

青剛櫟組織培養二次代謝產物之探討¹

王亞男² 李衛宗³

(收件日期：民國 91 年 4 月 26 日、接受日期：民國 91 年 6 月 30 日)

【摘要】本試驗乃利用青剛櫟 (*Cyclobalanopsis glauca*) 之未成熟胚為材料，誘導癒合組織，並利用高效液相層析法 (HPLC) 進行癒合組織內二次代謝物成分之分析，結果顯示：在黑暗的培养環境下，癒合組織誘導率較高，平均為 91.17%，其中以植物生長調節劑濃度為 1 mg/l 的 2,4-D 誘導率最高，達到 94.52%。在黑暗中培養 40 天之癒合組織，其重量平均增加 8.79 倍，其中又以 0.5 mg/l 之 2,4-D 處理較高，增加 17.97 倍。

在 36 個試驗細胞株樣品中，主要檢測出 (+)-catechin 和 (-)-epicatechin 二種成分。每 1 公克新鮮癒合組織細胞內平均含有 186.21 μ g 之 (+)-catechin 及 54.28 μ g 之 (-)-epicatechin。

【關鍵詞】青剛櫟、癒合組織、多酚性化合物。

SECONDARY METABOLITES FROM TISSUE CULTURES OF *CYCLOBALANOPSIS GLAUCA*¹

Ya-Nan Wang² Wei-Tsung Li³

(Received April 26, 2002; Accepted June 30, 2002)

【Abstract】 Immature embryos of *Cyclobalanopsis glauca* were used as explants in this experiment. When immature embryos were transferred into MS medium in the dark, average induction rate was 91.17% the highest induction rate was 94.52% among all treatments in the medium of 1 mg/l 2,4-D. After cultivation for 40 days in the dark, average doubling rate was 8.79. The highest doubling rate was 17.97 in the medium of 0.5 mg/l 2,4-D.

Among thirty-six callus cell samples, (+)-catechin and (-)-epicatechin were detected mainly. On average, one gram fresh callus cell contained 186.21 μ g (+)-catechin and 54.28 μ g (-)-epicatechin.

【Key words】 *Cyclobalanopsis glauca*, Callus, Polyphenolic compound.

I、前言

自從人類開始栽培植物以來，植物便被應用在許多廣泛的用途上，除了食用之外，最重要的是其醫藥用途，人類所使用的藥物之中有

一半以上是來自於植物，植物為現代醫藥提供了重要且多樣的藥物來源，藉由萃取植物內具有活性的化合物仍是許多藥廠開發新藥物的主要途徑，單在美國一地，高達百分之二十五的處方用藥仍是由植物體直接萃取而來 (Kadir, 1998)。

1 本文承國科會補助 (計劃編號：90WFA0101817；89WFA0100160)。

2 國立台灣大學森林系教授，通訊作者。

Professor, Department of Forestry, National Taiwan University. Corresponding Author.

3 國立台灣大學森林系碩士班研究生。

Graduate Student, Department of Forestry, National Taiwan University.

一些殼斗科櫟屬的植物在民間常被用來作為治療大量出血的收斂劑，以及治療發炎、黃疸和腫塊。Sheu *et al.*, (1997) 的研究指出：青剛櫟富含具有生物活性之多酚類化合物，包括：(+)-catechin、(-)-epicatechin、(+)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin、(+)-catechin-3-O- α -L-rhamnopyranoside、procyanidin-B-4。其中 catechins 可增加血漿之抗氧化性，降低罹患心血管疾病的風險，特別是(-)-epigallocatechin 可有效的預防血漿中低密度脂蛋白(LDL, low-density lipoprotein)氧化，而 LDL 氧化已被證實是血管粥狀硬化過程中很重要的步驟，可降低心臟冠狀動脈疾病和血管粥狀硬化所引起的新血管疾病的發病率及死亡率(Teruo, 2000)。此外，catechins 也證實對致癌物質具有抑制作用，特別是可預防皮膚癌和肺癌的發生，而在癌症的初期、中期及末期，亦可有效控制癌細胞的移轉和生長(Yang *et al.*, 2000)。

然而這些具生物活性之多酚性成分，在植物體中之含量極低，為獲得其中的有效成分，必須採集大量的葉片進行抽取，除需耗費廣大的土地來種植之外，也易受到環境、氣候或病蟲害的影響，且抽取過程往往需耗費大量之有機溶劑，造成環境二次污染的壓力。但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產生，並不符合經濟效益，且(+)-catechin、(-)-epicatechin、(+)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin 這些順反式同分異構物，並非都可利用化學合成的方式來進行大量生產。因此，經由青剛櫟癒合組織之誘導及培養，或許可取代上述二種方式，來合成具有藥用價值的成分。因此本實驗採用不同的生長調節劑與不同的培養環境，探討影響細胞生長及二次代謝物生產之因子，以期建立一套由青剛櫟癒合組織生產多酚性化合物的量產系統。

II、材料與方法

(I) 青剛櫟之癒合組織培養

1999、2000年9月，於宜蘭台7甲線2~6公里處所採得之青剛櫟未成熟種子，以水苔覆蓋，置於4°C冰箱中儲存。

1. 癒合組織之誘導

將未成熟種子去除其基部的殼斗後，先以稀釋500倍的的安期消毒劑(Benzethonium Chloride 10 w/v% + Alkyl Arylpolyether 10 w/v%)清洗10分鐘後，再以70%酒精浸泡5分鐘，最後以5% NaOCl水溶液(含約1% (v/v) Tween20 展著劑)消毒15分鐘。取其長約2mm的未成熟胚進行培養，再利用其未成熟胚所誘導出來的胚軸作為培植體進行癒合組織誘導，每一培養基中置入5-6個培植體，重複3次，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，以25°C分別於光照(27 μ E/m²·s)及黑暗狀態中培養4~5星期。本試驗所使用的培養基為MS培養基(Murashige and Skoog, 1962)，其中分別添加0.5、1.0及1.5 mg/l之NAA(α -naphthaleneacetic acid)①或②或2,4-D(2,4-dichloro phenoxyacetic acid)，另外加入3%(w/v)蔗糖及0.7%(w/v)洋菜，培養基在蒸餾前調酸鹼值至pH=5.7。經過1個月的培養之後，觀察所產生之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。

2. 癒合組織之增殖

將所誘導之癒合組織，選擇生長較佳、活力較好之細胞進行增殖，每40天測量其鮮重且進行繼代培養。將培養40天之癒合組織取出，置於濾紙上除去多餘水分後稱重，除以其初重，即為其增加倍率。

3. 統計分析

本試驗各項試驗設計全部以SAS統計軟體進行計算分析，採用完全隨機設計(Complete Randomized Design)，試驗結果之數據以ANOVA(Analysis of Variance)測驗其顯著性，並以鄧肯氏新多變域檢定法(Duncan's Multiple Range Test)檢查5%的差異顯著性。採用複因子設計，檢定MS基礎培養基中，於不同

光照下，單獨添加 0.5、1、1.5 mg/l 之 NAA 及 2,4-D 對癒合組織誘導及生長量之效應。

(II) 青剛櫟癒合組織內二次代謝物成分測定

選取生長量較佳、活力較好之光度與植物生長調節劑濃度組合，經 40 天培養所得之細胞株進行分析 (表 1)，將利用不同光度及植物生長調節劑培養的癒合組織，依不同單株來源分別收集，保存於 4°C 冰箱中。

表 1 進行癒合組織內二次代謝物分析之不同光度與植物生長調節劑濃度之組合

Table 1 The combination of different luminosity and plant growth regulators for secondary metabolism analysis in callus

光度 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$	植物生長調節劑種類與濃度	
	NAA (0.5 mg/l)	2,4-D (0.5 mg/l)
27	NL	DL
0	ND	DD

- NL：培養於含 0.5 mg/l NAA 之 MS 固態培養基，光照強度 27 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ，光週期為 16 小時。
- ND：培養於含 0.5 mg/l NAA 之 MS 固態培養基，於暗室中培養。
- DL：培養於含 0.5 mg/l 2,4-D 之 MS 固態培養基，光照強度 27 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ，光週期為 16 小時。
- DD：培養於含 0.5 mg/l 2,4-D 之 MS 固態培養基，於暗室中培養。

稱取 3 g 之癒合組織細胞，於研鉢中磨碎後移至三角錐瓶內，加入適量 80% acetone 溶液作為溶媒，以超音波震盪 50 分鐘，過濾收集其濾液；殘渣再加溶媒重複萃取 2 次，將濾液合併，置於抽氣櫃中 3 小時以上，使所得之濃縮液加入適當之 dichloromethane，搖盪 5 分鐘，以 4700 rpm 之離心力離心 5 分鐘，移除 dichloromethane，重複 3-5 次，收集萃取產物。再將萃取過產物以預先條件化之 cartridge，至完全進入 cartridge 後，加入 30 ml 水使通過 cartridge 後，真空抽乾 10 分鐘，丟棄洗液，以 20 ml 70% methanol 溶液作為沖提液沖提之，收

集所得沖提液，並將 cartridge 抽乾 2 分鐘，加入內部標準品溶液，以 70% methanol 溶液定容至 25 ml (內部標準品濃度 125 μM)，即為檢液並以高效液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 進一步分析其中的成分。

III、結果

(I) 青剛櫟癒合組織之培養

1. 癒合組織之誘導

每一培養基內置入 5-6 個培植體進行癒合組織之誘導，約經過 7-14 天後，於切口處就逐漸有癒合組織形成。經一個月後，在光照處理下誘導出之癒合組織多為白色稍帶綠色，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 (圖 1、2、3)。紀錄有形成與未形成癒合組織之培植體個數，計算癒合組織之誘導率，結果顯示：所有處理均有癒合組織產生，光照下誘導率平均為 83.95%，黑暗中下誘導率平均為 91.17% (表 2)。

在 12 種不同的處理中，進一步比較於不同光照與不同生長調節劑的試驗組合，經過 ANOVA 測驗其顯著性，統計結果顯示：不論是以何種濃度 (0.5、1、1.5 mg/l) 的 NAA 或 2,4-D 對培植體進行癒合組織誘導，其間的差異並不顯著，主要的差異是來自於光度的不同 (表 3)。在黑暗的培養環境下，癒合組織誘導率較高，平均為 91.17%，其中以濃度為 1 mg/l 的 2,4-D 誘導率最高，達到 94.52%，濃度為 1.5 mg/l 的 NAA 誘導率較低，但也有 87.50%。而在光照的培養環境下，癒合組織誘導率平均為 83.95%，其中以濃度為 0.5 mg/l 的 NAA 誘導率較高，達到 87.95%，濃度為 1 mg/l 的 NAA 誘導率較低，僅有 75.49%。

2. 癒合組織之增殖

將誘導所得到之癒合組織，選擇生長量較

佳、活力較好之細胞株，使用與癒合組織誘導相同的條件進行繼代培養。培養 40 天後將癒合組織取出，仔細除去附著的培養基後，置於濾

紙上除去多餘水分，稱重後計算其增加倍率，結果顯示：光照下增加倍率平均為 3.23 倍，黑暗中增加倍率平均為 8.79 倍（表 4）。

表 2 在不同光度與植物生長調節劑組合下，癒合組織之誘導率（%）

Table 2 The effect of plant growth regulators and luminosity on callus induction rate (%)

光度	植物生長調節劑	NAA (mg/l)			2,4-D (mg/l)		
		0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
光	照	87.95	75.49	87.50	82.72	87.34	85.00
黑	暗	89.53	90.80	87.50	93.15	94.52	91.03

- 培養環境 25°C 恆溫，光培養時光照強度 27 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ，光週期為 16 小時。暗培養則於同一環境下，另以暗箱培養之；每一處理 5-6 個培植體，重複 3 次。

表 3 在不同光度與植物生長調節劑組合下，癒合組織誘導率之變方分析表

Table 3 The variance analysis of luminosity and plant growth regulators on callus induction rate

Source	Degree of freedom	Anova SS	Mean Square	F-value	Pr > F
Model	11	670.4196	60.9472	4.64	0.0008
Luminosity	1	370.755	370.7550	28.21	<0.0001
Growth regulator	5	128.9721	25.7944	1.96	0.1210
luminosity×growth regulator	5	170.6924	34.1384	2.60	0.0516
Error	24	315.4261	13.1427		
Corrected Total	35	985.8457			

表 4 在不同光度與植物生長調節劑組合下，癒合組織之增加倍率

Table 4 The doubling rate of callus under different luminosity and plant growth regulators combination

		光 照			黑 暗		
		實驗前重量(g)	重量 (g)	增加倍率	實驗前重量(g)	重量 (g)	增加倍率
NAA	0.5 mg/l	1.47	6.21	4.22	1.47	9.61	6.58
	1.0 mg/l	1.35	3.15	2.32	1.15	3.54	3.08
	1.5 mg/l	1.20	3.45	2.88	1.37	6.86	5.06
2,4-D	0.5 mg/l	1.10	3.97	3.64	0.99	17.69	17.97
	1.0 mg/l	0.76	2.55	3.35	0.83	12.71	15.31
	1.5 mg/l	1.08	3.32	3.07	1.07	5.40	4.92
平 均		3.23 (± 0.65)			8.79 (± 6.21)		

- 培養環境為 25°C，每一處理重複 3 次
 □ 重量 = 癒合組織總重量 - 實驗前重量
 □ 增加倍率 = 重量/實驗前重量

在 12 種不同的處理中,進一步比較於不同光照與不同生長調節劑的試驗組合,經過 ANOVA 測驗其顯著性,統計結果顯示:光度與植物生長調節劑均對癒合組織的增殖有所影響,且兩者間具有交感效應,以各因子簡單效應比較結果發現,在控制各生長調節劑濃度下,黑暗環境培養之癒合組織,生長皆高於光照環境培養,平均增加 8.79 倍。而在控制黑暗或光照培養下,發現黑暗培養時以 0.5 mg/l 之 2,4-D 處理最好,而光照培養下以 0.5 mg/l 之 NAA 處理最佳。12 種處理組合以 lsmeans (least squares means) 分析,結果顯示所有處理組合中以 0.5 mg/l 2,4-D 於黑暗中培養時最好,達到 17.97 倍,其次為 0.5 mg/l 2,4-D 於黑暗中培養,達到 15.31 倍(表 5)。

(II) 癒合組織內二次代謝物成分測定

將利用各種不同的培養條件,經 40 天培養後收集癒合組織細胞以 4°C 冰箱保存。檢體經萃取濃縮後,以 HPLC 分析其中成分(圖 4)。在 36 個試驗細胞株樣品中,5 種預定目標成分中主要檢測出(+)-catechin 和(-)-epicatechin 2 種成分, (+)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin 及 rutin 並未發現。

1. (+)-catechin

在 36 個試驗癒合組織細胞檢體中,一共檢出 25 個細胞株內含有(+)-catechin。其中編號 II 號之母樹所含之(+)-catechin 含量最高,每 1 公克癒合組織細胞內平均有 764.26 μ g,其中以 0.5 mg/l NAA 在光照下培養的處理組合更可達到 1740.59 μ g,約為平均值的 9.3 倍(表 6)。

在 4 種不同的處理中,進一步比較於不同光照與生長調節劑的試驗組合,經過 ANOVA 測驗其顯著性後發現,光照強度對於(+)-catechin 含量並無顯著影響,(+)-catechin 含量主要是受到植物生長調節劑所控制,以 0.5 mg/l 2,4-D 培養所得之癒合組織,每 1 公克內(+)-catechin 含量平均為 89.98 μ g,而以 0.5 mg/l NAA 培養所得之癒合組織,每 1 公克內(+)-catechin 含量平均為 282.44 μ g,約為 2,4-D 處理的 3 倍(表 7、圖 5)。

2. (-)-epicatechin

在 36 個癒合組織細胞檢體中,全部的細胞株內都含有(-)-epicatechin。其中編號 VI 號之母樹所含之(-)-epicatechin 含量最高,每 1 公克癒合組織細胞內平均有 73.86 μ g,其中以 0.5 mg/l 2,4-D 在黑暗中培養的處理組合可達到 85.38 μ g,約為平均值的 1.5 倍(表 8)。

表 5 在不同光度與植物生長調節劑組合下培養 40 天,癒合組織增加倍率之變方分析表

Table 5 The variance analysis of luminosity and plant growth regulators on callus doubling rate after cultivation for 40 days

Source	Degree of freedom	Anova SS	Mean Square	F-value	Pr > F
Model	11	874.2933	79.4812	149.15	<0.0001
Luminosity	1	278.3892	278.3892	522.42	<0.0001
Growth regulator	5	327.9485	65.5897	123.09	<0.0001
luminosity×growth regulator	5	267.9555	53.5911	100.57	<0.0001
Error	24	12.7891	0.5328		
Corrected Total	35	887.0824			

表 6 不同單株母樹種子，以不同光度與植物生長調節劑組合誘導所得之癒合組織，經過 40 天培養後，其內(+)-catechin 含量

Table 6 The content of (+)-catechin in callus from seeds of different trees under different luminosity and plant growth regulators combination after cultivation for 40 days

單株	(+) catechin 含量 (μg)				
	NL	ND	DL	DD	平均
I	522.80	388.38	125.79	133.44	292.60 (\pm 196.06)
II	1740.59	880.01	257.42	179.03	764.26 (\pm 722.50)
III	437.24	256.18	124.50	67.27	221.29 (\pm 164.26)
IV	-	-	-	-	-
V	-	-	65.19	217.94	70.78 (\pm 102.81)
VI	97.36	486.51	202.32	138.00	231.04 (\pm 175.70)
VII	-	-	81.94	-	20.48 (\pm 40.97)
VIII	117.42	93.49	26.85	-	59.44 (\pm 55.13)
IX	63.90	-	-	-	15.97 (\pm 31.95)
平均	331.03	233.84	98.22	81.74	186.21 (\pm 118.18)

□ - : 表示未檢測出(+)-catechin

□ 每一處理重複 3 次

表 7 以不同光度與植物生長調節劑組合誘導所得之癒合組織，經過 40 天培養後，其內(+)-catechin 含量之變方分析表

Table7 The variance analysis of luminosity and plant growth regulators on the content of (+)-catechin in callus after cultivation for 40 days

Source	Degree of freedom	Anova SS	Mean Square	F-value	Pr > F
Model	3	1131251.53	377083.84	3.69	0.0143
Luminosity	1	87221.617	87221.617	0.85	0.3575
Growth regulator	1	1000057.650	1000057.650	9.79	0.0023
luminosity×growth regulator	1	43972.261	43972.261	0.43	0.5132
Error	104	10621189.75	102126.82		
Corrected Total	107	11752441.28			

在 4 種不同的處理中，進一步比較於不同光照與生長調節劑的試驗組合，經過 ANOVA 測驗其顯著性後發現，光照強度與植物生長調節劑種類 (2,4-D、NAA) 對於(-)-epicatechin 含量並無顯著影響，每 1 公克癒合組織細胞內 (-)-epicatechin 含量平均為 54.28 μg (表 9、圖 6)。

IV、討論

(I) 青剛櫟癒合組織之培養

本試驗在光照處理下誘導出之癒合組織，多為白色稍帶綠色疏鬆較脆之癒合組織，增殖

速度較快且較容易褐化,約 30 天左右細胞增殖量達到最高,此時即需進行繼代培養,否則容易喪失活力。在顯微鏡底下觀察,呈現排列疏鬆的長管狀細胞組成,屬於非胚原性癒合組織 (non-embryogenic callus)。暗處理之癒合組織多為黃白色、濕軟緊密之癒合組織,增殖速

度較慢,約 40 ~ 50 天左右細胞增質量達到最高,可維持較長時間之細胞活力,不易褐化,2 個月內進行繼代均可獲得良好之細胞生長。在顯微鏡底下觀察,呈現較小、細胞質濃、排列緊密之細胞,屬於胚原性癒合組織 (embryogenic callus)。

表 8 不同單株母樹種子,以不同光度與植物生長調節劑組合誘導所得癒合組織,經過 40 天培養後,其內(-)-epicatechin 含量

Table 8 The content of (-)-epicatechin in callus from seeds of different trees under different luminosity and plant growth regulators combination after cultivation for 40 days

單株	(+)catechin 含量 (μ g)				
	NL	ND	DL	DD	平均
I	68.77	77.03	73.07	61.83	70.18 (\pm 6.51)
II	79.68	42.39	45.41	41.22	52.18 (\pm 18.42)
III	76.08	61.70	46.27	28.54	53.15 (\pm 20.43)
IV	43.24	74.96	46.30	44.91	52.35 (\pm 15.12)
V	48.49	36.87	44.06	72.39	50.45 (\pm 15.39)
VI	65.58	60.19	85.38	84.29	73.86 (\pm 12.87)
VII	37.30	39.72	64.31	71.83	53.29 (\pm 17.37)
VIII	44.58	53.23	37.25	29.22	41.07 (\pm 10.25)
IX	50.67	56.74	35.55	25.17	42.03 (\pm 14.34)
平均	57.15	55.87	53.07	51.04	54.28 (\pm 2.75)

□ 每一處理重複 3 次

表 9 以不同光度與植物生長調節劑組合誘導所得之癒合組織,經過 40 天培養後,其內(-)-epicatechin 含量之變方分析表

Table 9 The variance analysis of luminosity and plant growth regulators on the content of (-)-epicatechin in callus after cultivation for 40 days

Source	Degree of freedom	Anova SS	Mean Square	F-value	Pr > F
Model	3	613.20	204.40	0.70	0.5543
Luminosity	1	73.74	73.74	0.25	0.6164
Growth regulator	1	535.75	535.75	1.83	0.1786
luminosity×growth regulator	1	3.69	3.69	0.01	0.9106
Error	104	30382.98	292.14		
Corrected Total	107	30996.18			

在光照下及黑暗中所培養之癒合組織，只要適時的進行繼代培養，均可維持良好之細胞活力。到目前為止，所培養之癒合組織細胞株約有 2 年的時間，除部分因操作不當而導致細胞失去活力外，均可維持良好之生長。2,4-D 及 NAA 是目前組織培養上最常被應用來誘導及維持癒合組織生長之人工合成 auxin，通常較高濃度之 auxin 可獲得理想之癒合組織，而低濃度之 auxin 則可維持癒合組織細胞良好之生長 (Franklin and Dixon, 1994)。在本試驗中，一共使用了 3 種不同濃度 (0.5、1.0、1.5 mg/l) 之 2,4-D 及 NAA 進行癒合組織的誘導及增殖；在癒合組織誘導部分，不論何種濃度的 2,4-D 及 NAA，可獲得 75% 以上的誘導率，但在細胞活力的維持及增殖方面，則以濃度 0.5、1.0 mg/l 的 2,4-D 效果較佳，培養 40 天之倍增率分別達到 10.8 及 9.3 倍；其次為 0.5 mg/l 之 NAA，培養 40 天之倍增率為 5.6 倍，約為 2,4-D 之一半，證實 2,4-D 在癒合組織細胞之增殖效果明顯優於 NAA，試驗結果大致與預期相符。

(II) 癒合組織內二次代謝物成分測定

一般植物二次代謝產物的產生往往與細胞快速生長相抵觸，亦即欲使細胞能生長快速，同時又能大量的產出二次代謝產物，二者兼顧非常困難，在許多相關的研究中均遭遇到相同的問題 (Yeoman *et al.*, 1982)。二次代謝產物均產自不同層次分化之植物組織，除了需要特定酵素來進行二次代謝物的合成過程，細胞內同時也要有相關的胞器 (如：細胞壁、液泡) 作為累積二次代謝物的場所。而細胞培養在一般的情況下並不易堆積此類代謝物，唯有依研究經驗，引導植物細胞走向生產二次代謝產物的方向。最簡單的做法便是嘗試不同配方的培養基，例如改變培養基中植物生長調節劑、礦物質、有機物質及碳水化合物組成，希望可以找出兼顧細胞生長與生產二次代謝產物的培養基。此外，培養環境也是影響細胞生長的重要因素，例如：溫度、光照強度、波長、震盪的速度、培養瓶內的 pH 值及氣體成分。這需要

投入大量人力、物力及時間，除了多做嘗試，充分收集文獻之外，還是得靠多方嘗試與經驗 (蘇和高, 1994)。

在本試驗中，比較細胞生長速度與 (+)-catechin 含量，也發現有相同之趨勢。以相同濃度 (0.5 mg/l) 之 2,4-D 及 NAA 在黑暗中所培養之癒合組織，2,4-D 之倍增率平均為 17.97 倍，而 NAA 之倍增率只有 6.58 倍，約為 2,4-D 的 1/3。但每 1 公克癒合組織細胞 (+)-catechin 的含量，2,4-D 僅有 89.98 μ g，而 NAA 則達到 282.44 μ g，約為 2,4-D 之 3 倍，細胞生長速率與 (+)-catechin 正好成一反比關係。一般而言，2,4-D 大多被應用於癒合組織之細胞增殖，Makunga 等 (1997) 的研究中指出：2,4-D 會造成 phenylalanine (PAL) 降解成胺基酸，而 PAL 為 flavan-3-ols 合成過程中的重要酵素，因此推測在 2,4-D 處理的檢體中，由於 PAL 缺乏而造成 (+)-catechin 含量低於 NAA 處理之檢體。此外，文中也指出光照會增加 PAL 之活性，所以造成光照處理檢體內之 (+)-catechin 含量高於黑暗處理。

(+)-catechin 在青剛櫟葉片中每公克平均含量為 57.62 μ g，而癒合組織細胞內則平均有 186.21 μ g，其中表現最好的細胞株更高達 1740.59 μ g，為葉片的 30.2 倍，因此若能篩選出高產量之細胞株，並進一步地找出最佳之培養條件進行懸浮培養，很有機會成為大量生產 (+)-catechin 的途徑，值得作更進一步的研究。

V、參考文獻

- 蘇維文、高楠斌 (1994) 利用植物細胞培養生產二級代謝物。生物產業 1(1)：1-13。
- Franklin, C. I. and R. A. Dixon (1994) Initiation and maintenance of callus and cell suspension culture. *In*: Dixon R. A. and R. A. Gonzales (eds.) Plant Cell Culture. Oxford University Press. pp.1-23.
- Kadir, A. A. (1998) Drugs from plants. *In*:

- Bruce, A. and J. W. Palfreyman (eds.) Forest Products Biotechnology, Great British, pp.209- 234.
- Makunga, N. P., J. van Staden and W. A. Cress (1997) The effect of light and 2,4-D on anthocyanin production in *Oxalis reclinata* callus. Plant Growth Regulation. 23:153-158.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15:437-497.
- Sheu S. Y., Y. H. Tsung, F. L. Hsu, F. J. Lu and H. C. Chiang (1997) Superoxide anion scavenge effect of *Quercus glauca* Thunb. in whole blood of patients with ankylosing spondylitis. American Journal of Chinese Medicine. 25:307-315.
- Teruo, M (2000) Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. BioFactors 13:55-59.
- Yang C. S., J. Y. Chung, G. Y. Yang, C. Li, X. F. Meng and M. J. Lee (2000) Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. BioFactors 13:73-79.
- Yeoman, M. M., K. Lindsey, M. B. Miedzybrodzka and W. R. Mclauchlian (1982) Accumulation of secondary products as facet of differentiation in plant cell and tissue cultures. In: Yeoman M. M. and D. E. S. Truman (eds.) Differentiation *in vitro*. Cambridge University Press. pp.65-82.

