

稀有中藥材—天麻種麻繁殖及栽培技術

葉志新

桃園區農業改良場 副研究員

zeamays@tydais.gov.tw

摘 要

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)係蘭科植物天麻的塊莖，是重要的中藥材，也是開發為機能性食品、食補的優良標的，具有發展潛力。本場建立天麻種麻繁殖及栽培技術，作為發展天麻栽種產業之基礎。天麻胚性癒合組織在 1/2 MS 培養基下 4 個月繼代 1 次最佳，增殖倍率為 8 倍；在 BA 10 mg·L⁻¹ 處理 1 週，誘導 PLB 形成及發芽效果最佳；蜜環菌 AM2 與天麻小塊莖共生情況，培養條件溫度需低於 25℃ 為宜。天麻種植的各階段均不需要光線是最大優勢，在環控設施可周年栽培，生產安全、品質均一之天麻原料，適合現有菇類養殖設施或植物工廠栽培。

關鍵詞：天麻、蜜環菌、胚性癒合組織

前 言

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)為一傳統中藥，以塊莖入藥，最早見於東漢神農本草經中，已超過 2,000 年的使用歷史。依據本草綱目記載，天麻氣味辛、溫、無毒，主治諸風濕痺、四肢拘攣、癱瘓不遂、眩暈頭痛等症，是中醫治療大腦及神經系統疾病的重要藥物。天麻主要功效成分包含天麻素(gastrodin)、天麻苷元(gastrodigenin)、派立辛(parishin)及天麻腺苷(N6-(4-hydroxybenzyl)adenine riboside)，其現代藥理研究亦證實天麻具有鎮靜、抗驚厥、鎮痛、抗衰老、降血壓、改善學習記憶和促進睡眠等功效(洪等，2010；胡等，2001；楊等，2000；Hsieh *et al.*, 1997；Wu *et al.*, 2015)，中國醫藥研究所發現天麻萃取物中腺苷類成分 T1-11 (N6-(4-hydroxybenzyl)adenine riboside)具有神經元保護作用，可預防和減少亨丁頓舞蹈症及一些同樣具有蛋白錯誤堆疊特性之神經退化性疾病的病變發生，以及其病程的進展(Chou *et al.*, 2015；Huang *et al.*；2007, Huang *et al.*, 2011)。天麻為高價藥材及藥膳材料，目前進口量為 67,000 公斤/年，在臺灣及華人地區均有非常大之需求量，且具有神經保護和促進睡眠作用效果的天麻，也是開發保健食品、中藥食補的優良標的。

天麻又稱高赤箭，屬蘭科(Orehidaceae)赤箭屬(*Gastrodia*)多年生草本植物，分布於西伯利亞，韓國，日本及中國大陸，並向南延伸至喜馬拉雅山區之尼泊爾、不丹至印度東北一帶，

臺灣位於其分布範圍之東南限界(許, 2008)。在臺灣主要分布於宜蘭、花蓮、南投、台東及嘉義等縣山區海拔 1,500 至 3,000 公尺之林下(Lin and Wang, 2014)。天麻生長習性奇特, 由於天麻不具正常功能的葉綠體, 根也完全退化, 塊莖僅有鱗片狀葉(scales), 除了在開花期與結果期會有單一花梗突出地表, 整個生活史中僅具地下塊莖, 而其種子發芽需與小菇屬(*Mycena* sp.)共生, 而生長需與蜜環菌(*Armellaria mellea*)共生, 栽培技術門檻高(徐和郭, 1989; 徐等, 1990a,b, 徐和牟 1990; 郭和王, 2001; Kusano, 1911)。臺灣為天麻的原生地之一, 但繁殖及栽培之基礎研究相當少, 本研究探討天麻組織培養技術, 藉由胚性癒合組織培養, 誘導 PLB 形成及發芽, 並透過瓶內接種蜜環菌生產天麻種麻, 建立天麻種麻繁殖及栽培技術, 作為後續開發天麻栽種量產之基礎。

材料方法

一、天麻胚性癒合組織(embryogenic callus, ECs)培養

試驗材料取自天麻種子誘導之胚性癒合組織 0.1 g 為供試培植體, 培養於不含生長調節劑培養基中, 基礎培養基為 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962)無機鹽類, 添加 30 g L⁻¹ 蔗糖, 6 g L⁻¹ 洋菜、1 g L⁻¹ 活性碳, pH 值 5.5, 每支試管 10 mL 培養基, 培養後每個月取樣秤種調查 1 次, 持續 5 個月。

二、天麻胚性癒合組織誘導形成 PLB 及發芽試驗

取培植體約 0.1 g 以不同濃度之 TDZ(0.1、0.5、1 mg·L⁻¹)、BA (1、5、10 mg·L⁻¹)、kinetin (1、5、10 mg·L⁻¹)及 zeatin (1、5、10 mg·L⁻¹)溶液浸泡 1 週處理, 再移至 1/2 MS 培養基中培養, 發芽率於第 4 週開始每週調查至第 8 週, 發芽數於第 8 週統計, 另以解剖顯微鏡及切片觀察 ECs 不同發育階段生長情形(切片為國立自然科學博物館李勇毅博士協助)。

三、天麻小塊莖與蜜環菌共生研究

天麻 PLB 及小塊莖分別與生長於木塊上之蜜環菌(AM1~AM7)共培養, 置於避光生長箱中, 溫度控制為 23℃, 生長 4 個月後調查米麻及白麻的數量及產量, 另外取天麻小塊莖與生長於木塊上之蜜環菌共培養, 置於避光生長箱中以 24、27 及 30℃, 生長 4 個月後調查。

資料以 SAS EG(SAS Institute Inc. 2010)進行變方分析(ANOVA)再以 least significant difference (LSD)測驗比較處理間平均值之差異。

結果與討論

一、天麻胚性癒合組織培養

天麻胚性癒合組織(embryogenic callus, ECs)生長調查結果顯示(圖 1)，培養 3 個月 ECs 增殖 4 倍，培養 4 個月 ECs 增殖 8 倍，培養 5 個月 ECs 增殖 12 倍，但培養 5 個月後培植體顏色由黃綠色轉為黃褐色，生長速度減緩，如果不進行繼代培養，培植體部分也會發育為 PLB，部分則會褐化，因此在培養 4 個月後繼代培養最適合。

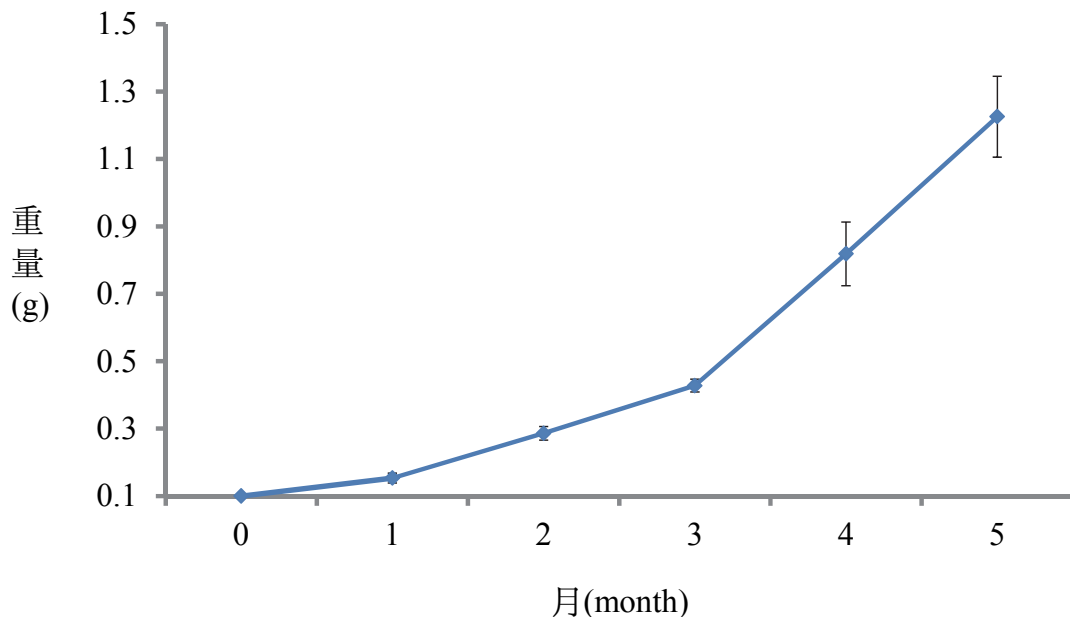


圖 1. 天麻胚性癒合組織生長速度

Fig. 1. The growth rate of ECs after sub-cultures.

二、天麻胚性癒合組織誘導 PLBs 形成及發芽

天麻胚性癒合組織(embryogenic callus, ECs)為黃白色由緊密細胞聚集體組成，組織切片顯示 ECs 周圍區域細胞團塊具有緻密的細胞質、小澱粉粒和液泡，而內部區域的細胞高度空泡化並充滿了許多大澱粉粒(圖 2A、2B)。經過細胞分裂素處理後，培養 4 週之 ECs 表面出現凸出球狀之擬圓球體(Protocorm-Like Bodies, PLB)，培養 6 週後可以觀察到不同大小的 PLB，組織切片顯示在表面可見細胞聚集分裂，隨後聚集形成 PLB(圖 2C、2D)。培養 8 週後，PLB 進一步發育形成小塊莖，小塊莖延長生長，有鱗狀葉片，具有一明顯的莖頂分生組織(圖 2E、2F) (Yeh *et al.*, 2017)。

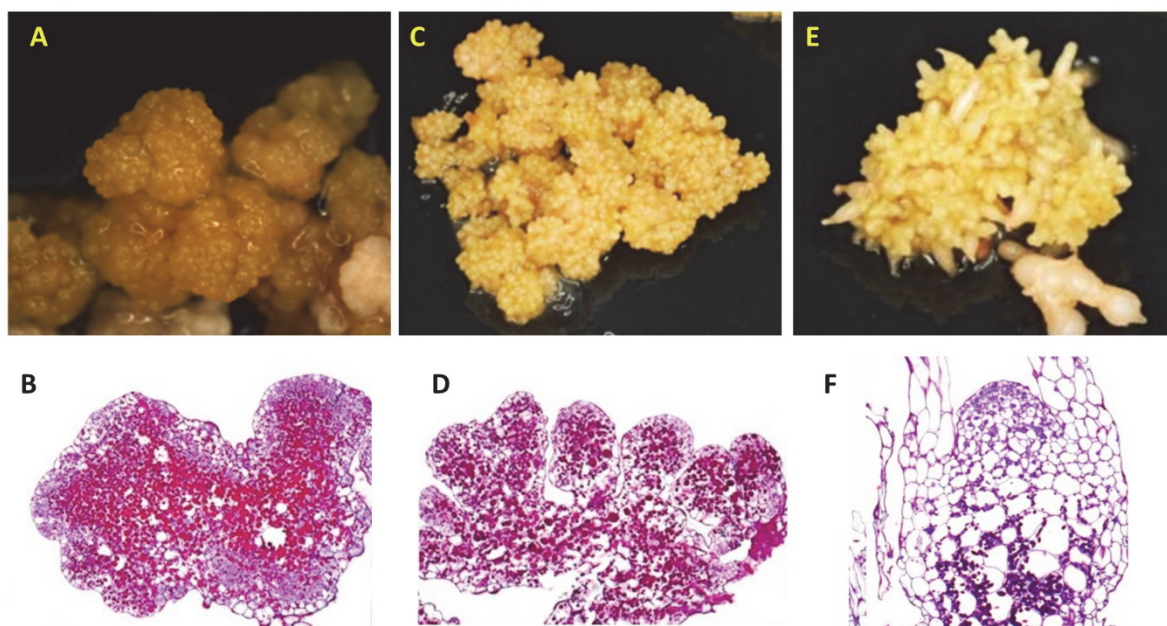


圖 2. 天麻胚性癒合組織不同生長階段

Fig. 2. Regeneration stage of PLBs from ECs cultures.

在未經細胞分裂素處理，培養 8 週後僅能觀察到少量 PLB 形成，而且未有小塊莖發生。在測試的 4 種細胞分裂素中，皆隨著細胞分裂素濃度的增加而增加，其中誘導 PLB 形成的細胞分裂素 TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 誘導率 88.6%、TDZ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 誘導率 94.1% 和 BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 誘導率 88.5% 最佳；Kinetin 及 Zeatin 誘導率在 50% 以下、每個培植體可產生的 PLB 數同樣以 TDZ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 33.4 芽、TDZ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 37.6 芽和 BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 41.0 芽最佳。在培養 5 週後開始觀察到 PLB 的形成，其中以 BA 5 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理的 PLBs 形成更快(圖 3、表 1)。但在培養更長的時間後 TDZ(0.5 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)處理組中形成小塊莖的比例並無增加且小塊莖較短小而易褐化。因此，試驗結果建議以 BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 處理 1 週，誘導 PLB 形成及發芽效果最佳(Yeh *et al.*, 2017)。

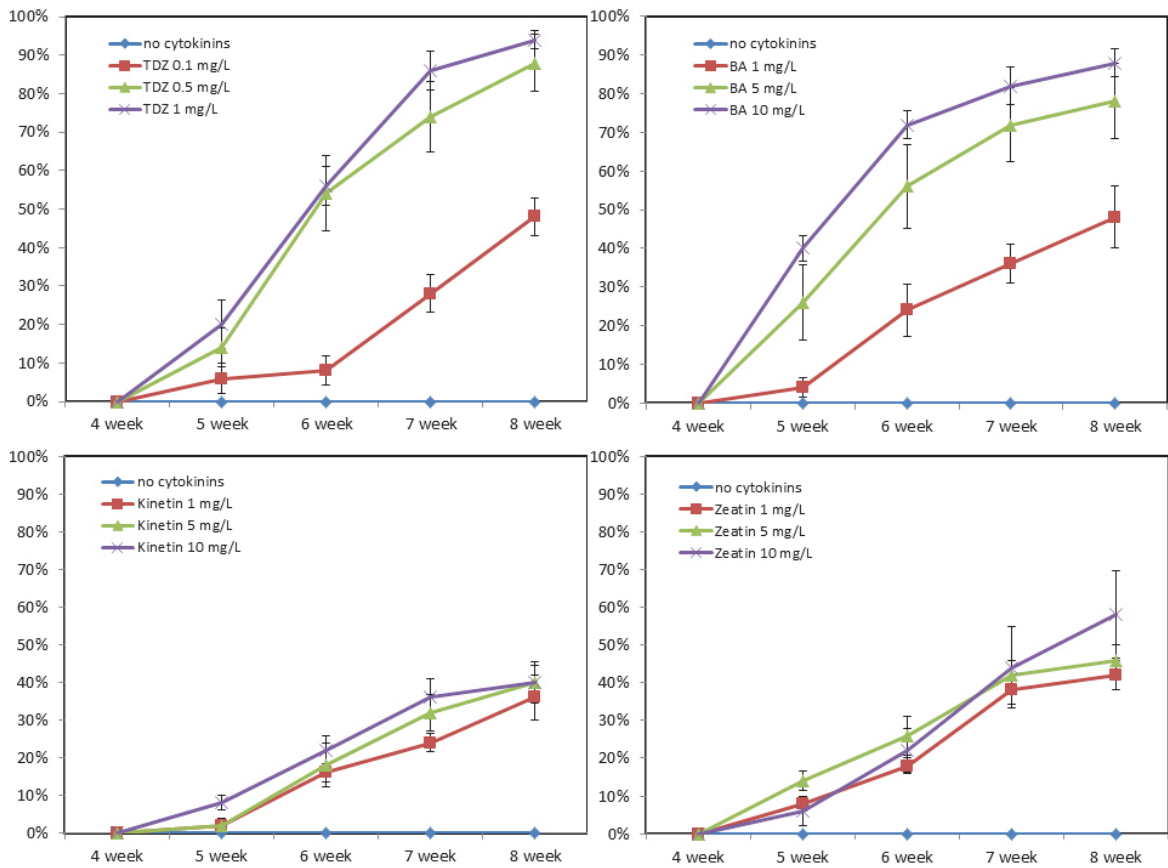


圖 3. 不同細胞分裂素誘導天麻 PLB 形成率之變化

Fig. 3. Mean percentage of PLBs regeneration of *G. elata* in relation to the time in culture for different cytokinins treatments.

表 1. 不同細胞分裂素誘導天麻 PLB 形成率及數量

Table 1. Effect of different cytokinins on PLBs regeneration of *G. elata*.

Cytokinins	mg·L ⁻¹	Number of PLBs per callus	PLBs regeneration (%)
TDZ	0.1	10.6d	48.2bc
	0.5	33.4ab	88.6a
	1	37.6ab	94.1a
BA	1	9.4 ^d	48.3 ^{bc}
	5	27.0 ^{bc}	78.7 ^{ab}
	10	41.0 ^a	88.5 ^a
Kinetin	1	6.6 ^d	36.0 ^c
	5	7.0 ^d	40.2 ^c
	10	6.2 ^d	40.4 ^c
Zeatin	1	10.0 ^d	42.1 ^c
	5	16.4 ^{cd}	46.9 ^{bc}
	10	17.4 ^{cd}	58.2 ^b

同一列文字相同者為以 LSD 顯著性測驗在 5%水準差異不顯著。

Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's protected LSD test.

三、天麻小塊莖與蜜環菌共生

天麻栽培時需要與蜜環菌(*Armillaria mellea*)共生，以消化蜜環菌菌絲作為養分來源，因此，栽種天麻前需先培養蜜環菌。蜜環菌接種於 PDA 培養基後約 2-3 天開始生長，約 4 週可長滿整個培養皿，蜜環菌培養於 PDA 或木塊上均會形成菌索 (shoestring) (圖 4)，菌索是菌絲相互纏結而成，酷似植物的根，外層由擬薄壁組織組成，顏色較深，叫皮層，內層由疏絲組織組成，叫心層。菌索是蜜環菌生長重要的構造，可以幫助菌絲快速感染到鄰近的天麻，也是判別蜜環菌生長的一個重要指標。

培養蜜環菌可先於 PDA 培養基中培養 2 週，確定蜜環菌菌株無雜菌污染，再將生長於 PDA 之蜜環菌，移至燕麥粒上以 25℃ 培養 2-3 週，待菌絲長滿後做為菌種，菌種與天麻小塊莖同時放入含木塊之玻璃瓶內培養米麻及白麻，或接種於木段上可培養為菌材供後續天麻種植使用。蜜環菌之保存，蜜環菌以 PDA 培養基培養，蜜環菌長滿試管後至於 4℃ 保存，可以保存 1 年以上能具有活力。



圖 4. 蜜環菌生長於 PDA 培養基及菌棒之情況

Fig. 4. The situation of *Armillaria mellea* grow in PDA and woods.

在不同蜜環菌對天麻小塊莖及瓶內接種蜜環菌之結果顯示(表 2)，以 AM2 蜜環菌不論是已與小塊莖或是米麻培養所生成之天麻數量及重量都最高，AM1、AM4 及 AM7 也都有天麻生長，但生成之種麻數量及總重量都較低，而其他菌株 AM3、AM5 及 AM6 都沒有天麻存活，顯示除 AM1、AM2 菌株外，其他 5 株蜜環菌菌株對於天麻並不適合，在多數情況下天麻生長不佳。

表 2. 不同蜜環菌對天麻 PLB 及小塊莖生長之影響

Table 2. Effect of culture PLB and young tuber in *Armillaria mellea* strain.

蜜環菌菌株	PLB		小塊莖	
	數量 (No.)	重量 (g)	數量 (No.)	重量 (g)
AM1	14.3 ^b	1.3 ^b	11.3 ^b	13.9 ^b
AM2	82.0 ^a	9.7 ^{0a}	28.8 ^a	40.3 ^a
AM3	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
AM4	66.8 ^a	8.6 ^a	0 ^c	0 ^c
AM5	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
AM6	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
AM7	0 ^c	0 ^c	7.8 ^b	10.1 ^b

同一列文字相同者為以 LSD 顯著性測驗在 5 %水準差異不顯著。

Means within each column followed by the different letter(s) are significantly different at $P < 0.05$ by Fisher's protected LSD test.

天麻小塊莖與蜜環菌共培養於玻璃瓶內之後置於 24、27、30℃ 生長箱培養 4 個月結果顯示(圖 5)，培養於 24℃ 下高赤箭生長良好，並持續生長為白麻，置於 27℃ 下培養雖天麻可以生長，但形成之塊莖纖細，生長勢已經明顯較差，培養於 30℃ 下天麻完全無法生長。顯示高赤箭的生長溫度不宜超過 27℃，最佳的生長溫度在 25℃ 以下，與文獻報導生長適溫 20-25℃ 相符。

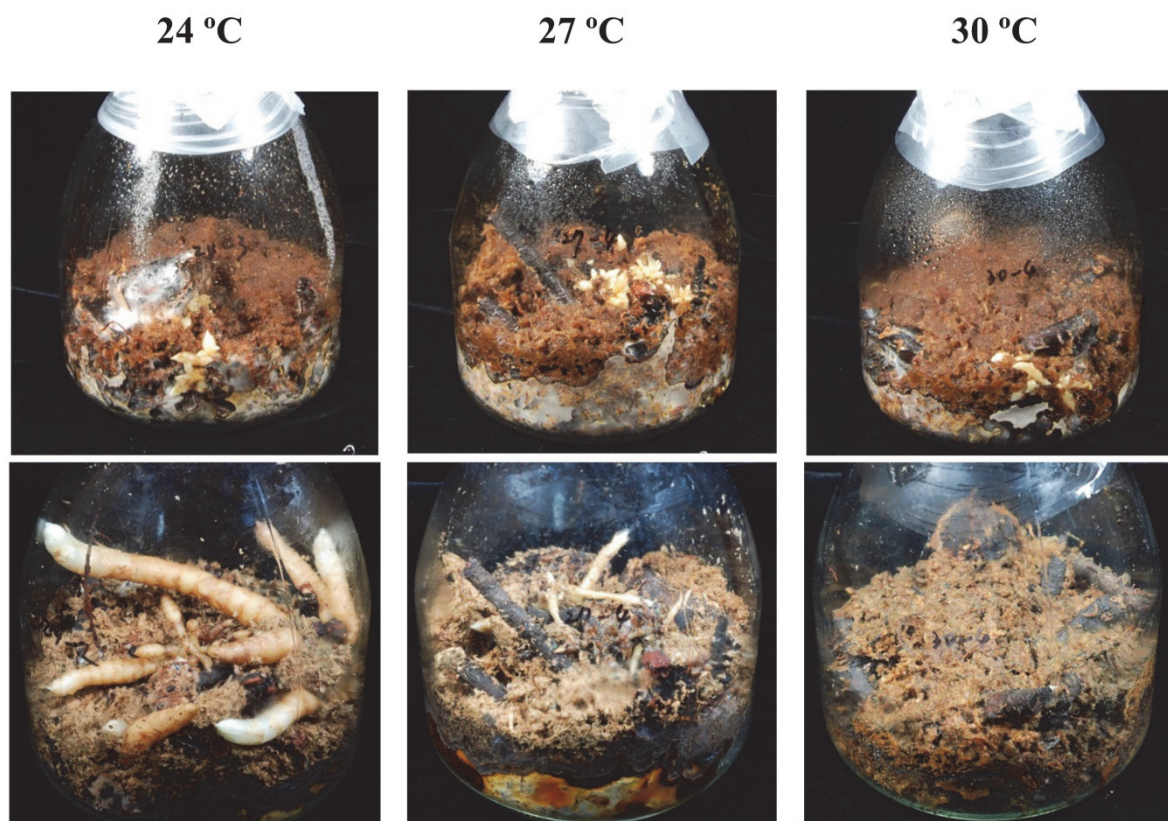


圖 5. 不同溫度對天麻生長之影響

Fig. 5. Effect of tuber growth in temperature treatment.

結 論

本場建立天麻種麻繁殖及栽培技術進行優良種苗生產，作為發展天麻栽種產業之基礎。透過天麻胚性癒合組織進行繁殖並誘導 PLB 形成及發芽，篩選適當之蜜環菌與天麻小塊莖共生培養，可生產健康的天麻種球。天麻最大優勢是種植的各階段均不需要光線，有利於環控設施高密度種植並可達成周年栽培，以生產安全、品質均一之天麻，並適合現有菇類養殖設施或植物工廠栽培。

參考文獻

- 許天詮。2008。台灣赤箭屬植物分類研究。國立台灣大學碩士論文。
- 胡一冰、崔佳、韓笑、邱德文、許建陽。2001。中藥天麻研究進展。貴陽中醫學院學報 23:48-51。
- 洪全、陳森、李雪萍。2010。天麻藥理研究進展。中國實用醫藥 5:249-250。
- 楊進林、蘭進、徐錦堂。2000。天麻的研究進展。中草藥 1:66-69。
- 徐錦堂、郭順星。1989。供給天麻種子萌發營養的真菌—紫萁小菇。真菌學報 8:221-226
- 徐錦堂、冉硯珠、郭順星。1990a。天麻種子發芽營養來源的研究。中國醫學科學院學報 12:431-433。
- 徐錦堂、牟春、冉硯珠。1990b。天麻種子萌發動態及紫萁小菇菌絲侵入的細胞學觀察。中國醫學科學院學報 12(5):313-316。
- 徐錦堂、牟春。1990。天麻原球莖生長發育與紫萁小菇及蜜環菌的關係。植物學報 32:26-31。
- 郭順星、王秋穎。2001。促進天麻種子萌發的石斛小菇優良菌株特性及作用。菌物系統 20:408-412。
- Chou A.H., Y.L. Chen, C.C. Chiu, S.J. Yuan, Y.H. Weng, T.H. Yeh, Y.L. Lin, 2015. T1-11 and JMF1907 ameliorate polyglutamine-expanded ataxin-3-induced neurodegeneration, transcriptional dysregulation and ataxic symptom in the SCA3 transgenic mouse. Neuropharmacology. 99:308-317.
- Huang, N.K., Y. Chern, J.M. Fang, C.I. Lin, W.P. Chen, and, Y.L. Lin. 2007. Neuroprotective principles from *Gastrodia elata*. Journal of natural products, 70(4):571-574.
- Huang, N.K., J.H. Lin, J.T. Lin, C.I. Lin, E.M. Liu, C.J. Lin and J.B. Chen. 2011. A new drug design targeting the adenosinergic system for Huntington's disease. PloS one. 6(6), e20934.
- Hsieh M.T., C.R. Wu, C.F. Chen. 1997. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. J Ethnopharmacol. 56:45-54.
- Kusano, S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. J. Coll. Agric. (Tokyo) 4:1-66.
- Lin, W.M. and Y.F. Wang. 2014. The Wild Orchids of Taiwan - An Illustrated Guide KBCC Press.
- Wu L.Y., W.C. Chen, F.S. Tsai, C.C. Tsai, C.R. Wu, L.W. Lin. 2015. p-Hydroxybenzyl Alcohol, an Active Phenolic Ingredient of *Gastrodia elata*, Reverses the Cycloheximide-Induced Memory Deficit by Activating the Adrenal Gland in Rats. Am J Chin Med. 43:1593-1604.
- Yeh, C.H., F.S. Liao, K.L. Huang, I. Miyajima, Y.I. Lee. 2017. An Efficient Protocol of Protocorm-Like Bodies Regeneration from Callus Cultures of *Gastrodia elata* Blume and the Further Associations with Mycorrhizal Fungi. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 62(1):39-46.

Rare Chinese herb-Seedling and of cultivation techniques in Tianma (*Gastrodia elata*)

Chih-Hsin Yeh

Associate Researcher

Taoyuan district agricultural research and extension station, COA.

zeamays@tydais.gov.tw

Abstract

Tianma (*Gastrodia elata*), rhizomes of a fully mycoheterotrophic orchid and an endangered herbal medicinal plant (Orchidaceae), is a commonly used Chinese herb as a potential functional food for anti-aging and sleep. In this study, we reported a reliable protocol of the seedling and cultivation techniques as a basis of the Tianma planting industry. Embryogenic callus of Tianma subculture and proliferation rate was 8-times every 4 months. The continuous immersion cultures with BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ improved PLBs regeneration frequency and growth rate. The best symbiotic growth of *Armillaria mellea* 'AM2' and tubers, the temperature should be lower than 25°C . The advantage of Tianma cultivation was no need for light during various stage. Year-round cultivation was to product a safe and uniform quality of Tianma raw materials in the environmental control facilities. It was suitable for cultivation by manufacturers of existing mushroom facilities or plant factories.

Key words: *Gasreodia elata*, *Armellaria mellea*, embryogenic callus