

芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立

劉克威^{1,#} 孫立庭^{2,#} 金立德^{3,4,*}

摘要

劉克威、孫立庭、金立德。2020。芸香種子中肉桂芸香鹼成分分析與微體繁殖系統之建立。台灣農業研究 69(4):326–334。

芸香屬於無患子目 (Sapindale) 的多年生草本植物，由於其種子中含有大量吲哚生物鹼類的「肉桂芸香鹼」(harmine)，有抗癌、抗病毒、抗菌、抗發炎等等許多藥理作用。文獻雖記載自荷蘭據台治理時期即栽種芸香作為藥用植物，但因年代久遠，再加上醫藥普及，台灣已未再有芸香經濟栽培及下游產業。因此，本研究重新選拔高含量肉桂芸香鹼芸香植株，並建立組織培養繁殖方法，期望獲得穩定足量的肉桂芸香鹼供後續應用。本研究以嘉義市野外採集及市售芸香種子為材料，種子在含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類的固態培養基中發芽，將幼苗莖頂和子葉作為培植體，接種於含有 6-苄基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BAP) 的固態培養基中誘導多芽體，再將多芽體切割成單芽後培養於 1/2 MS 基本鹽類且含有吲哚丁酸 (indole-3-butyric acid; IBA) 的固態培養基中誘導根生成，最後將完整植株馴化移植出瓶定植生長。定植生長後，蒐集成株結實種子以粗製步驟萃取後，將萃取液放在紫外燈光源下初篩，最後再使用高效液相層析分析與標準品比較肉桂芸香鹼之存在與否並定量。結果顯示，使用組織培養微體繁殖方式能成功增殖出芸香植株，並從 6 個相應種子樣本中確認一株肉桂芸香鹼之產出，進而獲得每 100 g 種子肉桂芸香鹼約為 0.75 g 產量、可供未來保健產業應用之本土芸香植株。

關鍵詞：芸香、肉桂芸香鹼、組織培養、高效液相層析。

前言

《健康全書》(拉丁語：*Tacuinum sanitatis*) 是一部歐洲中世紀改編自 11 世紀阿拉伯文的「保持健康」手冊之著作，書籍以拉丁文寫成，圖文並茂。插圖位於頁面上方，描繪有維持健康所需的動植物、礦物、器具等 (Daunay *et al.* 2009)，其中即記載芸香 (*Ruta graveolens* L.) 有明眼去脹氣之功能，天主教神父甚至以芸香枝為施灑聖水之用，加強去邪功能。芸香於荷蘭據台治理時期即是台灣重要藥用植物 (Wu 1993a)，具有清熱解毒、促進血液循環、

殺蟲殺菌及抗發炎等作用。現今已知芸香具有上述多重生物活性之主要原因，可能在於其種子與植株中含有 β -carboline 類的生物鹼——肉桂芸香鹼 (harmine) (Rayburn 2007) 有關。

肉桂芸香鹼具有抗菌、抑制血小板凝集、血管舒張、降血壓、降血糖、抗憂鬱及抗發炎等不同的藥理效果 (Patel *et al.* 2012)；此外，體外研究也證實單獨使用肉桂芸香鹼有抑制乳癌 (Zhao & Wink 2013; Tehrani *et al.* 2014)、甲狀腺癌 (Ruan *et al.* 2017)、胃癌 (Li *et al.* 2017)、神經膠質母細胞瘤 (Liu *et al.* 2013) 及肝癌 (Zhang *et al.* 2015) 等細胞株之增殖作用，具

投稿日期：2020 年 3 月 24 日；接受日期：2020 年 8 月 19 日。

* 通訊作者：litechin@mail.ncyu.edu.tw

對本文貢獻相同。

¹ 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所研究生。台灣 嘉義市。

² 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所免疫藥理研究室兼任研究員。台灣 嘉義市。

³ 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系暨研究所副教授。台灣 嘉義市。

⁴ 國防醫學院醫學科學研究所兼任副教授。台灣 台北市。

體效果機制可能與抑制癌細胞內端粒酶 (telomerase) (Zhao & Wink 2013)、週期蛋白依賴性激酶 (cyclin-dependent kinase) (Song *et al.* 2004) 或 Akt 訊息傳導路徑 (Liu *et al.* 2013) 等有關。另當病毒感染時，宿主細胞內高度表現的第 1A 型雙特異性酪氨酸磷酸化調節激酶 (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A; DYRK1A)，可以大幅穩定病毒蛋白，使細胞中病毒相關蛋白質維持高含量，進而增加病毒在宿主體內擴散的潛在可能性；利用結構生物學的方法，解析出肉桂芸香鹼乃 DYRK1A 的專一抑制劑 (Göckler *et al.* 2009)。進一步研究發現，無論是巨細胞病毒 (cytomegalovirus; CMV)、水痘病毒 (varicella-zoster virus; VZV) 甚至是第一型單純疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1; HSV-1) 之體外複製，皆可利用肉桂芸香鹼來大幅降低 (Hutterer *et al.* 2017)。專一抑制宿主細胞的 DYRK1A，這種機制應與先前報導肉桂芸香鹼亦有抑制披膜病毒 (togavirus) (Hudson *et al.* 1986)、第二型單純疱疹病毒 (herpes simplex virus type 2; HSV-2) (Benzekri *et al.* 2018) 及腸病毒 71 型 (enterovirus 71) (Chen *et al.* 2018) 感染等有相當之關聯性。

約 400 年前荷蘭人不只一次以文字方式記載芸香為台灣重要藥草 (Wu 1993a)，可見在荷蘭勢力廣布於非洲、南美洲及亞洲的年代，台灣南部芸香農產業不僅發展很早，且已發揮到了高峰。但隨著明清、日據時代及政府遷台後分別改以糧食作物和糖、米、雜糧、果實及蔬菜類等經濟作物為主要農業方向，如芸香等中草藥栽種即逐漸被忽視 (Wu 1993b)。反觀國際上已利用肉桂芸香鹼之特殊性質，開發諸如抗登革熱病毒 (Quintana *et al.* 2016) 藥物及抗癌 (Carvalho *et al.* 2017) 藥物進入現代化新藥市場，台灣芸香產業卻仍受限於園藝觀賞用途。

近年來以預防疾病的發生來代替對疾病治療之「預防醫學」觀念大為興起，芸香有千年以上的保健食用歷史，故對於人體應用安全性有相當大的保障，可算是具有療癒力的「活食物」。肉桂芸香鹼的作用並不專一針對個別病源，反而藉影響人體細胞而達其效果，這又與中醫「上醫治未病」的境界相呼應。本研究以

採集嘉義市蘭潭 (舊稱「紅毛埤」；本為荷蘭據台治理時期，荷人築堰為埤形成，截入八掌溪溪水用以灌溉附近一帶的田園) 周邊地區及市售之芸香種子，利用組織培養的方法繁殖，再藉肉桂芸香鹼在紫外線照射下會釋出藍紫色螢光之特性 (Shankaraiah *et al.* 2016)，建構高產芸香平台。期望可憑藉著芸香預防保健的豐富性而擴展實際應用的可能性，使台灣芸香產業恢復蓬勃發展生機。

材料與方法

種子來源與處理

採集嘉義市蘭潭周邊地區及農友種苗股份有限公司 (台灣高雄市) 和蔬菜工坊 (台灣台北市) 所售之芸香種子共六個樣本 (編號：a-f) 進行試驗，選擇大小、重量一致，外皮完整無皺縮的健康種子，使用 0.5% 次氯酸鈉溶液對種子進行表面滅菌，再以組織培養技術進行幼苗培育。另將市售芸香種子直接進行生物鹼之萃取；野外蒐集之芸香種子，則待微體繁殖、開花結實後，再收集大量種子進行生物鹼之萃取。

生物鹼粗萃取

以改進自 Elgubbi *et al.* (2017) 所述之方式進行肉桂芸香鹼萃取，將 100 g 種子以咖啡機磨碎後，浸泡於 3 倍重量之 30% 醋酸溶液中，以超音波振盪 15 min，然後於室溫靜置 48 h。之後將成麵團狀之混合物進行擠壓過濾，過濾後之殘留物再以 2× 重量之 30% 醋酸溶液進行超音波振盪 15 min，重複過濾過程一次。澄清液緩慢加入大量碳酸鈉 (pH 8) 同時攪拌直至溶液變渾濁，於 4°C 靜置 24 h 後，吸掉上清液並收集沉澱的生物鹼。所收集之淡黃色結晶體可溶於 60°C 水與 100% 醋酸 1 : 3 (v/v) 溶液中，而其中之肉桂芸香鹼會吸收 247 nm 及 322 nm 的紫外光並放出波峰為 415 nm 之藍紫色螢光 (Shankaraiah *et al.* 2016)。

芸香幼苗培育

以 MS (Murashige & Skoog 1962) 基礎培養基加上 3% (w/v) 之蔗糖作為配方，再加入

0.8% (w/v) 瓊脂之前先將培養基 pH 值調至 5.8。將配好的培養基放入高壓滅菌釜中滅菌後，每個培養平盤平均倒入 30 mL 培養基，靜置冷卻 12–18 h。種子用 0.5% 次氯酸鈉溶液將表面滅菌後進行固態培養，置於 26°C、42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照 16 h 培養進行無菌萌發。

多芽體誘導和生根

以 10 d 大的幼苗切下莖頂及子葉 (0.5 cm) 作為培植體，根據 Goel *et al.* (2009) 之報導，將培植體培養在添加 4.44 μM 6-benzylamino-purine (BAP) 的 MS 培養基上其芽體再生率最高。因此，本研究使用 MS 基礎培養基加上 3% (w/v) 蔗糖以及 1 mg L^{-1} (4.44 μM) BAP 作為配方，將 pH 值調至 5.8 後再加入 0.8% (w/v) 瓊脂。將配好的培養基滅菌後，每個蘭花培養瓶平均倒入 150 mL 培養基，靜置冷卻 12–18 h。將培植體進行固態培養，置於 26°C、42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 光照 16 h 進行多芽體誘導。之後分別切下在培養基中形成細長的多枝芽，並在無菌條件下植入含有 5.0 μM indole-3-butyric acid (IBA) 的 1/2 MS 培養基 (半強度鹽和 3% 蔗糖) 的培養管中生根。將完整的小植株用自來水中沖洗，洗去根部培養基，然後移植到裝有滅菌的泥炭培養土和珍珠石 1 : 1 混合物的花盆中。花盆上蓋有一個開小孔的聚乙烯袋，用以保持高濕度，放在培養箱中 15 d，每天將聚乙烯袋移開約 3–4 h，使植物暴露於自然濕度下。經過一個星期後，將植物移植至裝有泥炭培養土和珍珠石比例 1 : 3 的大塑膠盒中，並保持在自然條件下，待其開花結實。

生物鹼高效液相層析分析

將粗萃取之生物鹼配合使用 Dionex[®] ASI-100 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 自動樣品分注進樣器 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 及 Dionex[®] P580 泵浦 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 通過 5 毫米逆相 Supelco[®] C18 管柱 (250.0 mm \times 4.6 mm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 以進行梯度溶析，同時以 Dionex[®] PDA-100 光電二極管陣列可變 UV/Vis 檢測器 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)

測量 247 nm 的紫外線吸光度。進行高效液相層析分析所使用之肉桂芸香鹼和氫化肉桂芸香鹼的標準品購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)，流動相由雙次蒸餾水 (溶液 A) 和甲醇 (溶液 B) 組成。所有分離步驟均採取多步梯度 (multi-step gradient)；初始進樣量為 15 μL ，流速為 1 mL min^{-1} 。多步梯度條件如下：0–5 min 5.0% B，5–10 min 20.0% B，15–20 min 20.0% B，20–40 min 80.0% B，40–60 min 100.0% B，60–70 min 100.0% B，70–80 min 5.0% B。收集液相層析洗脫液，並在紫外燈下檢查螢光。

結果

芸香微體繁殖

將表面滅菌、特徵一致之芸香種子 (圖 1A，由左至右：農友種苗、蔬菜工坊、校園採集、環潭道路、水壩邊坡、紀念公園) 培養於 MS 基礎培養基上，經過 10 d 後顯示出大約 70% 以上的發芽率 (圖 1B–1G) 且生長良好，故用來生產大量繁殖用的培植體。添加細胞分裂素可以在體外誘導枝芽的再生，本研究使用 BAP 來誘導芸香培植體枝芽的再生，結果證實使用 1 mg L^{-1} (4.44 μM) 的使用量可以有效的誘導所有 6 種收集樣本再生出培植體枝芽 (圖 2)，因種子健康程度一致，故均有超過 90% 的誘導率。切下形成的細長多芽後，種於添加蔗糖以及 IBA 的 1/2 MS 培養基中可以有效的再生根部，其再生發根的平均效率約 80%、6 種樣本間無顯著之差異。將生根的芽苗先使用自來水沖洗根部培養基後，種植在已滅菌的泥炭培養土和珍珠石混合物比例為 1 : 1 的花盆中。在花盆外蓋上開一個孔洞的聚乙烯袋以保持濕度 15 d，並且每天將花盆放於自然條件下 3–4 h，以使幼苗適應環境。1 wk 後，將植物轉移至自然環境中正常生長 (圖 2)，存活率可達 90% (圖 2)。不同收集系的芽體誘導率、發根率以及出瓶後的存活率，並無統計上的顯著差異。

生物鹼萃取、螢光測試與高效液相層析

肉桂芸香鹼可藉吸收紫外線而產生增色

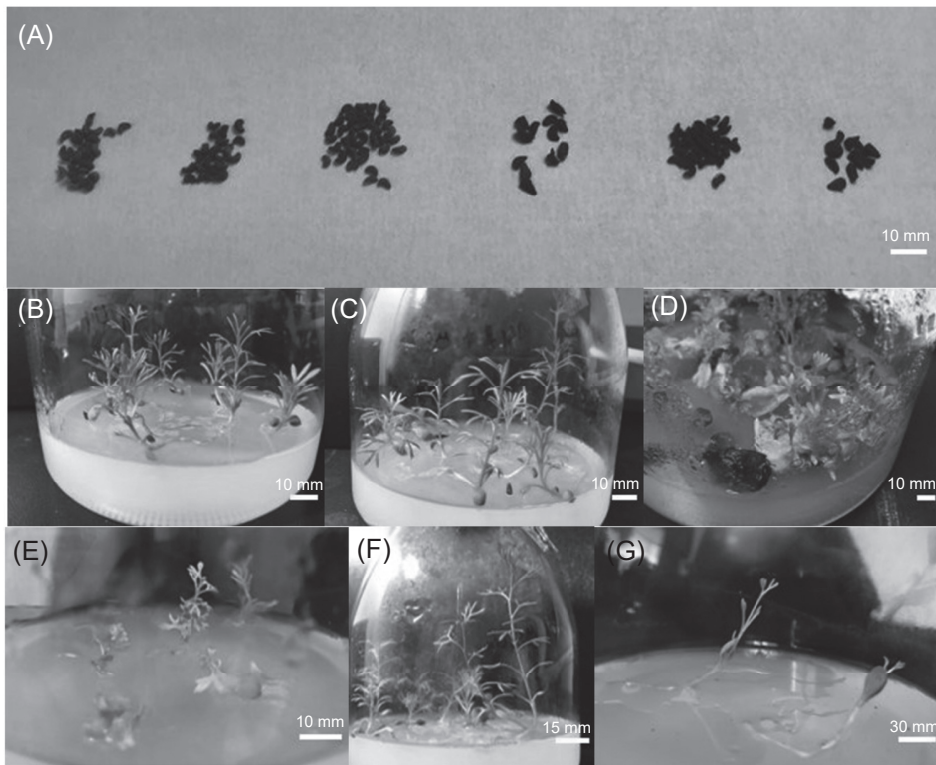


圖 1. (A) 本研究所使用之蒐集芸香種子外觀圖；由左至右分別對應植株 (B-G) 外觀圖。

Fig. 1. (A) The appearance of collected rue seeds and (B-G) the respective shoots.

(hyperchromicity) 效應，肉桂芸香鹼的大約含量可以透過追蹤紫外線的增色性來分析；在暗箱紫外線照射下，所有種子樣本皆未偵測到螢光，但當樣本 d (環潭道路) 之種子萃取液在冷凍乾燥後產生明顯的紫藍色螢光 (圖 3A)。此外，多芽體、莖、葉或花也沒有偵測到螢光發出。而 100 g 樣本 d 種子之萃取液置於紫外線照射中時，其亦會誘導螢光產生 (圖 3B)，由於螢光為採樣種子中樣本 d 萃取液所特別產出的，顯示樣本 d 含有 6 個樣本中最高濃度之肉桂芸香鹼。圖 4 顯示，使用本研究收集之樣品與開發的萃取條件，在高效液相層析分析下可見樣本 d 之種子萃取液中含有肉桂芸香鹼 (retention time 44–48 min) 和氫化肉桂芸香鹼 (harmaline; retention time 42–44 min)。樣本 d 之肉桂芸香鹼產量，每 100 g 種子約為 0.75 g。此外，如色譜圖所示，萃取液所含肉桂芸香鹼和氫化肉桂芸香鹼量之比值約為 6 : 4。

討論與結論

肉桂芸香鹼是一種具有許多藥理特性的生物鹼，因此民間有使用芸香作為調味品及有解毒功效的夏季清涼飲品。惟採集野生芸香，因植株不僅肉桂芸香鹼含量不一，且汁液含有檸檬油、桉油精及香豆素等可致敏成分，不慎觸碰後易導致嚴重的接觸性皮膚炎。故篩選高肉桂芸香鹼含量的芸香品種，並萃取肉桂芸香鹼，對實際民俗應用及相關產品後續研發甚至於開發小分子藥物上等皆極具關鍵性。

台灣有許多特有原生物種，惜受到不同等級威脅而逐漸消失於野外，故利用植物繁殖復育的技術來進行相關之保種保育任務相當重要。對於具有景觀園藝或經濟作物價值的物種，我國已多有有人工繁殖技術之推廣及加強栽種，不過對於芸香之相關研究卻不多見。國際上為避免異花授粉而造成基因的多變

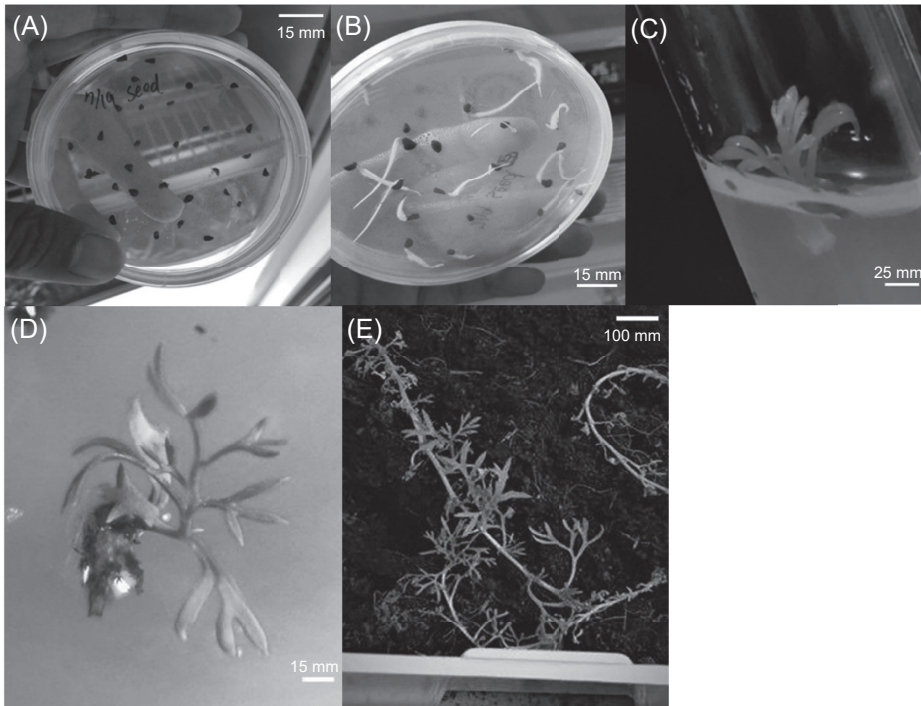


圖 2. 芸香組織培養與發育。(A) 芸香種子培養於 MS 基礎培養基上；(B) 種子發芽情形；(C) 莖尖培養在 1/2 MS + 4.44 μ M BAP 上再生芽體；(D) 在含有 5.0 μ M IBA 的 1/2 MS 培養基上從芽再生根；(E) 完整植株移植至大塑膠盒中。

Fig. 2. Tissue culture and the development of the rue plants. (A) Collected seeds were grown on the MS (Murashige & Skoog 1962) basal medium; (B) germination of rue seed; (C) generation of multiple shoots from the dissected shoot apex on MS + 4.44 μ M 6-benzylaminopurine (BAP); (D) regenerating roots on half strength salt medium containing 5.0 μ M indole-3-butyric acid (IBA); and (E) transplantation of whole plants into big plastic boxes.

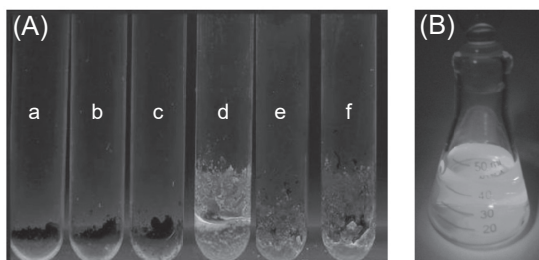


圖 3. 芸香種子萃取物螢光檢測。(A) 冷凍乾燥萃取物顯示出不同芸香種子萃取物其紫外線吸收所產螢光各異。(B) 暴露於短波紫外線 (247 nm) 下，可觀察到從樣本 d 的種子萃取液發出藍紫色螢光。

Fig. 3. Fluorescence detection of the rue seed extracts. (A) Fluorescence emanating by different lyophilized extracts. (B) Visualization for blue-purple fluorescence under UV light exposure with a short wavelength of UV (247 nm) from the extract of sample d.

性，因此大部分的研究團隊捨棄種子而採用芽 (Atta-Alla *et al.* 2008) 或節間組織 (Hussain & Nathar 2020) 誘發體外培養的方式來進行芸香保株。惟因芸香所含之肉桂芸香鹼大多存在於其種子中 (Rayburn 2007)，且獲取肉桂芸香鹼以期在疾病預防治療時扮演關鍵角色，故以異於植物保護復育之方式，從種子中培育出植株後，篩選生物鹼高產之品種。

代謝自氨基萘酸 (anthranilic acid) 的肉桂芸香鹼，不僅可在芸香科 (Rutaceae) 之芸香中發現，如主要分布在熱帶、亞熱帶、溫帶的乾旱地區的約 250 種蒺藜科 (Zygophyllaceae) 亦被報導含肉桂芸香鹼 (Aniszewski 2007)。其他還有南美安地斯山脈的酢醬薯 (*Oxalis tuberosa* L.) (Bais *et al.* 2002)、百香果 (*Passiflora*

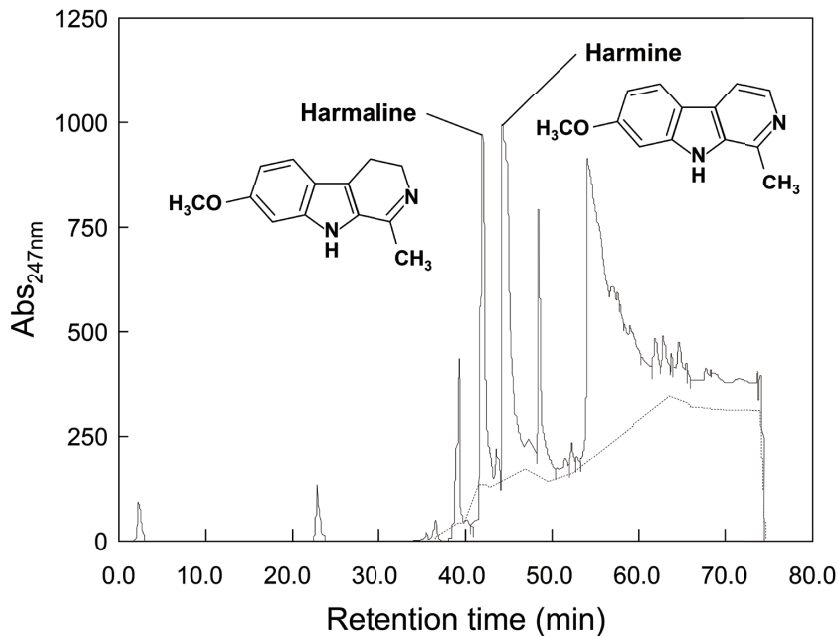


圖 4. 芸香種子萃取物多步梯度高效液相層析檢測；色譜圖鑑定出含有肉桂芸香鹼和氯化肉桂芸香鹼。

Fig. 4. Separation and characterization of the rue seed extract. The chromatographic profile shows the presence of harmaline and harmine.

edulis) (Pereira *et al.* 2014)，甚至於同屬無患子目的近親敘利亞芸香 (*Peganum harmala* L.) (Berlin *et al.* 1993) 的種子中，亦含有大量包括肉桂芸香鹼的吲哚類生物鹼。但進口外來植物牽涉到複雜的檢疫程序，且台灣的體質即是多樣性，過去也原生存在許多被外人稱道的芸香，珍貴遺產值得後人繼承發揮。本研究利用種子篩選出的植株，其肉桂芸香鹼產量每 100 g 種子在 0.75 g 左右，若能進一步改良萃取條件，之後即可將高產樣本進行大量繁殖以穩定取得肉桂芸香鹼，並應用於保健產業中。商業培養純化後，民眾可直接購買衍生商品，不須採集野外族群，不但可避免過敏等副作用，同時也減輕野外芸香族群之壓力。

引用文獻

Aniszewski, T. 2007. Definition, typology and occurrence of alkaloids. p.1–60. *in*: Alkaloids- Secrets of Life: Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. (Aniszewski, T., ed.)

Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 334 pp.
 Atta-Alla, H. K., I. H. A. El Soud, and M. H. Eid. 2008. *In vitro* culture of *Ruta graveolens* L. *Catrina*. *Intl. J. Environ. Sci.* 3:33–36.
 Bais, H. P., S. W. Park, F. R. Stermitz, K. M. Halligan, and J. M. Vivanco. 2002. Exudation of fluorescent β -carboline from *Oxalis tuberosa* L. roots. *Phytochemistry* 61:539–543. doi:10.1016/s0031-9422(02)00235-2
 Benzekri, R., L. Bouslama, A. Papetti, M. Hammami, A. Smaoui, and F. Limam. 2018. Anti HSV-2 activity of *Peganum harmala* (L.) and isolation of the active compound. *Microb. Pathog.* 114:291–298. doi:10.1016/j.micpath.2017.12.017
 Berlin, J., C. Rügenhagen, N. Greidziak, I. N. Kuzovkina, L. Witte, and V. Wray. 1993. Biosynthesis of serotonin and β -carboline alkaloids in hairy root cultures of *Peganum harmala*. *Phytochemistry* 33:593–597. doi:10.1016/0031-9422(93)85453-X
 Carvalho, A., J. Chu, C. Meinguet, R. Kiss, G. Vandembussche, B. Masereel, J. Wouters, A. Kornienko, J. Pelletier, and V. Mathieu. 2017. A harmine-derived β -carboline displays anti-cancer effects *in vitro* by targeting protein synthesis. *Eur. J. Pharmacol.*

- 805:25–35. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.034
- Chen, D., X. Tian, X. Zou, S. Xu, H. Wang, N. Zheng, and Z. Wu. 2018. Harmine, a small molecule derived from natural sources, inhibits enterovirus 71 replication by targeting NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 60:111–120. doi:10.1016/j.intimp.2018.04.050
- Daunay, M. C., J. Janick, and H. S. Paris. 2009. *Tacuinum sanitatis*: Horticulture and health in the late middle ages. *Chron. Horticult.* 49:22–29.
- Elgubbi, H., G. S. G. Haith, and M. Balto. 2017. Harmine isolation and purification by a new design of silica gel column chromatography. *EC Nutr.* 10:51–56.
- Göckler, N., G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F. J. Tejedor, and W. Becker. 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* 276:6324–6337. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07346.x
- Goel, N., N. Singh, and R. Saini. 2009. Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nat. Sci.* 7:129–134.
- Hudson, J. B., E. A. Graham, and G. H. N. Towers. 1986. Antiviral effect of harmine, a photoactive β -carboline alkaloid. *Photochem. Photobiol.* 43:21–26. doi:10.1111/j.1751-1097.1986.tb05586.x
- Hussain, M. A. and V. N. Nathar. 2020. *In vitro* method of high-frequency plant regeneration through internodal callus of *Ruta graveolens* L. p.761–768. *in: Medicinal Plants: Biodiversity, Sustainable Utilization and Conservation.* (Khasim, S. M., C. Long, K. Thammasiri, and H. Lutken, eds.) Springer. Singapore, Singapore. 829 pp. doi:10.1007/978-981-15-1636-8
- Hutterer, C., J. Milbradt, S. Hamilton, M. Zaja, J. Leban, C. Henry, D. Vitt, M. Steingruber, E. Sonntag, I. Zeitträger, H. Bahsi, T. Stamminger, W. Rawlinson, S. Strobl, and M. Marschall. 2017. Inhibitors of dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (DYRK) exert a strong anti-herpesviral activity. *Antivir. Res.* 143:113–121. doi:10.1016/j.antiviral.2017.04.003
- Li, C., Y. Wang, C. Wang, X. Yi, M. Li, and X. He. 2017. Anticancer activities of harmine by inducing a pro-death autophagy and apoptosis in human gastric cancer cells. *Phytomedicine* 28:10–18. doi:10.1016/j.phymed.2017.02.008
- Liu, H., D. Han, Y. Liu, X. Hou, J. Wu, H. Li, J. Yang, C. Shen, G. Yang, C. Fu, X. Li, H. Che, J. Ai, and S. Zhao. 2013. Harmine hydrochloride inhibits Akt phosphorylation and depletes the pool of cancer stem-like cells of glioblastoma. *J. Neuro-Oncol.* 112:39–48. doi:10.1007/s11060-012-1034-x
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Patel, K., M. Gadewar, R. Tripathi, S. K. Prasad, and D. K. Patel. 2012. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of β -carboline alkaloid “Harmine”. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2:660–664. doi:10.1016/S2221-1691(12)60116-6
- Pereira, C. A. M., T. R. Rodrigues, and J. H. Yariwake. 2014. Quantification of harman alkaloids in sour passion fruit pulp and seeds by a novel dual SBSE-LC/Flu (stir bar sorptive extraction-liquid chromatography with fluorescence detector) method. *J. Braz. Chem. Soc.* 25:1472–1483. doi:10.5935/0103-5053.20140130
- Quintana, V. M., L. E. Piccini, J. D. P. Zéner, E. B. Damonte, M. A. Ponce, and V. Castilla. 2016. Antiviral activity of natural and synthetic β -carbolines against dengue virus. *Antiviral. Res.* 134:26–33. doi:10.1016/j.antiviral.2016.08.018
- Rayburn, D. 2007. Medicinal herbs and plants. p.30–444. *in: Let's Get Natural with Herbs.* (Rayburn, D., ed.) Ozark Mountain Publishing. Huntsville, AR. 676 pp.
- Ruan, S., F. Jia, and J. Li. 2017. Potential antitumor effect of harmine in the treatment of thyroid cancer. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* 2017:9402615. doi:10.1155/2017/9402615
- Shankaraiah, N., C. Jadala, S. Nekkanti, K. R. Senwar, N. Nagesh, S. Shrivastava, V. G. M. Naidu, M. Sathish, and A. Kamal. 2016. Design and synthesis of C3-tethered 1,2,3-triazolo- β -carboline derivatives: Anticancer activity, DNA-binding ability, viscosity and molecular modeling studies. *Bioorg. Chem.* 64:42–50. doi:10.1016/j.bioorg.2015.11.005
- Song, Y., D. Kesuma, J. Wang, Y. Deng, J. Duan, J. H. Wang, and R. Z. Qi. 2004. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317:128–132. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.019
- Tehrani, S. S. H., S. H. S. Shabani, S. T. Enferadi, and Z. Rabiei. 2014. Growth inhibitory impact of *Peganum harmala* L. on two breast cancer cell lines. *Iran. J. Biotechnol.* 12:8–14.
- Wu, T. C. 1993a. 1624–1662 (Dutch Formosa). p.340–345. *in: The History of Taiwan Agriculture.* Department of Cultural Publishing, Independent Evening News. Taipei, Taiwan. 546 pp. (in Chinese)
- Wu, T. C. 1993b. Conversions in major crops. p.412–418. *in: The History of Taiwan Agriculture.* Department of Cultural Publishing, Independent Evening News. Taipei, Taiwan. 546 pp. (in Chinese)

Zhang, L., F. Zhang, W. Zhang, L. Chen, N. Gao, Y. Men, X. Xu, and Y. Jiang. 2015. Harmine suppresses homologous recombination repair and inhibits proliferation of hepatoma cells. *Cancer Biol. Ther.* 16:1585–1592. doi:10.1080/15384047.2015.1078021

Zhao, L. and M. Wink. 2013. The β -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. *Peer J.* 1:e174. doi:10.7717/peerj.174

Establishment of a Rue Plant Breeding System for Harmine by Using Collected Seeds and Micropropagation

Ke-Wei Liu^{1,#}, Li-Ting Sun^{2,#}, and Li-Te Chin^{3,4,*}

Abstract

Liu, K. W., L. T. Sun, and L. T. Chin. 2020. Establishment of a rue plant breeding system for harmine by using collected seeds and micropropagation. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(4):326–334.

Rue belongs to a perennial herb of the Sapindale order. Rue has been reported with many pharmacological properties, such as anti-cancer, anti-viral, antibacterial and anti-inflammatory effects, primarily because of large amounts of indole alkaloids and harmine in its seeds. It has been documented that the plant has been cultivated endogenously in Taiwan as a medicinal plant since the Dutch occupancy period; however, due to its long history of discontinuity and the popularity of modern medicine, the local large-scale cultivation and its corresponding downstream industries seem to have lost sight. Therefore, we collected seeds from the field and markets in the city of Chiayi as the starting materials in the present study. The seeds were germinated in a solid medium containing MS (Murashige & Skoog 1962) basic salts, and then the germinated shoot apex and cotyledons were cut out from the seedlings as explants. Subsequently, 6-benzylaminopurine (BAP) was used to induce multiple shoots. The resulting shoots were cut into single pieces and cultured in the media of 1/2 MS basic salts supplemented with 4-(indol-3-yl) butyric acid for root formation. Finally, the whole plant was transplanted out of the bottle for soil-based growth. Seeds were harvested and semi-purified by acid extraction. The content of harmine was confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicate that productive rue plants can be successfully preserved using tissue culture technology, and the presence of harmine alkaloids can also be confirmed from the seeds.

Key words: Rue, Harmine, Tissue culture, High-performance liquid chromatography (HPLC).

Received: March 24, 2020; Accepted: August 19, 2020.

* Corresponding author, e-mail: litechin@mail.ncyu.edu.tw

Authors share equal contributions to this work.

¹ Graduate Student, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Adjunct Research Fellow, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁴ Adjunct Associate Professor, Graduate Institute of Medical Sciences, National Defense Medical Center, Taipei City, Taiwan, ROC.