

## 地黃無菌播種及微體繁殖研究

曹進義<sup>1</sup> 陳威臣<sup>1</sup> 吳姿穎<sup>2</sup> 夏奇鈺<sup>3,\*</sup>

### 摘要

曹進義、陳威臣、吳姿穎、夏奇鈺。2015。地黃無菌播種及微體繁殖研究。台灣農業研究 64(3):177-188。

本研究利用地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch) 種子進行無菌播種，地黃種子以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒 15 min 可獲得良好之殺菌效果，可明顯降低污染率，並有最高發芽率，分別為 5% 與 80%。以無菌播種地黃小苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，接種於含有 3% 蔗糖、0.8% Bacto agar 及 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基 (以下簡稱基本培養基) 並添加 0-2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 不同濃度，分別於光照與黑暗環境下培養。結果顯示，暗處理下培植體有較高之成活率，且葉柄培植體較葉片培植體之再生反應為佳，葉柄培植體於含有 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 培養基中於黑暗環境下培養具有最高之存活率 62%，可同時誘導出芽體與癒傷組織，分別為 10% 與 62%。另以地黃組培苗之頂芽莖段與莖中段 2 種不同莖段部位作為微體繁殖材料，接種於添加不同蔗糖濃度 (3-9%) 之基本培養基中培養，結果顯示以 3% 蔗糖為最佳，成活率可達 100%，9% 高蔗糖濃度為最差，會導致培植體褐化死亡。進一步利用組培苗之頂芽莖段、莖中段與近基部莖段 3 種不同莖段部位培植體培養於含有 3% 蔗糖濃度並添加 0-2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度之基本培養基中誘導芽體，3 種培植體中以頂芽莖段表現最佳，成活率為 80-100%，BA 濃度於 0.5-1.0 mg L<sup>-1</sup> 之間可誘導出最多芽體，每 1 培植體平均可誘導出 27 個芽。莖段培植體與 BA 濃度二者皆顯著影響地黃芽體之誘導率與培養存活率，且二者間具有交感效應。

關鍵詞：地黃、微體繁殖、無菌播種、芽體誘導。

### 前言

地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch) 屬於玄參科 (Scrophulariaceae) 植物，其地下根部是傳統中醫之重要藥材，具清熱生津、涼血、止血之功能 (Liao *et al.* 2007)。地黃為多年生異花授粉植物，經濟栽培一般不採用種子繁殖，在生產上採用塊根營養繁殖 (Wen *et al.* 2001)。由於地黃長期以塊根進行無性繁殖，因此多種病害常隨塊根傳播，其中又以病毒病害最為嚴重，田間感染率達 100%，病毒在植物體內代代相傳，導致品種退化 (Tien 1962; Wen *et al.* 2001)。感染病毒的植株由於品種不

同、病程長短、環境條件和病原種類的變化，因此所表現出的症狀相當多樣，但通常可以觀察到地下塊根不能正常膨大，塊根表面粗糙、龍頭細長、產量低且品質變差，導致商品等級下降 (Wen *et al.* 2001)。台灣的地黃種原主要是早期自中國大陸引進，多年來相同來源的塊根不斷以無性繁殖方式推廣至台灣各地栽種，田間經常可發現植株葉部出現濃綠不均、嵌紋及皺縮等病毒感染之病徵，植株生長與塊根產量皆受到影響 (Liao *et al.* 2007)。根據 Liao *et al.* (2007) 的研究顯示，台灣地黃感染之病毒係屬於菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV) 的 1 個獨立菌株系 (strain)，與感染中

投稿日期：2014 年 11 月 17 日；接受日期：2015 年 1 月 19 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

國河南地黃的 TMV 之核酸序列相似度高達 97.1%，二者的親緣關係極接近，推測很可能出自同一來源。根據 Tien (1962) 的研究顯示經由有性生殖而來的種子不帶有病毒，且種子繁殖可應用於雜交育種，是選育優質、高產新品種的主要途徑 (Wen *et al.* 2001)。本試驗以地黃異株雜交授粉所得之種子進行無菌播種，並建立微體大量繁殖之技術，除可獲得無病毒之地黃健康種苗外，並可應用於地黃種苗大量繁殖。

## 材料與方法

### 試驗材料及培養基配製

地黃種子係由行政院農業委員會農業試驗所生物技術組之作物機能研究室所提供。培養基配製完成後將 pH 皆調整至 5.6，再以 121°C 滅菌 20 min。

### 消毒時間對地黃種子無菌播種之影響

以商業用之漂白水 Clorox® (USA) 稀釋 10 倍 (0.6% NaOCl) 進行消毒，消毒時間分別為 10、12、15 與 18 min，之後以無菌水清洗 3 次。消毒後之種子，接種於 9 cm 塑膠培養皿中之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基 [添加 3% 蔗糖及 0.8% Bacto agar (Difco, USA)]，每皿接種 50 粒種子，每種消毒時間處理共接種 4 皿。培養室溫度為 25°C ± 1°C，並於光照強度為 38 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 及 14 h 光週期環境培養 4 wk 後進行調查。

### BA (6-Benzyladenine) 濃度與光照條件對葉片及葉柄培植體芽體誘導之影響

以無菌播種長出之地黃組培苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，切取約 1 cm 長之葉片或葉柄作為培植體，接種於 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> 5 種不同濃度 BA 處理之基本培養基，每皿接種 10 個培植體，每種處理接種 8 皿。分別置於光照或黑暗的環境下培養 (即每種 BA 處理之光與暗培養各有 4 皿)，培養室及光照條件 (含下述試驗) 同前所述，培養 8 wk 後進行調查。

### 蔗糖濃度對莖段培植體生長之影響

將無菌播種長出之地黃無菌苗繼代至蘭花瓶中，待小苗生長至約 3 cm 高時，去除含有根之莖基部，將地上部區分成 1 cm 長之頂芽段與其下 1 cm 長之莖中段 2 種培植體，每 1 培植體皆含有 2 個節，分別接種於添加 3、6 與 9% 蔗糖濃度之上述基本培養基中。每瓶蘭花瓶置 100 mL 培養基，各處理接種 4 個蘭花瓶，每個蘭花瓶中接種 5 個培植體，培養 8 wk 後進行調查。

### BA 濃度對地黃不同莖段培植體芽體誘導之影響

以頂芽段、莖中段以及莖基部段 (去除根) 3 個不同部位之莖段作為培植體，每個培植體約 1 cm 長，每 1 培植體皆含有 2 個節，分別接種於含有 3% 蔗糖並分別添加 0.0、0.125、0.25、0.5 與 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度之基本培養基中進行芽體誘導與增殖之試驗。每處理接種 4 個蘭花瓶，每個蘭花瓶接種 5 個培植體，培養 8 wk 後進行調查。

### 統計分析方法

試驗採用完全逢機 (completely randomized design; CRD)，上述 3 種試驗所得資料均經以 SAS 9.1.3 統計分析套裝軟體 (SAS Institute Inc. 2002) 進行變方分析 (ANOVA) 後，若處理間差異顯著，則再利用 Least Significant Difference (LSD) 測驗比較各處理平均值間之個別差異性。

## 結果

地黃種子經由不同消毒時間處理後之結果顯示，以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒 15 min 具有明顯之殺菌效果及種子發芽率，種子污染率與發芽率分別為 5% 與 80%，延長消毒時間至 18 min 雖然可降低污染率 (2%)，但發芽率亦隨之降低為 40% (表 1)。

以無菌播種之組培苗作為微體繁殖材料，切取約 1 cm 大小之葉片與葉柄為培植體，接種於含有 0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度之基本培養基中，結果葉片培植體於

表 1. 以 0.6% 次氯酸鈉溶液配合不同消毒時間對地黃種子無菌播種之影響。

Table 1. Effect of various disinfection times with 0.6% sodium hypochlorite (NaOCl) on the *in vitro* seed germination of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Treatment time (min)	Contamination (%)	Germination (%)	Non-germination (%)
10	25 a <sup>z</sup>	60 b	15 b
12	18 b	65 b	17 b
15	5 c	80 a	15 b
18	2 c	50 c	48 a

<sup>z</sup> Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

照光與黑暗條件下皆易褐化，僅於黑暗培養下 0.125–1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 中可誘導根生成，誘導率為 2–7%；於 1.0 與 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度下可誘導出癒傷組織，誘導率分別為 15% 與 5% (表 2、圖 1)，但無法誘導出芽體，最終褐化死亡。葉柄在光照培養下褐化率亦高，但有 5–7% 芽體誘導率；於黑暗中培養可提高成活率，其中以 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理之芽體誘導率最高，為 20%；提高 BA 濃度至 2.0 mg L<sup>-1</sup> 可提高存活率、癒傷組織誘導率，分別為 62% 與 62%，但芽體誘導率下降為 10%；於較低 BA 濃度

(0.125–0.5 mg L<sup>-1</sup>) 培養基中，培植體有較高之根誘導率 (表 3、圖 2)，為 18–35%。

以地黃瓶苗之頂芽段與中間莖段 2 種莖段培植體分別接種於含有 3、6 與 9% 蔗糖濃度之基本培養基中，結果顯示 2 種培植體皆以培養在 3% 蔗糖濃度中有較佳之生長，其中又以頂芽段培植體表現較佳，成活率可達 100%，小苗之株高、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀皆顯著優於其他蔗糖濃度。在 3% 蔗糖濃度下，中間莖段培植體雖然成活率較莖頂培植體為低 (70%)，小苗生長與發育近似於頂芽段培植體。

表 2. 光照培養下 BA 濃度與不同培植體對地黃芽體誘導之影響。

Table 2. Effect of BA concentrations and explant types on shoot induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch under the light culturing.

BA (mg L <sup>-1</sup> )	Explant type	Browning (%)	Survival (%)	Shoot induction (%)	Root induction (%)	Callus induction (%)
0.0	Leaf	100 a <sup>z</sup>	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
0.125	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	0 a
0.25	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	0 a
0.5	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
1.0	Leaf	97 a	3 a	0 b	0 a	3 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	5 a
2.0	Leaf	92 a	8 a	0 b	0 a	8 a
	Petiole	93 a	7 a	7 a	0 a	5 a
Explant type		NS <sup>y</sup>	NS	NS	NS	NS
BA		NS	NS	NS	NS	NS
Explant type × BA		NS	NS	NS	NS	NS

<sup>z</sup> Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

<sup>y</sup> Non-significant.

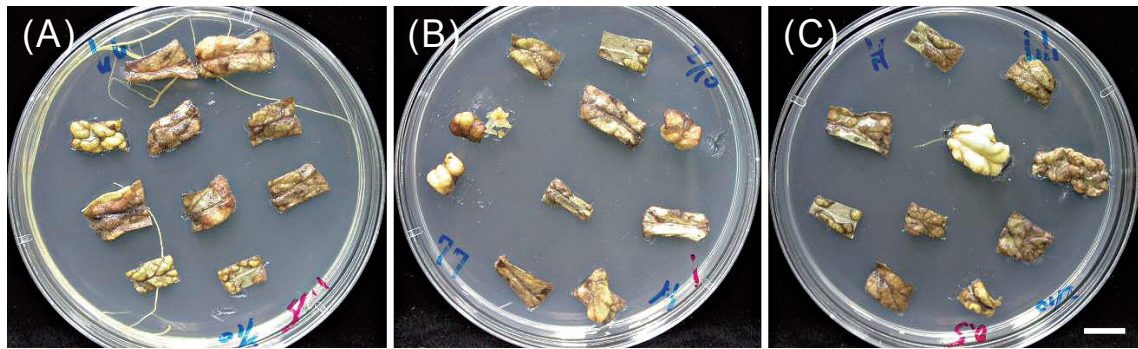


圖 1. 地黃葉片培植體以基本培養基添加不同 BA 濃度於黑暗中培養誘導不定根與癒傷組織之情形。(A) 0.125 mg L<sup>-1</sup>; (B) 0.5 mg L<sup>-1</sup>; (C) 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA (標尺 = 1 cm)。

Fig. 1. Leaf explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations under dark condition for adventitious root and callus induction. BA concentration: (A) 0.125 mg L<sup>-1</sup>; (B) 0.5 mg L<sup>-1</sup>; and (C) 1.0 mg L<sup>-1</sup> (Bar = 1 cm).

表 3. 黑暗培養下 BA 濃度與不同培植體對地黃芽體誘導之影響。

Table 3. Effect of BA concentrations and explant types on shoot induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch under the dark culturing.

BA (mg L <sup>-1</sup> )	Explant type	Browning (%)	Survival (%)	Shoot induction (%)	Root induction (%)	Callus induction (%)
0.0	Leaf	100 a <sup>z</sup>	0 f	0 c	0 d	0 d
	Petiole	100 a	0 f	0 c	0 d	0 d
0.125	Leaf	93 ab	7 ef	0 c	7 bcd	0 d
	Petiole	65 e	35 b	0 c	35 a	0 d
0.25	Leaf	100 a	0 f	0 c	0 d	0 d
	Petiole	68 e	32 b	0 c	32 a	32 b
0.5	Leaf	98 a	2 f	0 c	2 cd	0 d
	Petiole	63 e	37 b	3 c	18 b	37 b
1.0	Leaf	85 bc	15 de	0 c	2 cd	15 c
	Petiole	70 de	30 bc	20 a	8 bc	30 b
2.0	Leaf	80 cd	20 cd	0 c	0 d	5 cd
	Petiole	38 f	62 a	10 b	3 cd	62 a
Explant type		**y	**	**	**	**
BA		**	**	**	**	**
Explant type × BA		**	**	**	**	**

<sup>z</sup> Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

<sup>y</sup> \*\* Significant at 0.01 level.

隨著蔗糖濃度提升至 9% 時，莖頂及中間莖段培植體之成活率皆下降，芽體生長與發育受影響，芽體品質較差，尤其中間莖段培植體長出之小苗皆黃化死亡 (表 4、圖 3)。

以頂芽莖段、中間莖段與莖基部 3 種部位之莖段組織為培植體，分別接種於含有 3% 蔗

糖並添加 0.0、0.125、0.25、0.5 與 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度之基本培養基中進行芽體誘導。結果顯示，3 種莖段培植體中以頂芽莖段有最佳之芽體誘導率，在不同 BA 濃度下培植體皆有較高的成活率，為 80–100%。其中，於 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 每 1 培植體平均可誘導出 27 個芽為最高

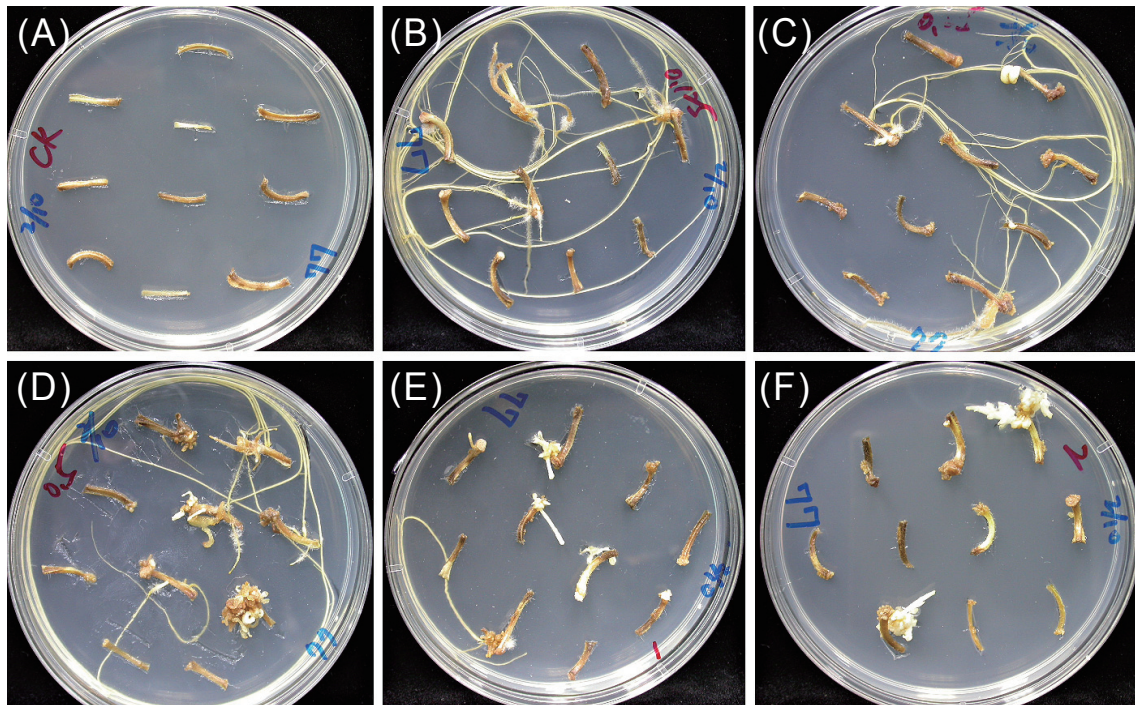


圖 2. 地黃葉柄培植體以基本培養基添加不同 BA 濃度於黑暗中培養誘導不定根、癒傷組織與芽體之情形。(A) 0.0 mg L<sup>-1</sup>; (B) 0.125 mg L<sup>-1</sup>; (C) 0.25 mg L<sup>-1</sup>; (D) 0.5 mg L<sup>-1</sup>; (E) 1.0 mg L<sup>-1</sup>; (F) 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA (標尺 = 1 cm)。

Fig. 2. Petiole explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations under dark condition for adventitious root, callus, and shoot induction. BA concentration: (A) 0.0 mg L<sup>-1</sup>; (B) 0.125 mg L<sup>-1</sup>; (C) 0.25 mg L<sup>-1</sup>; (D) 0.5 mg L<sup>-1</sup>; (E) 1.0 mg L<sup>-1</sup>; and (F) 2.0 mg L<sup>-1</sup> (Bar = 1 cm).

表 4. 地黃不同莖段培植體與蔗糖濃度對地黃芽體誘導與生長之影響。

Table 4. Effects of stem explant types and sucrose concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Explant type	Sucrose (%)	Survival (%)	No. of shoot explant <sup>-1</sup>	No. of root explant <sup>-1</sup>	Shoot height (cm)	No. of leaves explant <sup>-1</sup>	Leaf length <sup>z</sup> (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
Shoot tip	3%	100 a <sup>y</sup>	1 a	6.4 a	8.4 a	11.6 ab	4.6 a	2.0 a	2.5 a
	6%	100 a	1 a	5.0 ab	6.4 b	9.4 bc	3.2 b	1.2 c	1.4 b
	9%	80 b	1 a	2.8 b	3.9 c	7.8 c	1.7 c	0.8 d	0.4 c
Inter-nodalsegment	3%	70 b	1 a	6.0 a	8.6 a	12.4 a	3.9 ab	2.0 a	3.0 a
	6%	50 c	1 a	4.2 ab	5.7 b	10.2 abc	3.3 b	1.6 b	1.1 bc
	9%	0 d	0 b	- <sup>x</sup>	-	-	-	-	-
Sucrose	**	NS <sup>w</sup>	NS	**	**	**	**	**	**
Explant	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sucrose explant	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>z</sup> The largest leaf.

<sup>y</sup> Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

<sup>x</sup> No survival explant was found.

<sup>w</sup> NS, \*, \*\*: Non-significant or significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

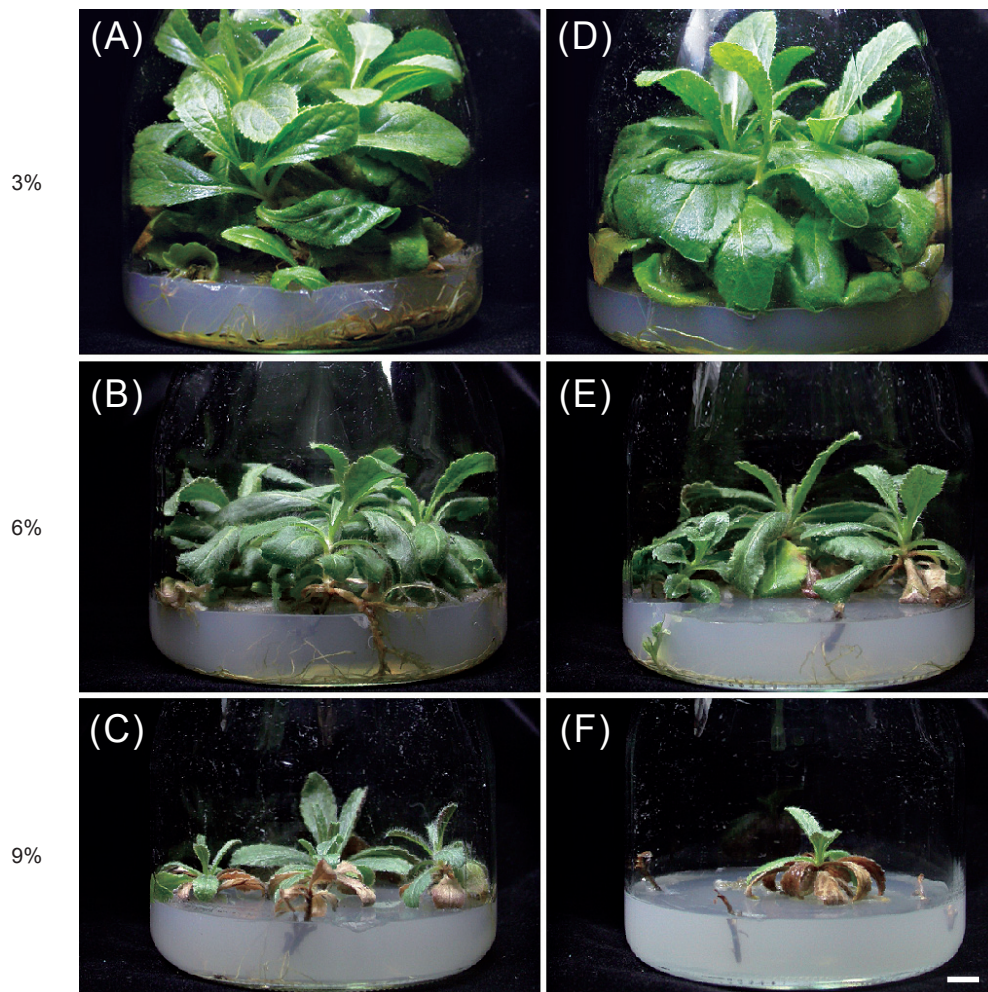


圖 3. 不同蔗糖濃度與莖段培植體對地黃芽體誘導與生長之影響。(A)–(C) 頂芽莖段培植體，蔗糖濃度分別為 3、6 與 9%；(D)–(F) 中間莖段培植體，蔗糖濃度分別為 3、6 與 9% (標尺 = 1 cm)。

**Fig. 3.** Effect of different stem explants and sucrose concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch. (A)–(C) Growth of shoot tip explants on medium with 3, 6, and 9% sucrose. (D)–(F) Growth of inter-nodal stem explants on medium with 3, 6, and 9% sucrose (Bar = 1 cm).

(含二次芽體，即從誘導芽體之節位上又誘導出芽體)；中間莖段培植體的芽體誘導率其次，雖於  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BA 每 1 培植體最高可誘導出 32.6 個芽，但其因成活率僅達 50%，相較之下，中間莖段培植體的總誘導芽數仍較頂芽莖段為少；基部莖段培植體在 3 種莖段培植體中表現最差，除了接種在不合或較低的 BA 濃度 ( $0.0\text{--}0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) 培養基中有較高的成活率 (60–100%) 之外，隨著 BA 濃度的提升，培植體存活率下降，當 BA 濃度達  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  (含)

以上時，成活率只剩 20–40% (表 5)。頂芽培植體在不同濃度 BA 培養基中培養，以  $0.5\text{--}1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA 有較高的芽體增殖效果，每 1 培植體可誘導出最多的芽數。在誘導芽體之根數、長度、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀方面，除對照組之外，則於  $0.125 \text{ mg L}^{-1}$  BA 為最佳，中間莖段與莖基部培植體亦有相同的現象，且不同莖段培植體與 BA 濃度處理間具有極顯著交感效應 (表 5、圖 4)。

表 5. 不同莖段培植體與 BA 濃度對地黃芽體誘導與生長之影響。

Table 5. Effects of stem explant types and BA concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Explant type	BA (mg L <sup>-1</sup> )	Survival (%)	No. of shoot explant <sup>-1</sup>	No. of root explant <sup>-1</sup>	Shoot height (cm)	No. of leaves explant <sup>-1</sup>	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
Shoot tip	0.0	100 a <sup>z</sup>	1.0 e	0.2 cd	9.4 ab	10.4 b	4.4 b	2.0 b	1.6 c
	0.125	100 a	1.8 e	12.2 a	8.9 b	13.8 a	3.8 b	1.8 bc	2.5 b
	0.25	100 a	4.4 e	3.4 ef	5.6 e	6.4 cd	2.9 c	1.1 d	0.4 de
	0.5	90 ab	27.0 bc	1.3 fgh	3.7 f	6.2 cd	1.2 de	0.5 ef	0.1 e
	1.0	80 abc	26.2 c	0.0 h	3.1 fg	5.6 d	1.1 e	1.1 d	0.1 e
Inter-nodal segment	0.0	100 a	1.0 e	9.6 b	9.6 ab	12.2 a	4.4 b	2.1 b	2.1 b
	0.125	100 a	2.4 e	5.2 de	6.5 d	7.8 c	3.0 c	1.0 d	0.8 d
	0.25	80 abc	4.0 e	1.8 fgh	3.5 fg	5.2 d	1.7 d	0.7 e	0.1 e
	0.5	50 de	32.6 a	1.5 fgh	3.2 fg	5.2 d	1.2 de	0.4 ef	0.1 e
	1.0	50 de	30.8 ab	1.0 gh	3.2 fg	5.8 d	1.1 e	0.4 f	0.1 e
Basal-nodal segment	0.0	100 a	1.0 e	8.0 bc	10.0 a	13.5 a	5.8 a	2.7 a	4.3 a
	0.125	70 bcd	1.2 e	8.3 bc	7.6 c	12.6 a	3.7 b	1.6 c	2.5 b
	0.25	60 bcd	4.4 e	2.6 fg	3.1 fg	4.8 d	1.3 de	0.6 ef	0.1 e
	0.5	40 ef	13.0 d	2.0 fgh	3.3 fg	5.4 d	1.5 de	0.5 ef	0.1 e
	1.0	20 f	27.0 bc	1.7 gh	2.7 g	5.6 d	1.0 e	0.4 f	0.1 e
BA		** <sup>y</sup>	**	**	**	**	**	**	**
Explant type		**	**	NS	**	**	*	**	**
BA × Explant type		**	**	**	**	**	**	**	**

<sup>z</sup> Means in the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by LSD test.

<sup>y</sup> NS, \*, \*\*: Non-significant or significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

## 討論

次氯酸鈉 (漂白水) 為常用的殺菌劑，廣泛應用於建立組織培養無菌培植體時作為殺菌之用。根據研究顯示，次氯酸鈉濃度與消毒時間會影響種子消毒效果，進而影響種子發芽以及存活率。在甜椒種子之消毒試驗顯示，以 0.1% 次氯酸鈉消毒 10 min 有最佳的殺菌與種子發芽效果，汙染率與發芽率分別為 0 與 66.6% (Chao *et al.* 2010)；番茄種子以 4% 次氯酸鈉消毒 10 min，可促進種子發芽，接種於 MS 培養基後 13 d，其發芽率可達 78.1%，消毒效果較使用 HgCl 為佳 (Morla *et al.* 2011)；拖鞋蘭 (*Paphiopedilum wardii* Sumerh) 成熟種子以 0.5% 次氯酸鈉溶液消毒 60 min 或以 1% 濃度消毒 40 min 有最佳除菌的效果，並可提高種子發芽率 (Zeng *et al.* 2012)。本試驗以

0.6% 次氯酸鈉分別處以 10、12、15 與 18 min 消毒時間，其中以 15 min 對地黃種子有最佳之消毒效果及種子發芽率，其汙染率與發芽率分別為 5% 與 80%。延長消毒時間至 18 min 雖然可降低的汙染率至 2%，但可能因此造成種子的傷害，反而影響後續之發芽率僅剩 40% (表 1)。地黃種子無菌播種後，除汙染種子外，仍有種子未發芽，可能與消毒液濃度、消毒時與種子成熟度有關。根據上述，甜椒、番茄與拖鞋蘭等種子消毒雖有最適消毒液濃度與消毒時間，但仍對部分種子造成影響而不發芽，本試驗之地黃種子經 0.6% 次氯酸鈉消毒 10 min 即可獲得無菌種子並發芽，但仍有部分種子不發芽。除了種子本身因素影響發芽外，此消毒時間可能已傷害部分種子活性而影響發芽。於蝴蝶蘭 (Tu & Lee 1988) 與萬代蘭 (Mathews & Rao 1980) 的研究顯示，選擇適當成熟度之

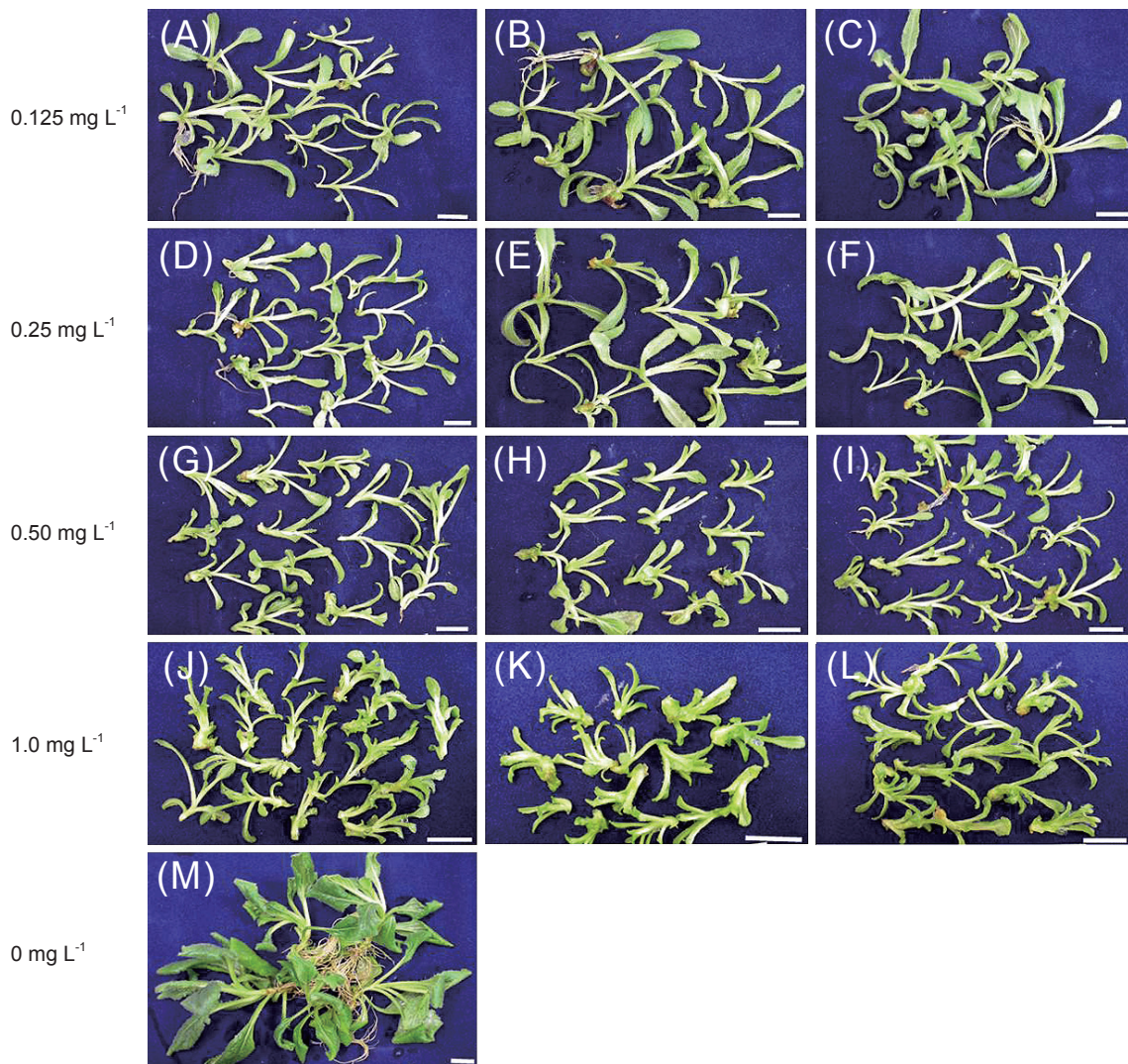


圖 4. 莖段培植體於添加不同 BA 濃度基本培養基所誘導之芽體。(A)–(C) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度  $0.125 \text{ mg L}^{-1}$  所誘導之芽體；(D)–(F) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  所誘導之芽體；(G)–(I) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  所誘導之芽體；(J)–(L) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  所誘導之芽體；(M) 對照組，頂芽培植體於不含 BA 之基本培養基所誘導之芽體 (標尺 = 1 cm)。

**Fig. 4.** Stem explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations for shoot induction. (A)–(C) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with  $0.125 \text{ mg L}^{-1}$  BA; (D)–(F) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  BA; (G)–(I) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with  $0.50 \text{ mg L}^{-1}$  BA; (J)–(L) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA; (M) Shoot tip explant cultured on the basal medium without BA (Bar = 1 cm).

果莢或種子的採收時間可獲得最佳之種子發芽率，最高可達 100%。本試驗並未進行地黃種子不同採收時間與成熟度對發芽率之影響，因此仍需更進一步探討。

根據 Chang (2009) 對小葉懸鉤子 (*Rubus taiwanicola* Koidz. & Ohwi) 葉片組織培養的研究顯示，於 16 h 光照、8 h 黑暗環境下，將葉片與葉柄培養於不同種類與濃度之 cytokinin

培養基中，葉片培植體不定芽之誘導效果皆較葉柄培植體為佳，分別為 90% 與 5%，但在癒傷組織誘導率則二者無差異皆為 100%；Park *et al.* (2002) 在蝴蝶蘭的研究顯示，葉片培植體培養於含 88.8 mM BA 及 5.4 mM NAA 之 MS 培養基中，在較低光照強度  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  下，有最佳之擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 誘導率與分化數量，分別為 90% 與 12 PLBs explant<sup>-1</sup>，隨著光照強度提高，培植體存活率、PLB 的誘導率與分化數量皆降低。根據 Chawla (2002) 的研究顯示，培植體於照光環境下培養容易導致培植體切口所分泌之酚類化合物氧化，因此造成培植體與所誘導出之癒傷組織褐化，相反的於黑暗環境下培養則可減少培植體的褐化，而有較高之成活率。Afshari *et al.* (2011) 利用不同光照環境與植物生長調節劑進行油菜 (*Brassica napus* L.) 種子苗癒傷組織誘導的研究顯示，因上胚軸培植體於培養過程產生較少酚類化合物，可適合於光照環境下培養，並促進癒傷組織的誘導與生長。但子葉培植體於光照下易造成所誘導之癒傷組織褐化，因此子葉培植體適合於黑暗中培養，並可促進癒傷組織的發生。本試驗以地黃組培苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，葉片培植體於光照與黑暗條件下皆容易褐化，僅有少量根分化，雖可誘導出癒傷組織，但無芽體長出。以葉柄培植體配合暗培養以  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA 濃度芽體誘導最佳，為 20% (表 3)。因此，建議採用地黃組培苗之葉柄作為培植體並於黑暗中培養可以有較高之存活率、癒傷組織與芽體誘導率。綜合而言，利用地黃試管苗之葉柄作為微體繁殖培植體材料，施以適當之 ( $1.0\text{--}2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) BA 濃度於黑暗環境中培養，對於不定芽的誘導效果最好。

糖 (醣) 類在培養基中主要為提供碳源供培植體生長所需，並有調節培養基中滲透壓之功能 (Moncousin 1991)。不同作物之組培苗對蔗糖濃度的耐受性有所不同，根據 Chen *et al.* (2004) 高氏柴胡 (*Bupleurum kanoi* Liu, Chao et Chuang) 組織培養的研究顯示，組培苗成活率在 1.5–12% 蔗糖濃度間並無顯著影響，為 96–100%，但芽體增殖率與發根率仍以較低

(1.5–3%) 蔗糖濃度為佳；Chang & Liaw (2005) 於大蒜 (*Allium sativum* L.) 組織培養試驗中亦顯示蔗糖濃度以 3% 有較佳的成活率；Tu & Lee (1988) 於不同蔗糖濃度 (1–3%) 對蝴蝶蘭 (白花雜交種) (*Phalaenopsis*, white Hybrid) 的無菌播種研究顯示，種子於低蔗糖濃度 (1% & 1.5%) 具有較佳的發芽率及原球體發育。於高蔗糖濃度 (2.5% & 3.0%) 下，不僅發芽差，且易造成原球體之黃化或褐化，蔗糖濃度提高對促進幼苗根部生長影響之程度比莖葉大。Chen *et al.* (2000) 於湖北貝母 (*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia) 的研究顯示，3% 蔗糖對小鱗莖之根形成具有促進效果最佳，Kumar *et al.* (1999) 於唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus* Hort.) 的研究則顯示，高蔗糖濃度 (0.232 M；約 8%) 較有利組培苗發根。本試驗比較地黃不同莖段培植體於不同蔗糖濃度中對芽體生長之影響，結果顯示蔗糖濃度對於誘導芽數、根數、株高、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀有顯著差異，但 2 種培植體間並無差異。3 種蔗糖濃度中以 3% 蔗糖對小苗生長最佳，蔗糖濃度提高，對小苗的生長與發育有不良影響，尤其中間莖段培植體於 9% 蔗糖濃度時全數黃化死亡 (表 4)。

蔗糖濃度亦會影響根與塊莖的發育，於馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 試管塊莖的研究顯示，培養基中添加高濃度的蔗糖 (8%) 對塊莖誘導具有良好的促進作用，而且隨著蔗糖濃度的提高，可加速塊莖的形成，高濃度的蔗糖是試管塊莖形成的必要條件 (Khuri & Moorby 1995)。此外，高濃度蔗糖還能誘導塊莖形成過程中特別基因的表達，進而促進塊莖貯藏蛋白的累積 (Zrenner *et al.* 1995; Kuhn *et al.* 2003)。在甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 的研究方面，蔗糖誘導與光合產物累積對甘藷莖、葉和葉柄 *Sporamin* 基因有正調控作用，*Sporamin* 可在葉和葉柄中被大量的表達從而促進甘藷塊根的膨大 (Nakamura *et al.* 1991; Ohta *et al.* 1991; Chen *et al.* 1997)。由於地黃在藥材上主要利用塊根部位，本試驗嘗試以較高濃度 (6–9%) 蔗糖於試管中誘導不定根膨大，試驗結果顯示，地黃試管苗莖段培植體所

誘導長出之芽體於 3、6、9% 三種蔗糖濃度中培養皆無法誘導不定根膨大，而且隨著蔗糖濃度的提升，顯著影響小苗的生長與發育。於蔗糖 9% 時培植體全數褐化死亡，推測不同作物對培養基中蔗糖濃度之耐受度不同，亦或是塊根膨大與塊莖膨大的機制不同而有所差異。

許多組織培養的研究結果顯示，利用瓶苗之不同部位作為培植體，反應不盡相同，此因不同部位培植體具有不同分化能力所致。故選擇適當培植體乃組織培養成功之重要關鍵 (Huang *et al.* 2000; Komalavalli & Rao 2000; Chueh *et al.* 2001)，由台灣龍膽 [*Gentiana davidii* var. *formosana* (Hayata) T. N. Ho] 微體繁殖的研究顯示，以葉片、莖段、莖節與根部作為培植體，其中以莖節之芽體誘導能力最強，平均每個培植體可誘導 6.3 個芽體，而其他培植體則無法誘導芽體形成 (Chueh *et al.* 2001)。組培苗之莖段是作為瓶內繁殖之良好材料，主要是莖部組織上的頂芽或莖節上之腋芽都具有芽體分化之能力。Chen *et al.* (2004) 於高氏柴胡 (*B. kaoi* Liu, Chao et Chuang) 腋芽培養之研究顯示，以瓶苗近頂芽或近基部之莖節作為培植體之芽體誘導率分別為 80% 與 66.7%，每一培植體所誘導芽數分別為 3.3 與 2.6 個芽，近頂芽之培植體其芽體誘導率稍高於基部莖節培植體，但二者並無顯著差異。

在本試驗中利用頂芽莖段、莖中段與基部莖段 3 種不同莖段培植體，雖然芽體之誘導主要受 BA 濃度影響，但仍以頂芽莖段為最佳。主要是頂芽莖段培植體有較高之成活率，提高 BA 濃度雖然在誘導芽體數量方面可獲得良好之效果，但芽體的品質會隨著 BA 濃度的增加而降低 (表 5、圖 4)。因此，建議在芽體增殖的階段可於較高 BA 濃度 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) 下培養，而於出瓶前培養階段可降低 BA 濃度，藉以獲得品質較佳的地黃種苗。

綜合上述試驗結果顯示，以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒地黃種子 15 min 即可獲得良好之除菌效果，具有最低之汙染率與最高之發芽率。以瓶苗之莖段為培植體時以頂芽莖段為最佳，有較高之存活率，培養基中之蔗糖濃度則以 3% 對小苗的生長最為適當。本試驗方法

以地黃異花授粉種子探討無菌播種及微體繁殖技術以獲得健康種苗，然而地黃為異花授粉植物，其後代高度分離，此種苗有性繁殖方式雖有可能導致不同植株中活性成分之變異，但可做為選育優質高產新品種進而大量無性繁殖的主要途徑。

## 誌謝

本研究承本所生技組作物機能研究室鄭統隆前副研究員、賴瑞聲助理研究員以及高瑞隆前助理研究員提供地黃種子與種苗材料協助試驗進行，特此致謝。

## 引用文獻

- Afshari, R. T., R. Angoshtari, and S. Kalantari. 2011. Effect of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics J.* 4:60–67.
- Chang, C. H. and S. I. Liaw. 2005. Effect of growth regulators on the growth of garlic explant. *Crop Environ. Bioinform.* 2:287–295. (in Chinese with English abstract)
- Chang, W. C. 2009. Tissue Culture and the Evaluation of Antioxidant Activity of *Rubus taiwanicola* Koidz. & Ohwi. Master Thesis, Department of Bioengineering, Tatung University, Taitung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)
- Chao, Y. C., S. T. Hsu, and K. C. Tzeng. 2010. Bactericidal efficacy of chlorine dioxide against three seed-borne plant pathogenic bacteria and application of seed treatment for eradication of these bacteria. *Plant Pathol. Bull.* 19:19–29. (in Chinese with English abstract)
- Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. 2nd ed. Science Publishers Inc., Enfield. 528 pp.
- Chen, J. C., Y. M. Chen, and K. W. Yeh. 1997. Isolation and characterization of new sporamin gene numbers from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Taiwania* 42:34–42.
- Chen, U. C., C. D. Tai, C. C. Chen, and H. S. Tsay. 2000. Study on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia. III. Influence of medium component and light treatment on *in vitro* rooting, and acclimatization of bulblet. *J. Agric. Res. China* 49:39–47. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004. Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal

- herbs- *Bupleurum kaoi* by axillary bud culture. J. Agric. Res. China 53:27–38. (in Chinese with English abstract)
- Chueh, F. S., C. C. Chen, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2001. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. *Planta Med.* 67:70–73.
- Huang, C. L., M. T. Hsieh, W. C. Hsieh, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an thno-medicinal plant, from shoot-tip, leaf, and inflorescence-node explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:220–224.
- Khuri, S. and J. Moorby. 1995. Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Ann. Bot.* 75:295–303.
- Komalavalli, N. and M. V. Rao. 2000. *In vitro* micro-propagation of *Gymnema sylvestre*- A multipurpose medical plant. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 61:97–105.
- Kuhn, C., M. R. Hajirezaei, A. R. Fernie, U. Roessner-Tunali, T. Czechowski, B. Hirner, and W. B. Frommer. 2003. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol.* 131:102–113.
- Kumar, A., A. Sood, L. M. S. Polni, and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat-shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:105–112.
- Liao, J. Y., C. C. Hu, J. L. Kao, and T. C. Deng. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia glutinosa*. *Plant Pathol. Bull.* 16:61–69. (in Chinese with English abstract)
- Mathews, V. H. and P. S. Rao. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrid through tissue culture technique. *Plant Sci. Lett.* 17:383–389.
- Moncousin, C. H. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusce* (Delaware). *Hort-Science* 26:586–589.
- Morla, S., C. S. V. Ramachandra Rao, and R. Chakrapani. 2011. Factors affecting seed germination and seedling growth of tomato plants cultured *in vitro* conditions. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 1:328–334.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–491.
- Nakamura, K., M. Ohto, N. Yoshida, and K. Nakamura. 1991. Sucrose-induced accumulation of  $\beta$ -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol.* 96:902–909.
- Ohta, S., T. Hattori, and A. Morikami. 1991. High level expression of a sweet potato sporamin gene promoter  $\beta$ -glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. *Mol. Gen. Genet.* 225:369–378.
- Park, S. Y., H. N. Murthy, and K. Y. Paek. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:168–172.
- Tien, P. 1962. A virus from degenerated *Rehmannia glutinosa* in Honan. *Acta Microbiol. Sin.* 8:418–419. (in Chinese with English abstract)
- Tu, M. C. and N. Lee. 1988. Effect of nitrogen, sucrose concentration and light intensity on seed germination and seedling growth in *Phalaenopsis* white hybrid. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 34:293–302. (in Chinese with English abstract)
- Wen, X. S., X. E. Li, and S. L. Yang. 2001. Viral diseases of *Rehmannia glutinosa* and problems demanding prompt solution. *Chin. Trad. Herb Drugs.* 32:662–664. (in Chinese with English abstract)
- Zeng, S., K. Wu, J. A. T. da Silva, J. Zhang, Z. Chen, N. Xia, and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Sci. Hort.* 138:198–209.
- Zrenner, R., M. Salanoubat, L. Willmitzer, and U. Sonnewald. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7:97–107.

## *In Vitro* Seed Germination and Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch

Chin-Yi Tsao<sup>1</sup>, Uei-Chern Chen<sup>1</sup>, Tzu-Ying Wu<sup>2</sup>, and Chi-Ni Hsia<sup>3,\*</sup>

### Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2015. *In vitro* seed germination and micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):177–188.

*In vitro* studies were conducted to establish protocol for micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch, an important Chinese herbal medicine. Results showed that seeds disinfection with 0.6% sodium hypochlorite for 15 min significantly reduced the contamination rate to 5% and obtained the highest germination rate to 80%. Comparing the regeneration rate of leaf and petiole explants from *in vitro* grown seedlings revealed that petiole explants growing on MS medium containing 0.01 mg L<sup>-1</sup> 1-Naphthaleneacetic acid with 2.0 mg L<sup>-1</sup> Benzyladenine (BA) and cultivated in darkness obtained a better survival rate (62%) along with 10% shoot induction rate and 62% callus induction rate. Cultivating shoot tip and nodal stem segment of *in vitro* grow seedlings on the basal medium containing various sucrose concentrations (3–9%) showed that addition of 3% sucrose had the highest survival rate (100%). Furthermore, shoot tip, inter-nodal and basal nodal stem segments of seedlings were cultured on the basal medium containing 3% sucrose and various BA concentrations (0.0–1.0 mg L<sup>-1</sup>) to evaluate their regenerative potential. The results showed that shoot tip had the highest survival rate (80–100%) and had the most adventitious shoots induced per explant when cultured on the medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA. The results show that type of stem segment explants and BA concentration are key factors influence the micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* Libosch, Micropropagation, *In vitro* seed germination, Shoot induction.

---

Received: November 17, 2014; Accepted: January 19, 2015.

\* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.