體可誘導 27.4 條根，但根的長度明顯較 IBA 所誘導之根短（照片 5.）。

表十七、喜樹胚在 MS 培養基添加不同濃度 IBA 處理之根誘導結果。

Duncan Grouping*	植物生長調節劑	培植體數目	發根總數**	單一培植體平均發根數***
D	IBA0	15.00	0.00	0.00±0.00
C	IBA0.5	15.00	92.00	6.13±2.29
B	IBA1	15.00	154.00	10.27±1.9
A	IBA2	15.00	285.00	19.13±2.2
C	IBA4	15.00	90.00	6.00±1.3

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

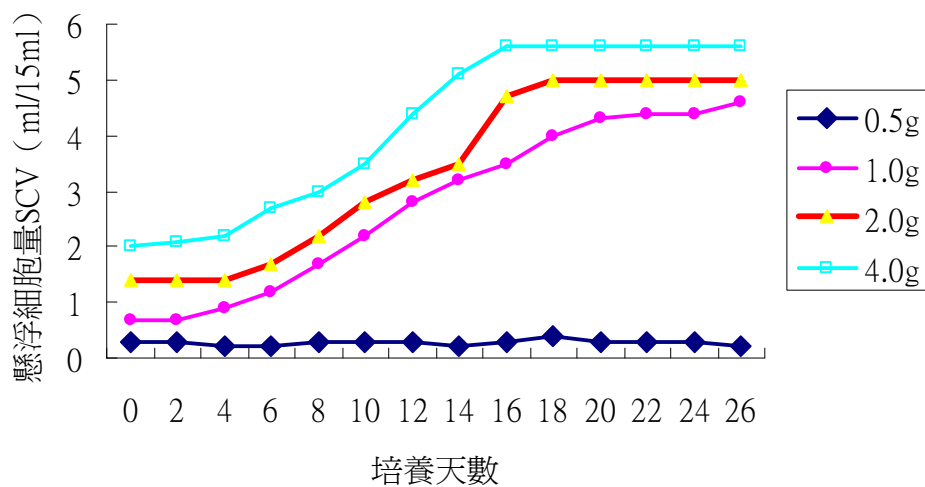
**每種處理 3 個培植體，共計 5 瓶。

***單一培植體平均產芽數 = 芽體總數 ÷ 培植體數目。

(三) 細胞懸浮培養

將癒合組織增殖之癒合組織，置入含 NAA 之 MS 液態培養基中進行懸浮細胞培養，採細胞沈降體積 (Packed Cell Volume, PCV) 法測量細胞生長曲線，得到圖之懸浮細胞生長曲線，圖三中顯示顯示培養 16 天細胞生長開始減緩，若超過 18 天後，細胞會開始褐化死亡，因此繼代培養以 14 天一次 (圖三)。

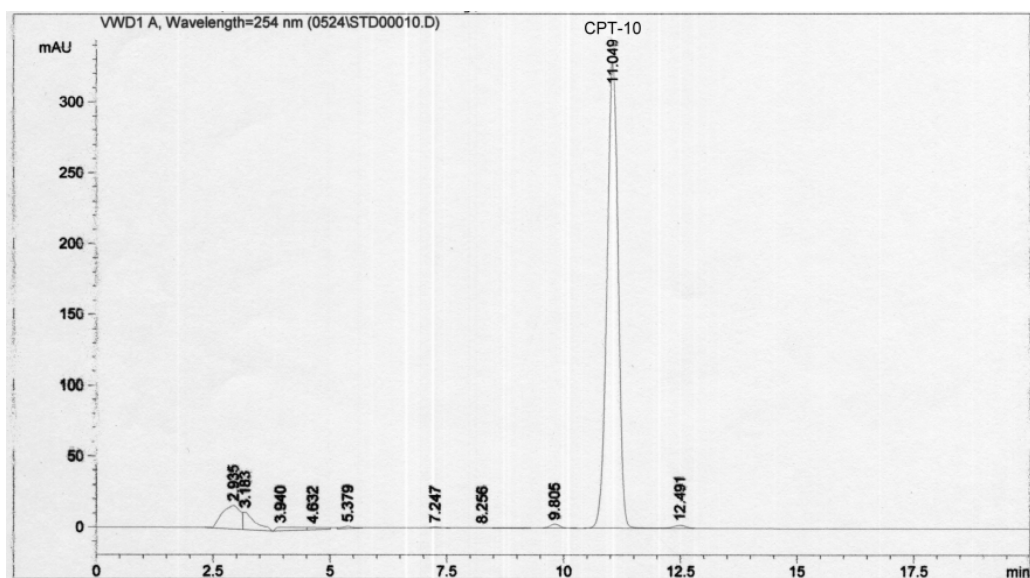
細胞接種量，經試驗發現當接種 0.5g/35ml 會發生稀釋效應導致細胞死亡，而接種量為 2~4g/35ml，則遲滯期較短，可快速進入對數增殖期迅速成長。



圖三、喜樹癒合組織在 MS 添加 NAA 2 mg/l 液態培養基中，不同細胞接種量之懸浮細胞培養生長曲線

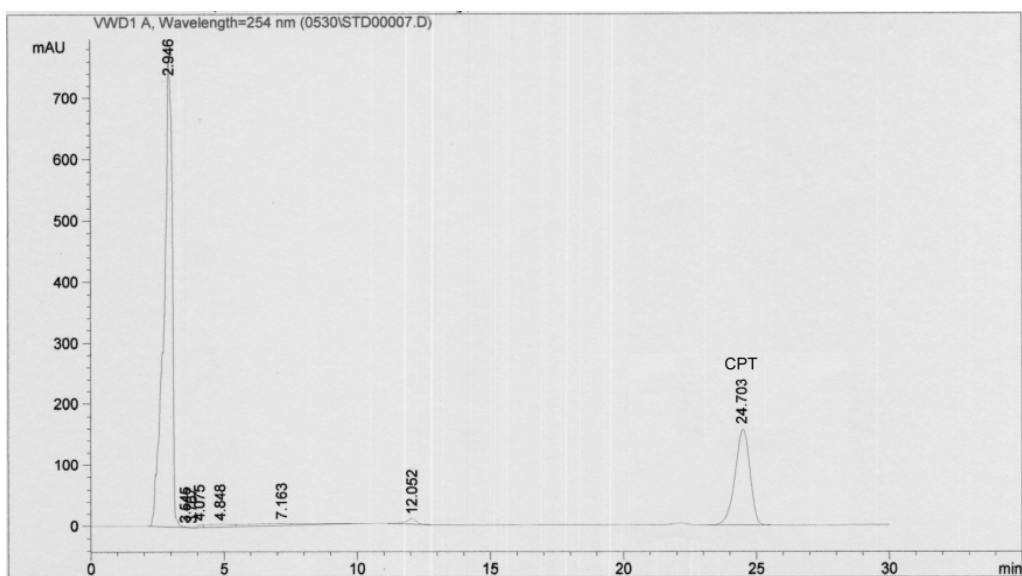
二、喜樹鹼成份測定

將利用各種不同處理培養出來的喜樹細胞利用冷凍乾燥，收集細胞並保存於-20℃冰箱。樣品經萃取濃縮後，以高效液相層析法（High-performance liquid chromatography, HPLC）分析其成份含量（圖四、五、六、七）。



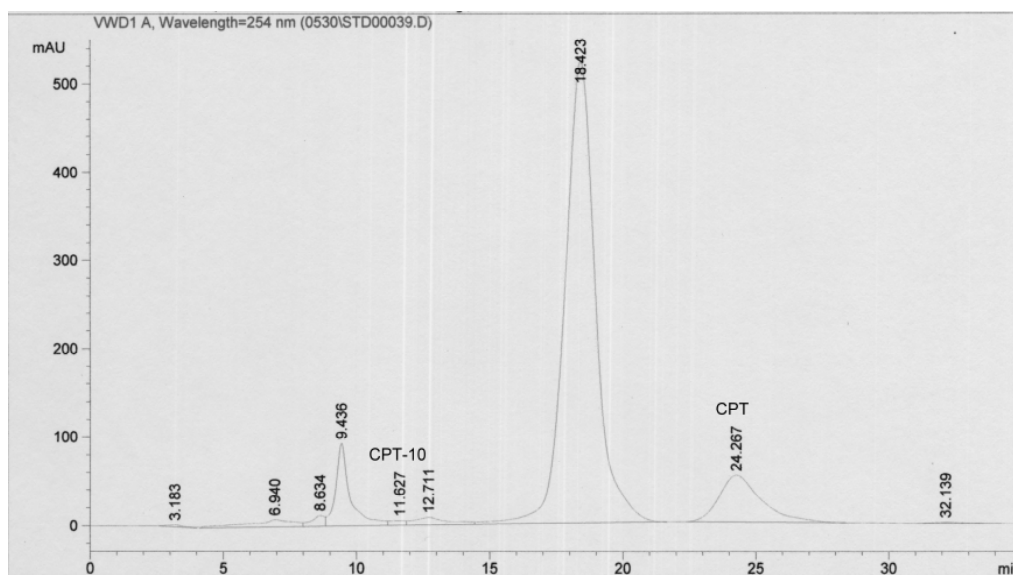
圖四、10-羥基喜樹鹼標準品之高效液層析圖

※管柱：Monitor C18 5 μ M 15 $\times$ 4.6mm、移動相：氘甲烷 25%，水 75%、流速：1.0ml/min、PDA：254nm



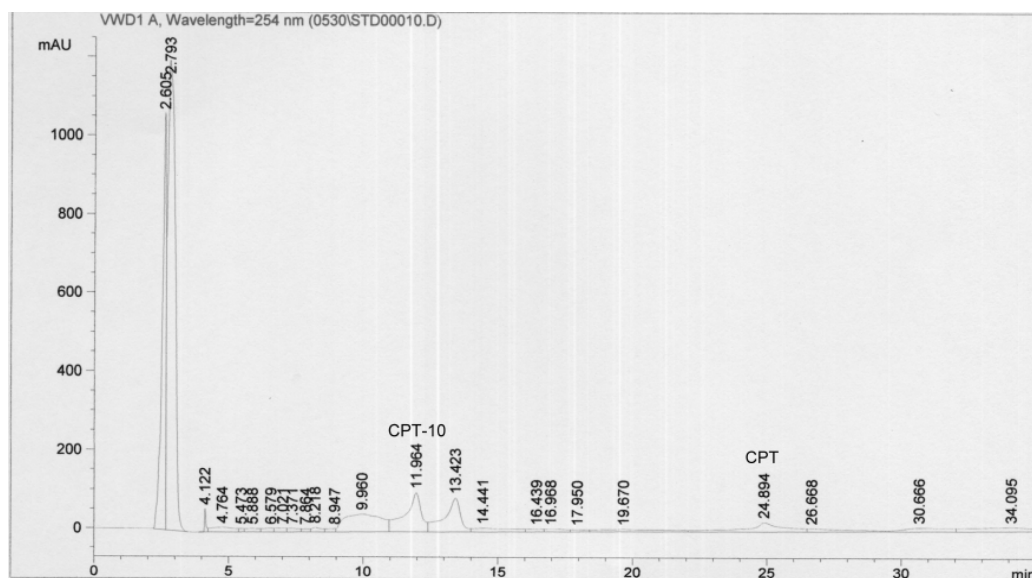
圖五、喜樹鹼標準品之高效液層析圖

※管柱：Monitor C18 5 μ M 15 $\times$ 4.6mm、移動相：氘甲烷 25%，水 75%、流速：1.0ml/min、PDA：254nm



圖六、喜樹植物體之高效液層析圖

※管柱：Monitor C18 5 μ M 15 $\times$ 4.6mm、移動相：氙甲烷 25%，水 75%、流速：1.0ml/min、PDA：254nm

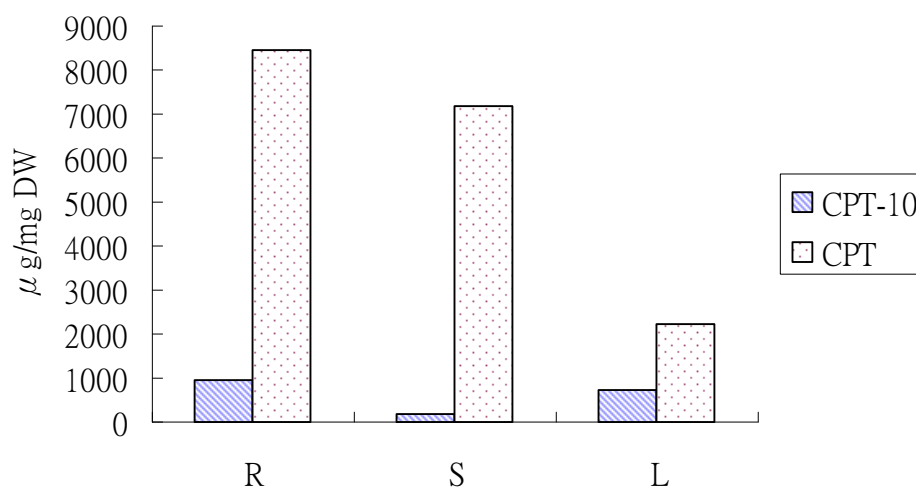


圖七、喜樹癒合組織之高效液層析圖

※管柱：Monitor C18 5 μ M 15 $\times$ 4.6mm、移動相：氙甲烷 25%，水 75%、流速：1.0ml/min、PDA：254nm

(一) 喜樹植物體之成分分析

HPLC 定量分析結果顯示喜樹鹼跟 10-羥基喜樹鹼均為根含量最高分別為 $8454.38 \mu\text{g/g}$ 及 $969.96 \mu\text{g/g}$ ；而莖的喜樹鹼含量為 $7170.63 \mu\text{g/g}$ ，10-羥基喜樹鹼則為三種不同部位中最低僅 $189.37 \mu\text{g/g}$ ；葉部喜樹鹼含量較根、莖低為 $2223.18 \mu\text{g/g}$ ，10-羥基喜樹鹼為 $270.77 \mu\text{g/g}$ （圖八）。



圖八、2 年生喜樹不同部位喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量

※ R：根 S：莖 L：葉

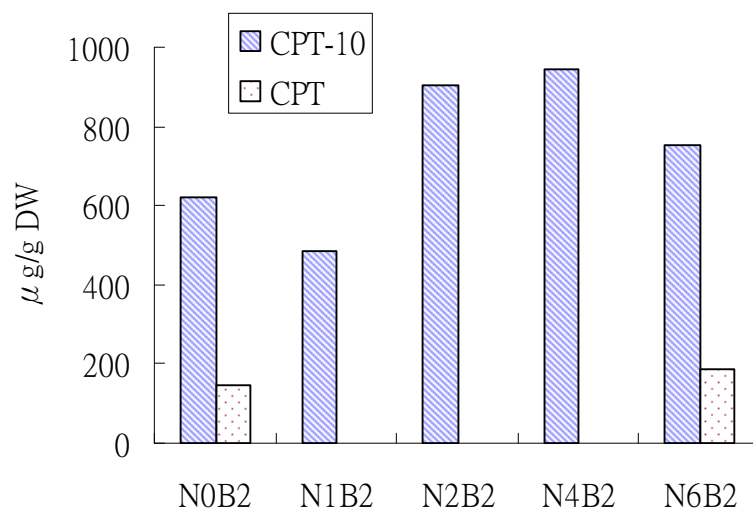
(二) 不同植物生長調節劑對喜樹鹼生產之影響

本試驗僅就 4 種不同 auxin 去改變其濃度，來觀察 auxin 對喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼的影響。

1. NAA 對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼之影響

在 NAA 0~6 mg/l 五種不同濃度與 BA 2 mg/l 組合中，14 天培養後經凍乾萃取分析，結果在此試驗中僅 NAA 0 mg/l，BA 2 mg/l 及 NAA 6 mg/l，BA 2 mg/l 可檢測出喜樹鹼分別為 148.70 μ g/g、188.31 μ g/g；而 10-羥基喜樹鹼以 NAA4 mg/lBA 2 mg/l 組合可獲 945.42 μ g/g 效果較佳，但是此一組合不利於喜樹鹼生成（圖九）（表十八、十九、二十、二十一）。

本試驗結果與 Wiedenfeld（Wiedenfeld1 *et al.*, 1997）等結果比較，發現本試驗喜樹鹼產量較低，10-羥基喜樹鹼產量則略高；但是 Wiedenfeld 等之結果喜樹鹼遠高於 10-羥基喜樹鹼，與本試驗結果相反，推論其原因可能為培養時間較短所致或細胞株間之差異所致。



圖九、不同濃度 NAA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響

※N0B2：NAA 0 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理、N1B2：NAA 1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

N2B2：NAA 2 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理、N4B2：NAA 4 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

N6B2：NAA 6 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

每種處理重複三次

表十八、不同濃度 NAA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	308737.7	48.21	<.0001
Error	10	2338.755		
Corrected Total	14			

表十九、不同濃度 NAA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	945.42	3	4
A	904.58	3	2
B	752.48	3	6
C	623.06	3	0
D	486.81	3	1

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表二十、不同濃度 NAA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	26142.33	64.55	<.0001
Error	10	404.9724		
Corrected Total	14			

表二十一、不同濃度 NAA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	188.31	3	6
B	148.7	3	0
C	0	3	1
C	0	3	4
C	0	3	2

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

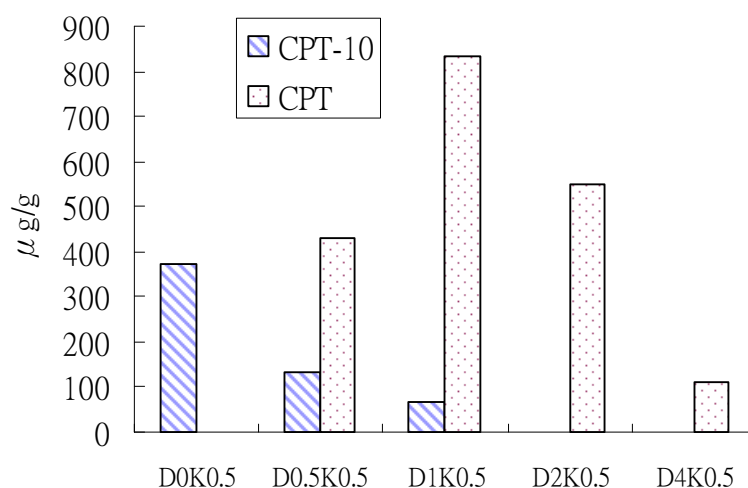
**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

2. 2,4-D 對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼之影響

在 2,4-D 0~4 mg/l 五種不同濃度與 Kinetin 0.5 mg/l 組合中，30 天培養後經凍乾萃取分析，結果顯示隨 2,4-D 濃度提高喜樹鹼亦隨之提高，以 2,4-D 1 mg/l，Kinetin 0.5 mg/l 組合可獲 832.00 μ g/g 的喜樹鹼效果較佳，但濃度提高至 2 mg/l 時喜樹鹼產量開始下降；而 10-羥基喜樹鹼結果相反，不添加 2,4-D 產量最高可達 373.36 μ g/g，當 2,4-D 濃度高於 2mg/l 則無法檢測出 10-羥基喜樹鹼（圖十）（表二十二、二十三、二十四、二十五）。

本試驗結果與 Sakato（Sakato *et al.*, 1974）等結果比較發現，本試驗喜樹鹼產量較高，因 Sakato 等並未測定 10-羥基喜樹鹼產量所以無法比較；Makunga（Makunga *et al.*, 1997）等指出 2,4-D 會造成細胞內 PAL 含量減少，而改變整個代謝途徑，不利部分二次代謝物的生產，本試驗結果發現添加 2,4-D 會不利 10-羥基喜樹鹼生產，喜樹鹼方面低濃度 2,4-D 可提高其含量，但高濃度 2,4-D 則不利喜樹鹼生產。



圖十、不同濃度 2,4-D 對喜樹鹼合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響

※D0K0.5：2,4-D 0 mg/l 與 kinetin 0.5 mg/l 處理、D0.5K0.5：2,4-D 0.5 mg/l 與 kinetin 0.5 mg/l 處理

D1K0.5：2,4-D 1 mg/l 與 kinetin 0.5 mg/l 處理、D2K0.5：2,4-D 2 mg/l 與 kinetin 0.5 mg/l 處理

D4K0.5：2,4-D 4 mg/l 與 kinetin 0.5 mg/l 處理

每種處理重複三次

表二十二、不同濃度 2,4-D 與 kinetin 0.5 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	71942.52	406.94	<.0001
Error	10	176.7889		
Corrected Total	14			

表二十三、不同濃度 2,4-D 與 kinetin 0.5 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	373.36	3	0
B	135.13	3	0.5
C	66.86	3	1
D	0	3	2
D	0	3	4

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

*****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表二十四、不同濃度 2,4-D 與 kinetin 0.5 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	339135.8	174.27	<.0001
Error	10	1946.012		
Corrected Total	14			

表二十五、不同濃度 2,4-D 與 kinetin 0.5 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	832	3	1
B	550.4	3	2
C	428.68	3	0.5
D	111.35	3	4
E	0	3	0

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

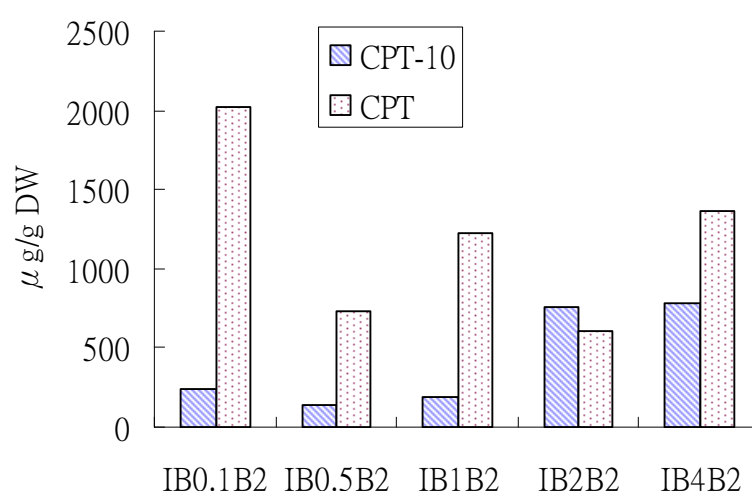
**每種處理重複三次。

*****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

3. IBA 對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼之影響

在 IBA 0.1~4 mg/l 五種不同濃度與 BA 2 mg/l 組合中，30 天培養後經凍乾萃取分析，結果顯示以 IBA 0.1 mg/l，BA 2 mg/l 組合可獲 2020.95 $\mu\text{g/g}$ 的喜樹鹼效果最佳；而 10-羥基喜樹鹼則隨 IBA 濃度增加產量會提高，IBA 4 mg/l，BA 2 mg/l 組合可獲 782.38 $\mu\text{g/g}$ （圖十一）（表二十六、表二十七、表二十八、表二十九）。

本試驗結果與 Wiedenfeld（Wiedenfeld1 *et al.*, 1997）等結果比較，發現本試驗喜樹鹼、10-羥基喜樹鹼產量均為較高，其原因可能為 Wiedenfeld 等採用 NN 培養基或其 kinetin 濃度較低所致。



圖十一、不同濃度 IBA 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響

※IB0.1B2：IBA 0.1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理、IB0.5B2：IBA 0.1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

IB1B2：IBA 0.1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理、IB2B2：IBA 0.1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

IB4B2：IBA 0.1 mg/l 與 BA 2 mg/l 處理

每種處理重複三次

表二十六、不同濃度 IBA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	308737.668	132.01	<.0001
Error	10	2338.755		
Corrected Total	14			

表二十七、不同濃度 IBA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	782.38	3	4
A	752.99	3	2
B	236.92	3	0.1
C B	187.5	3	0.5
C	133.84	3	1

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表二十八、不同濃度 IBA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	951621.625	8.89	0.0025
Error	10	106994.057		
Corrected Total	14			

表二十九、不同濃度 IBA 與 BA 2 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	2021	3	0.1
B	1365.9	3	4
C B	1223.5	3	1
C D	738.2	3	0.5
D	605	3	2

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

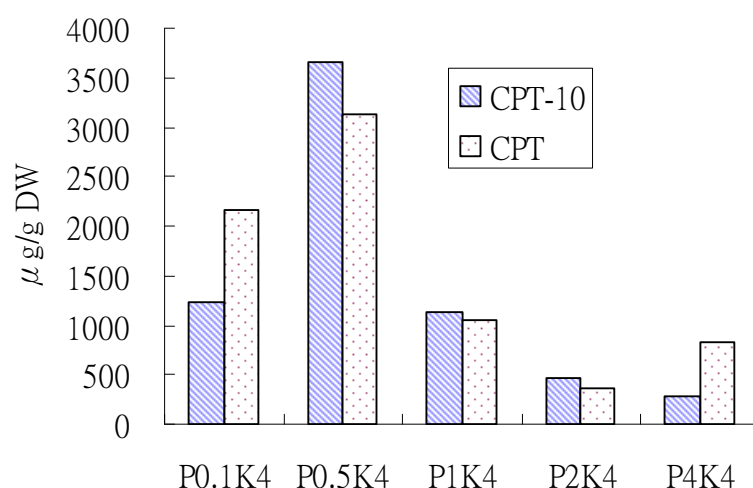
**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

4. Picloram 對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼之影響

在 Picloram 0.1~4 mg/l 五種不同濃度與 Kinetin 4 mg/l 組合中，30 天培養後經凍乾萃取分析，結果顯示低濃度 Picloram 可獲較多喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼 Picloram 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 組合可獲 3663.54 μ g/g 的喜樹鹼，及 10-羥基喜樹鹼 3130.83 μ g/g 效果最佳（圖十二）（表三十、表三十一、表三十二、表三十三）。

根據楊千瑩(楊千瑩, 2001)研究結果顯示 Picloram 與 BA 處理來誘導青脆枝癒合組織效果甚佳，且其喜樹鹼及 9-羥基喜樹鹼含量亦高。而本試驗結果發現 Picloram 與 Kinetin 處理，喜樹癒合組織內之喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量甚高，為植物生長調節劑試驗中最佳之處理；然因 Picloram 與 Kinetin 處理所誘導之癒合組織質地較硬脆，較不適合用於喜樹懸浮細胞生長培養，故若要喜樹癒合組織大量培養時可採二階段(Two-stage)策略培養，生產階段再採用 Picloram 與 Kinetin 處理應可獲較佳之效果。



圖十二、不同濃度 Picloram 對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響

※P0.1K4：Picloram 0.1 mg/l 與 Kinetin 4 mg/l 處理、P0.5K4：Picloram 0.5 mg/l 與 Kinetin 4 mg/l 處理

P1K4：Picloram 1 mg/l 與 Kinetin 4 mg/l 處理、P2K4：Picloram 2 mg/l 與 Kinetin 4 mg/l 處理

P4K4：Picloram 4 mg/l 與 Kinetin 4 mg/l 處理

每種處理重複三次

表三十、不同濃度 Picloram 與 kinetin 4 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	5503983	37.13	<.0001
Error	10	148253.8		
Corrected Total	14			

表三十一、不同濃度 Picloram 與 kinetin 4 mg/l 組合對喜樹癒合組織內喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	3663.5	3	2
B	1227.1	3	0.1
C	1135	3	1
C	463	3	0.5
C	283.1	3	4

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

表三十二、不同濃度 Picloram 與 kinetin 4 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	3761286	18.82	0.0001
Error	10	199860.6		
Corrected Total	14			

表三十三、不同濃度 Picloram 與 kinetin 4 mg/l 組合對喜樹癒合組織內 10-羥基喜樹鹼含量影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	植物生長調節劑濃度 (mg/l)
A	3130.8	3	0.5
B	2158.2	3	0.1
C	1055	3	1
C	826.3	3	4
C	372.8	3	2

* Duncan,s Multiple Range Test；在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

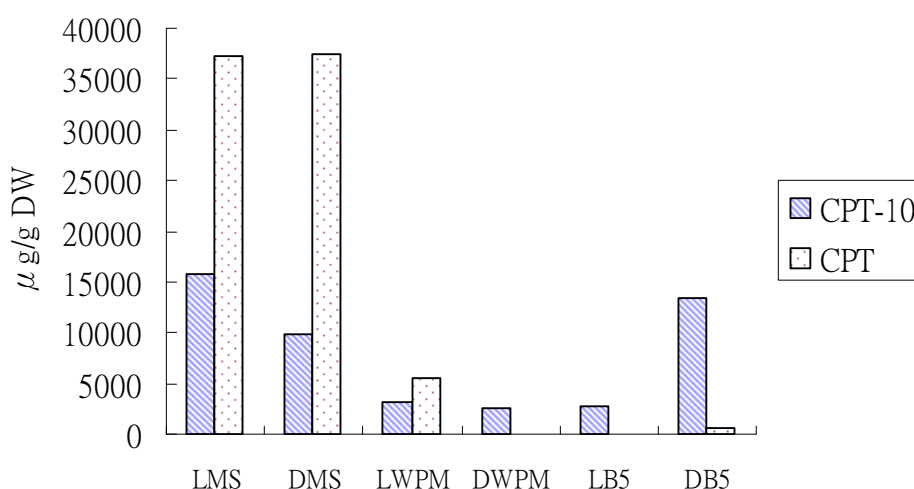
**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加植物生長調節劑。

(三) 不同基礎培養基及光照對喜樹鹼生產之影響

在 3 種不同基礎培養基及光照與否組合中，45 天培養後經凍乾萃取分析，結果顯示以 MS 基礎培養基進行生產所獲喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼產量最高，黑暗下培養喜樹鹼產量可達 $37352.00 \mu\text{g/g}$ ，10-羥基喜樹鹼則有 $9900.15 \mu\text{g/g}$ ，光照環境下喜樹鹼產量為 $37221.00 \mu\text{g/g}$ ，而 10-羥基喜樹鹼可獲 $15718.55 \mu\text{g/g}$ ，利用 WPM 基礎培養基生產喜樹鹼或 10-羥基喜樹鹼其含量均較低，而 B₅ 基礎培養雖不利喜樹鹼產生，但培養於黑暗中時可獲大量 10-羥基喜樹鹼 $13333.69 \mu\text{g/g}$ ，僅次於 MS 與光照之組合（圖十三）。

一般植物組織培養常用到的培養基有 MS、WPM、B₅、White 等，其中以 MS 最為常用。MS 基礎培養基所含微量元素種類較齊全，濃度也較高，但因無機鹽類較高，並非所有植物均適宜，故往往需略做無機鹽類濃度調整，植物生長效果會較佳，因此有 1/2MS、1/4MS 等改自 MS 的培養基產生。 NH_4NO_3 會抑制植物細胞生長及二次代謝物累積（張淑華,1996），而 B₅ 培養基因僅含有 KNO_3 不含 NH_4NO_3 ，故亦常用於植物組織培養生產二次代謝物。而本試驗結果以 MS 基礎培養基最適合喜樹癒合組織生產喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼，可能是因為喜樹對無機鹽類濃度需求較高或因為 MS 所含微量元素種類較多所致。



圖十三、不同濃度基礎培養基對喜樹癒合組織內喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼含量之影響

※ LMS:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 MS 固體培養基，光照強度約為 $25 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ ，光週期 16 小時。

DMS:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 MS 固體培養基，於暗室中培養。

LWP:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 WPM 固體培養基，光照強度約為 $25 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ ，光週期 16 小時。

DWP:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 WPM 固體培養基，於暗室中培養。

LB₅:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 B₅ 固體培養基，光照強度約為 $25 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ ，光週期 16 小時。

DB₅:培養於含 NAA 4mg/l 與 BA 2mg/l 之 B₅ 固體培養基，於暗室中培養。

每種處理重複三次

(四) 不同誘發劑對喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼之影響

誘發劑 (elicitor) 是植物抗病生理過程中誘發植物生產植物抗毒素 (phytoalexins) 和引起植物過敏反應 (hypersensitive reaction, HR) 的因子, 而利用誘發劑進行二次代謝物調控, 為提高植物組織培養生產的重要方法之一。

據推論因培養時間過短, 因此添加誘發劑之所有試驗大多無法測得喜樹鹼, 僅少數試驗測得微量喜樹鹼存在, 故本試驗均僅檢測 10-羥基喜樹鹼。

1. 水楊酸對喜樹癒合組織生長及生長之影響

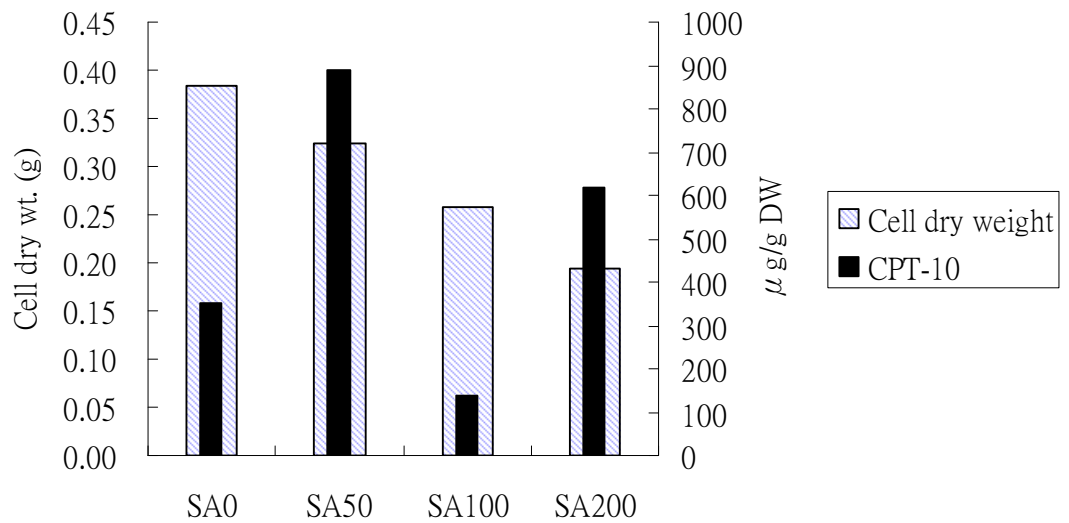
水楊酸 (salicylic acid) 是存在於植物體內一種非常重要的酚類物質, 水楊酸在植物受到病原菌感染後, 產生防禦反應, 包括 HR 反應限制病原菌擴展、促進寄主細胞死亡和誘導植物產生系統性抗病 (systemic acquired resistance, SAR) (蕭裕生和張喜寧, 2001)。此外水楊酸在植物體內尚有許多生理生化功能, 例如促進開花、醣解作用、降低鉀離子吸收、氣孔關閉等。當植物受到創傷或受到植物、微生物來源的誘發劑刺激, 則植物體內水楊酸的含量會提高 10-100 倍。因為水楊酸與植物防禦機制關係密切, 而植物二次代謝物產生亦與植物防禦機制息息相關, 因此可藉由水楊酸的添加來提高植物二次代謝產物的增加。

本試驗為選取生長良好之喜樹懸浮培養細胞經繼代培養第 7 天, 再添加不同濃度水楊酸, 待第 14 天, 取出細胞凍乾, 秤重來觀察其細胞生長量, 另將凍乾細胞磨粉、萃取來檢測喜樹鹼含量變化。

水楊酸濃度在 0~200 μM 內對細胞生長量經 ANOVA 檢測發現具顯著差異, 隨水楊酸濃度的提高細胞生長量會隨之下降 (圖十四) (表三十四)。

添加水楊酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響, 結果顯示隨水楊酸濃度提高 10-羥基喜樹鹼含量亦隨之提高, 但高於 200 μM 時 10-羥基喜樹鹼產量開始下降。故本試驗以水楊酸濃度為 100 μM 時, 10-羥基喜樹鹼含量可達 887.49 $\mu\text{g/g}$ 效果較佳 (圖十四) (表三十五、三十六)。

Yu (Yu *et al.*, 2001) 等及梅興國(梅興國, 2000)研究結果均顯示, 水楊酸能有效提高紅豆杉(*Taxus*)細胞內紫杉醇(taxol)的含量, 梅興國更發現水楊酸會抑制過氧化物酶及可提高 PAL 的活性, 促進細胞內 H_2O_2 含量上升, 進而誘導或加強抗病反應, 致使紫杉醇的大量合成; 而本試驗結果顯示水楊酸可有效提高喜樹懸浮細胞內 10-羥基喜樹鹼之含量。



圖十四、添加不同濃度水楊酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響

※SA0：salicylic acid 0 μ M、SA50：salicylic acid 50 μ M、SA100：salicylic acid 100 μ M

SA200：salicylic acid 200 μ M

以 MS 液態培養基添加 NAA 2 mg/l，蔗糖 2%

每種處理重複三次

表三十四、不同濃度水楊酸對喜樹懸浮細胞生長影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.020067	4.27	0.0447
Error	8	0.0047		
Corrected Total	11			

表三十五、不同濃度水楊酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	318325	198.13	<.0001
Error	8	1606.656		
Corrected Total	11			

表三十六、不同濃度水楊酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	誘發劑濃度 (μ M)
A	887.49	3	100
B	618.36	3	0
C	353.25	3	200
D	135.81	3	50

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度水楊酸。

2. 幾丁質

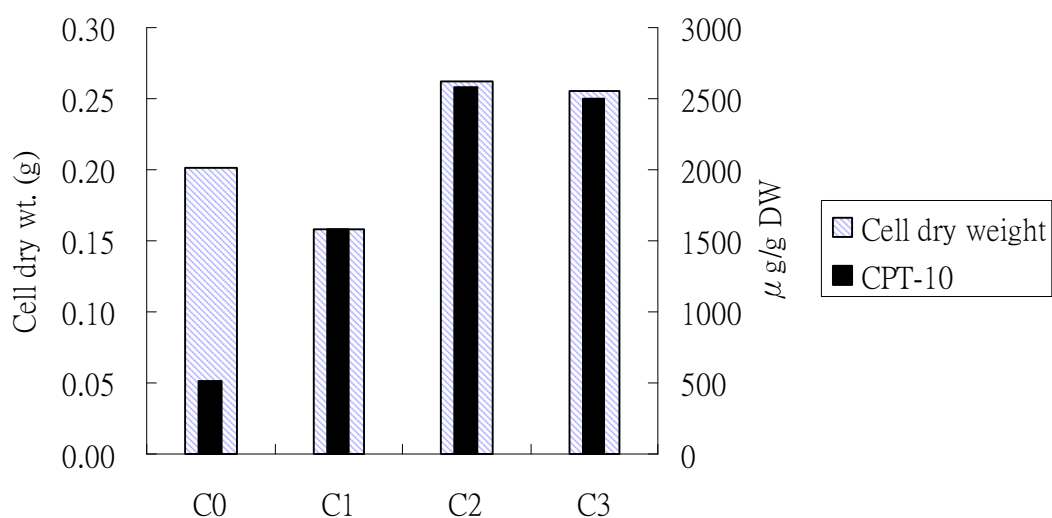
幾丁質(chitin)為構造類似纖維素的直鏈狀高分子醣類聚合物，在自然界分佈廣泛，如甲殼動物的外殼，節肢動物的外甲皮，軟體動物的外殼和內骨骼，還有真菌或酵母菌等微生物的細胞壁等，都有它的存在。幾丁質為真菌細胞壁之主要成份，當真菌入侵植物時，真菌細胞壁之幾丁質會誘導植物抗病原體的幾丁質酶及其同功酶的各種功用（董漢松,1995）。因此幾丁質可用於誘導改善植物二次代謝物的產量，例如蔡建欣（蔡建欣,1997）、楊舒婷（楊舒婷,2000）即使用幾丁質分別來提高藜豆生產 L-DOPA 及牛舌草生產迷迭香酸的產量，此外幾丁質亦會改變植物細胞膜的通透性及流動性（董漢松,1995）。

本試驗為選取生長良好之喜樹懸浮培養細胞經繼代培養第 7 天，再添加不同量之幾丁質懸浮液，待第 14 天，取出細胞凍乾，秤重來觀察其細胞生長量，另將凍乾細胞磨粉、萃取來檢測喜樹鹼含量變化。

幾丁質懸浮液在 0~3 ml/ 25ml 內對細胞生長量經 ANOVA 檢測發現具有顯著差異，即此幾丁質懸浮液濃度提高會提高喜樹細胞生長量（圖十五）（表三十七）。

添加幾丁質懸浮液對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示隨幾丁質懸浮液濃度提高 10-羥基喜樹鹼含量亦隨之提高，幾丁質懸浮液濃度為 2 ml/ 35ml、3 ml/ 35ml 時，10-羥基喜樹鹼含量分別可達 2579.49 μ g/g 及 2502.71 μ g/g 效果較佳（圖十五）（表三十八、表三十九）。

幾丁質會增加碗豆細胞中幾丁質酶與 1,3- β -glucanase 的活性，並且刺激細胞合成乙烯（Mauch, 1984）；幾丁質酶與 1,3- β -glucanase 的活性增加在植物防禦系統中扮演重要角色，因此幾丁質可用於誘導改善植物二次代謝物的產量；而本試驗結果顯示幾丁質可有效提高喜樹懸浮細胞內 10-羥基喜樹鹼之含量。



圖十五、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響

※C0：chitin 0 ml/ 25m 、C1：chitin 50 ml/ 25m、C2：chitin 100 ml/ 25m、C3：chitin 200 ml/ 25m

以 MS 液態培養基添加 NAA 2 mg/l，蔗糖 2%

每種處理重複三次

表三十七、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹懸浮細胞生長影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.007519	6.89	0.0132
Error	8	0.001092		
Corrected Total	11			

表三十八、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	2795741	127.84	<.0001
Error	8	21869.63		
Corrected Total	11			

表三十九、添加不同量幾丁質懸浮液對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N*	誘發劑濃度 (ml/25ml)
A	2579.5	3	1
A	2502.7	3	0
B	1584.8	3	2
C	516.2	3	3

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加不同量幾丁質懸浮液。

3. 茉莉酸

茉莉酸與甲基茉莉酸 (methyl jasmonate) 和其他茉莉酸的衍生物，均為一種特殊的環戊酮化合物，這類化合物統稱為 Jasmonates。這類物質可調控許多基因表達，歸納起來主要可分為兩大類：一部份是與植物發育有關，如種子的萌發和生長、儲藏蛋白的累積、花與果實的發育；另一部份與自身防禦系統有關，如真菌感染、病蟲害、乾旱、機械傷害、滲透壓迫等逆境的抗逆境耐力 (吳勁松、重康,2002)。

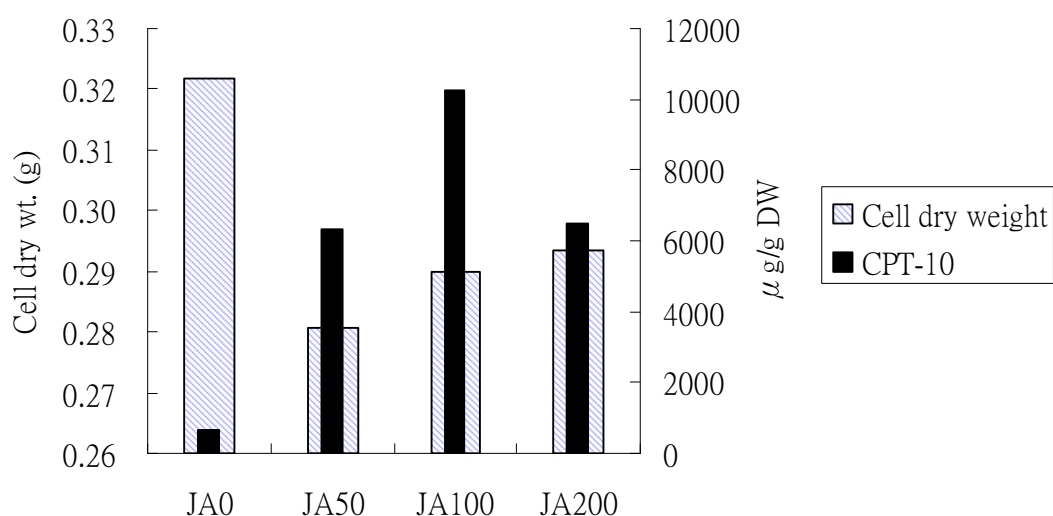
茉莉酸廣泛存在於高等植物體內的一种植物生長調節劑，當植物受到昆蟲、病原菌、乾旱時，體內茉莉酸含量會明顯增加，並累積蛋白酶抑制劑 (proteinase inhibitor)、植物防禦素與植物防禦反應相關的抗病蛋白 (pathogenesis-related protein, PR-protein)，增加植物對逆境的抗性 (Jong-Joo *et al.*, 2003、吳勁松、重康,2002)，此外亦可誘導改善植物二次代謝物的產量 (Yu, 2002)。

本試驗為選取生長良好之喜樹懸浮培養細胞經繼代培養第 7 天，在添加不同濃度之茉莉酸，待第 14 天，取出細胞凍乾，秤重來觀察其細胞生長量，另將凍乾細胞磨粉、萃取來檢測喜樹鹼含量變化。

茉莉酸在 0~200 μM 內對細胞生長量經 ANOVA 檢測發現並無顯著差異，即此濃度內茉莉酸對喜樹細胞生長並無顯著影響 (圖十六) (表四十)。

添加茉莉酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示茉莉酸可促進 10-羥基喜樹鹼生產，但經 ANOVA 檢定結果顯示不同濃度茉莉酸對 10-羥基喜樹鹼無顯著差異 (圖十六) (表四十一、表四十二)。

茉莉酸類物質可藉由誘導細胞色素 P450 基因的表達，進而誘導細胞色素 P450 酶的活性來促進植物二次代謝物的合成。推論茉莉酸類物質能提高喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼，可能也是通過細胞色素 P450 基因的表達，進而誘導細胞色素 P450 的活性而提高產量 (Suzuki, 1996；Pauli, 1998)。



圖十六、不同濃度茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響

※JA0 : jasmonic acid 0 μ M 、JA50 : jasmonic acid 50 μ M 、JA100 : jasmonic acid 100 μ M

JA200 : jasmonic acid 200 μ M

以 MS 液態培養基添加 NAA 2 mg/l ，蔗糖 2%

每種處理重複三次

表四十、不同濃度茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.001044	1.84	0.2175
Error	8	0.000567		
Corrected Total	11			

表四十一、不同濃度茉莉酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	46923466	3.76	0.0596
Error	8	12480722		
Corrected Total	11			

表四十二、不同濃度茉莉酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	誘發劑濃度 (μ M)
A	10246	3	100
B A	6490	3	200
B A	6346	3	0
B	657	3	50

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度茉莉酸。

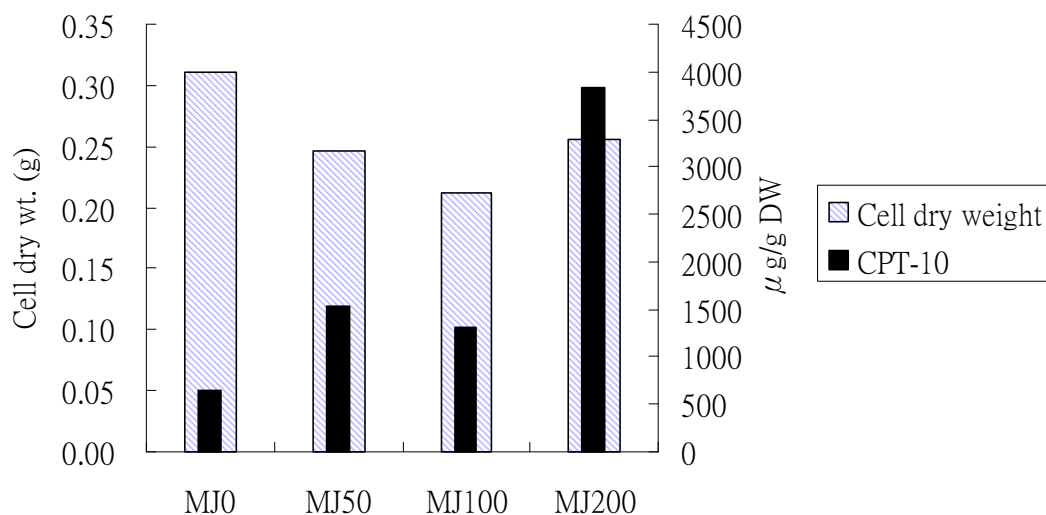
4. 甲基茉莉酸

甲基茉莉酸 (methyl jasmonate) 在其他植物中意有廣泛的分佈。近年來發現它在植物細胞的多種逆境反應中具有系統信號分子的功能，引起細胞抗逆境能力的提升，對於多種二次代謝物的合成具有誘導作用，被認為是非常有效的誘發劑 (Parchmann *et al.*, 1996)。Yukimune 等 (Yukimune *et al.*, 1996) 以甲基茉莉酸的添加來提高 *taxus media* 細胞培養紫杉醇的含量。

本試驗為選取生長良好之喜樹懸浮培養細胞經繼代培養第 7 天，添加不同濃度之幾丁質懸浮液，待第 14 天，取出細胞凍乾，秤重來觀察其細胞生長量，另將凍乾細胞磨粉、萃取來檢測喜樹鹼含量變化。

甲基茉莉酸在 0~200 μM 內對細胞生長量經 ANOVA 檢測發現具有著差異，即此甲基茉莉酸濃度提高會降低細胞生長量 (圖十七) (表四十三)。

添加甲基茉莉酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示隨甲基茉莉酸的提高，10-羥基喜樹鹼產量亦相對提高，本試驗以甲基茉莉酸濃度為 200 μM 時，10-羥基喜樹鹼含量可達 3836.59 $\mu\text{g/g}$ 效果較佳 (圖十七) (表四十四、表四十五)。



圖十七、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長及 10-羥基喜樹鹼生產之影響

※MJ0：methyl jasmonate 0 μM 、MJ50：methyl jasmonate 50 μM 、MJ100：methyl jasmonate 100 μM

MJ200：methyl jasmonate 200 μM

以 MS 液態培養基添加 NAA 2 mg/l，蔗糖 2%

每種處理重複三次

表四十三、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹懸浮細胞生長影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.004822	6.89	0.0131
Error	8	0.0007		
Corrected Total	11			

表四十四、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之變方分析表

Source	DF	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	5798495	35.8	<.0001
Error	8	161956.4		
Corrected Total	11			

表四十五、不同濃度甲基茉莉酸對喜樹懸浮細胞生產 10-羥基喜樹鹼影響之鄧肯氏新多變域測驗結果表

Duncan Grouping*	Mean	N**	誘發劑濃度 (μ M)
A	3836.6	3	0
B	1539.9	3	100
C B	1304.8	3	50
C	641.7	3	200

* Duncan,s Multiple Range Test ; 在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，相同字母同級，A 最好、以下類推。

**每種處理重複三次。

****以 MS 為基礎培養基，添加不同濃度甲基茉莉酸。

伍、結論

一、植物生長調節劑對喜樹癒合組織生長、分化、喜樹鹼生產影響

在喜樹癒合組織誘導方面除空白培養基及低濃度之 IBA (0.1~0.5mg/l) 無法誘導癒合組織外，其餘均可誘導獲得癒合組織。

本研究所採用的四種 auxin 以 NAA、IBA、Picloram 較有利喜樹癒合組織生長，2,4-D 則效果較差，且隨 auxin 濃度提高，生長情況會越差。單獨使用 NAA 1 mg/l 可獲得乾重細胞 0.1754g。2,4-D 與 Kinetin 搭配時，則最佳組合為 2,4-D 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 可得 0.0402 g 乾重細胞。IBA 與 BA 組合。以 IBA 0.5 mg/l，BA 4 mg/l 可獲 0.2935 g 乾重細胞。Picloram 與 Kinetin 組合，Picloram 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 可獲 0.1958 g 乾重細胞。

多芽體誘導方面，以喜樹胚為材料經 30 天培養後，IBA 0.5 mg/l 與 BA 0.5 mg/l 組合效果較佳，每個培植體平均可誘導得 8.93 個芽體，若再提高 IBA 濃度則所獲芽體數量開始減少，當 IBA 濃度提高至 4 mg/l 則不再有多芽體形成。

根誘導方面以喜樹胚為材料，以添加不同濃度 IBA 之 MS 培養基進行根之誘導。經 30 天培養，結果以 IBA 2 mg/l 誘導根效果較佳，每個培植體可獲得 19 條根，而當濃度高於 4 mg/l 時則效果開始變差。另外單獨使用 NAA 1 mg/l 亦可誘導不定根的形成，平均每個培植體可誘導 27.4 條根，但根的長度明顯較 IBA 所誘導之根短。

細胞懸浮培養方面，經試驗當細胞接種量為 0.5g/35ml 會發生稀釋效應導致細胞死亡，而接種量為 2~4g/25ml，則遲滯期較短，可快速進入對數增殖期迅速成長。

植物生長調節劑對喜樹癒合組織生產喜樹鹼方面 NAA 0 mg/l，BA 2 mg/l 及 NAA 6 mg/l，BA 2 mg/l 可檢測出喜樹鹼分別為 148.7001 μ g/g、188.3068 μ g/g；而 10-羥基喜樹鹼以 NAA 4 mg/l，BA 2 mg/l 組合可獲 945.4199 μ g/g，但是此一組不利於喜樹鹼生成。2,4-D 1 mg/l，Kinetin 0.5 mg/l 組合可獲 831.9969 μ g/g 的喜樹鹼效果最佳，隨 2,4-D 濃度提高至 2 mg/l 時喜樹鹼產量開始下降；而 10-羥基喜樹鹼結果相反，不添加 2,4-D 產量最高可達 373.3609 μ g/g，當 2,4-D 濃度高於 2mg/l 則無法檢測出 10-羥基喜樹鹼。IBA 0.1 mg/l，BA 2 mg/l 組合可獲 2020.9529 μ g/g 的喜樹鹼效果最佳；而 10-羥基喜樹鹼則隨 IBA 濃度增加產量會提高，IBA 4 mg/l，BA 2 mg/l 組合可獲 782.3756 μ g/g。低濃度 Picloram 可獲較多喜樹鹼及 10-羥基喜樹鹼 Picloram 0.5 mg/l，Kinetin 4 mg/l 組合可獲 3663.54 μ g/g 的喜樹鹼，及 10-羥基喜樹鹼 3130.83 μ g/g 效果較佳。

二、基礎培養基對喜樹生長、喜樹鹼生產之影響

植物組織培養中常用到的基礎培養基有 MS、WPM、B₅、White、LS 等，其中以 MS 培養基最為常用，無機鹽類濃度較高，為較穩定的離子平衡溶液，而一

般認為木本植物所需的鹽類濃度較低在紅豆杉、紫草、及赤桉中皆以 B₅ 培養基生長效果較佳，而 B₅ 中僅含 KNO₃ 而無 NH₄NO₃，故有利於細胞生長及二次代謝產生。另外 Fujita 指出 Whit 培養基可促進紫草二次代謝物之生產。本研究以 MS、WPM、為基礎培養基進行癒合組織誘導、生長、生產，結果顯示喜樹癒合組織誘導方面均有良好效果；而生長方面以 MS 培養基較適合喜樹癒合組織生長，MS 基礎培養基搭配光照環境次之可得乾重細胞 0.6166g，其原因可能是喜樹對培養基鹽類濃度需求量較高所致；生產喜樹鹼方面亦以 MS 為最佳，黑暗中下培養喜樹鹼產量可達 37352 $\mu\text{g/g}$ 10-羥基喜樹鹼則有 9900.1520 $\mu\text{g/g}$ ，光照環境下喜樹鹼產量為 37221 $\mu\text{g/g}$ 而 10-羥基喜樹鹼可獲 15718.5509 $\mu\text{g/g}$ 。

三、誘發劑對喜樹癒合組織生長、喜樹鹼生產之影響

本研究結果顯示添加 0~200 μM 水楊酸、0~200 μM 甲基茉莉酸，7 天的時間培養對喜樹細胞生長具顯著影響，隨濃度增加其生長量會減少，預備試驗發現當高濃度水楊酸培養時間超過 14 天即會褐化死亡。0~3ml/25ml 幾丁質，7 天的時間培養對喜樹細胞生長亦具顯著影響，隨濃度增加其生長量會增加。0~200 μM 茉莉酸 7 天的時間培養對喜樹細胞生長並無顯著影響。

而對喜樹二次代謝物生產方面，因培養時間過短，故僅少數檢品有測出喜樹鹼且含量均甚低，故本試驗均以檢測 10-羥基喜樹鹼為主；添加水楊酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示隨水楊酸濃度提高 10-羥基喜樹鹼含量亦隨之提高，但高於 200 μM 時 10-羥基喜樹鹼產量開始下降。故結果以水楊酸濃度為 100 μM 時，10-羥基喜樹鹼含量可達 887.4911 $\mu\text{g/g}$ 效果最佳。添加幾丁質懸浮液對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示隨幾丁質懸浮液濃度提高 10-羥基喜樹鹼含量亦隨之提高，幾丁質懸浮液濃度為 2 ml/ 35ml、3 ml/ 35ml 時，10-羥基喜樹鹼含量分別可達 2579.4853 $\mu\text{g/g}$ 及 2502.7098 $\mu\text{g/g}$ 效果最佳。添加茉莉酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示茉莉酸可促進 10-羥基喜樹鹼生產，但經 ANOVA 檢定結果顯示不同濃度茉莉酸對 10-羥基喜樹鹼無顯著差異，本試驗以茉莉酸濃度為 100 μM 時，10-羥基喜樹鹼含量可達 10246.2173 $\mu\text{g/g}$ 效果較佳。添加甲基茉莉酸對喜樹癒合組織生產 10-羥基喜樹鹼之影響，結果顯示隨甲基茉莉酸的提高，10-羥基喜樹鹼產量亦相對提高，本試驗以茉莉酸濃度為 200 μM 時，10-羥基喜樹鹼含量可達 3836.5916 $\mu\text{g/g}$ 效果較佳。

陸、參考文獻

- 田中秀夫、高山貞策、真也佳博、林隆久、豬口雅彥,1992,植物細胞工學 p 261-320
- 田蔚城,1996,生物技術,眾光文化出版 p 208-221
- 江蘇植物研究所編,1993,江蘇植誌,江蘇植物研究所編
- 吳勁松、重康,2002,茉莉酸作用的分子生物學研究,植物學通報 19 (2) : 164-170
- 花薇妮,2000,不同品系茄子組織培養生產花青素之研究,東海大學食品科學系碩士論文, p 9-36
- 邱年永、張光雄,1992,原色台灣藥用植物圖鑑(五),南天書局有限公司
- 張淑華、何政坤、蔡錦瑩,1996,台灣紅豆杉癒合組織之誘導、培養與紫杉醇生產台灣林業科學 11 (4) : 445-453
- 苗迺蕙,1998,銀杏細胞大量培養與銀杏內酯含量之探討,中國文化大學生物科技研究所碩士論文, p 8-91
- 梅興國、張舟寧、蘇湘鄂、龔佛, 2000, 水楊酸對紅豆杉細胞的誘導作用, 生物技術 10 (6) : 18-20
- 劉業經、呂福原、歐辰雄,1994,台灣樹木誌,國立中興大學農學院出版委員會 p 264
- 楊千瑩,2000,台灣產葛及青脆枝之成分分析與青脆枝癒合組織之誘導,國立屏東科技大學熱帶農業暨國際合作研究所碩士論文
- 楊舒婷,2000,利用牛舌草植物懸浮細胞培養生產迷迭香酸之研究,國立臺灣大學農業化學研究所碩士論文
- 董漢松主編,1995,植物誘導抗病性原理和研究,科學出版社 119-135
- 蔡建欣,1997,誘發劑對藜豆懸浮細胞培養系統生產 L-DOPA 的影響,國立臺灣大學化學工程研究所碩士論文
- 蘇遠志、楊瑞森、高建元,1990,利用植物細胞培養生產二級代謝物,生物產業, 1 (1) : 1-14
- 蕭裕生、張喜寧,2001, 誘導植物防疫功能的生化調控, 科學農業 49 : 64-69
- Apostol, I., Heistein, P.F. and Low, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells- role in defense and signal transduction. Plant Physiol. 90:109-116
- Choi, H. K., S. I. Kim, J. S. Son, S. S. Hong, H. S. Lee, and H. J. Lee , 2000, Enhancement of paclitaxel production by temperature shift in suspension culture of *Taxus chinensis* , Enzyme and Microbial Technology 27: 593-598
- Collins-Pavao, M.,C. -K. Chin, H. Pedersen ,1996, Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia* ,Journal of Biotechnology 49: 95-100
- Dominique, L.,T. G. Jocelyne, C. Jean-Claude and T. A. van Beek,1997, Production

- of ginkgolide and bilobalide in transformed and gametophyte derived cell cultures of *Ginkgo biloba*, phytochemistry 46:127-130
- Eilert, U., Constabel, F. and Kurz, W. G. W. ,1986,Elicitor stimulation of monoterpene indole alkaloid formation in suspension culture of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol. 126:11-22
- Ellis, D.D., E. L. Zeldin, M. Brodhagen, W. A. Russin and B.H. McCown ,1996, Taxol Production in Nodule Cultures of taxus , J. Nat. Prod. 59:246-250
- Fukushima, M. , N. Fukamiya, M. Okano, T. Nehira and K. Tagahara ,2000, Cytotoxicity of non-alkaloidal taxane diterpenes from *Taxus chinensis* against a paclitaxel-resistant cell line ,Cancer Letters 158: 151-154
- Hengel A.J.,Marien P. Harkes, Harry J. Whichers, Paul G.M. Hesselink and Reinetta M. Buitelaar, 1992, Charaterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28:11-18
- Ho, C. H.1994. Metabolic studies of *Catharanthus roseus* hairy root culturew by ¹³p and ¹³c nuclear magnetic resonance spectroscopy. Ph. D. dissertation Chemical Engineering, Rice University, USA
- Kitajima, M., U. Fischer, M. Nakamura, M. Ohsawa and M. Ueno, 1998, Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell culture. Phytochemistry 48(1):107-111
- Kim, S. I. , H. K. Choi, J. H. Kim, H. S. Lee and S. S. Hong,2001, Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis* , Enzyme and Microbial Technology 28:202-209
- Liu Z., Z. li, 2001, Micropropagation of camptotheca acuminata decaisne from axillary buds, shoot tip, and seed embryos in a tissue culture system, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 37:84-88
- Mauch, F., L.A., Hadwiger, and T. Boller, 1984, Ethylene: Symptom, not signal for induction of chitinase and 1,3- β -glucanase in pea pods by pathogens and elicitors., Plant Physiol., 76:607-611
- Manske R.H.F., 1983, The alkaloids chemistry and pharmacology volume X X I , National Institutes of Health Bethesda, Maryland 101-135
- Matsumoto, T., K. Nishida, N. Masao and E. Tamaki ,1973,Some factors affecting the anthocyanin formation by *Populus* cells in suspension culture. Agr. Biol. Chem. 37:561-567
- Merck Research Laboratories, 2001, The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals 13th ed.
- Morris, P., Scragg, A. H., Smart, N. J. and Stafford, A.,1985,Secondary product formation by cell suspension culture. In Plant Cell Culture. A Practical Approach.

- Dixon, R. A. (ed.) IRL Press, Washington DC, pp.127-167
- Ohana, P., D. P. Delmer, G. Volman, D. E. Mathews and M. Benziman, 1992, β -furfuryl- β -glucan synthase. Biological activity, distribution and *in vivo* synthesis. Plant
- Parchmann, S., H. Gundlach, M. J. Mueller, 1997, Induction of 12-Oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures, Plant Physiol, 115(3):1057-1064
- Pauli H. H., Kutchan T.M., 1998, Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding(S)-N-methylcoclaurine 3-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P450-dependent mono-oxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. Plant J, 13(6):793-801
- Renaudin, J. P., Brown, S. C. and Guern, J., 1985, Compartmentation of alkaloids in a cell suspension of *Catharanthus roseus*: A reappraisal of the role of pH gradients. In Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture. Neumann, K. -H., Barz, W., Reihard, E.(eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 124-132
- Roja, G., and M.R.Hemle, 1994, The quinoline alkaloids camptothecin and 9-methoxycamptothecin from tissue culture and mature trees of *Nothapodytes fortida*. Phytochemistry 36(1)65-66
- Sakto, K., and M. Misawa, 1974, Effect of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminata* cell culture. Agri.Bio.Chem. 38(3) : 491-497
- Scheel, D., 1990, Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. Z.Naturforsch 45c. 569-575 Schlattmann, J. E., C. M. A. Koolhaas, J. E. Vinke, H. J. G. ten Hoopen and J. J.
- Sudo H., Hasegawa Y. and Matsunaga J., 1991, Antiviral components of *Ophiorrhiza mungos* isolation of camptothecin and 10-methoxycamptothecin. Lloydia 39:261-262
- Suzuki G., H. Ohta, T. Kato, F. Sakai, D. Shibata, A. Takano, T. Masuda, Y. Shioi, K. Takamiya, 1996, Induction of a novel cytochrome P450(CYP93 family) by methyl jasmonate in soybean suspension cultured cells, FEBS Letters, 383(1-2):83-86
- Torssell, K.B.G., 1983, Natural Product Chemistry---a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism, John Wiley and Sons.
- Heilnen, 1995, The role of glucose in ajmalicine production by *Catharanthus roseus* cellculture. Biotechnology and bioengineering 47:525-534
- Van-Hengel A. J., Harkes M.P., Wichers H. J., Hesselink P.G. M., and Buitelaar R. M., 1992, Characterization of callus formation and camptothecin production by cellines of *Camptotheca acuminata*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28:11-18

- Van-Hengel A. J. , Buitelaar R. M. , Wichers H. J. , 1994, *Camptotheca acuminata*.
Done: In vitro culture and the production of camptothecin. In Bajaj YPS(ed)
Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol28. Medicinal and aromatic Plants
VII98-112 pp
- Wall M. E., Waant M.C., Cooke C.E., Palmer K.H., McPhail A.T. and Sim G. A.,
1966, Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin. A
novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* J.Am.
Chem. Soc. 88:3888-3890
- Wang, H. Q., J. T. Yui and J. J. Zong, ,1999, Significant improvement of taxane
production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy ,
Process Biochemistry 35 :479 – 483
- Wiedenfeld H.,M. Furmanowa,E. Roeder, J. Guzewska and W. Gustowski, 1997,
Csmptothecin and 10-Hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca
acuminata* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49:213-218
- Yu, L. J.,W. Z. Lan, W. M. Qin, H. B. Xu, 2001, Effects of salicylic acid on fungal
elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell
suspension cultures of *Taxus chinensis* , Process Biochemistry 37: 477 - 482
- Yu, k. w., W. Gaob, E J. Hahna., K. Y. Paek, 2002,Jasmonic acid improves
ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer,
Biochemical Engineering Journal 11:2-3
- Yukimune, Y., H. Tabata, Y. Hara,1996, Methyl jasmonate-induced overproduction of
paclitaxel and bac III in *Taxus* cell suspension culture. Nature Biotechnology,
14:1129-1032
- Zhang, W. , X. F. Bai, Z. S. Bu , J. M. Wang, X. J. Yu and Q. Yuan, 1998,Enhanced
production of harringtonine and homoharringtonine in *Cephalotaxus fortunei* callus
culture by periodic temperature oscillation. Biotechnology letters 20:63-66
- Zu, Y. G., T. Z. Hua, J. H. Yu, and C. J. Zhao, 2003, Camptothecin and
10-Hydroxycamptothecin accumulate differentially under specific developmental
control in *Camptotheca acuminata*, Acta Botanica Sinica 45(4):494-499

柒、照片

照片 1. 喜樹胚培養於 MS 空白培養基 30 天後無法誘導出癒合組織。
(bar=5mm) 。

照片 2. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出少量綠、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 3. 喜樹胚培養於 MS 添加 2 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出少量綠、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 4. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出少量綠、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 5. 喜樹胚培養於 MS 添加 1 mg/l NAA 培養基 30 天後能誘導出大量黃色及白色癒合組織及不定根。(bar=5mm)。

照片 6. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l NAA 培養基 30 天後能誘導出大量黃色及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 7. 喜樹胚培養於 MS 添加 1 mg/l NAA 與 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出大量白色、綠色及少量紅色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 8. 喜樹胚培養於 MS 添加 1 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出大量白色、綠色及紅色癒癒合組織。(bar=5mm)。



照片 1.



照片 5.



照片 2.



照片 6.



照片 3.



照片 7.



照片 4.



照片 8.

照片 9. 喜樹胚培養於 MS 添加 6 mg/l NAA 與 4 mg/l BA 培養基 30 天後能誘導出黃色及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 10. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l kinetin 培養基 30 天後能誘導出少量白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 11. 喜樹胚培養於 MS 添加 1 mg/l kinetin 培養基 30 天後能誘導出少量白色癒合組織但易褐化死亡。(bar=5mm)。

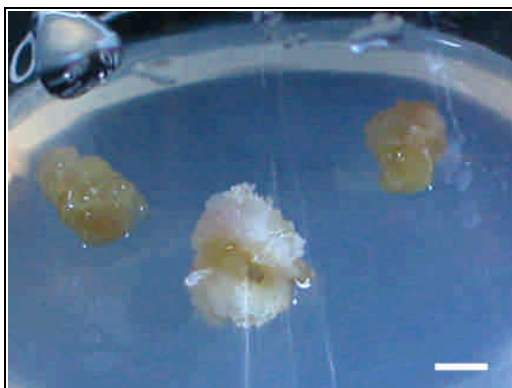
照片 12. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l kinetin 培養基 30 天後子葉會身展開來且能誘導出少量白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 13. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l 2,4-D 與 0.5 mg/l kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃色及紅色癒合組織。(bar=5mm)。(bar=5mm)。

照片 14. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l 2,4-D 與 2 mg/l kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃色及白色癒合組織。

照片 15. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l 2,4-D 與 0.1 mg/l kinetin 培養基 30 天後能誘導出少量黃色及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 16. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l 2,4-D 與 4 mg/l kinetin 培養基 30 天後誘導出黃色及白色癒合組織。(bar=5mm)。



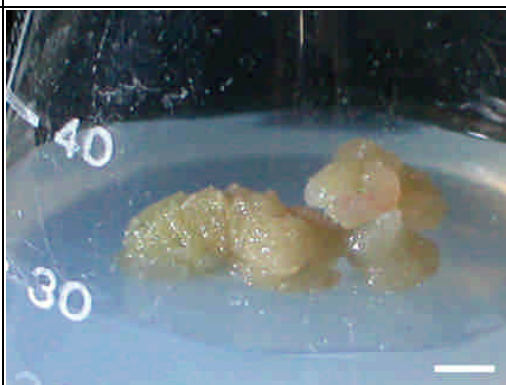
照片 9.



照片 13.



照片 10.



照片 14.



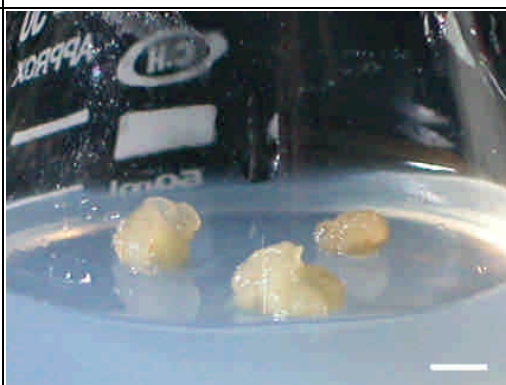
照片 11.



照片 15.



照片 12.



照片 16.

照片 17. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.1 mg/l IBA 培養基 30 天後無法誘導出癒合組織，培植體褐化死亡。(bar=5mm)。

照片 18. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 培養基 30 天後能誘導出不定根。(bar=5mm)。

照片 19. 喜樹胚培養於 MS 添加 2 mg/l IBA 培養基 30 天後能誘導大量不定根。(bar=5mm)。

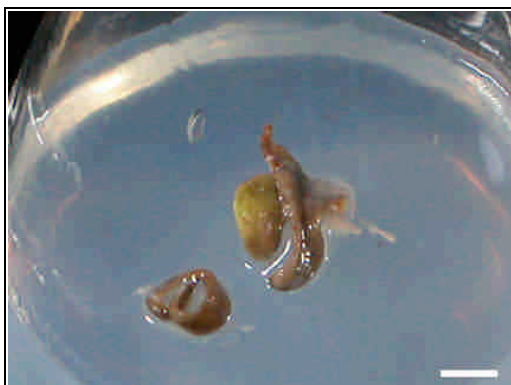
照片 20. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l IBA 培養基 30 天後能誘導出不定根及黃色與白色質地較硬的癒合組織。(bar=5mm)。

照片 21. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.1 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後芽體抽長且子葉會捲曲狀展開，並產生少量白色及綠色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 22. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後之情形。喜樹胚培養於 MS 添加 2mg/l IBA 與 0.5mg/l BA 培養基 30 天後芽體抽長且子葉會捲曲狀展開，並產生少量白色及綠色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 23. 喜樹胚培養於 MS 添加 2 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後芽體抽長且子葉會捲曲狀展開，並產生少量白色及綠色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 24. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基 30 天後後子葉會捲曲狀展開，並產生少量白色及綠色癒合組織，但較易於褐化 (bar=5mm)。



照片 17.



照片 21.



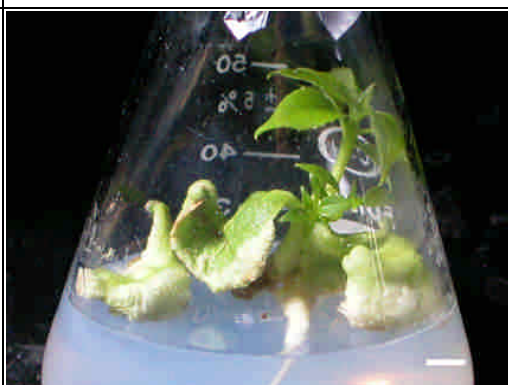
照片 18.



照片 22.



照片 19.



照片 23.



照片 20.



照片 24.

照片 25. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 1 mg/l BA 培養基 30 天後後子葉會捲曲狀展開，誘導出綠色及白色癒合組織，但較易褐化。(bar=5mm)。

照片 26. 喜樹胚培養於 MS 添加 2 mg/l IBA 與 1 mg/l BA 培養基 30 天後後子葉會捲曲狀展開，誘導出綠、紅及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 27. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l IBA 與 1 mg/l BA 培養基 30 天後子葉會捲曲狀展開，誘導出綠、紅及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 28. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.1 mg/l Picloram 與 0.1 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出綠、紅及白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 29. 喜樹胚培養於 MS 添加 2 mg/l Picloram 與 0.1 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃及白色癒合組織，但易褐化。(bar=5mm)。

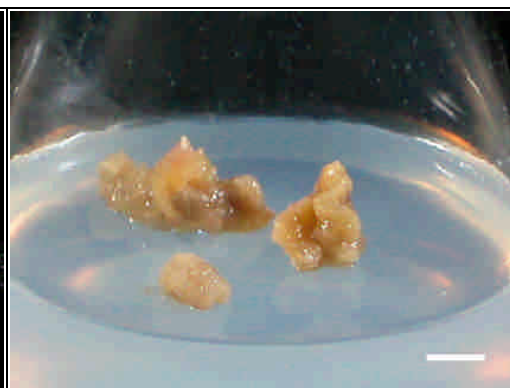
照片 30. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l Picloram 與 0.1 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃及白色癒合組織，但易褐化。(bar=5mm)。

照片 31. 喜樹胚培養於 MS 添加 0.5 mg/l Picloram 與 1 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出大量紅色及少量黃色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 32. 喜樹胚培養於 MS 添加 1 mg/l Picloram 與 1 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出紅色及黃色癒合組織。(bar=5mm)。



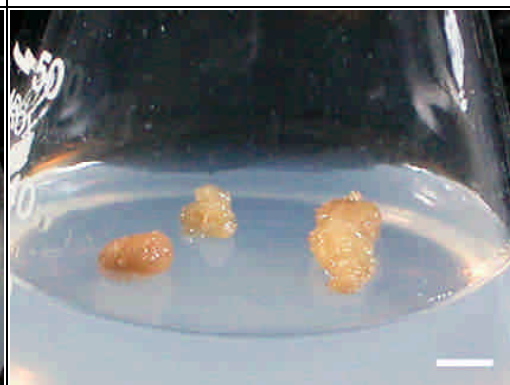
照片 25.



照片 29.



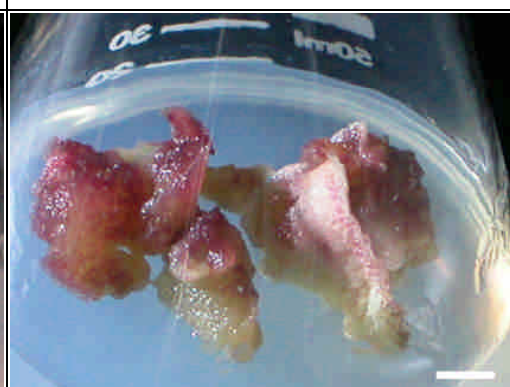
照片 26.



照片 30.



照片 27.



照片 31.



照片 28.



照片 32.

照片 33. 喜樹胚培養於 MS 添加 4mg/l Picloram 與 1mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 34. 喜樹胚培養於 MS 添加 4 mg/l Picloram 與 4 mg/l Kinetin 培養基 30 天後能誘導出黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 35. 喜樹胚置於 MS 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基光照環境下培養 45 天後能誘導出綠、紅、黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 36. 喜樹胚置於 MS 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基黑暗環境下培養 45 天後能誘導出黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 37. 喜樹胚置於 WPM 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基光照環境下培養 45 天後能誘導出綠、紅、黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

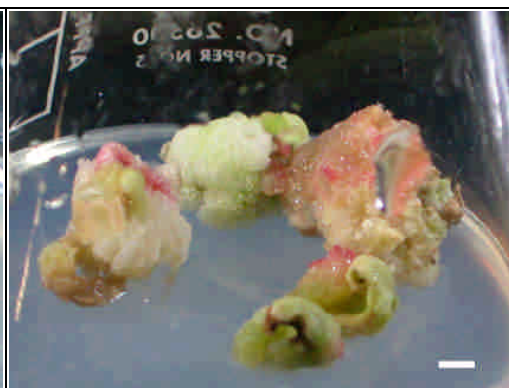
照片 38. 喜樹胚置於 WPM 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基黑暗環境下培養 45 天後能誘導出黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 39. 喜樹胚置於 B₅ 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基光照環境下培養 45 天後能誘導出綠、紅、黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。

照片 40. 喜樹胚置於 B₅ 添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 培養基黑暗環境下培養 45 天後誘導出黃、白色癒合組織。(bar=5mm)。



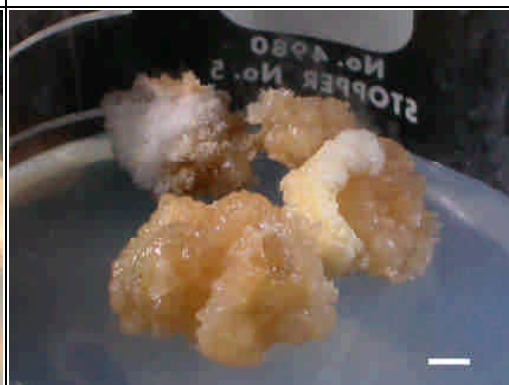
照片 33.



照片 37.



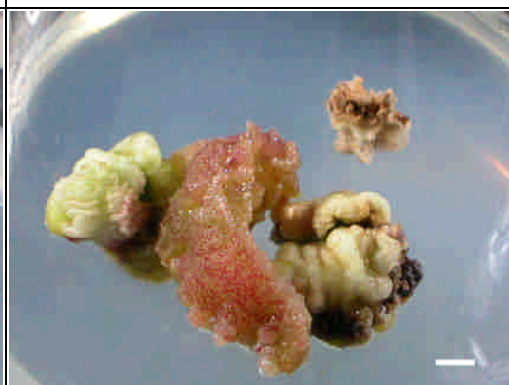
照片 34.



照片 38.



照片 35.



照片 39.



照片 36.



照片 40.

照片 41. 喜樹胚置於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基光照環境下培養 9 天後所誘導不定芽之情形。(bar=5mm)。。

照片 42. 喜樹胚置於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基光照環境下培養 15 天後所誘導不定芽之情形。(bar=5mm)。。

照片 43. 喜樹胚置於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基光照環境下培養 30 天後所誘導不定芽之情形。(bar=5mm)。。

照片 44. 喜樹胚置於 MS 添加 0.5 mg/l IBA 與 0.5 mg/l BA 培養基光照環境下培養 45 天後所誘導不定芽之情形。(bar=5mm)。。

照片 45. 喜樹胚置於添加 2 mg/l IBA 之 MS 培養基光照環境下培養 7 天後誘導不定根之情形。(bar=5mm)。。

照片 46. 喜樹胚置於添加 2 mg/l IBA 之 MS 培養基光照環境下培養 15 天後誘導不定根之情形。。(bar=5mm)。

照片 47. 喜樹胚置於添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 之 MS 培養基光照環境下培養 45 天後之紅色癒合組織以塗抹片觀察法於倒立顯微鏡下觀察之情形。(倍數=100)。

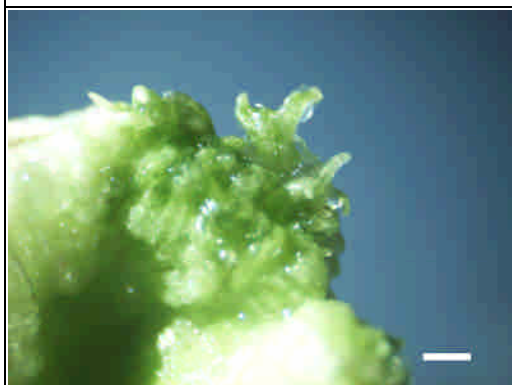
照片 48. 喜樹胚置於添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 之 MS 培養基光照環境下培養 45 天後之白色癒合組織以塗抹片觀察法於倒立顯微鏡下觀察之情形。(倍數=100)。



照片 41.



照片 45.



照片 42.



照片 46.



照片 43.



照片 47.



照片 44.



照片 48.

照片 49. 喜樹胚置於添加 4 mg/l NAA 與 2 mg/l BA 之 MS 培養基黑暗環境下培養 45 天後之白色癒合組織以塗抹片觀察法於倒立顯微鏡下觀察之情形。(倍數=100)。。



照片 49.

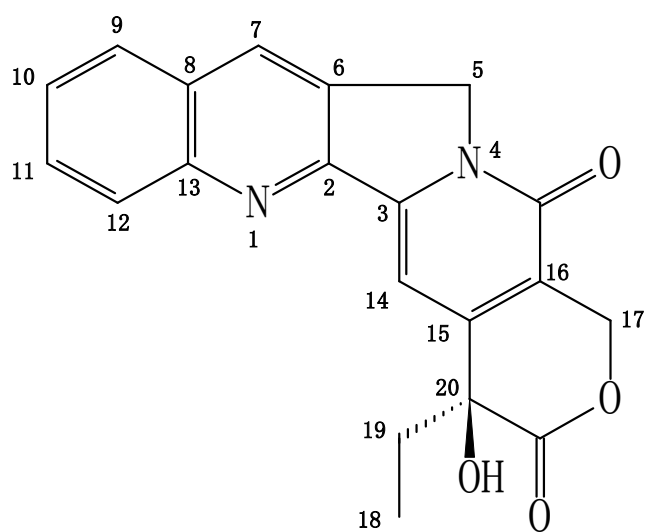
捌、附錄

附錄一、喜樹 (*Camptotheca acuminata* Decaisne) 之形態 (江蘇植物研究所, 1982)



图 1618 喜 树

附錄二、Camptothecin 結構式 (Manske.,1983)



^1H NMR (in CF_3COOH) : d

0.69 (3H, t, $J=7.0$, H-18)

1.72 (2H, q, $J=7.0$, H-19)

5.40 (2H, s, H-5)

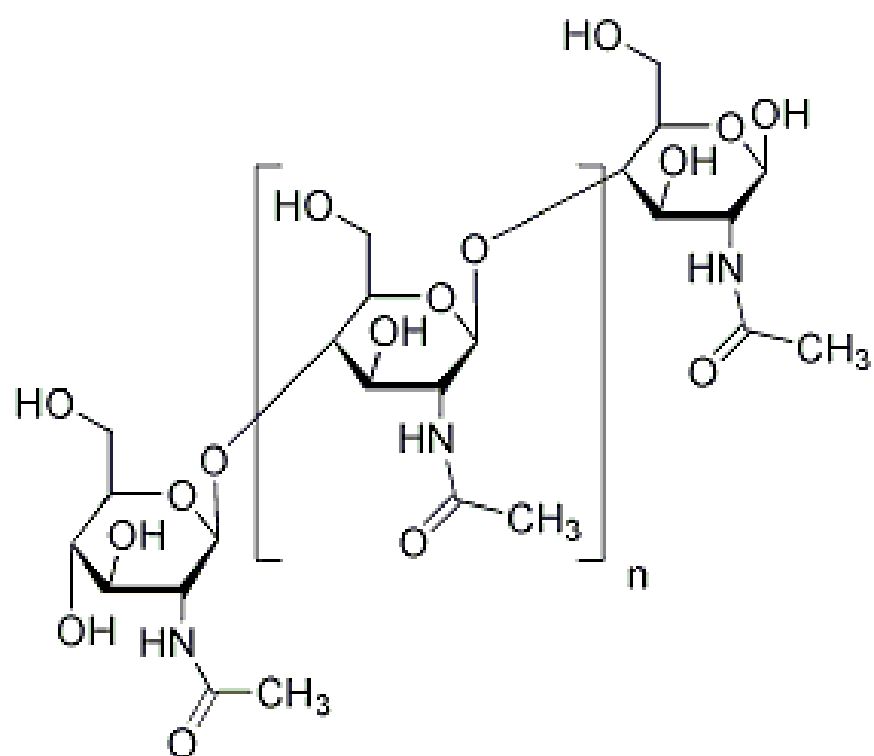
5.18 (1H, d, $J=16.0$, H-17)

5.54 (1H, d, $J=16.0$, H-17)

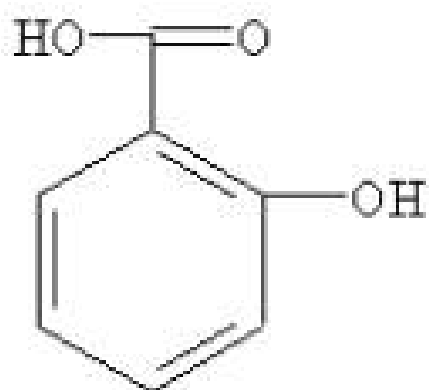
7.66-8.14 (5H, m, H-9-12,14)

9.00 (1H, s, H-7)

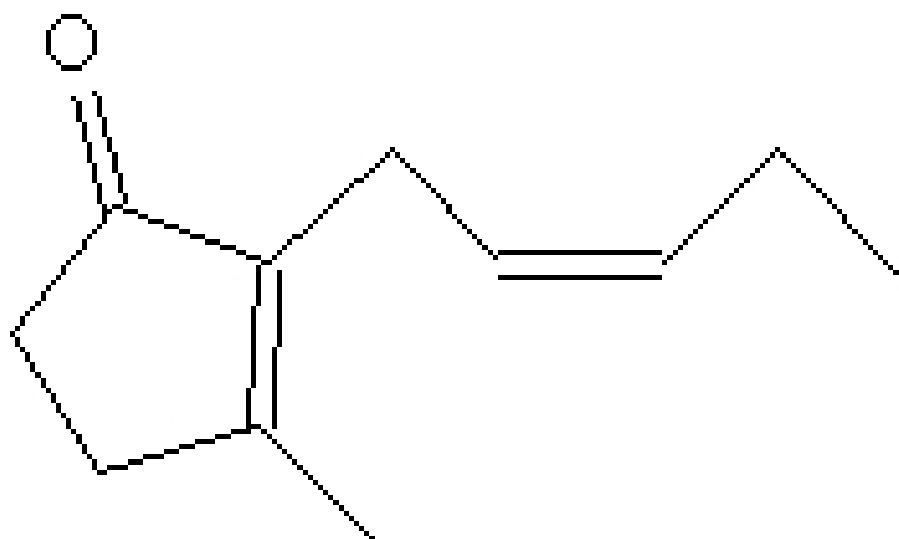
附錄三、機丁質結構式（Merck Research Laboratories, 2001）



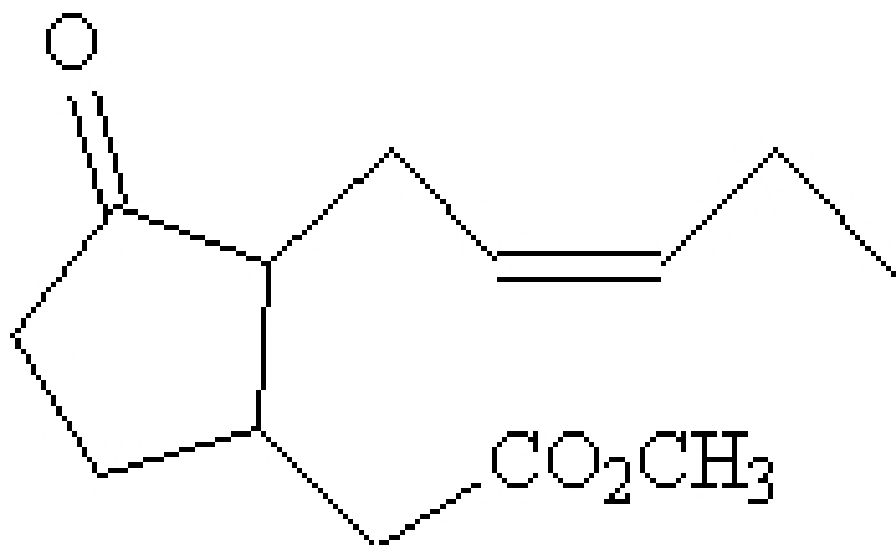
附錄四、水楊酸結構式（Merck Research Laboratories, 2001）



附錄五、茉莉酸結構式（Merck Research Laboratories, 2001）



附錄六、甲基茉莉酸結構式（Merck Research Laboratories, 2001）



附錄七、基礎培養基組成份一覽表

成分含量(mg/L)	WPM	MS	B ₅
KNO ₃		1900	2500
NH ₄ NO ₃	400	1650	
KH ₂ PO ₄	170	170	
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O			150
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556		
CaCl ₂ ·7H ₂ O	96	440	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	250
(NH ₄) ₂ SO ₄			134
K ₂ SO ₄	990		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O		22.3	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	3
KI		0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025	0.025
Thiamine·HCl	1.0	0.1	10
Pyridoxine·HCl	0.5	0.5	1
Nicotinic acid	0.5	0.5	1
Glycine	2.0	2.0	
Myo-inositol	100	100	100
sucrose	20000	30000	20000
pH	5.2	5.7	5.5

附錄八、不同濃度 NAA 與 BA 組合處理，細胞增加乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果－試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且達到顯著水準，故再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果

A	B	obs LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.0154	0.006491	0.0216	1
1	2	0.0692	0.006491	<.0001	2
1	3	0.0635	0.006491	<.0001	3
1	4	0.0651	0.006491	<.0001	4
1	5	0.0529	0.006491	<.0001	5
2	1	0.1754	0.006491	<.0001	6
2	2	0.1636	0.006491	<.0001	7
2	3	0.1285	0.006491	<.0001	8
2	4	0.098893	0.006491	<.0001	9
2	5	0.027	0.006491	0.0001	10
3	1	0.0425	0.006491	<.0001	11
3	2	0.1665	0.006491	<.0001	12
3	3	0.1197	0.006491	<.0001	13
3	4	0.0404	0.006491	<.0001	14
3	5	0.0514	0.006491	<.0001	15
4	1	0.0391	0.006491	<.0001	16
4	2	0.1637	0.006491	<.0001	17
4	3	0.0444	0.006491	<.0001	18
4	4	0.0664	0.006491	<.0001	19
4	5	0.0426	0.006491	<.0001	20
5	1	0.0161	0.006491	0.0165	21
5	2	0.0416	0.006491	<.0001	22
5	3	0.0705	0.006491	<.0001	23
5	4	0.087	0.006491	<.0001	24
5	5	0.0243	0.006491	0.0005	25

附錄九、不同濃度 2,4-D 與 Kinetin 組合處理，細胞增加乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果－試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且達到顯著水準，故再以 Least Squares Means(LSMEAN)進行比較之結果

A	B	obs LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.0184	0.003845	<.0001	1
1	2	0.0349	0.003845	<.0001	2
1	3	0.0357	0.003845	<.0001	3
1	4	0.0166	0.003845	<.0001	4
1	5	0.0288	0.003845	<.0001	5
2	1	0.0199	0.003845	<.0001	6
2	2	0.0184	0.003845	<.0001	7
2	3	0.0262	0.003845	<.0001	8
2	4	0.0289	0.003845	<.0001	9
2	5	0.0402	0.003845	<.0001	10
3	1	0.02	0.003845	<.0001	11
3	2	0.0178	0.003845	<.0001	12
3	3	0.01	0.003845	0.0122	13
3	4	0.0168	0.003845	<.0001	14
3	5	0.009	0.003845	0.0233	15
4	1	0.0116	0.003845	0.004	16
4	2	0.014	0.003845	0.0006	17
4	3	0.0117	0.003845	0.0037	18
4	4	0.0085	0.003845	0.0317	19
4	5	0.0102	0.003845	0.0107	20
5	1	0.005	0.003845	0.1994	21
5	2	0.0097	0.003845	0.0149	22
5	3	0.0082	0.003845	0.0379	23
5	4	0.037	0.003845	<.0001	24
5	5	0.0096	0.003845	0.0159	25

附錄十、不同濃度 IBA 與 BA 組合處理，細胞增加乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果－試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且達到顯著水準，故再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果

A	B	obs LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.0043	0.01089	0.6946	1
1	2	0.0854	0.01089	<.0001	2
1	3	0.1994	0.01089	<.0001	3
1	4	0.113	0.01089	<.0001	4
1	5	0.1841	0.01089	<.0001	5
2	1	0.0221	0.01089	0.0478	6
2	2	0.0791	0.01089	<.0001	7
2	3	0.1805	0.01089	<.0001	8
2	4	0.1181	0.01089	<.0001	9
2	5	0.2935	0.01089	<.0001	10
3	1	0.0366	0.01089	0.0015	11
3	2	0.2704	0.01089	<.0001	12
3	3	0.116	0.01089	<.0001	13
3	4	0.0844	0.01089	<.0001	14
3	5	0.0595	0.01089	<.0001	15
4	1	0.1025	0.01089	<.0001	16
4	2	0.0798	0.01089	<.0001	17
4	3	0.0997	0.01089	<.0001	18
4	4	0.1396	0.01089	<.0001	19
4	5	0.1979	0.01089	<.0001	20
5	1	0.038	0.01089	0.001	21
5	2	0.0665	0.01089	<.0001	22
5	3	0.1373	0.01089	<.0001	23
5	4	0.044	0.01089	0.0002	24
5	5	0.1496	0.01089	<.0001	25

附錄十一、不同濃度 Picloram 與 Kinetin 組合處理，細胞增加乾重，以 SAS 軟體進行 CRD 分析結果—試驗組間因為 A，B 兩因子具有交感作用並且達到顯著水準，故再以 Least Squares Means(LSMean)進行比較之結果

A	B	obs LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
1	1	0.0908	0.004005	<.0001	1
1	2	0.1143	0.004005	<.0001	2
1	3	0.1588	0.004005	<.0001	3
1	4	0.1036	0.004005	<.0001	4
1	5	0.1424	0.004005	<.0001	5
2	1	0.024	0.004005	<.0001	6
2	2	0.0192	0.004005	<.0001	7
2	3	0.1093	0.004005	<.0001	8
2	4	0.0833	0.004005	<.0001	9
2	5	0.1958	0.004005	<.0001	10
3	1	0.0264	0.004005	<.0001	11
3	2	0.0406	0.004005	<.0001	12
3	3	0.0372	0.004005	<.0001	13
3	4	0.0526	0.004005	<.0001	14
3	5	0.0427	0.004005	<.0001	15
4	1	0.0116	0.004005	0.0056	16
4	2	0.0204	0.004005	<.0001	17
4	3	0.0305	0.004005	<.0001	18
4	4	0.0202	0.004005	<.0001	19
4	5	0.0294	0.004005	<.0001	20
5	1	0.0236	0.004005	<.0001	21
5	2	0.016	0.004005	0.0002	22
5	3	0.0222	0.004005	<.0001	23
5	4	0.0261	0.004005	<.0001	24
5	5	0.0407	0.004005	<.0001	25