中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）45(2)：156～163（1996）

當歸組織培養之研究

（Ⅰ）未熟胚培養擬胚化癒合組織之誘導及生長[1]

黃漢龍[2]　陳忠川[2]　陳威臣[3]　蔡新聲[3]

摘要：當歸 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 載於本經中品，歷代本草均有著錄，自古即爲我國之重要藥材。其功用甚廣，應用於許多中醫方劑，主治婦人疾患。當歸的傳統栽培法是以種子爲材料，而種子繁殖的缺點是其品質不易控制，影響當歸品質甚巨。植物組織培養是取代傳統育種及栽培方式，提升當歸品質的良好方法。本研究探討以當歸之未熟胚建立大量繁殖的可行性。結果顯示，當歸未熟胚於 MS 基礎培養基中培養一個月後，可形成擬胚化癒合組織、正常植物體及不正常植物體三種材料。擬胚化癒合組織於 MS 基礎培養基之生長狀況較 B_5 及 White 培養基好。而培養基之無機氮源以 NH_4^+: No_3^-=1：2或1：4的組合較適合。此外，25°C與照光（2,000 lux）的條件對癒合組織生長及增殖較佳。

關鍵詞：當歸、未熟胚培養、擬胚化癒合組織。

當歸 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 載於本經中品，歷代本草均有著錄，自古即爲我國之重要藥材[3,4,5,6,7,8,10,11,12,14]。古人以爲當歸之名源自其藥能，可使「氣血各有所歸」[8]。婦女以血爲本，「當歸調血」，故爲「婦人要藥」，能「補女子諸不足」[5,7]。用於治療一切血症，咳逆上氣，溫中止痛，諸惡瘡瘍，亦可作爲潤腸劑和強壯劑。歷代本草所載當歸的功用，許多已由現代的實驗藥理學得到證實[9]。

當歸屬於溫帶之植物，宜在濕度較大的高寒山區栽培[1]。臺灣過去栽培過大和當歸，今已成爲山地自生（歸化）或栽培的品種[13]。大陸地區多以種子繁殖進行當歸之栽培，因種子良莠不齊，且不良種子會使當歸提早抽苔及根系木化等缺點，影響當歸的品質與重量甚巨。曾有報告指出，當歸苗達40～70%的抽苔率時已不堪入藥[1,2]。因此，尋求更好及更有效率的繁殖途徑是非常重要的課題。

植物組織培養之大量繁殖技術已廣泛應用在種苗生產事業。顧（1982）由葉柄誘得之癒合組織經器官分化（organogenesis）可得到當歸植物體[15]。Zhang *et al.*（1989）則由根誘得之癒合組織經擬胚化（embryogenesis）培養可得到當歸植物體[24]。Ammirato *et al.*（1983）指出，擬胚化培養較器官分化培養節省許多人力及物力，是值得開發的繁殖途徑[16]。本研究以當歸之離體未熟胚（excised immature embryo）爲材料誘導癒合組織，進一步探討適合當歸擬胚化癒合組織培養的條件，期能誘得大量體胚（somatic embryo）並使之形成正常植株，爲當歸大量繁殖提供另一途徑。

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告　第 1846 號。
2. 中國醫藥學院前研究生與教授。臺灣省　臺中市。
3. 本所農藝系助理與研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

材料與方法

一、材　料

本研究使用之材料，係原產於甘肅之中國當歸 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 已授粉之子房。

二、方　法

㈠培植體之採樣及消毒：

將當歸之子房以清水洗淨，於70%酒精中浸泡30秒，再以1%次氯酸鈉（每50ml 加 Tween 20一滴）溶液於超音波振盪器消毒5分鐘，移至無菌接種箱後，以無菌水清洗五次。剝離子房外被，取未熟胚（immature embryo）置於固體培養基中培養。

㈡培養基的配製：

本研究主要以 MS 無機鹽類及有機成分爲基本配方且內含3%蔗糖及0.9%洋菜，並添加 casein hydrolysate (CH) 和 L-glutamine 等各類添加物，培養基加入洋菜前先用 1N NaOH 及 HCl 將 pH 值調至5.7±0.1，然後以121°C、1.05 kg/cm² (15 lb/in²) 高溫高壓滅菌15分鐘後，擺成斜面放冷備用。

㈢培養環境：

接種後，將材料置於25±1°C之恆溫照光（固體培養約2,000 lux）下培養。

㈣當歸擬胚化癒合組織培養之建立：

未熟胚置於 MS 基礎培養基培養一個月後，形成正常植物體（normal plantlet）、不正常植物體（abnormal plantlet）及擬胚化癒合組織(embryogenic callus)三種材料（圖1）。取擬胚化癒合組織繼代培養於含有不同成分的固體培養基，並測其增殖情形。

㈤統計方法：

試驗所得資料經變方分析後，若處理間差異顯著，則利用 Duncan's multiple range test 測定比較各處理平均值間之差異。

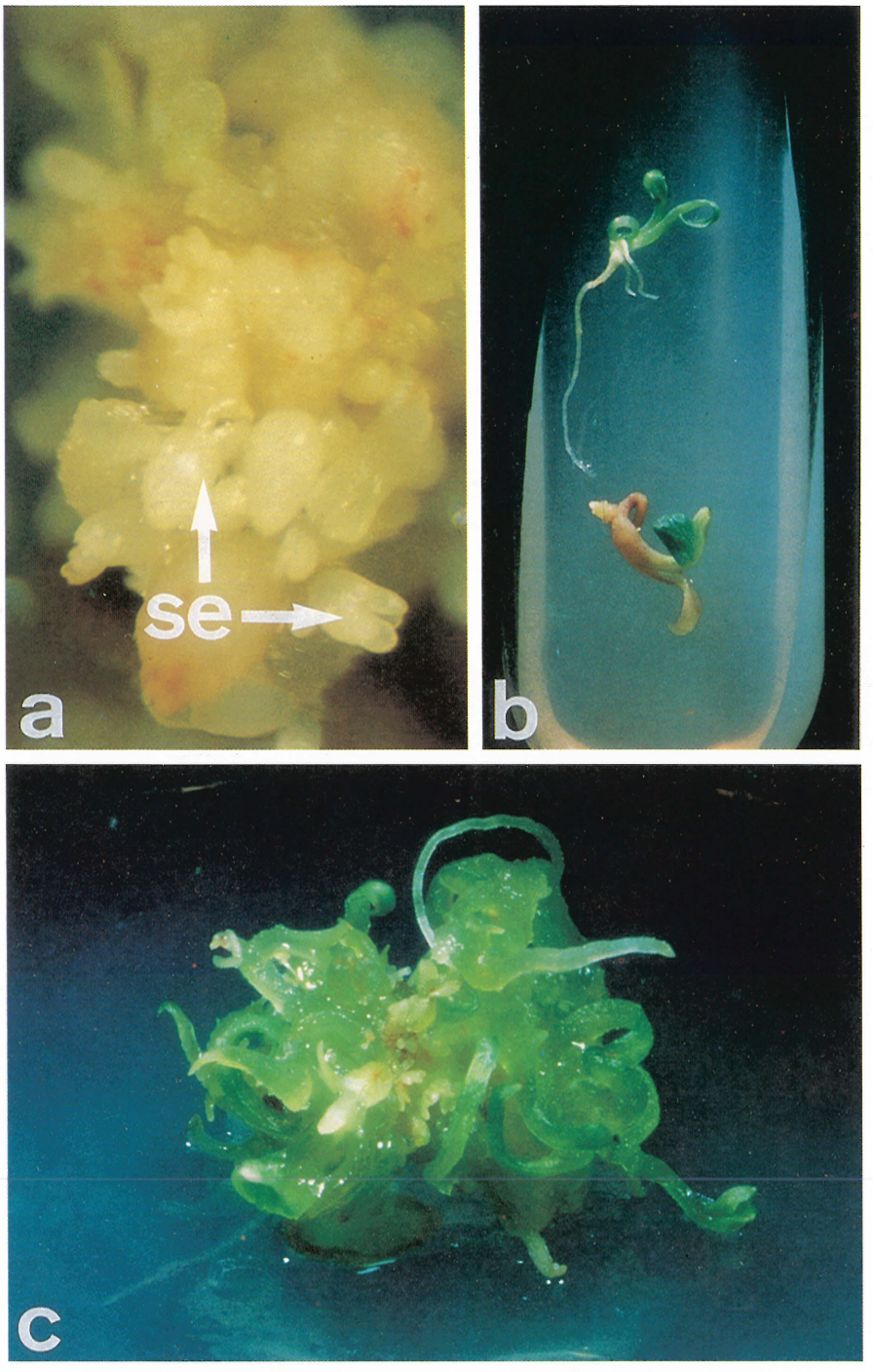


圖 1. 未熟胚於 MS 基礎培養基中形成 (a) 體胚及擬胚化癒合組織、(b) 正常小苗及 (c) 不正常植物體。

Fig. 1. Immature embryo culture of *A. Sinensis*. Embryogenic callus (a) with somatic embryos (se) , normal plantlets (b) and abnormal plantlets (c) were induced from immature embryo cultured on MS basal medium for one month.

結　果

未熟胚培養於 MS 基礎培養基一個月後，即可誘導形成擬胚化癒合組織 (embryogenic callus, EC) 。取此擬胚化癒合組織進行下列試驗，並於30天後測鮮重比較其增殖情形。

一、不同基礎培養基對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

將擬胚化癒合組織培養於不同基礎培養基，結果如表1所示，以 MS和1/2 MS 培養基之擬胚化癒合組織質地鬆軟、呈淡黃色且增殖情形較佳，但兩者間並無顯著差異。其次爲 B_5 培養基，而 White 培養基則最差。培養於 B_5 培養基之癒合組織顏色深黃，White 培養基則接近白色，兩者之癒合組織表面部分均有褐化情形。

表 1. 不同的基礎培養基對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

Table 1. Influence of basal medium on the growth of embryogenic callus (EC) of *A. sinensis*

Basal medium[z]	No. of EC cultured[y]	Average fresh weight -mg-
1×MS	54	235.92a[x]
1/2×MS	54	248.58a
1×B_5	54	147.83b
1×White	52	40.58c

[z] Basal medium: MS (Murashige and Skoog, 1962) , B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) and White (1954) basic salts supplemented with 3% sucrose, 0.9% agar and pH=5.7.
[y] The initial fresh weight of EC was 20mg. The cultured duration was 30 days.
[x] Means with the same letter are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

二、溫度對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

將擬胚化癒合組織置於15°C、20°C和25°C三種溫度，光照強度保持2,000 lux 的條件下培養，結果如表2所示，擬胚化癒合組織於25°C下增殖最快，20°C以下則不利於擬胚化癒合組織的增殖。

表 2. 溫度對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

Table 2. Influence of temperature on the growth of embryogenic callus (EC) of *A. sinensis*[z]

Temperature (°C)	No. of EC cultured[y]	Average fresh weight -mg-
15	40	140.37b[x]
20	31	195.12b
25	40	282.25a

[z] Basal medium: MS salts supplemented with 3% sucrose, 0.9% agar and pH=5.7.
[y,x] Same as Table 1.

三、光照對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

將擬胚化癒合組織置於2,000 lux 的光照及暗處理下培養，結果如表3所示，光照下培養的擬胚化癒合組織增殖優於暗培養者。

表 3. 光照對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

Table 3. Influence of light on the growth of embryogenic callus (EC) of *A. sinensis*[z]

Light intensity (lux)	NO. of EC cultured[y]	Average fresh weight -mg-
Dark	60	139.00b[x]
2,000	60	168.44a

[z] Same as Table 2.
[y,x] Same as Table 1.

四、無機氮源對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

將擬胚化癒合組織置於含不同比例的 NH_4^+ 和 NO_3^- 的 MS 基礎培養基下培養，結果如表4所示，擬胚化癒合組織於 NH_4^+: NO_3^- 爲1：2和1：4的 MS 基礎培養基下增殖最佳，其次爲1：8者，1：1者質地及增殖情形都較差。

表 4. 無機氮對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

Table 4. Influence of inorganic nitrogen source on the growth of embryogenic callus (EC) of *A. sinensis*

Basal medium with NH_4^+: NO_3^-[z]	No. of EC cultured[y]	Average fresh weight -mg-
1：1	60	149.11b[x]
1：2	60	214.78a
1：4	57	199.33a
1：8	60	178.33ab

[z] Same as Table 2.
[y,x] Same as Table 1.

五、有機氮源對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

將擬胚化癒合組織置於含不同比例的 casein hydrolysate 和L-glutamine 的 MS 基礎培養基下培養，結果如表5所示，有機氮 casein hydrolysate 和 L-glutamine 對擬胚化癒合組織的增殖並無顯著影響，擬胚化癒合組織於不同比例的有機氮下，質地及顏色也沒有明顯差異。

表 5. 有機氮對當歸擬胚化癒合組織增殖之影響

Table 5. Influence of organic nitrogen source on the growth of embryogenic callus (EC) of *A. sinensis*

Basal medium with[z]		No. of EC cultured[y]	Average fresh weight -mg-
CH -ppm-	Glu		
0	0	60	308.11a[x]
500	0	60	316.89a
1,000	0	60	293.00a
500	500	60	321.22a
1,000	500	60	331.22a

[z] Same as Table 2. CH=casein hydrolysate; Glu=glutamine.
[y,x] Same as Table 1.

討　論

Sharp *et al.* (1980) 提出植物組織培養擬胚化構造的產生可分爲直接和間接兩種，前者由培植體直接誘得體胚，後者則先由培植體誘得癒合組織再由癒合組織誘得體胚[22]。植物產生直接或間接的擬胚化構造，除了可能與植物的種類及其培植體的部位有關外，植物生長調節劑的刺激應有重要的影響。許多報告都認爲直接產生的擬胚化組織與cytokinins 有關，例如 Hatanaka *et al.* (1991) 報導 *Caffea canephora*的葉片只有在 cytokinins 的刺激下才能產生體胚，而 auxin 類的植物生長調節劑則會抑制體胚的形成[20]。Norgaard *et al.* (1991) 於 *Abies nordmanniana* 的研究也獲致相似的結果，0.5 μM (1.12 ppm) 的 BA 可誘導 *A. nordmanniana*的未熟胚形成體胚[21]。間接產生的擬胚化組織則可能與 auxin 類的植物生長調節劑有關。Evan *et al* . (1981) 即指出57.1%的體胚培養是利用2,4-D 所建立而成[18]。早期研究指出當歸也有相似的結果，因而確認 auxin 類的植物生長調節劑，尤其是2,4-D 是建立當歸擬胚化培養的重要植物生長調節劑[15,24]。但本研究結果顯示，利用當歸未熟胚置於 MS 基礎鹽類培養基，不需任何植物生長調節劑的刺激便能形成擬胚化癒合組織、正常及不正常的植物體。亦即當歸未熟胚培養具有如同 Sharp *et al.* (1980) 所描述的 proembryogenic determined cell (PEDC) 的特性，似乎較顧 (1982) 及 Zhang and Chen (1989) 報導需經2,4-D刺激再由癒合組織建立擬胚化培養簡單。初步研究結果亦顯示，利用當歸的根、葉柄及未熟胚均可誘導形成擬胚化癒合組織 (後繼報導整理中) 。

植物癒合組織生長所需之基礎培養基因植物種類而異，有些植物適於高鹽類的培養基 (如B_5、MS) ，有些則適於低鹽類的培養基 (如 White) 。顧 (1982) 比較 White (1963) 、MS (Murashige and Skoog, 1962) 和 H (Hildebrandt *et al.*, 1946) 三種培養基對當歸癒合組織生長的影響，結果顯示 MS 和 H 培養基爲較佳的培養基[15]；而 Zhang and Chen (1989) 比較 B_5 (Gamborg *et al.*,1968) 、KU (Kameya and Uchimiya, 1972) 、MS 及 NT (Nagata and Takebe, 1971) 四種配方之基本鹽類，結果顯示 B_5 和 MS 培養基爲當歸擬胚化癒合組織生長的適當培養基[24]。本試驗以 MS、1/2 MS、B_5 及 White 四種培養基測試，結果亦顯示高濃度鹽類的 MS 培養基，較適宜當歸擬胚化癒合組織的生長。

培養環境也是影響擬胚化培養的重要因素。Vazquez *et al.*(1991)指出，暗培養有助於 *Secale vavilovii* 的癒合組織形成擬胚化的構造[23]。然而顧(1982)及 Zhang and Chen(1989)指出，照光下有助於當歸擬胚化癒合組織的形成，顧並進一步指出，溫度會影響癒合組織器官的分化，18～20°C爲誘導癒合組織分化的良好環境[15,24]。本研究結果顯示，當歸擬胚化癒合組織之增殖，較適當的培養環境仍以25°C且照光(2,000 lux)的條件較佳，20°C以下或是暗培養都會減緩擬胚化癒合組織的增殖。20°C及暗培養對體胚分化似無顯著影響，15°C以下則明顯抑制體胚形成。此結果與 Esan(1973)於甜橙珠心胚培養的結果殊爲一致，即培養溫度過低，對擬胚化培養有不利的影響[17]。

培養基的氮含量也會影響擬胚化癒合組織之增殖。Ghosh *et al.* (1991) 於*Asparagus cooperi* 的研究指出，適當的有機及無機氮源的組合可以增加擬胚化癒合組織的鮮重，300 ppm glutamine、1,000 ppm CH 及1,200 ppm NH_4NO_3 是較佳的組合[19]。Norgaard *et al.* (1991) 指出，3.4 mM (496.9 ppm) glutamine和50 ppm CH 的組合，可使*Abies nordmanniana*擬胚化癒合組織的鮮重增加約30%，並可使體胚維持於球形期 (globular stage) 的"stage 1"[21]。本研究結果則顯示，無機氮源對擬胚化癒合組織的影響較大，以 NH_4^+: NO_3^-=1：2或1：4爲較佳的組合，CH 及 glutamine 等有機氮源對擬胚化癒合組織的增殖則無明顯的影響。

根據本研究結果，當歸未熟胚可利用 MS 基礎培養基誘導形成擬胚化癒合組織，以 MS 或1/2 MS 爲基礎培養基 (NH_4^+: NO_3^- 爲1：2和1：4) ，在25°C及2,000 lux 光照的條件下培養，可得較佳

且大量的擬胚化癒合組織，未來應可利用此擬胚化癒合組織建立當歸之細胞懸浮培養，並進而做爲誘導體胚形成及製作人工種子之材料。

誌 謝

本研究承國科會經費補助（計畫編號：NSC85-2321-B055-04），特此申謝。

引用文獻

1. 中草藥栽培技術。1979。257-260頁。人民衛生出版社。
2. 全國中草藥匯編。1983。355-356頁。人民衛生出版社。
3. 吳其濬。1962。植物名實圖考長編（上册）。622-624頁。世界書局。
4. 吳其濬。1974。植物名實圖考（下册）。624頁。世界書局。
5. 李時珍。1988。本草綱目。484-487頁。國立中國醫藥研究所。
6. 那 琦、謝文全。1977。重輯名醫別錄。64-65頁。國立中國藥學研究所。
7. 唐愼微。1976。重修政和經史證類備用本草。199頁。南天書局。
8. 唐愼微。1970。經史證類大觀本草。212頁。正言出版社。
9. 梅其炳。1983。中國當歸藥理研究進展。中草藥。14(8)：379-382。
10. 陶弘景。神農本草經集注。小島尙眞、森立之重輯。58頁。1972。南大阪印刷株式會社。
11. 掌禹錫。嘉祐補注神農本草。那琦、謝文全、李一宏重輯。84頁。1989。國立中國藥學研究所。
12. 劉文泰、王道純。1983。本草品彙精要。299頁。南天書局。
13. 賴榮祥。1976。原色生藥學。95-99頁。創譯出版社。
14. 蘇 敬。新修本草。岡西爲人重輯。195-196頁。1964。國立中國藥學研究所。
15. 顧靜文。1982。當歸 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 組織培養的研究。藥學學報 17(2)：131-137。
16. Ammirato, P. V. 1983. Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture, Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. (Evans, D. A. *et al.*, eds.) Macmillan, New York, London. pp. 82-123.
17. Esan, E. B. 1973. A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae. Ph. D. dissertation. Univ. California, Riverside, USA.
18. Evans, D. A., W. R. Sharp and C. E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: Plant Tissue Culture: Methods and applications in agriculture. (Thorpe, T. A. ed.) Academic Press, New York. pp. 45-113.
19. Ghosh, B. and S. Sen. 1991. Plant regeneration through somatic embryogenesis from spear callus culture of *Asparagus cooperi* Baker. Plant Cell Rep. 9: 667-670.
20. Hatanaka, T., O. Arakawa and T. Yasuda. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. Plant Cell Rep. 10：179-182.
21. Norgaard, J. V. and P. Krogstrup. 1991. Cytokinin induced somatic embryogenesis form immature embyos of *Abies nordmanniana* L K. Plant Cell Rep. 10: 509-513.
22. Sharp, W. R., M. R. Sondahl and L. S. Caldas. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hortic. Rev. 2：268-310.
23. Vazquez, A. M., F. J. Espino and J. Rueda. 1991. A comparative study of somatic embryogenesis in *Secale varilovii*. Plant Cell Rep. 10: 265-268.
24. Zhang, S. and K. Cheng. 1989. *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: *In vitro* culture, regeneration, and the production of medicinal compounds. In: Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 7. Medicinal and aromatic plants. (Bajaj, Y. P. S. ed.) Springer Velag, Berlin, Heidelberg. pp. 1-22.

Studies on Tissue Culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.

(Ⅰ)Induction and Growth of Embryogenic Callus from Immature Embryo[1]

Han-Lung Huang[2], Chung-Chuan Chen[2], Uei-Chin Chen[3] and Hsin-Sheng Tsay[3]

Summary

Angelica sinensis has been used widely to cute women's peculiar disease in China. Because of its broad pharmacological effects, it has been adopted in a lot of traditional Chinese medicinal prescription. The purpose of this study is to find the possibility to mass-propagate and improve the quality of *A. sinensis* by developing its immature embryos. It was found that the embryogenic callus, normal plantlets and abnormal plantlets could be induced from immature embryos cultured on MS basal medium for one month. The growth of embryogenic callus on MS basal medium was better than on B_5 and White medium. The inorganic nitrogen source in the medium, NH_4^+: NO_3^-=1 : 2 or 1 : 4, are the better combination. The embryogenic callus showed better growth when cultured under light (2,000 lux) than in darkness. 25°C was the optimal temperature for the growth of embryogenic callus.

Key words : *Angelica sinensis*, Immature embryo culture, Embryogenic callus.

1. Contribution No. 1846 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant from National Sciences Council (85 NSC-2321-B055-04) , Republic of China.
2. Respectively, former graduate student and Professor of Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College. Taichung, Taiwan, ROC.
3. Respectively, Research Assistant and Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI. Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.