

迷迭香微體繁殖與細胞懸浮培養之研究

黃柄龍、蔡奇助¹

摘 要

以迷迭香葉片為培植體，培養在含有VW鹽類基本培養基，2,4-D 5mg/l及BA 0.5mg/l中，經兩個月照光培養，可形成黃色至土黃色質地鬆軟的癒合組織；癒合組織增殖時則以含BA 2mg/l及NAA 0.2mg/l之MS培養基的效果最好。加入吸收褐色物質的吸收劑(PVP)對芽體再生有益，並可提高正常植株的形成率。細胞懸浮培養則以經0.71mm篩網過濾的癒合組織有生長勢快速的最佳反應，可作為未來發展香精產業之應用。

關鍵字：迷迭香、組織培養、細胞懸浮培養

前 言

迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)，屬唇形花科，常綠多年生灌木，具有特殊的香氣，通常可由其花、枝葉以水蒸氣蒸餾得到具揮發性的精油^(8,9,23)。迷迭香抽出物中的rosmarinic acid具有抗氧化的特性⁽²⁰⁾，其成分可以高效液體層析法(high-performance liquid chromatography, HPLC)來分離分析⁽¹⁶⁾，並可提高過氧化酵素活性，增加對病原菌的防禦反應，減少酚類化合物產生⁽²⁷⁾，避免危害寄主植物^(21,15)，為一種天然的醫藥及香料作物。在台灣，迷迭香的用途主要作為烹調食物的香料及香草茶飲的材料⁽⁴⁾；而在歐美地區，已廣泛研究並應用在各種食物及肉品熱消毒後的保存上^(12,13,18)。

迷迭香一般繁殖方法為播種繁殖或扦插繁殖。不過，優良迷迭香栽培品種中內容物含量主要決定在季節、環境因子及其個別的遺傳來源^(11,14)。為保有其優良的性狀，利用組織培養方法進行迷迭香大量繁殖或誘導癒合組織，並藉由細胞懸浮培養的方式同樣可產生rosmarinic acid，加速其乾物重及鮮重之生產速率為傳統繁殖法的數倍之多，生產效率高⁽¹⁷⁾。

由於台灣南部地區夏季高溫多雨，致使迷迭香生長不佳，甚至死亡。因此，若要發展香精產業，組織培養及細胞培養方法具有產量大、產能高及不受環境因子影響的優點，則為一個可供應用的重要工具。

¹ 行政院農業委員會高雄區農業改良場助理研究員、副研究員

材料與方法

盆栽迷迭香葉面具有許多絨毛，葉背呈凹陷狀，內藏許多油胞，造成滅菌不易。可先行將盆栽迷迭香移至室內二週，每三天噴灑億力(Benlate, 杜邦)1000 倍稀釋液，進行初步之淨化；再取枝條上端新長出之細嫩部分，利用 0.5% 次氯酸鈉(NaOCl)溶液，加 2 滴/100ml 展著劑 Tween-20，激烈振盪進行表面消毒 10 分鐘，最後以無菌水沖洗數次後備用，進行以下的試驗。

一、照光培養與暗培養對癒合組織誘導的影響

將滅菌過的葉片材料，切成 0.6 cm 長之片段，作為誘導癒合組織之培植體，培養於含有 Thiamine·HCl 0.4mg/l、Pyridoxine·HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Myo-Inositol 100mg/l、Glycine 1.0mg/l、4% (w/v) Sucrose、20% (v/v) coconut water 及 0.8% Merck agar 的 VW⁽²⁶⁾ 基本鹽類固體培養基 (pH=5.3)，添加 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 5mg/l 及 BA(6-benzyladenine) 0.5 mg/l 等生長調節劑濃度，於溫度 25±1℃，光強度 1,750 lux，進行每日 16 小時之照光培養及暗培養二種處理，每一處理 30 個培植體，二個月後調查癒合組織的誘導率及組織質地。癒合組織誘導率為計算未褐化死亡、培植體表面增生綠色或土黃色癒合組織團所佔的比率。

二、不同濃度 BA 與 NAA 對癒合組織增殖的影響

將葉培植體置於 2,4-D 5mg/l、BA 0.5mg/l 濃度下，經照光培養或暗培養所誘得的癒合組織，切成直徑約 5 mm，培養於含有 adenine sulfate 40mg/l、NaH₂PO₄·H₂O 170mg/l、3% Sucrose 及 1% Merck agar 之 MS⁽²²⁾ 固體培養基 (pH=5.2)，配合 BA 0, 2, 4, 8mg/l 及 NAA 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2mg/l，作為癒合組織增殖之試驗培養基。每一處理 9~15 團癒合組織，採每日 16 小時照光培養，四週後調查癒合組織之存活率、具增殖個體比率及癒合組織之增殖效率。癒合組織增殖率估算方式為由生長良好的癒合組織培植體直接再生癒合組織，或從部分褐化的培植體長出新的癒合組織者。

三、不同濃度抗氧化劑與滲透壓調節劑處理對減低癒合組織褐化及芽體再生之影響

迷迭香癒合組織增殖後期，極易於表面產生褐化現象，分化產生的芽原體也容易形成水浸狀、玻璃質化。將癒合組織同樣分切成直徑約 5 mm，利用癒合組織增殖培養基，配合 0, 500, 1000, 1500, 2000mg/l 等不同濃度褐化物質吸附劑 PVP(polyvinylpyrrolidone, m. w. = 40000, Sigma)，期望能有效與酚類化合物鍵結，減少氧化產物對細胞的傷害，降低癒合組織的褐化率，或滲透壓調節劑山梨糖醇(D-sorbitol, Sigma) 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4M 處理，減少癒合組織含水量，改善水浸狀現象；相同培養基並同時作為誘導芽體分

化使用，比較植株再生過程，降低芽體玻璃質化現象及產生正常芽體之影響。每一處理培養 15 團癒合組織，共 4 個重複，四週後調查癒合組織改變情形及芽體外觀。

四、懸浮細胞系之建立

將迷迭香葉片材料於光照培養下誘導產生的癒合組織切碎，利用 0.5 mm、0.71 mm、1.0 mm 大小篩網濾過後，各取 5ml 細胞液，分別培養於含有 20ml 增殖培養基之 125ml 具側管三角瓶中(圖 1A)，以 100rpm 轉速之迴旋振盪器振盪培養，培養溫度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光強度 1000 lux，進行每日 16 小時之照光培養。每日測量一次體積，測量體積時須注意混勻細胞及培養液，調查其在側管中增加的細胞沉降體積，以建立懸浮培養之生長曲線；每隔 18 天作一次繼代培養，繼代培養時需以篩網過濾後，去除較大之老細胞團，再將懸浮細胞液移至新的培養基繼續培養，每種處理 5 瓶三角瓶，重複六次生長曲線測定，探討懸浮培養時細胞組織之最適當大小，作為利用生物反應器或大量培養時之參考。

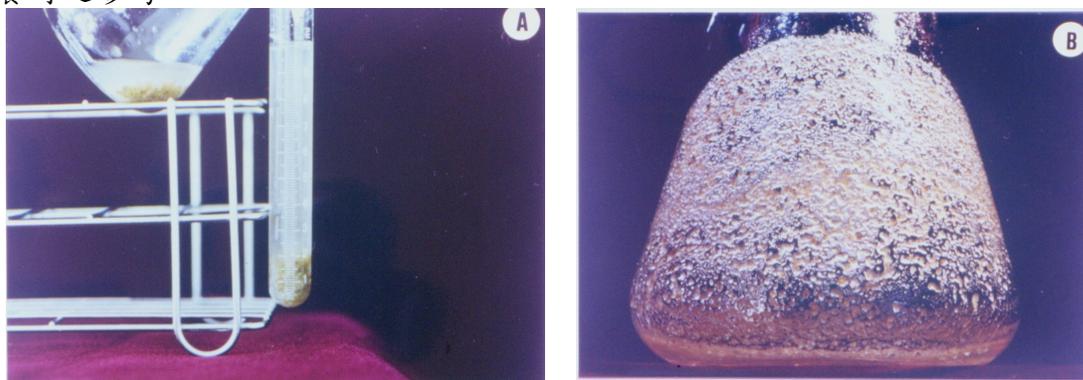


圖 1. 迷迭香懸浮培養之情形(A)調查細胞沉降體積(B)懸浮細胞

Fig 1. Cell suspension culture of *Rosmarinus officinalis*.(A)The investigation of the packed cell volume. (B)The suspension cell.

結 果

一、照光培養與暗培養對癒合組織誘導的影響

試驗結果顯示，植物生長調節劑 2,4-D、BA，可以促使迷迭香葉片培植體產生癒合組織。每日 16 小時之照光培養及暗培養二種處理下，其癒合組織誘導率分別為 60%及 53%，均可形成大團之癒合組織；不過，照光培養下誘導產生的癒合組織呈綠色、增殖快、質地鬆軟的現象，比暗培養下誘得的土黃色、含水量少、質緻密的癒合組織有較佳的質地外觀，同時癒合組織

褐化現象亦較輕微。

二、不同濃度 BA 與 NAA 對癒合組織增殖的影響

表 1 結果顯示，不同濃度 BA 與 NAA 組合對迷迭香不同來源癒合組織培植體具有不同之增殖效果。在無植物生長調節劑存在時，不論培植體來源係照光培養或暗培養而來的，均無法令癒合組織存活或再由褐化部位形成癒合組織；經暗培養誘得的癒合組織，其增殖效率極差，只有在 BA 2mg/l 存在時僅部分培植體團具有增殖之能力，大多數情況下癒合組織培植體均褐化死亡。

表 1. 不同濃度 BA 與 NAA 組合對迷迭香不同來源癒合組織存活及增殖之影響
Table 1. Effect of different concentration combination of BA and NAA supplemented to MS medium on survival and callus amplification under different source to *Rosmarinus officinalis*

PGRs combination(mg/l)		No. of explants (in light/in dark)	Survival rate(%) (in light/in dark)	Callus amplified(%) (in light/in dark)	result of callus induction* (in light/in dark)
BA	NAA				
0	0	9/12	0/0	0/0	-/-
	0.01	9/9	33/0	33/0	+/-
	0.05	9/9	33/0	0/0	+/-
	0.1	9/9	66/0	66/0	+/-
	0.2	9/9	88/0	88/0	+/-
2	0	12/9	42/0	42/0	++/-
	0.01	12/9	92/0	92/0	++/-
	0.05	12/9	100/33	100/33	+++
	0.1	12/9	100/11	100/11	++++
	0.2	9/9	100/33	100/33	++++
4	0	15/9	87/0	87/0	++/-
	0.01	12/9	100/0	100/0	+/-
	0.05	12/9	100/0	100/0	++ +/-
	0.1	9/9	78/0	78/0	+/-
	0.2	9/9	89/0	89/0	++/-
8	0	15/9	33/0	27/0	+/-
	0.01	15/9	13/0	13/0	+/-
	0.05	15/9	40/0	40/0	+/-
	0.1	15/9	100/0	100/0	++/-
	0.2	15/9	60/0	53/0	+/-

*Degree of callus inducing : -, not visible ; +, pale green callus was observed but very small ; ++, small pale green callus was induced ; + + +, large pale green callus was induced

經每日 16 小時照光培養誘導而來的癒合組織，在含植物生長調節劑的培養基中均可促使癒合組織增殖，其中以含 BA 2mg/l、NAA 0.2mg/l 的效果最佳，其次為 BA 2mg/l、NAA 0.1mg/l 或 BA 4mg/l、NAA 0.05mg/l，增殖產生的癒合組織呈黃綠色、細胞團大、細胞分裂旺盛。所以，迷迭香癒合組織的增殖，BA 濃度不宜過高，以 2mg/l 為適當，高濃度的 BA 反而使癒合組織增殖率減低；而無 auxin 類存在時，癒合組織的褐化嚴重，甚至死亡。

三、不同濃度抗氧化劑與滲透壓調節劑處理對減低癒合組織褐化及芽體再生之影響

迷迭香初期增殖的癒合組織，極容易直接發生器官形成(organogenesis)，產生迷迭香芽體。不過，所形成的芽體大多呈水浸狀、玻璃質化現象，無法繼續發育成植株。添加 PVP 0, 500, 1000, 1500, 2000mg/l 等不同濃度處理，均能有效地降低癒合組織增殖時的褐化率(圖 2A)，或從已褐化的癒合組織上再增殖出少量的癒合組織及大量的芽體分化(圖 2B)；分化產生的芽體玻璃質化現象獲得明顯的改善，能夠發育形成外觀正常的植株(圖 2C)，達到大量繁殖的目的(圖 2D)，而其中又以 PVP 500mg/l 的效果最佳。滲透壓調節劑山梨糖醇處理，雖然可以減少癒合組織誘導過程中組織內的水分含量，進而影響癒合組織的生長及細胞分化，提高植株的再生能力，不過，迷迭香癒合組織經山梨糖醇處理後，仍無法改善水浸狀、玻璃質化現象，癒合組織存活率隨山梨糖醇濃度的增加而減少，所分化產生的芽體團小，芽體外觀不正常。

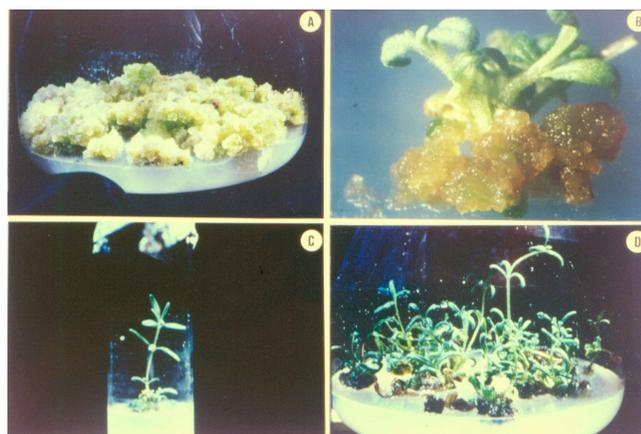


圖 2. 迷迭香利用葉片培植體進行大量繁殖之過程 (A)癒合組織增殖 (B)芽體分化 (C)外形正常的再生植株(D)大量繁殖

Fig 2. Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* derived from leaf explants. (A)Callus formation. (B)shoot regeneration. (C)The normal regenerated plantlet. (D)Mass propagation.

四、懸浮細胞系之建立

圖 3 結果顯示，以不同大小癒合組織進行迷迭香懸浮之初始培養，其中以最大體積者，其沉降體積增加最多，同時在第 3 次繼代培養時達到最大的體積增加量，不過，經 1.0 mm 大小篩網過濾的，由於細胞團大，培養液不易浸潤至組織內部，因此在第 4 次繼代培養時，大部分細胞均呈褐化、死亡；經 0.5 mm 篩網過濾者，其沉降體積增加量在第 4 次繼代培養時達到最高峰，之後便逐漸趨向平緩，在第 6 次繼代培養時亦都全部變褐；只有經 0.71 mm 篩網培養的，繼代能力至少可以達 6 次以上，其體積增加穩定，生長快速，致使在第 6 次繼代培養時已無足夠的培養液可供繼續生長，而增殖產生的懸浮細胞，其在品質、色澤等均佳(圖 1B)。所以，迷迭香懸浮細胞系培養時，以經過 0.71 mm 大小篩網的細胞組織最適當，太大或太小孔目的篩網均會影響其繼代培養的次數，無法作大量培養的應用。

討 論

歐美國家對迷迭香在食品科學上的研究極為廣泛，不過，有關組織培養方面的研究報告則極少見。本試驗主要探討生長調節劑、褐化物質吸附劑及滲透壓調節劑對迷迭香組織培養的影響，同時進行細胞懸浮培養系培養條件之探討。以葉為材料誘導癒合組織之相關研究，如楊等⁽⁶⁾單獨使用 2,4-D，僅能造成少數火鶴花葉片培植體形成癒合組織，且隨著培養時間的增加而易轉為褐色；Rosario 及 Lapitan⁽²⁴⁾則認為同時使用生長素及細胞分裂素才能獲得好的癒合組織。本試驗同樣利用 2,4-D、BA，對迷迭香葉片亦具有良好的癒合組織誘導能力，這也和黃與蔡⁽³⁾利用相同組成份、相同濃度下，對薑花葉片誘導產生胚性癒合組織，具有相同的結果。

文獻指出培養基中細胞生長素的濃度是決定桑樹生成癒合組織的主要因子⁽²⁵⁾，但對長果桑芽體培養而言，添加 BA 卻是導致癒合組織增殖的主要原因⁽⁷⁾，顯示不同的 auxin 和 cytokinin 的交互作用，對不同的作物種類會形成不同的影響。本試驗結果發現，不同濃度 BA 與 NAA 對迷迭香癒合組織增殖的影響，以 BA 2~4mg/l、NAA 0.05~0.2mg/l 的效果較佳，BA 的濃度不宜過高，且在無生長調節劑時，均無法增殖癒合組織，而無 NAA 存在下，癒合組織的褐化嚴重，此結果也和黃與蔡⁽³⁾利用 BA 4mg/l、NAA 0.05mg/l 作為薑花癒合組織增殖用的培養基類似，均顯示出 BA 和 NAA 之間對癒合組織的增殖存在著較佳的相互關係。

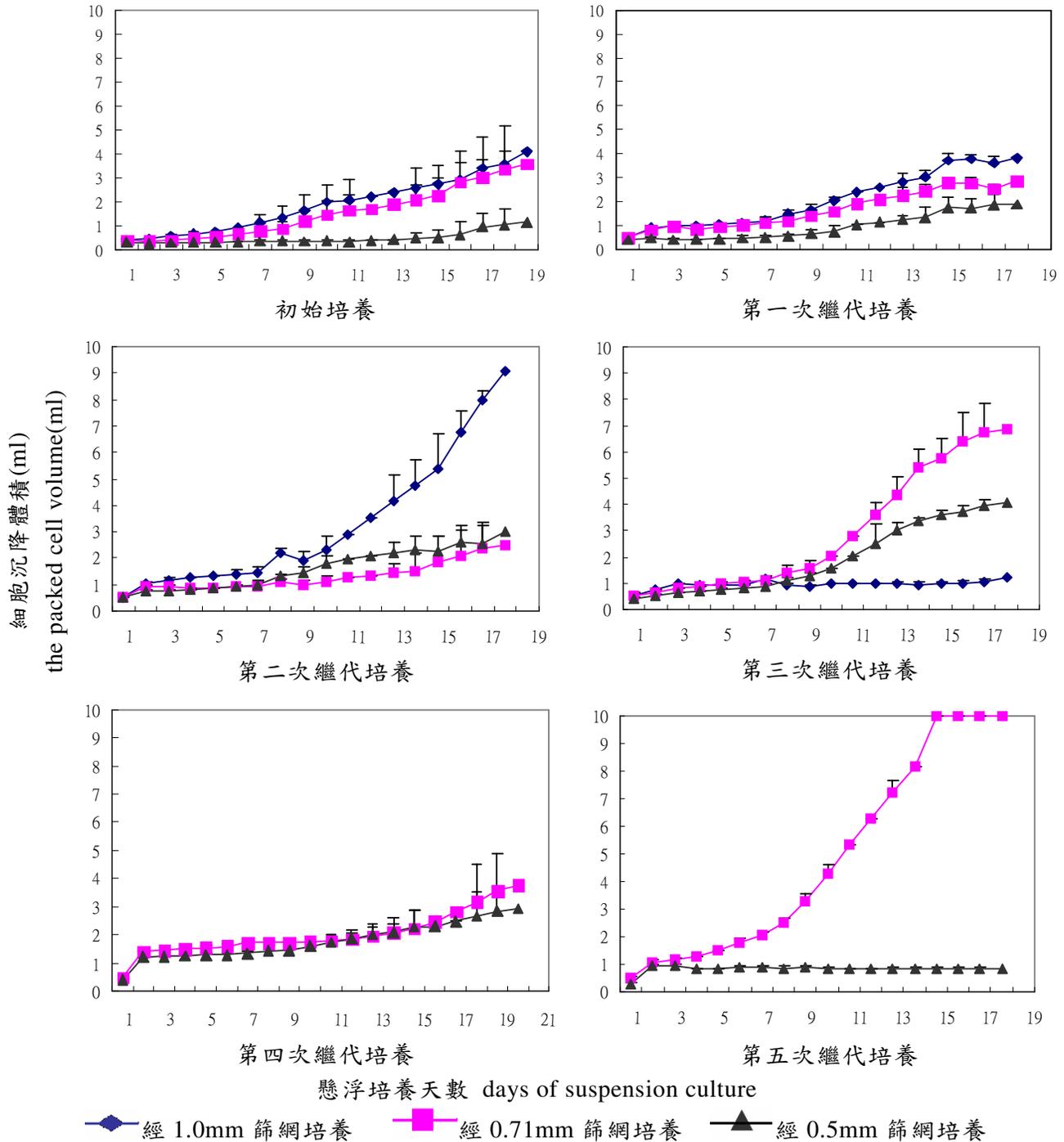


圖 3. 迷迭香癒合組織懸浮細胞培養之生長曲線

Fig 3. The growth curve of *Rosmarinus officinalis* in suspension culture.

酚類化合物在植物體內常與糖類化合，而且容易組合成一些蛋白質及酵素，影響植物生理。在組織培養時，若一些代謝物質不能被有效的分解，不斷累積的結果造成濃度的提高，對植物的生長反而具有抑制作用，必須設法加以去除來減少毒害的發生，如加入一些酚類的吸收劑如 PVP 等在培養基中可促進生長⁽¹⁾。本研究中，添加 PVP 亦均能有效地降低癒合組織增殖時的褐化率，分化產生的芽體玻璃質化現象也能獲得明顯的改善，發育形成外觀正常的植株。然而，繼代培養太多次之迷迭香葉片癒合組織，其芽體再生能力降低，造成僅能增殖癒合組織，而無法分化再生植株，這與一些瓜類的培養情形相類似⁽²⁾，推測除了與培養基成分有關外，和所使用的培植體來源也有極大的關連，或者是培養方式仍不適當，造成培植體不易吸收培養基內的營養所致，有待做更進一步的研究。

而在懸浮細胞系培養方面，以經過 0.71 mm 大小篩網的細胞組織最適當，其細胞數穩定增加，可供繼代培養的次數最多，由第 2 次繼代培養以後，在每隔 18 天的培養週期中約略可看出在第 15-17 天時生長曲線趨於平緩，因此在培養第 14-15 天時就需要繼代，這點則與馮⁽⁵⁾在聖誕紅 'Nobel Star' 懸浮培養的研究相近。所以懸浮培養時應選在快速生長期就給予繼代，才能維持細胞的活性，同時也可避免因為養分的不足而造成的生長抑制現象。

利用組織培養方法培養迷迭香，不僅可以克服土地、氣候及環境因素變化的限制^(10,14,19)，達到短時間內大量繁殖的目的，更可避免生產地的改變威脅原本植物相的持續，影響迷迭香生長之繁茂與香氣之濃郁，對油脂中與氧化合之香氣成分形成極大的差異。同時，細胞懸浮培養的應用，可在最長繼代培養時間及最大生產量上尋得一平衡點，降低商業生產上的成本及人力支出，提高最大的產量收益。因此，利用植物組織培養大量生產香料作物細胞，開發出一條嶄新的、穩定的原料供應途徑，這或許可以提供香精工業另一種新的思考方式。

參考文獻

1. 王珍韶. 1990. 蝴蝶蘭營養繁殖之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
2. 黃柄龍、蔡奇助. 2001. 利用單一培養步驟誘導胡瓜體胚形成之研究. 高雄區農業改良場研究彙報 12(2): 15-24.
3. 黃柄龍、蔡奇助. 2002. 利用體胚形成進行薑花之微體繁殖. 中國園藝 48(3): 239-246.
4. 黃雅玲. 2002. 香草植物迷迭香. 高雄區農情月刊第 59 期. 行政院農業委員會高雄區農業改良場印行.

5. 馮莉真. 2003. 聖誕紅單節培養及經由體胚之誘變育種. 國立中興大學園藝學研究所碩士論文.
6. 楊苑欣、林金和、陳福旗. 2003. Thidiazuron 及 2,4-D 或 Picloram 促進火鶴花試管苗葉片之培養再生不定芽. 中國園藝 49(4): 375-382.
7. 盧美君. 2003. 長果桑芽體組織培養之研究. 中國園藝 49(3): 251-258.
8. 賴滋漢、賴業超. 1994. 食品科技辭典. pp.1266. 富林出版社. 台中.
9. Basile, A., M. M. Jimenez-Carmona and A. A. Clifford. 1998. Extraction of rosemary by superheated water. Journal of Agricultural & Food Chemistry 46(12):5205-5209.
10. Dolan, R. W., R. Yahr, E. S. Menges and M. D. Halfhill. 1999. Conservation implications of genetic variation in three rare species endemic to Florida rosemary scrub. American Journal of Botany 86(11):1556-1562.
11. Elamrani, A., S. Zrira, B. Benjilali and M. Berrada. 2000. A study of Moroccan rosemary oils. Journal of Essential Oil Research 12(4):487-495.
12. Galobart, J., A. C. Barroeta, M. D. Baucells, R. Codony and W. Ternes. 2001. Effect of dietary supplementation with rosemary extract and alpha-tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with omega3-fatty acids. Poultry Science 80(4):460-467.
13. Guntensperger, B., D. E. Hammerli-Meier and F. E. Escher. 1998. Rosemary extract and precooking effects on lipid oxidation in heat-sterilized meat. Journal of Food Science 63(6):955-957.
14. Hidalgo, P. J., J. L. Ubera, M. T. Tena and M. Valcarel. 1998. Determination of the carnosic acid content in wild and cultivated *Rosmarinus officinalis*. Journal of Agricultural & Food Chemistry 46(7):2624-2627.
15. Hori, M. 1998. Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. Journal of Chemical Ecology 24(9):1425-1432.
16. Ibanez, E., A. Cifuentes, A. L. Crego, F. J. Senorans, S. Cavero and G. Reglero. 2000. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Journal of Agricultural & Food Chemistry 48(9):4060-4065.
17. Komali, A. S. and K. Shetty. 1998. Comparison of the growth pattern

- and rosmarinic acid production in rosemary(*Rosmarinus officinalis*)shoots and genetically transformed callus cultures. Food Biotechnology 12(1/2):27-41.
18. Madsen, H. L., B. Sorensen, L. H. Skibsted and G. Bertelsen. 1998. The antioxidative activity of summer savory(*Satureja hortensis L.*)and rosemary(*Rosmarinus officinalis L.*)in dressing stored exposed to light or in darkness. Food Chemistry 63(2):173-180.
 19. Moretti, M. D. L., A. T. Peana, G. Sanna-Passino and V. Solinas. 1998. Effects of soil properties on yield and composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil. Journal of Essential Oil Research 10(3):261-267.
 20. Munne-Bosch, S. and L. Alegre. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. Plant Physiology 125(2):1094-1102.
 21. Munne-Bosch, S., K. Schwarz and L. Alegre. 1999. Enhanced formation of alpha-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. Plant Physiology 121(3):1047-1052.
 22. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
 23. Rezzoug, S. A., N. Louka and K. Allaf. 2000. Effect of the main processing parameters of the instantaneous controlled pressure drop process on oil isolation from rosemary leaves. Journal of Essential Oil Research 12(3):336-344.
 24. Rosario, T. L. and L. A. Lapitan. 1981. Callus and plantlet formation in *Anthurium andraeanum* Lind. Philip. Agr. 64:197-202.
 25. Sharma, K. K. and T. A. Thorpe. 1990. *In vitro* propagation of mulberry(*Morus alba L.*)through nodal segments. Scientia Hort. 42:307-320.
 26. Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110:605-613.
 27. Zheng, Z. and K. Shetty. 2000. Azo dye-mediated regulation of total phenolics and peroxidase activity in thyme(*Thymus vulgar L.*)and rosemary(*Rosmarinus officinalis L.*)clonal lines. Journal of Agricultural & Food Chemistry 48(3):932-937.

Micropropagation and Cell Suspension Culture of *Rosmarinus Officinalis*

Ping-Lung Huang and Chi-Chu Tsai¹

Abstract

Leaf explants obtained from potted seedlings were used to establish an *in vitro* shoot organogenesis propagation system of *Rosmarinus officinalis*. Modified VW medium supplemented with 5mg/l 2,4-D and 0.5mg/l BA resulted in a better textual callus after cultured in light for 2 months. When callus proliferated, it could have the best effect after cultured in MS medium containing 2mg/l BA and 0.2mg/l NAA. Addition of absorbents (PVP) were beneficial for shoots regeneration, and increasing the rate of normal plantlets regeneration. In cell suspension culture experiment, callus filtered through 0.71 mm filter had the best growth responses. It could be expected to be used for the methods of future flavor industry.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, Tissue culture, Cell suspension culture

¹ Assistant Researcher and Associate Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, COA.