

不同有機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭生長之影響

黃 宣 淦¹⁾ 林 深 林²⁾

關鍵字：有機氮源、芭菲爾鞋蘭、瓶內

摘要：為瞭解芭菲爾鞋蘭對氮肥型態的反應，以全量 MS 作為基礎培養基，並將其中氮源以不同有機氮源型態作為代替處理瓶內芭菲爾鞋蘭植株 90 天。結果顯示，不管是在地上與地下部游離胺基酸、植株總氮、葉片葉綠素含量與培養基中氮吸收量皆以 Casein 處理顯著最差。而對照組，無機氮源處理培養基所培養植株則有顯著較高地上部胺基酸含量、根部硝酸還原酶活性、銨態氮的吸收和較低的培養基游離胺基酸吸收。而在不同有機氮源處理中，以 Peptone 處理有顯著較佳的植株外表性狀、地上與地下部鮮重。顯示在不同有機氮源中以 Peptone 較可有效促進瓶內芭菲爾鞋蘭生長。

前 言

仙履蘭 (Slipper orchids) 為蘭科 (Orchidaceae)，杓蘭亞科 (Cypripedioideae) 一群植物稱之。其中 *Paphiopedilum* 屬，原產地主要分布在熱帶亞洲，因其種類眾多，花朵型態特異且顏色鮮豔，世界各地均擁有特定的愛好者 (Cribb, 1998)。現今野生族群因人為過度採集與喪失適宜生長環境而受到滅絕危機，因此目前所有 *Paphiopedilum* 屬物種已受到國際瀕臨絕種動植物貿易公約 (CITES) 保護，將其列入 Appendix I，嚴禁野生植株進出口 (Zeng *et al.*, 2015)。

而芭菲爾鞋蘭依葉片型態的不同，生長習性也不同，如：綠葉種從實生組培苗出瓶後到開花需要 3 至 5 年以上的時間 (張等, 2015)。因此需要利用適當養分供應來縮短營養生長期，其中又以氮肥對營養生長最具相關性。氮為植物體主要元素之一，在植物生長與繁殖中扮演著重要的角色，然而，在許多生態系統中普遍會發生氮缺乏的情況，當氮的供應不足時，會引發植物生長、葉面積、葉含氮量與誘導光合作用能力下降 (Boussadia *et al.*,

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系講師，通訊作者。

2010；Chapin *et al.*, 1986；Ferrar and Osmond, 1986)。在組織培養中，氮的利用性與其供給型態顯著影響組植物型態發生與生長。大多數培養基中，氮源可分為無機與有機氮源，無機氮源包括硝態氮 (NO_3^- -N)與銨態氮 (NH_4^+ -N)，而有機氮源如：Tryptone、Peptone、Yeast extract、Casein hydrolysate 與 Glutamic acid 等。Arditti (1967)指出有機添加物可影響瓶內再生能力、PLBs 增殖與蘭花實生苗的生長等。而有機添加物的使用被認為可供養分、作為嵌合劑或具有穩定 pH 值之緩衝作用等 (吳, 1991)。蘭花種子的發芽、原球體的發育與幼苗生長可藉由有機添加物當作輔助物質來促進其生長 (Zeng *et al.*, 2012)。在蘭花組織培養中，有機添加物的使用已有些例子，例如：在芭菲爾鞋蘭屬植物方面，Zeng 等 (2012)，使用胡蘿蔔、BH 與 PH 三種不同濃度有機添加物對 *Paph. wardii* 實生苗 90 天後，顯示已添加 100 ml/L BH 對植株顯著較佳的株高、葉片數與根數等外表性狀。Huang 等 (2001)指出使用椰奶與 Casein Hydrolysate 有效提高 *Paph. philippinense* × *Paph. susan booth* 實生苗地上部與地下部增長。Pierik 等 (1988)指出使用 Tryptone (1.5, 2.0 或 2.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)可顯著促進 *Paph. ciliolare* 種子發芽與後續實生苗的生長。本試驗主要探討瓶內芭菲爾鞋蘭對於不同有機氮源型態吸收之影響，以觀察何種形式氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭生長較佳。

材料與方法

一、試驗材料

莖高約 0.5 公分，葉幅約 2 公分，並帶有 3 片葉之芭菲爾鞋蘭 *Paph. hangianum* × *Paph. moquetteanum* 組織培養分生苗，由行政院農業委員會種苗改良繁殖場提供。並於組織培養室 16/8 hr 光週期，光度 21 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，25°C 環境下進行培養。

二、試驗方法

(一) 試驗處理

以全量 MS 培養基 (Murashige and Skoog, 1962)，20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖，1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性碳，7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Agar，0.8 ppm IAA，0.2 ppm BA 為基礎培養基，所有處理總氮濃度為 30 mM，如下：

Treatment	Conc.(Mm)					
	Inorganic-N ^z	Casein-N	Peptone-N	Tryptone-N	Yeast Extract-N	KCl-K
IN	30	-	-	-	-	0
Cas	-	30	-	-	-	10.3
Pep	-	-	30	-	-	10.3
Try	-	-	-	30	-	10.3
YE	-	-	-	-	30	10.3

z: Inorganic Nitrogen, NO_3^- -N and NH_4^+ -N in MS medium.

隨後將 pH 調整至 5.7，最後將培養基分裝於蘭花瓶中，每一蘭花瓶裝填 100 ml，再以 121°C (1.1 kg·cm⁻²)滅菌 20 分鐘。隨後將瓶內植株於無菌操作台下轉移至上述不同處理培養基中進行 90 天培養，每一蘭花瓶 5 植株，3 個月後即出瓶並進行各項化學分析。出瓶植株先用自來水沖掉根部上所攜帶培養基，再以 RO 水洗淨，隨後紙巾吸乾植株表面水分，並進行外表性狀觀察包括：最長根長、根粗度、根數、葉長、葉寬、莖長度與葉片數。試驗共 5 種處理，每處理 50 植株。

(二) 調查項目

1. 游離銨、游離硝 (Free NH₄⁺、NO₃⁻)分析

(1) 硝酸態氮 (NO₃⁻)

分析依 Cataldo 等 (1975)方法。培養基加熱溶解後，吸取 2 ml 加去離子水定量至 25 ml，從中再取 0.1 ml，加 0.4 ml 5% Salicylic acid，震盪均勻後反應 20 分鐘，隨後緩慢加入 9.5 ml 8% NaOH，震盪均勻後於光電比色計測定 410 nm 波長的吸光值，每處理六重複。

(2) 銨態氮 (NH₄⁺)

分析依 Weatherburn 等 (1967)之方法。培養基加熱溶解後，吸取 0.05 ml 加 3.95 ml 0.3 Mm H₂SO₄，隨後依序加入呈色劑 A 液及 B 液各 0.5 ml，再於 37°C 水浴震盪 20 分鐘後，以分光光度計測量 625 nm 波長下之吸光值，每處理六重複。

呈色劑配置：

A 液：秤取 0.5 g phenol 及 25 ml Sodium nitroprusside，以去離子水溶解定量至 100 ml。

B 液：秤取 2.5g NaOH，加入 40 ml 5% Sodium hypochlorite，以去離子水定量至 100 ml。

2. 總氮 (Total nitrogen)分析

植株取全株，置入分解管內，培養基則加熱溶化後取 1 ml 至分解管內，隨後加入 1 g 催化劑，再加入 4.5 ml 濃硫酸，並置於高溫分解爐中，410°C 持續加熱 2-3 小時，分解完全後，隨後取出冷卻，加入 15 ml 蒸餾水，震盪均勻，於 micro-Kjeldahl 裝置，加入 20 ml 之 12 N NaOH，通過蒸氣使其氮化，並用 20 ml 含 2% Boric acid 指示劑 (19 μM Bromocresol green 及 25 μM Methyl red)接收氮氣及氨水，直至總體積達 50 ml 為止，再以 1/14 N H₂SO₄ 滴定，當溶液從綠色變為粉紅色瞬間即為滴定數量，以計算 N 之百分比。N (%) = 1/14 N H₂SO₄ 滴定數量 × F 值/2。每處理六重複。

3. 游離胺基酸

取新鮮植株並分地上與地下部，培養基則加熱溶解取 0.2 g，隨後加入 5 ml PO₄ buffer (pH = 7.0)於冰浴環境下研磨，再以 2°C 10000 rpm 離心 10 分鐘，取 0.1 ml 上清液加 0.9 ml 去離子水稀釋 10 倍，再加入 1 ml Ninhydrin reagent (5 g Ninhydrin, 95 g KH₂PO₄, 43 g Na₂HPO₃ 及 3 g fructose 溶於 600 ml 蒸餾水中，再定量至 1L，於 2°C 黑暗中保存)，隨後以沸水煮浴 10 分鐘後，以冰水迅速冷卻來中止反應，再加入 5 ml 呈色劑 (2 g KIO₃ 溶解於 600 ml 蒸餾水中，再以 95% 酒精定量至 1 L)震盪均勻之，再以光電比色計 (Spectronic 20D+，

Thermo Inc.，USA)測量 570 nm 波長下之吸光值。標準曲線以 1 mM Glycine 配製。每處理 3 重複。

4. 可溶性蛋白質 (Soluble protein)

取新鮮植株並分地上與地下部，培養基則加熱溶解取 0.2 g，隨後加入 5 ml PO₄ buffer (pH=7.0)於冰浴環境下研磨，再以 2°C 10000 rpm 離心 10 分鐘，取 0.1 ml 上清液再加 1.9 ml 去離子水至稀釋，隨後加入 5 ml Reagent A (2 g NaCO₃，1 ml K₂C₄H₄O₆ (2% potassium tartarate)，1 ml CuSO₄ (1% CuSO₄·5H₂O)，10 ml 1N NaOH，90 ml H₂O)震盪均勻，靜置 10 分鐘後再加入 0.5 ml Reagent B (Folin Reagent：H₂O=1：1)震盪均勻，靜置 30 分鐘後，以光電比色計 (Spectronic 20D+，Thermo Inc.，USA)於波長 660 nm 測定其吸光值，標準取線以 100 ppm BSA 配製。單位為 mg/g FW 表示。

5. 硝酸還原酶 (Nitrate reductase activity；NRA)

分析依 Jawosi (1971)之方法，取新鮮葉片，以打孔機取直徑 0.5 cm 的葉圓片 5 片，或根部取 0.2 g，並橫切 0.5 cm，隨後放入試管中，加入 5ml 萃取液，萃取液包含 2.5 ml 0.2M KH₂PO₄ buffer (pH 7.5)、0.25 ml 100% n-propanol、1.15 ml 去離子水、0.1 ml 0.05% Chloramphenicol 及 1 ml 0.1M KNO₃，對照組以去離子水取代 KNO₃。置於 25°C 水浴黑暗環境下震盪，反應 30 分鐘，隨後加入 1 ml 1% sulfanilic acid 來終止反應，在加入 1 ml 的 0.02% N-(1-naphthyl ethylene) diamide HCL 呈色劑。組織傷口變褐色時，再利用光電比色計測定在波長 540 nm 之吸收值。標準曲線以 0.1mM NO₂配製。每處理 3 重複。

6. 培養基 pH 值測定:

將培養基加熱溶解均勻攪拌冷卻後，以 pH meter (EZDO-PH5011；台灣)測定。

7. 葉綠素含量分析

參考 Arnon (1949)方法並加以修改。使用打孔器在葉片上，取 3 片直徑 0.5 cm 圓片，隨後置於玻璃試管中，加入 5 ml 80% 丙酮，將葉圓片完全浸泡，放置 5°C 黑暗環境下 2 天後於室溫震盪混和均勻，以 80% 丙酮作為空白組，於分光 645 與 663 nm 波長檢測其吸光值。

$$\text{Chl a} = 12.7 * \text{OD}_{663} - 2.69 * \text{OD}_{645}$$

$$\text{Chl b} = 22.9 * \text{OD}_{645} - 4.68 * \text{OD}_{663}$$

$$\text{Total Chl} = 20.2 * \text{OD}_{645} + 8.02 * \text{OD}_{663}$$

三、統計分析

試驗結果利用 Costat 統計軟體進行 ANOVA 變方分析 (analysis of variance)並利用最小顯著差異 (Least Significant Difference；LSD)比較個處理間差異顯著性。

結 果

添加不同有機氮源處理瓶內芭菲爾鞋蘭植株 90 天後，結果顯示，在植體內含氮化合物部分，植株地上部可溶性蛋白以 YE 處理有較高趨勢，但又與 IN、Cas 與 Ppe 處理無顯著差異，地下部相較於其他處理，以 YE 與 Cas 處理顯著較高。在游離胺基酸中，與其他處理相比地上部以 IN 具顯著較高游離胺基酸含量，Cas 處理顯著最低，地下部則以 YE 有顯著較高的游離胺基酸含量，Cas 顯著最低。硝酸還原酶活性在個處理間，地上部無太大差異，而地下部以 IN 處理顯著較高 (表 1)。

表 1. 不同有機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭植株地上部與地下部的可溶性蛋白、游離胺基酸與硝酸還原酶活性影響。

Table 1. Effects of different organic nitrogen source on free amino acid (FAA), nitrate reductase activity (NRA) and soluble protein (SP) in shoot and root of *in vitro* *Paphiopedilum*.

Treatment ^y	S.P. (mg/g)		FAA (mM/g)		NRA (umol/hr * gFw)	
	shoot	root	shoot	root	shoot	root
IN	45 ab ^z	55 b	36 a	47 b	0.35 ab	0.29 a
Cas	38 ab	79 a	3 d	5 c	0.34 ab	0.22 b
Pep	43 ab	50 b	13 c	54 b	0.32 b	0.22 b
Try	35 b	51 b	19 b	78 b	0.36 ab	0.18 b
YE	48 a	86 a	17 bc	81 a	0.47 a	0.17 b

z: Mean in a column followed by different letters are significantly different at 5% by LSD test.

y: IO: inorganic nitrogen, Cas: Casein hydrolysate, Pep: Peptone, Try: Tryptone, YE: yeast extract.

葉片葉綠素 a 與 a+b 相較其他處理以 IN、Pep 與 YE 處理顯著較高，Cas 處理顯著較低，葉綠素 b 以 Cas 處理顯著較低，IN、Pep、Try 與 YE 無顯著差異。在植株總氮部分各處理間仍以 Cas 處理顯著較低，IN、Pep、Try 與 YE 處理間則無顯著差異 (表 2)。

在植株培養基部分，以不同有機氮培養芭菲爾鞋蘭 90 天後檢測培養基總氮、游離胺基酸、硝態氮與銨態氮含量，結果顯示，在培養基總氮部分以 IN 處理，其植株可吸取較高總氮趨勢，Cas 處理則最低。游離胺基酸則以 YE 處理有較高消耗量趨勢，IN 與 Cas 處理則最低。銨態氮則以 IN 處理使植株有較高吸收量，Cas 處理仍最低。而在硝態氮部分各處理間其消耗量差異不大 (圖 1)。在外表性狀與植株地上地下部鮮重以 Pep 處理有顯著較高的趨勢 (表 2、圖 2)。

表 2. 不同有機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭植株葉片葉綠素與全株總氮含量影響。

Table 2. Chlorophyll and total nitrogen in leaf of *in vitro* *Paphiopedilum* grown in various nitrogen source.

Treatment ^y	Chl a	Chl b	Chl a+b	Whole plant Total N
	µg/cm ²			%
IN	14 a ^z	6 a	20 a	0.22 a
Cas	7 c	3 b	10 c	0.11 b
Pep	14 a	6 a	20 a	0.20 a
Try	11 b	5 a	16 b	0.21 a
YE	15 a	6 a	21 a	0.23 a

^z: Mean in a column followed by different letters are significantly different at 5% by LSD test.

^y: IO: inorganic nitrogen, Cas: Casein hydrolysate, Pep: Peptone, Try: Tryptone, YE: yeast extract.

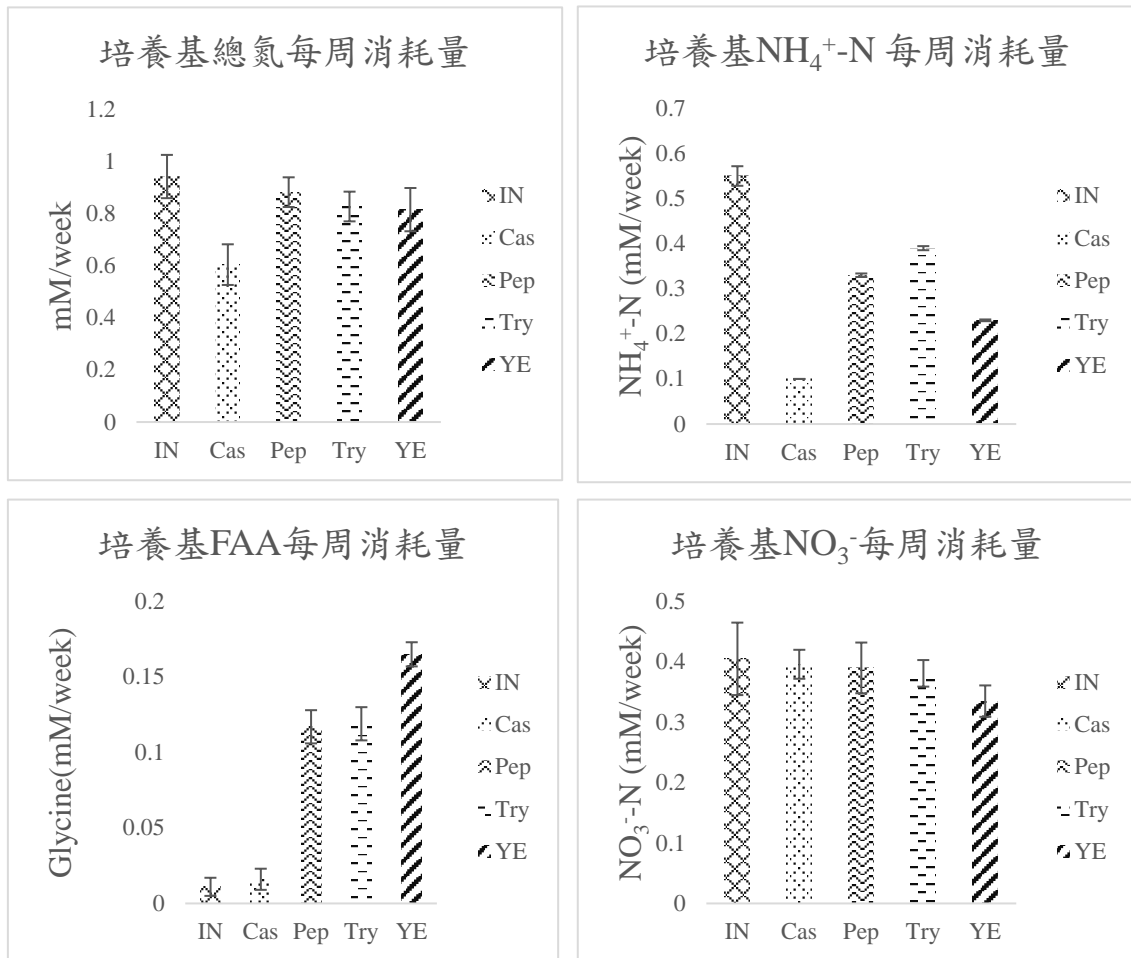


圖 1. 不同有機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭培養基總氮、游離胺基酸、銨態氮與硝態氮消耗量之影響。

Fig. 1. Effects of different organic nitrogen source on the consumption of total nitrogen、free amino acid (FAA)、NH₄⁺ and NO₃⁻ in media by *in vitro* *Paphiopedilum*.

表 3. 不同有機機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭植株外表性狀與鮮重影響

Table 3. Effects of different organic nitrogen source on morphological traits and fresh weight in plant of *in vitro* *Paphiopedilum*.

Treatment ^y	根長(mm)	根徑(mm)	葉幅(mm)	葉寬(mm)	莖高(mm)	根數	葉數	地上部鮮重(g)	地下部鮮重(g)
IN	46 b ^z	0.83 c	56 a	7.1 b	11.2 c	3.0 b	4.0 a	0.25 a	0.14 b
Cas	46 b	1.05 c	50 b	7.6 a	10.5 d	2.2 c	3.1 c	0.25 a	0.11 c
Pep	52 a	1.63 a	54 a	7.9 a	11.9 b	3.0 b	3.8 b	0.26 a	0.22 a
Try	28 c	1.60 a	48 b	7.6 a	12.7 a	3.0 b	3.7 b	0.25 a	0.14 b
YE	6 d	1.17 b	45 c	7.1 b	11.1 cd	3.6 a	3.5 b	0.19 b	0.02 d

^z: Mean in a column followed by different letters are significantly different at 5% by LSD test.

^y: IO: inorganic nitrogen, Cas: Casein hydrolysate, Pep: Peptone, Try: Tryptone, YE: yeast extract.

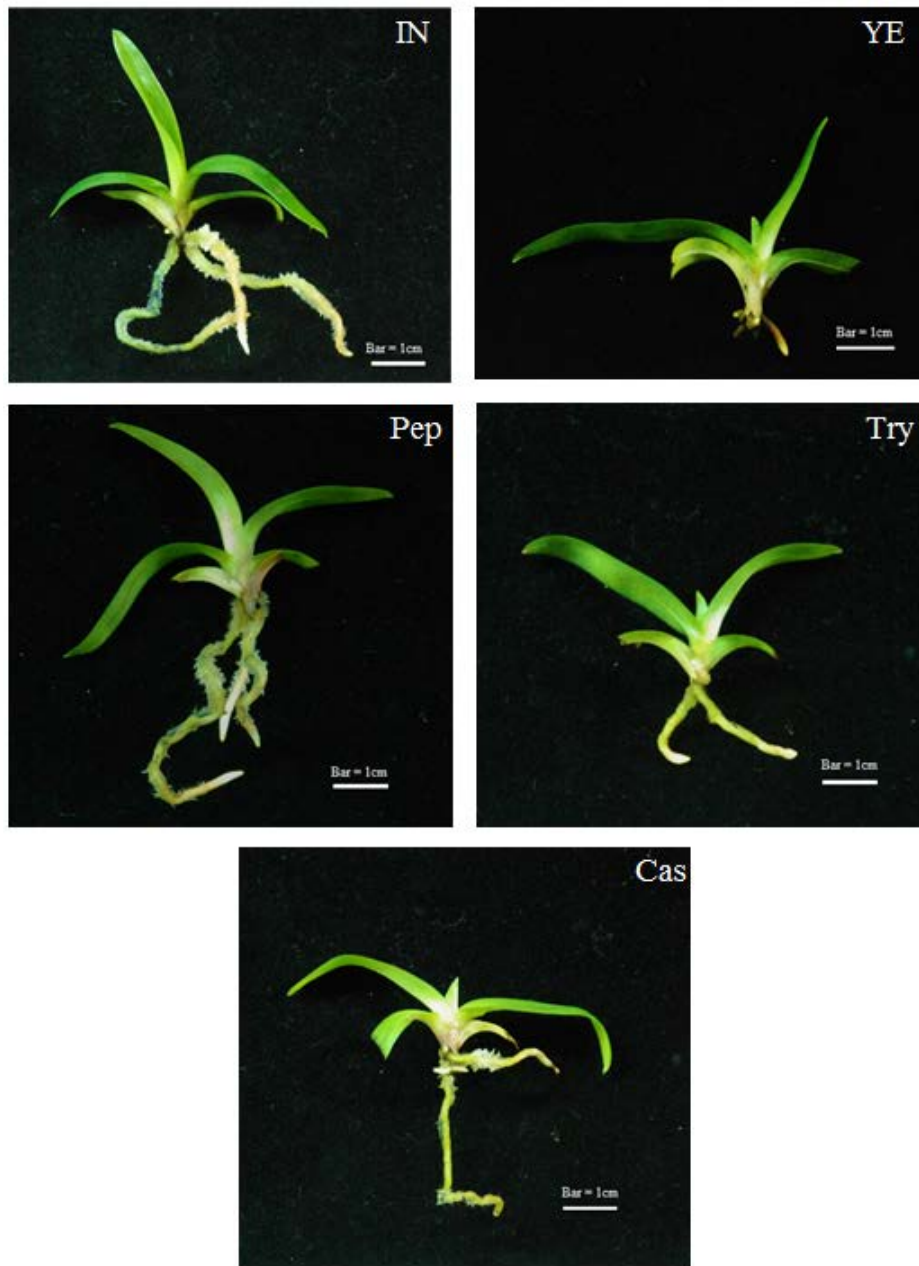


圖 2. 90 天後不同有機氮源對瓶內芭菲爾鞋蘭植株生長情況。

Fig. 2. Effects of different organic nitrogen source for 90 days on growth of *in vitro* *Paphiopedilum*. (Bar = 1cm).

討 論

本試驗以 MS 作為基礎培養基，並將當中氮源去除以 4 種不同有機氮添加物 Casein Hydrolysate、peptone、tryptone 與 Yeast extract 來代替，結果以 Peptone 有較好的外表性狀與鮮重。Nhut 等 (2008)指出在植物組織培養中 Peptone 可做為碳和氮的來源。其具有水溶性的蛋白質水解酶特性，且高含量胺基酸，可能有助於培養物的生長 (Kaur and Bhuthani, 2012)。有文獻指出 peptone 的添加有助於改善 *Vanda tessellata* 生長速率 (Roy and Banerjee, 2002)，或者增加 *Calopogon tuberosus* 實生苗發展與整齊度 (Kauth *et al.*, 2006)。

氮是限制植物生長及各種代謝的重要因子之一。植物為了避免氮的損失及浪費，產生了複雜的吸收、同化及調節氮的能力 (Fernandes and Rossiello, 1995)。Nadarajan 等 (2011)以 6 種不同地生與附生蘭花作為材料，並培養在 5 種不同有機與無機氮源培養基中，結果指出，比起銨態氮或硝酸態氮某些蘭花更偏好胺基酸來作為氮源，而在地生蘭 *Paph. delenatii* 與 *Paph. philippinense* 於各培養基中皆生長良好。

本試驗中使用無機態氮作為氮源結果顯示，地上部游離胺基酸含量顯著較高，地下部則呈現較低的情況 (表 1)，或許與吸收較多銨態氮有關 (圖 1)。一般植物根部細胞若處於較高的銨氮環境下，為了避免銨毒害，會進入有機態氮代謝，藉由麩胺醯胺合成酶迅速將銨態氮同化為胺基酸或醯胺，隨後運往地上部 (Elliott, 1953)。另一方面，除了 Casein 處理外，使用有機氮源可使根部游離胺基酸顯著較高，地上部則呈現相反趨勢 (表 1)，而看至消耗量部分顯示 (圖 1)，培養基中隨著游離胺基酸消耗的增加，其根部游離胺基酸隨之提高，支持戴 (2009)芭菲爾鞋蘭根部於瓶內環境下，可直接吸收游離胺基酸的假說。而早期研究顯示，許多物種植物可直接吸收有機態氮，例如胺基酸 (Miettinen, 1959)。取決於物種的不同，植物吸收胺基酸含量會佔掉植物吸收總氮含量的 10-80% (Kielland, 1994)。

而在硝酸還原酶部分，使用無機態氮作為氮源顯示，其根部活性顯著較有機態氮處理佳。一般硝酸還原酶為高度可調節誘導酵素，其需要受質 (硝酸態氮)與光，來誘導硝酸還原酶的傳訊 RNA 增加，接續重新合成硝酸還原酶蛋白質 (徐和廖，2009)。從圖一可得知無機與有機氮處理，其硝態氮吸收量均差不多，代表根部有足夠受質來提高硝酸還原酶活性。但經有機氮源處理植株其根部硝酸還原酶活性則有較低的趨勢，雖然在硝態氮吸收上與無機氮源差不多，但可發現，隨著根部胺基酸含量的增加，其根部硝酸還原酶活性也隨之下降。在其他物種，某些文獻指出，阿拉伯芥 (Doddema and Otten, 1979)、菜豆 (Breterler and Arnozis, 1985)與小麥 (Rodgers and Barneix, 1989)中，外源性的供給胺基酸與醯胺會減少硝態氮的吸收。也有研究指出大量的胺基酸可能會進行反饋抑制 (Feedback inhibition)，進而抑制硝酸還原酶活性 (Takács and Técsi, 1992)。但是在正常條件下，游離胺基酸的吸收是必要的，以應付蛋白質合成與生長過程中發生的變化 (Barneix and Causin, 1996)。綜合上述，瓶內生長芭菲爾鞋蘭可以直接應用培養基中的有機態氮，可能以直接吸收胺基酸的形式進行。

結 論

不同有機氮型態，結果以 Peptone 處理對於瓶內芭菲爾鞋蘭分生苗有顯著較佳的外表性狀與地上、地下部鮮重，而在葉片葉綠素含量、植株總氮、根部硝酸還原酶活性則與 Tryptone 與 YE 處理無顯著差異，Casine 處理部分皆呈現顯著最低的地上與地下部游離胺基酸、葉片葉綠素與植株總氮。

參 考 文 獻

- 徐善德、廖玉琬譯。Hopkins, W.G.和 P.A. Hüner 原著。2009。植物生理學。偉明圖書有限公司。pp. 179-271。
- 吳新棋、李晔。1991。紅花鶴頂蘭之無菌發芽。中國園藝。37: 183-198。
- 張嘉滿、楊藹華、王聖善。2015。仙履蘭花期調節技術之研究。臺南區農業改良場研究彙報。65: 10-19。
- 戴裕森。2010。不同氮源型態對芭菲爾鞋蘭生長之影響。國立中興大學園藝學系碩士論文。103pp。
- Arditti, J. 1967. Germination of orchid seeds. Bot. Review 33: 1-97.
- Barneix, A. J. and H. F. Causin. 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. J. Plant Physiol. 149: 358-362.
- Breteler, H. and P. Arnozis. 1985. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. Phytochem. 24: 653-658.
- Boussadia, O., K. Steppe, H. Zgallai, S. Ben Ei Hadj, M. Braham, R. Lemeur, and M. C. Van Labeke. 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. Sci. Hort.123: 336-342.
- Cataldo, D. A., M. Haroon, L. E. Schrader, and V. L. Young. 1975. Rapid colorimetric of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6: 71-80.
- Chapin III, F. S., M. P. Vitousek, and K. V. Cleve. 1986. The nature of nutrient limitation in plant communities. AmerNat. 127: 48-58.
- Cribb, P. 1998. The Genus *Paphiopedilum*, 2nd ed. National History Publications, (Borneo) Kota Kinabalu. 222pp.
- Doddema, H. and H. Otten. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. Physiol. Plant. 45: 332-338.
- Elliott, W. H. 1953. Isolation of glutamine synthetase and glutamotransferase from green peas. J. Biol. Chem. 201: 661-672.
- Ferrar, P. J. and C. B. Osmond. 1986. Nitrogen supply as a factor influencing photoinhibition and

- photosynthetic acclimation after transfer of shade-grown *Solanum dulcamara* to bright light. *Planta* 168: 563-570.
- Fernandes, M. S. and R. O. P. Rossiello. 1995. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 111-148.
- Huang, L. C., C. J. Lin, C. I. Kuo, B. L. Huang, and T. Murashige. 2001. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci. Hort.* 91: 111-121.
- Jawosi, E. G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 43: 1274-1279.
- Kaur, S. and K. K. Bhutani. 2012. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort. Sci.* 39: 47-52.
- Kauth, P. J., W. A. Vendrame, and M. E. Kane. 2006. *In vitro* seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 85: 91-102.
- Kielland, K. 1994. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecol.* 75: 2373-2383.
- Miettinen, K. J. 1959. Assimilation of amino acids in higher plants. In Symposium 13 Society of Experimental Biology. Academic Press, New York, USA. pp. 210-230.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nhut, D. T., N. N. Thi, B. L. T. Khiet, and V. Q. Luan. 2008. Peptone stimulates *in vitro* shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Sci. Hort.* 115: 124-128.
- Nadarajan, J., S. Wood, T. R. Marks, P. T. Seaton, and H. W. Pritchard. 2011. Nutritional requirements for *in vitro* seed germination of 12 terrestrial lithophytic and epiphytic orchids. *J. Trop. For. Sci.* 23: 204-212.
- Rodgers, C. O. and A. J. Barneix. 1989. The effect of N-deprivation on nitrate uptake and growth rate of two wheat cultivars selected for different fertility levels. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 387-392.
- Takács, E. and L. Técsi. 1992. Effects of $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Physiol.* 140: 98-305.
- Pierik, R. L. M., P. A. Sprenkels, B. Van Der Harst and Q. G. Van Der Meys. 1988. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *In Vitro. Sci. Hort.* 34: 139-153.
- Roy, J. and N. Banerjee. 2002. Optimization of *in vitro* seed germination, protocorm growth and seedling proliferation of *Vanda tessellate* (Roxb.) Hook. *Ex G. Don. Phytomorphology* 52:

167-178.

Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39: 971-974.

Zeng, S., K. Wu, J. A. Teixeira 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.

Zeng, S., W. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. A. Teixeira da Silva, and J. Duan. 2015. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36: 1-14.

Effects of Different Organic Nitrogen Sources on Growth of *In Vitro Paphiopedilum* Orchids

Hsuan-Te Huang ¹⁾ Shen-Lin Lin ²⁾

Key words: Organic nitrogen, *Paphiopedilum*, *In vitro*

Summary

To understand reaction of nitrogen type in *Paphiopedilum* orchid, plants were grown in media with different organic nitrogen types for 90 days. Plants treated with casein had significantly lower FAA in shoot and root, total nitrogen of plant, chlorophyll content of leaf and total nitrogen uptake in media. The other hand, plants treated with inorganic nitrogen source had significantly higher FAA in shoot and NRA in root. However, if plants treated with peptone had better morphological traits, significantly higher fresh weight in shoot and root than other treatments.

1) Student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Lecturer, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, corresponding author.