

仙履蘭之器官培養

林德承¹⁾ 林瑞松²⁾

關鍵字：仙履蘭、花蕾器官、生長調節劑、器官形態發生

摘要：本試驗主要使用仙履蘭不同花蕾器官及營養器官培養於不同培養基中，探討其誘導率及生長情形。試驗結果顯示花蕾器官之子房基部及子房部分有器官形態的發生；營養器官之葉柄基部亦有器官形態發生情形，根尖部位培養有毛狀根膨大的形態產生。最適合培養的生長調節劑濃度為 1 mg/l NAA 與 4 mg/l Kinetin，經切片觀察芽體於 3 週左右開始萌發，子房基部於培養 4 週後調查有最高的芽體數產生，經照光後，誘導出的芽體會有一部分褐化死亡。

前 言

仙履蘭(slipper orchid)為蘭科(Orchidaceae)杓蘭亞科(Cypripedioideae)的植物總稱，包含四個屬，即為芭菲爾拖鞋蘭屬(*Paphiopedilum*)、鬚拉密拖鞋蘭屬(*Phragmipedium*)、喜普拖鞋蘭屬(*Cypripedium*)及西麗妮拖鞋蘭屬(*Selenipedium*)。由於原生地環境多遭嚴重破壞及人為濫採的行為，使得仙履蘭於 1989 年被列入華盛頓公約附錄一之物種，禁止其野生種之國際貿易，但同意人工培植之拖鞋蘭可經由政府核發之文件出口。

仙履蘭在國內產業界之育種基礎佳，收集種源豐富，已成為新興的蘭花產業，台灣約在 1990 年代開始流行栽培，目前已登記的人工培植場有 30 家，栽培面積 5.9ha，栽培的種苗超過 250 萬株，年出口近十萬株，民國 96 年台灣仙履蘭出口產值約為 3000 萬新台幣(蔡，2007)。近年來仙履蘭在無菌播種技術已有突破，在芭菲爾鞋蘭屬的斑葉單花品系(Maudiae Type)及綠葉單花之複合雜交品系(Complex Type,俗稱肉餅)已有部分優良組合朝向企業化量產，但特定的雜交組合常因供應量不穩定無法評估商機，目前組織培養分生技術瓶頸至今仍無法突破，雖然有部分研究成果顯示仙履蘭可經由癒傷組織分生系統獲得分生苗但其變異率有待評估(chen,2002; chen, 2004)，有關於組織培養分生技術的建立將有助

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教授，通訊作者。

於產業之發展，是目前迫切解決的問題。

目前仙履蘭利用分生組織培養的報告極少(Huang, 1988)，大部分發表的報告皆以無菌播種形成的原球體(protothorms)利用植物生長調節劑如 TDZ 及 2,4-D 或 NAA 來誘導癒傷組織(Lin *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2008)，再進一步分化為擬原球體或再生小植株。少數採用花梗芽作為增殖的材料(Kawase, 1990、1994、1997; Tanaka, 1996)，但皆面臨褐化及生長速度緩慢的問題。目前仙履蘭的種苗生產目前仍以無菌播種苗為主，組織培養因消毒困難、易褐化及增殖速率低等原因，尚未建立具商業價值的分生技術。

本研究以仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 之花蕾器官及 *Paphio.* TSS 97100 瓶苗之營養器官為培植材料來進行初代培養，探討各器官部位及初代培養條件對誘導的影響，建立目前除了外植體短縮莖可誘導出增殖材料以外，另一可誘導出增殖材料路徑之可行性。

材 料 與 方 法

(一) 植物材料

自台中縣新社鄉種苗場取得品種代號為 *Paphio.* 'TSS 97100' 之分生瓶苗及自台中縣大雅鄉穎川蘭園購入品種代號為 *Paphio.* 'In-Charm 2880' (斑葉單花) 之含苞植株為試驗材料。

(二) 試驗方法

初代培養基為基本培養基 3.2 g/l B5 配方(sigma, USA)，添加氯化鈣 0.44 g/l、椰子水 150 ml/l 和蔗糖 20 g/l。除了上述配方外再分別加入添加物並分為 2 類培養基，代號為 C 及 K 培養基；C 代號培養基為加入 2,4-D(1、10 mg/l)配合 TDZ(0.1、1 mg/l)4 種培養基。K 代號培養基則分別加入 NAA(1 mg/l)配合 Kinetin(0、1、2、4、6、8 mg/l)6 種培養基，依 Kinetin 濃度分為 K1~K6。培養基先調整 pH 值至 5.5，在加入洋菜(Difco Bacto-agar) 6 g/l 後，以 121°C (1.1 kg/cm²)滅菌 20 分鐘後分裝於培養皿(90×15 mm)中，每個培養皿裝填約 10 ml 之培養基。以仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 含苞植株之花器官約 4~6 cm 為培植體，將苞片剝除後於含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液超音波震盪 10 分鐘，殺菌後將花苞器官分為花梗、子房基部、子房、花苞基部(附錄 2)，培養於不同培養基中，每個培養皿皆包含上述 4 個部位。於培養溫度 25°C、黑暗環境下培養 4 週，移至光強度 3000 lux，光週期明暗各為 12 小時之光照下繼續培養 4 週，培養 8 週後調查其芽體數、誘導率及褐化率，並於培養過程中進行組織切片觀察。另外，以仙履蘭 *Paphio.* TSS 97100 分生瓶苗之葉片及根為培植體，將葉片分為葉尖、葉中肋及葉柄，各切成 0.5 × 0.5 cm 大小；根分為根尖及根部，各切成 0.5 cm 長的大小，分別培養於不同培養基中，每個培養皿含 6 個培植體，於培養溫度 25°C、黑暗環境下培養 4 週，移至光強度 3000 lux，光週期明暗各為 12 小時之光照下繼續培養 4 週，培養 8 週後調查其芽體數及誘導率。

(三) 分析與調查方法

1. 培植體生育調查：於黑暗誘導四週後調查各器官產生的芽體數，於照光後培養 4 週調查芽體褐化數及存活率。
2. 統計分析：試驗設計採完全隨機設計(completely randomized design)，試驗數據利用 CoStart 6.1 軟體(CoHort software, Monterey, CA, USA)以費雪爾氏 LSD 法(Fisher's Least Significant Difference test)比較 5 % 差異顯著性。

結 果

(一)不同花蕾器官於 C 培養基中對誘導芽體發生之影響

C 培養基配方誘導 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 花蕾器官中，子房基部於 C2 及 C4 培養基中，一個月後觀察皆有 2 個芽體形成，誘導率分別為 28.5% 及 33.3%，照光培養再經一個月後發現芽體皆褐化死亡，而子房部位一樣在 C2 及 C4 培養中有胎座瘤狀突起，分別有 5 和 4 個，誘導率為 23.8 及 22.2%，繼續培養 4 周後觀察無褐化情形產生，其餘花蕾基部及花梗部位皆無反應產生(表 1、表 2、圖 1A、圖 2A)。

表 1. C 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 子房誘導芽體形成及褐化之影響
Table 1. Effect of different C medium on shoot formation、browning and survival of *Paphio.* 'In-Charm 2880' ovary explants.

Treatment	2,4-d TDZ (mg/l)	No. explant	No. shoots	No. browning shoots	Browning (%)	Shoot formation (%)	The survival (%)
C1	1、0.1	18	0	18	100a	0b	0b
C2	1、1	21	5	16	76.19b	23.8a	23.8a
C3	10、0.1	21	0	21	100a	0b	0b
C4	10、1	18	4	14	77.77b	22.22a	22.22a

^zMean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.

number of browning shoots investigate after 4 weeks culture illumination.

表 2. C 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 子房基部誘導芽體形成及褐化之影響
Table 2. Effect of different C medium on shoot formation、browning and survival of *Paphio.* 'In-Charm 2880' the base of ovary explants.

Treatment	2,4-d TDZ (mg/l)	No. explant	No. shoots	No. browning shoots	Browning (%)	Shoot formation (%)	The survival (%)
C1	1、0.1	6	0	6	100a	0a	0a
C2	1、1	7	2	7	100a	28.57a	0a
C3	10、0.1	7	0	7	100a	0a	0a
C4	10、1	6	2	6	100a	33.33a	0a

^zMean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.

number of browning shoots investigate after 4 weeks culture illumination.

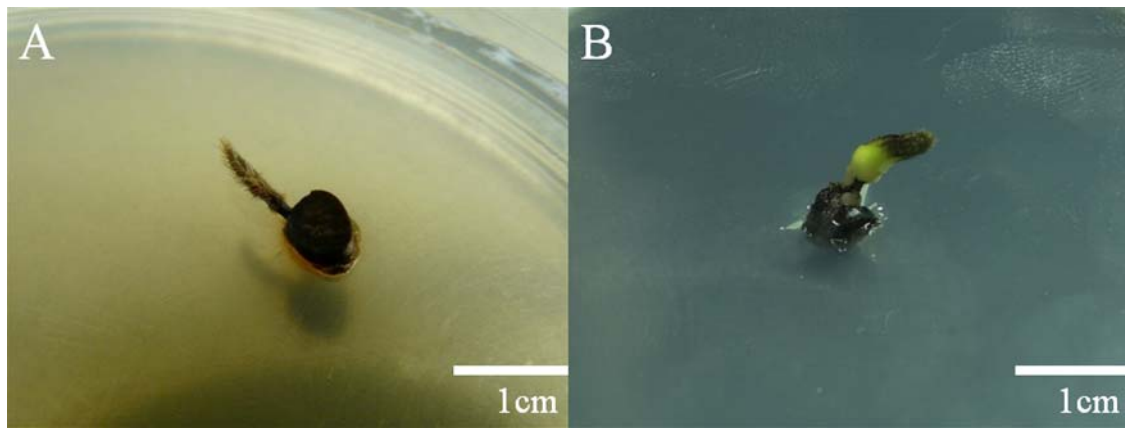


圖 1. 仙履蘭花器官誘導形成之芽體。A 為 C2 培養基誘導 *Paphio.* 'In-Charm 2880'、B 為 K4 培養基誘導 *Paphio.* 'In-Charm 2880'

Fig1. Effect of shoots formation induce from flower organ of *Paphiopedilum* for micropropagation. A. use C2 medium to induce *Paphio.* 'In-Charm 2880'、B. use K4 medium to induce *Paphio.* 'In-Charm 2880'.

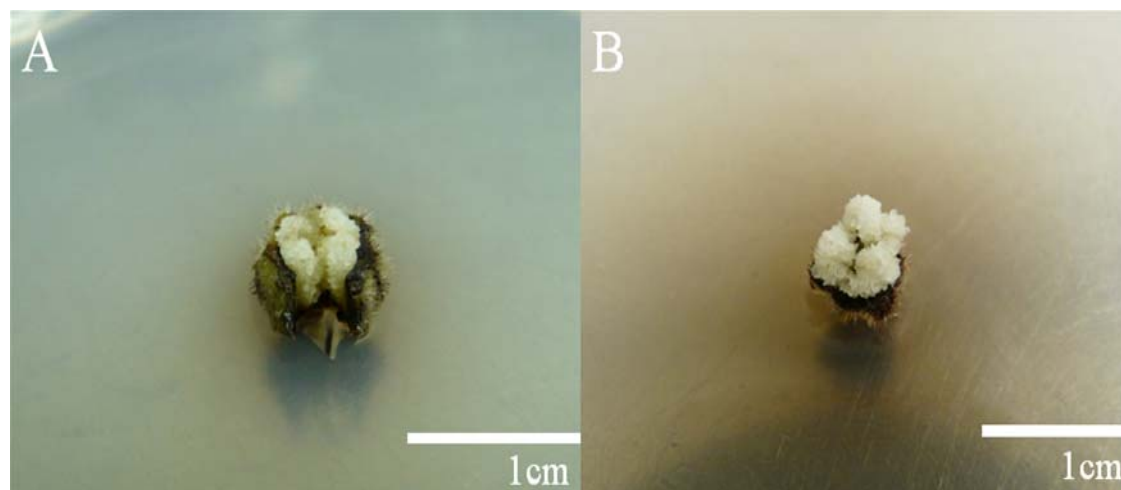


圖 2. 仙履蘭花器官誘導形成之子房胎座瘤狀突起。A 為 C 培養基誘導、B 為 K 培養基誘導

Fig 2. Some tumor like process produced in the placental ovary from floral parts of *Paphiopedilum*. A. induce from C medium; B. induce from K medium.

(二) 不同花蕾器官於 K 培養基中對誘導芽體發生之影響

K 培養基配方誘導 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 花蕾器官中，子房基部於 K 培養基中皆有芽體的產生，在 K3、K4 培養基中，一個月後觀察有明顯的器官發生現象，誘導率分別為 72.4% 及 83.3%，繼續培養再經一個月後亦有芽體褐化，最後 K3 及 K4 的芽體存活率分別為 42.9 及 66.7%，而子房部位一樣於 K 培養基中皆有胎座瘤狀突起，在 K4、K5 培養基中較顯著的器官型態發生情形，誘導率皆為 33%，誘導率繼續培養 4 周後觀察無褐化情形產生，其餘花蕾基部及花梗部位皆無反應產生(表 3、表 4、圖 1B、圖 2B)

(三) 不同營養器官於 K 培養基中對誘導芽體發生之影響

利用仙履蘭分生瓶苗 *Paphio.* 'TSS 97100' 之葉片誘導，培養 2 個月後發現在 S 及 C 培養基中皆無任何芽體及癒傷組織產生，唯有於添加 NAA 及 Kinetin 組合之 K 培養基中誘導有器官型態之發生，葉柄部位於 K2、K3 及 K4 培養基中有芽體產生，誘導率分別為 1.6、5 及 5%，而培養過程中皆無癒傷組織產生(表 5、圖 3)。

利用仙履蘭分生瓶苗 *Paphio.* 'TSS 97100' 之根部於 K 培養基中誘導，在 K2、K3、K4、K5 培養基中培養，根尖部分有膨大的情形，並有毛狀根的情形產生，培養過程中皆無癒傷組織產生(表 6、圖 4)。

表 3. K 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 子房誘導芽體形成及褐化之影響
 Table 3. Effect of different K medium on shoot formation、browning and survival of *Paphio.* 'In-Charm 2880' ovary explants.

treatment	Kinetin (mg/l)	No. explant	No. shoots	No. browning shoots	browning (%)	Shoot formation (%)	The survival (%)
K1	Ck	12	0	12	100a	0b	0b
K2	1	21	4	17	80.95ab	19.04ab	19.04ab
K3	2	21	6	15	71.42ab	28.57ab	28.57ab
K4	4	18	6	12	66.67b	33.33a	33.33a
K5	6	18	6	12	66.67b	33.33a	33.33a
K6	8	15	4	11	73.33ab	26.67ab	26.67ab

^zMean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.

number of browning shoots investigate after 4 weeks culture illumination.

表 4. K 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'In-Charm 2880' 子房基部誘導芽體形成及褐化之影響
 Table 4. Effect of different K medium on shoot formation、browning and survival of *Paphio.* 'In-Charm 2880' the base of ovary explants.

Treatment	Kinetin (mg/l)	No. explant	No. shoots	No. browning shoots	browning (%)	Shoot formation (%)	The survival (%)
K1	CK	4	0	4	100a	0c	0c
K2	1	7	2	7	100a	28.57bc	0c
K3	2	7	5	4	57.14b	71.42ab	42.86ab
K4	4	6	5	2	33.33c	83.33a	66.67a
K5	6	6	3	5	83.33ab	50abc	16.67b
K6	8	5	1	5	100a	20bc	0c

^zMean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.

number of browning shoots investigate after 4 weeks culture illumination.

表 5. K 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'TSS 97100' 瓶苗葉柄誘導芽體形成之影響Table 5. Effect of different K medium on shoot formation of *Paphio.* 'TSS 97100' flask the base of leaf explants.

Treatment	Kinetin (mg/l)	No. explant	No. shoots	Shoot formation(%)
K1	CK	60	0	0b
K2	1	60	1	1.67ab
K3	2	60	3	5a
K4	4	60	3	5a
K5	6	60	0	0b
K6	8	60	0	0b

^z Mean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.

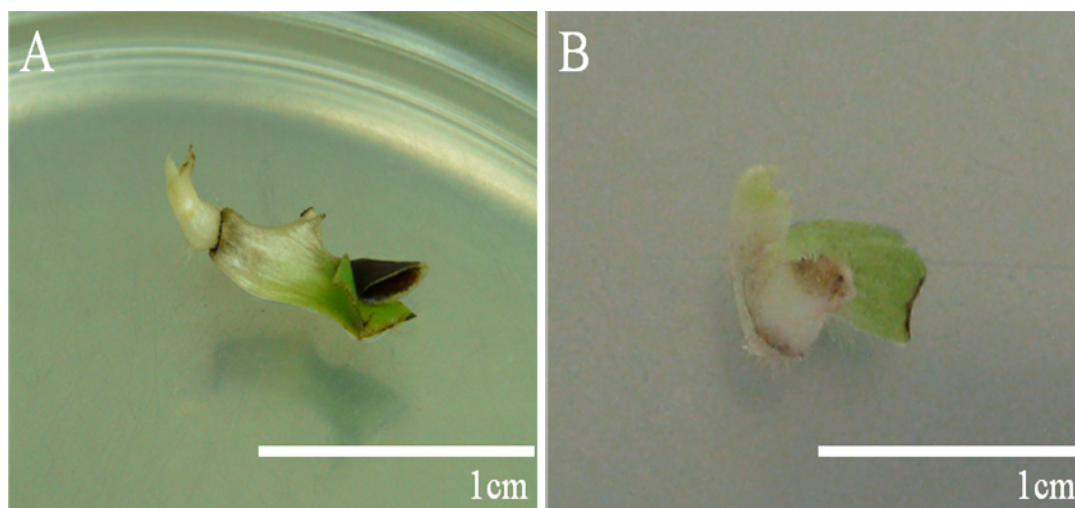
圖 3. 仙履蘭 *Paphio.* 'TSS 97100' 葉片誘導形成之芽體。A 為 K3 培養基誘導、B 為 K4 培養基誘導Fig 3. Effect of shoots formation induce from leaf of *Paphio.* 'TSS 97100' flask. A.inducing from K3 medium; B.inducing from K4 medium.

表 6. K 培養基配方對仙履蘭 *Paphio.* 'TSS 97100' 瓶苗根尖誘導芽體形成之影響

Table 6. Effect of different K medium on shoot formation of *Paphio.* 'TSS 97100' flask root tip explants.

Treatment	NAA Kinetin	No. explant	No. shoots	Root expand(%)
K1	ck	60	0 ^z	0c
K2	1、1	60	0	6.67ab
K3	1、2	60	0	10a
K4	1、4	60	0	3.33bc
K5	1、6	60	0	3.33bc
K6	1、8	60	0	0c

^z Mean separation within columns by LSD test at $P \leq 0.05$.

number of shoots investigate after 4 weeks culture in the dark.



圖 4. 仙履蘭根尖部位以 K4 培養基誘導形成之膨大毛狀根

Fig 4. Effect of root hair formation induce from K4 medium of *Paphio.* 'TSS 97100' flask root tip.

討 論

利用仙履蘭不同部位來誘導培植體於前人皆有成功的例子。本試驗利用花蕾器官部位作為培植體來誘導，可成功於子房基部誘導出芽體，子房胎座部位有瘤狀突起的產生(圖 1、2)。此與 Stewart 和 Button(1975)在研究中發現子房片段培養時，只有胎座會持續生長分化，但未有癒傷組織形成的結果一致。本試驗在使用葉片基部誘導時有芽體的出現，但無癒傷組織形成，且誘導率很低，推測於切取葉片培植體時，基部截取到短縮莖節的部分，與 Chen 等人(2002)將 *Paphiopedilum philippense* hybrids(PH59 和 PH60)的莖節組織培養於含有 2,4-D 組合 TDZ 的 1/2 MS 培養基上，成功誘導芽體的情形相似，但本試驗使用 2,4-D 組合 TDZ 的培養基誘導葉片皆無芽體形成，只於添加 Kinetin 1、2、4 mg/l 有芽體形成(表 5、圖 3)。林(1998)的研究中指出實生瓶苗的根並不具有形成癒傷組織的能力，本試驗利用根部器官作為培植體誘導，結果顯示只有根尖部分有膨大突起，亦並無癒傷組織產生(表 6、圖 4)。

本試驗基礎培養基設計為 B5，而 B5 培養基之含鉍量較 MS 為低，取決標準於拖鞋蘭植體分析，Cos Terrer and frutos Tomas(2001)藉由分析龍爪稗葉片來修正培養基成分，來達到較高的再生率，黃(2009)利用培養於 MS 培養基之玫瑰與仙履蘭進行植體分析，發現仙履蘭植體含氮及銅的濃度分別為玫瑰花的 0.03 及 22.64 倍。銅離子在許多電子傳遞、多酚代謝和蛋白質生成中扮演重要角色，進而影響再生反應表現外，亦能抑止乙烯的生成，Lindon *et al.*(1995)研究指出高濃度硫酸銅濃度可抑制乙烯前驅物形成。乙烯為一種氣態植物荷爾蒙，調節許多細胞發育過程，並在不同的逆境當中反應，並在組培中扮演重要角色如癒傷組織的生長，根和芽的產生及體胚的形成具有正面或負面的影響(Biddington 1992)。於前人研究中發現一般仙履蘭之癒傷組織適合培養於含有植物細胞分裂素 TDZ 組合植物生長素 2,4-D 的 1/2 MS 培養基中生長。Hong 等人(2008)從 *Paphiopedilum* 'Alma Gevaert'之種子成功誘導癒傷組織後，進一步將癒傷組織培養於含有 2.69 uM NAA 及 0.45 uM TDZ 之 1/2 MS 培養基，四個月後有 30%的癒傷組織形成類原球體，且類原球體平均帶有 3 個再生芽體。在文心蘭的形態發生研究方面，植物生長素會抑制培植體體胚發生的效果，而植物細胞分裂素則會促進培植體的體胚發生率(Chen and Chang, 2001)。此外、培養基中添加 GA₃、cycocel、AgNO₃與 CoCl₂ 會抑制文心蘭的形態發生，而培養基中含有 ancymidol、paclobutrazol 及 ACC 則會促進體胚發生(Chen and Chang, 2003; Chen and Chang, 2003)。在蝴蝶蘭的形態發生研究方面，葉片培養於不添加植物生長調節劑的培養基，則沒有體胚或不定芽的形成。而葉片培植體培養於含有 BA 或 TDZ 之培養基，則 30 天後就有體胚產生後由直接體胚形成路徑獲得再生植株(Chen and Chang, 2006; Kuo *et al.*, 2005)。本實驗之生長調節劑(PGR)使用 2,4-D 配合 TDZ 及 NAA 配合不同濃度 Kinetin 來誘導仙履蘭花器官發現 Kinetin 對其有促進芽體產生的效果，以 1 mg/l NAA 配合 4 mg/l Kinetin 效果最佳，誘導率可達 83.3%(表 4)。以 2,4-D 配合 TDZ 對花器官芽體誘導影響不顯著(表 1、表 2)。

參 考 文 獻

- 黃慧宜。2009。芭菲爾鞋蘭之微體繁殖。碩士論文。國立中興大學園藝研究所。68pp。
- 蔡瑜卿。2007。仙履蘭種苗出口現況。仙履蘭產品發展座談會書面資料。p.8-15。
- Chen, J.T. and Chang, W.C. 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Grower Ramsey'. *Plant Growth Regul.* 34: 229-232.
- Chen, J.T. and Chang, W.C. 2003. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhances direct somatic embryogenesis for *Oncidium* leaf cultures. *Biol. Plant.* 46: 455-458
- Chen, J.T. and Chang, W.C. 2003. Effects of GA₃, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 105-108
- Chen, J.T. and Chang, W.C. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biol. Plant.* 50: 169-173
- Chen, T.Y., J.T. Chen, and W.C. Chang. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 38: 595-597.
- Chen, T.Y., J.T. Chen, and W.C. Chang. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell. Tiss. Org. Cul.* 79: 11-15.
- Cos Terrer, J. and D. Frutos Tomas. 2001. Determination of macronutrients to be induced *in vitro* culture media according to leaf concentrations. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 76: 484-488.
- Hong, P.I., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2008. Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid. *Acta Physiol Plant.* 30: 755— 759
- Huang, L.C. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilums in vitro*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 57: 274-278.
- Kawase, K. 1990. Clonal propagation of *Paphiopedilum* by tissue culture. 3. Effect of flower age on PLB formation and vegetative growth of undeveloped buds. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 59(Suppl. 2): 666-667.
- Kawase, K. 1994. Clonal propagation of *Paphiopedilum* by tissue culture. 4. Formation and culture of knot-like-tissues and shoots from ovaries and flower stalks. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63(Suppl. 2): 514-515.
- Kawase, K. 1997. Inflorescence culture in species of *Paphiopedilum*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66(Suppl. 1): 512-513.
- Kuo, H.L., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2005. Efficient plant regeneration through direct

- somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. In *Vitro Cell. Dev. Biol.– Plant.* 41: 453-456.
- Lin, Y. H., C. Chang, and W.C. Chang. 2004. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell. Tiss. Org. Cul.* 62: 21-25.
- Tanaka, M., E. Ohno, T. Takamura, and T.S. Zhou. 1996. Micropropagation of *Paphiopedilum*. 2. Induction of plantlets as the TTS sources from cultured terminal buds of flower stalks. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 65(Suppl. 2): 630-631.

The Organ Culture of *Paphiopedilum*

De-Cheng Lin ¹⁾ Ruey-Song Lin ²⁾

Key word: *Paphiopedilum*, Floral parts organ, Plant growth regulator, Organogenesis

Summary

The purpose of this study is to investigate the differences of the inducing rate and growth by using different floral parts and vegetative organ of *Paphiopedilum* cultivating in dissimilar media. The result showed organogenesis in the floral parts which the base of ovary and ovary parts primary cultured after one month. Vegetation organ also show organogenesis in the base of leaf and root tip expanded after cultured. The most effect plant growth regulator is 1 mg/l NAA, 4 mg/l Kinetinm, Technique of paraffin section showed the shoot start growth after 3 weeks cultured, the base of ovary had the highest number of shoot after 4 weeks cultured, which after illumination, the part of shoot browning and death.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.