

仙履蘭培植體前處理抗氧化劑與細胞分裂素 對芽體再生之影響

王美琪¹⁾ 林瑞松²⁾

關鍵字：花梗芽培植體、抗壞血酸、激動素

摘要：仙履蘭單花品系 *Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 按花朵發育程度分成兩個階段，花苞 S1 和花朵全開 S2，在消毒殺菌前將其花梗芽培植體預先處理抗氧化劑中之抗壞血酸 200 mg/L 溶液 5、10、25 和 40 min，結果只有處理 25 min 的 S1 培植體能有 25% 之芽體再生率。仙履蘭 S1 培植體前處理 100 mg/L 抗壞血酸溶液 25 min 會稍微提高存活率。前處理抗壞血酸 100 mg/L 配合 4 mg/L 激動素 (kinetin, KT) 後，仙履蘭 S1 和 S2 培植體的芽體誘導率分別為 60% 及 20%，再生的植株生長勢強且能發根；而在對照組和無菌水處理組中，只有 S1 的培植體能誘導芽體的形成，S2 則無芽體的形成。仙履蘭 S1 花梗芽培植體的存活率及芽體誘導率以前處理抗壞血酸配合 KT 優於抗壞血酸配合 6-benzyladenine (BA)。總之，前處理抗壞血酸配合 KT 是誘導仙履蘭花梗芽培植體再生芽體之有效方法，而且培植體取自花朵發育在花苞的階段會較成熟的階段能有較低的褐化率及較高的芽體誘導率。

前 言

仙履蘭的花瓣兩側成對，唇瓣為囊袋狀，萼片在上端者為上萼瓣 (dorsal sepal)，下方兩側的萼瓣連成一片，稱為合萼瓣 (synsepalum)，上萼瓣較合萼瓣大 (麥, 1987)。花瓣和花萼下方為子房，其基部有苞片圍繞，內有花芽(許, 2007)。近來研究顯示多花品系仙履蘭花苞 (約 1.5 cm) 之子房基部接近花梗節的芽體誘導率能達 57%-75%，而單花品系之花苞要大於 2.5-3 cm 其芽體誘導率最高能達 60%，但其培植體容易發生褐化 (Liao *et al.*,

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生。
2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

2011)。在植物的組織培養中，抗壞血酸 (ascorbic acid, AA)，俗稱維生素 C，是常被使用的抗氧化物之一，除了能作為植株的營養成分，也能防止酚類物質的氧化作用造成的褐化 (de Pinto *et al.*, 1999)。由於抗壞血酸是易受熱破壞的水溶性維生素，一般是用於沖洗或浸泡培植體，或者過濾殺菌後再添加至培養基中，以期能有效防止培植體褐化 (Pierik, 1987)。

為了預防培植體之褐化，除了將培植體在接種前預措抗氧化物，也會以細胞分裂素處理以降低組織褐化。細胞分裂素 (cytokinin) 具有促進分生組織的細胞分裂、細胞分化、側芽生長、葉片開展、葉綠體發育，延緩葉片的老化，抑制頂芽優勢，刺激果實與種子的發育等功能 (Mok and Mok, 1994)。人工合成的細胞分裂素如 6-benzyladenine (BA)、kinetin (KT)，雖其化學結構與天然的植物荷爾蒙不相同，但亦具有調節植物的生長發育者，又稱為植物生長調節劑 (plant growth regulator)，一般只要極低的劑量就能影響植物的生長發育 (Mok *et al.*, 2000)。研究顯示細胞分裂素 BA、KT 處理可降低桉樹 (Herve *et al.*, 2001) 及霍山石斛 (Luo *et al.*, 2009) 之培植體褐化。此外，細胞分裂素能夠促進開花 (Bernier *et al.*, 1993)，噴施 BA、KT 在蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭能增加花梗數及花朵數 (Wu and Chang, 2009; 2012)，使用 KT 亦能增加文心蘭花梗的分支數及小花數 (林, 2006)。

由於仙履蘭培植體容易褐化，因此本研究以單花品系的仙履蘭按不同花朵發育期之花梗芽為培植體材料，在消毒殺菌前預先浸泡處理抗壞血酸或配合細胞分裂素，探討其對單花品系之花梗芽培植體褐化之抑制與芽體再生之影響。

材料與方法

一、植株材料

仙履蘭 *Maudiae* Type 之紅花為 *Paph. Hsinying Web'Giant'* × *Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 雜交種和綠花 *Paph. Alma Gevaert* (親本為 *Paph. lawrenceanum* × *Paph. Maudiae*) 的盆花植株購自南投縣埔里長益仙履蘭園，依花朵的發育程度分成兩個階段：花苞 S1 階段 (圖 1A) 和花朵全開 S2 階段 (圖 1C)，並分別以其花朵子房基部之花梗芽 (圖 1B, D) 做為組織培養之試驗材料。

二、試驗方法

(一) 抗壞血酸 (AA) 及配合細胞分裂素前處理

試驗前 3 天仙履蘭盆花停止澆水並置放在室溫 25°C 的環境。在子房基部之側花梗芽材料取下殺菌前，預先配製前處理液 (1) 200 mg/L 的 AA (Sigma-Aldrich, USA) 溶液、前處理液，(2) 100 mg/L 的 AA 或是前處理液，(3) 100 mg/L 的 AA 與 4 mg/L 或 5 mg/L 的細胞分裂素 (6-benzyladenine (BA) 或 kinetin (KT)，Sigma, USA) 溶液。剪下已帶花的仙履蘭花梗並去除花朵，保留子房，用棉花沾 70% 的酒精，擦拭植株表面。將花梗芽外部包覆的苞

片沿著中肋剪開 2/3，並以酒精燈的火焰快速除去植株表面的細絨毛，花梗芽下方約留 2 cm 花梗，置入 50 mL 的離心管中，每管倒入 45 mL 的前處理液(1)手搖震盪 5、10、25、40 min，或是前處理液(2)或前處理液(3)手搖震盪 25 min 後，倒掉，再置換 1% NaOCl 之 Clorox (Oakland, CA., USA)稀釋液內含 1-2 滴之 TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)，手搖震盪 10 min 殺菌消毒，然後放在無菌操作台上，再以滅菌水清洗 6-7 次，直到植株無泡沫殘留。消毒後的花梗芽，以銳利的解剖刀除去苞片及子房，只留下花梗芽及約 0.5 cm 的花梗作為培植體 (圖 1B)，接種於無菌的培養基中。

(二)、培養基配方及培養條件

本論文試驗所使用的藥品除了有特別標示製造商的化學品之外，皆購自 Sigma-Aldrich, USA 公司。基礎培養基的配方是以 MS 配方 (Murashige and Skoog, 1962) 加以修正，去除 MS 大量元素中的硝酸銨，添加 2 g/L 的 Bacto-peptone (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)、20 g/L 的 sucrose (Zymeset, Taiwan)和 4 mg/L 的 kinetin。

培養基以 1N KOH 或 1N HCl 調整 pH 值至 5.8，後再添加 5.5 g/L 的 Agar (A7002-500G)，並微波加熱至 Agar 溶解，在分裝至(1) 25 × 148 mm 之玻璃試管中，每試管充填 10 mL 培養基，或(2)每組培養基分裝至 600 mL 的蘭花瓶中，每瓶分裝 100 mL 培養基，瓶口以雙層鋁箔紙 (Diamond, USA)封住，並以 121°C 高壓滅菌 20 min，冷凝 3 天後使用。

培植體初期暗培養於溫度 25±1°C 的環境下一星期後，再移至光強度約 10 μmol m⁻² s⁻¹ 的光照下培養一星期後，再移至光強度 20-22 μmol m⁻² s⁻¹ 的冷白日光燈 (東亞省電型晝光色 FL40D/38)下，光/暗週期設定為 10/14 小時的環境下。

三、統計分析

仙履蘭之增殖芽體培養八個月後，從瓶中取出以量尺測量其長度，每處理三重複，每重複一株。所得數據以 Costat 6.1 (CoHort software, Minneapolis, USA)軟體進行分析，試驗採完全逢機設計 (completely randomized design, CRD)，選用 ANOVA (analysis of variance) 變異數分析及 LSD (least significant difference)最小顯著差異測驗法 (P = 0.05)判別顯著差異。

結 果

一、抗壞血酸前處理對仙履蘭花梗芽培植體的影響

仙履蘭 Maudiae Type 紅花雜交種依照花朵發育分為 S 1(圖 1A)和 S2 階段 (圖 1C)，並取其花朵子房基部之花梗芽 (圖 1B, D)作為培植體，在殺菌接種前分別處理抗壞血酸 200 mg/L 的溶液 5、10、25 和 40 min，培養二個月後，只有處理 25 min 的 S1 花梗芽培植體有芽體的形成，芽體的再生率為 25%；而 S2 階段的花梗芽培植體無法誘導芽體的再生，不是受到微生物的汙染，就是培植體褐化死亡，故芽體的誘導率為 0% (表 1)。

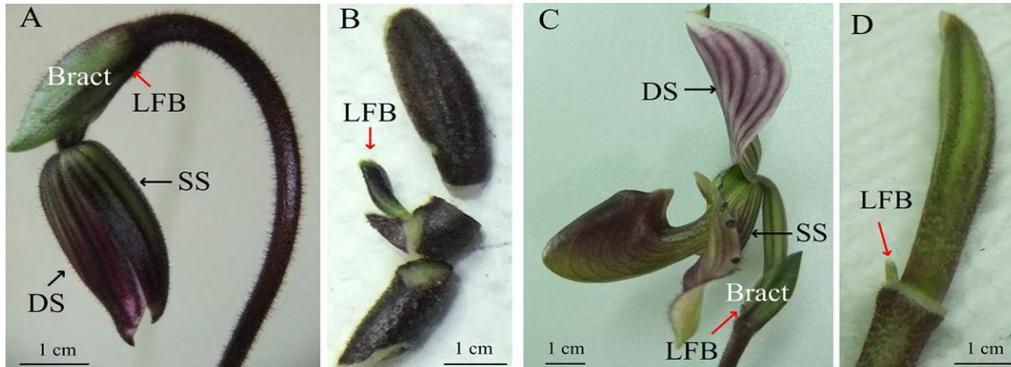


圖 1. 仙履蘭花朵不同的綻放階段與其花梗芽。A:花苞 S1 階段，B:去除苞片的 S1 花梗芽，C:花朵全開 S2 階段，D:去除苞片的 S2 花梗芽。

Fig. 1. *Paph.* flowers at different flowering stages and their respective lateral flower buds (LFBs). A: Floral bud at S1 stage (dorsal sepal (DS) and synsepalum (SS) closed), B: LFB (red arrow) of S1 without bract, C: Flower full opening at S2 stage (DS and SS entirely unfolded), D: LFB (red arrow) of S2 without bract.

表 1. 抗壞血酸前處理時間對仙履蘭花梗芽培植體再生芽體之影響

Table 1. Effect of ascorbic acid pretreatment time on shoot regeneration of *Paph.* lateral flower bud explants.

Treatment time (min)	Flowering stage					
	S1			S2		
	Total explants	No. shoot per responding explant	Shoot regeneration rate (%)	Total explants	No. shoot per responding explant	Shoot regeneration rate (%)
5	4	0	0	4	0	0
10	4	0	0	4	0	0
25	4	1	25	4	0	0
40	4	0	0	4	0	0

Data were recorded after 2 months of incubating the explants in modified MS medium.

* All explants were soaked in 200 mg/L ascorbic acid before surface sterilization.

仙履蘭紅花 *Paph. Hsinying Web 'Giant'* × *Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* (圖 2A) 與綠花 *Paph. Alma Gevaert* 取花苞 S1 階段 (圖 2B) 的花梗芽培植體，前處理 100 mg/L 的抗壞血酸溶液 25 min 後，經培養二個月，只有紅花的 S1 花梗芽培植體有 9 個存活 (圖 2C) 且能誘導芽體的形成，存活率為 33%；而綠花的 S1 花梗芽培植體不是受到微生物的污染，就是培植體褐化死亡 (圖 2D)，存活率為 0%，沒有任何芽體的產生 (表 2)。



圖 2. 仙履蘭花苞 S1 階段與其花梗芽培植體。A: 紅花 *Paph. Hsinying Web 'Giant'* × *Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 花苞，B: 綠花 *Paph. Alma Gevaert* 花苞與突出於苞片外的花梗芽，C: 存活的紅花 *Paph. Hsinying Web 'Giant'* × *Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 花梗芽培植體培養二個月，D: 褐化的綠花 *Paph. Alma Gevaert* 花梗芽培植體培養二個月。

Fig. 2. *Paph.* floral buds at S1 stage and their respective lateral flower bud explants. A: Red floral bud at S1 stage (DS and SS closed), B: Green floral bud at S1 stage with LFB outside the bract, C: Survival LFB explant of Red *Paph. Hsinying Web 'Giant'* × *Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* after 2-month culture, D: Browning LFB explant of Green *Paph. Alma Gevaert* after 2-month culture. (Abbreviated DS: dorsal sepal, SS: synsepalum, LFB: lateral flower bud.)

表 2. 抗壞血酸前處理對仙履蘭紅 *Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'*、綠 *Paph. Alma Gevaert* 之 S1 花梗芽培植體存活率之影響。

Table 2. Effect of ascorbic acid pretreatment on survival rate of red *Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* and green *Paph. Alma Gevaert* S1 lateral flower bud explants.

<i>Paph. species</i>	S1 stage			
	Total explants	Microbial contamination rate (%)	Explant Browning rate (%)	Survival rate (%)
<i>Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'</i>	27	22	44	33
<i>Paph. Alma Gevaert</i>	27	26	74	0

Data were recorded after 2 months of incubating the explants in modified MS medium.

* All explants were soaked in 100 mg/L ascorbic acid for 25 min before surface sterilization.

二、不同前處理對仙履蘭花梗芽培植體的影響

不同前處理對仙履蘭花梗芽培植體的試驗中，以仙履蘭紅花 *Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 的 S1 花苞 (圖 3A) 及 S2 花朵全開 (圖 3B) 之花梗芽作為培植體，去除包圍在子房基部之苞片後，可以看見位在花梗節上著生不同大小的花梗芽 (圖 3C, D, 紅色箭頭所指)。將 S1 及 S2 花梗芽培植體分成三組：(1) 對照組不做前處理，直接殺菌接種；(2) 前處理無菌水 25 min；(3) 前處理抗壞血酸配合 KT 溶液 25 min，經過六個月的培養後，結果顯示 S1 花梗芽培植體的芽體誘導率呈現遞增現象分別為 20%、40% 和 60%；而 S2 花梗芽培植體只有前處理抗壞血酸配合 KT 溶液，能有芽體的形成，其誘導率為 20% (表 3)。對照組 S1 花梗芽培植體只有一個再生芽體的形成，經過繼代培養六個月後，此再生芽體共增殖了 5 個芽體，但植株葉片呈黃綠色，其中 3 個芽體的葉色為淡黃綠色且生長勢不佳 (圖 4A)。前處理無菌水的 S1 花梗芽誘導 2 個芽體的形成，再經繼代培養六個月後，其中 2 個植株葉色偏白色，且發育狀況不良，較為矮小 (圖 4B)。經由抗壞血酸配合 KT 溶液前處理的 S1 花梗芽，可以誘導 3 個芽體的形成，持續培養六個月後，共增殖 6 個芽體，植株葉片呈綠色，發育狀況良好 (圖 4C)。而 S2 花梗芽培植體只有經過前處理抗壞血酸配合 KT 溶液，培植體可以誘導一個芽體的再生，經繼代培養六個月後，共增殖 2 個

芽體 (圖 4D)，此外，將長根的S2再生植株移盆栽培二個月後，植株生長健康且有新葉萌發 (圖 4E)。仙履蘭S1花梗芽培植體的再生植株經過八個月培養後，芽體之平均長度以前處理抗壞血酸配合KT溶液的植株最高，可達39 mm，以無菌水前處理的S1花梗芽培植體的再生植株長度最低為21 mm，而對照組的S1再生植株長度居次為28 mm (圖 5)。

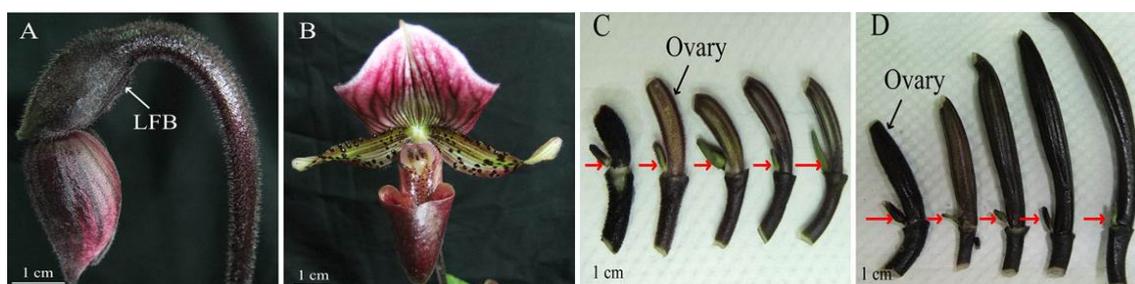


圖 3. 仙履蘭 S1、S2 階段之花朵與其花梗芽。A: S1 階段之花苞，B: 花朵全開之 S2 階段，C: S1 花苞的花梗芽(箭頭處)，D: S2 花朵全開的花梗芽(箭頭處)。

Fig. 3. *Paph.* flowers at S1, S2 stage and their respective lateral flower buds (LFBs). A: Floral bud of S1 stage, B: Blooming flower of S2 stage, C: LFB of S1 at the base of the ovary (red arrow), D: LFB of S2 at the base of the ovary (red arrow).

表 3. 不同前處理 25 min 對仙履蘭 S1、S2 花梗芽培植體芽體誘導率之影響。

Table 3. Effect of different pretreatment for 25 min on shoot induction rate of *Paph.* S1 and S2 lateral flower bud explants.

Treatment type	Flowering stage					
	S1			S2		
	Total explants	No. shoot per responding explant	Shoot induction rate (%)	Total explants	No. shoot per responding explant	Shoot induction rate (%)
Control	5	1	20	5	1	0
DDW	5	2	40	5	1	0
AA+KT	5	3	60	5	1	20

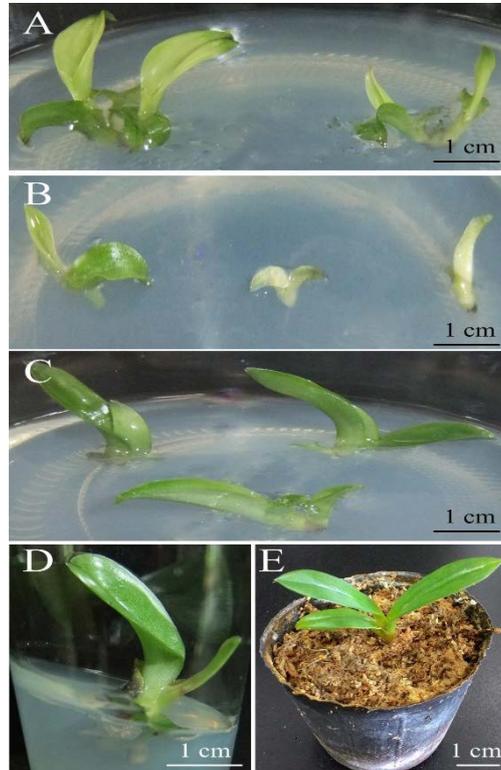


圖 4. 仙履蘭 S1、S2 花梗芽培植體不同前處理後培養的再生芽體。A: 未前處理的 S1 再生芽體，B: 無菌水前處理的 S1 再生芽體，C: 抗壞血酸配合激動素前處理的 S1 再生芽體，D: 抗壞血酸配合激動素前處理的 S2 再生芽體，E: S2 再生植株轉移至盆中栽培 2 個月。

Fig. 4. Plantlet regeneration from S1 and S2 explants of *Paph.* lateral flower buds by different pretreatments. A: Regenerated shoots (RSs) from S1 explants without pretreatment, B: RSs from S1 explants pre-treated with DDW, C: RSs from S1 explants pre-treated with AA+KT, D: RSs from S2 explants pre-treated with AA+KT, E: S2 regenerated plantlet after transferring to a pot and grown for 2 months.

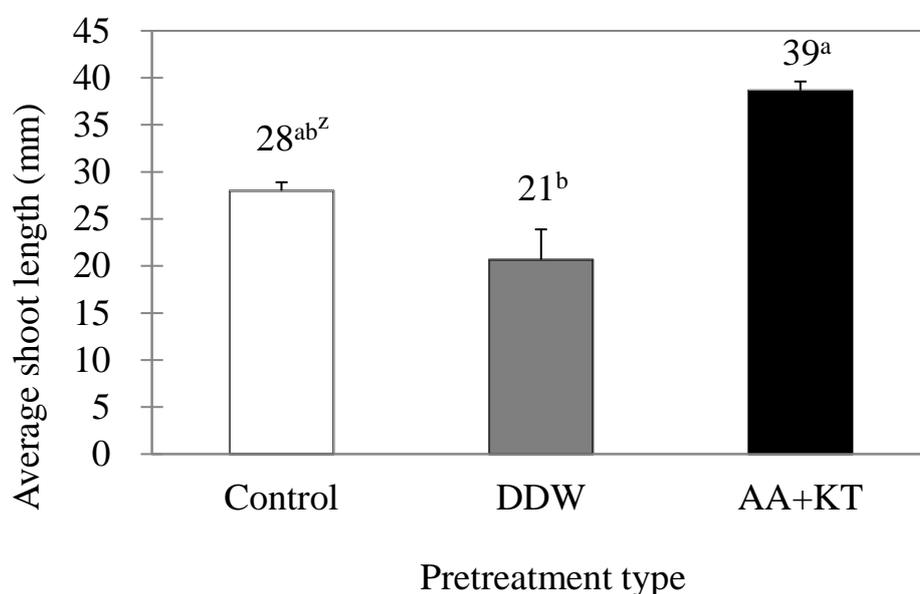


圖 5. 仙履蘭 S1 培植體再生植株培養八個月之平均芽體長度。

Fig. 5. Average shoot length of regenerated plantlets from *Paph.* S1 explants after 8-month culture.

^z Means above each column followed by the same letter are not significantly different according to Fisher's least significant difference (LSD) test.

三、抗壞血酸配合細胞分裂素前處理對仙履蘭S1花梗芽培植體的影響

由於仙履蘭S1花梗芽較S2花梗芽培植體的芽體再生誘導率高，因此選擇S1花梗芽，在殺菌接種前處理抗壞血酸配合不同細胞分裂素溶液後，探討其對仙履蘭花梗芽培植體的影響。前處理抗壞血酸配合5 mg/L BA、抗壞血酸配合5 mg/L KT和抗壞血酸配合4 mg/L KT的培植體在經過六個月的培養後，芽體的誘導率分別為13%、25%和38% (表 4)。調查S1花梗芽再生芽體的生長情形，發現前處理抗壞血酸配合BA溶液的S1花梗芽之再生芽體較另外二組的葉色淺，呈淡綠色 (圖 6A)，從花梗芽內長出的花苞在培養後就會褐化並停止發育 (圖 6B)。前處理抗壞血酸配合4 mg/L KT溶液的S1花梗芽同時有花苞的發育和芽體的再生 (圖 6C)，去除包圍在花苞外部之苞片後，仔細觀察可以看到正在發育中的花苞雛形，再生芽體的葉片呈綠色 (圖 6D)；而前處理抗壞血酸配合5 mg/L KT溶液的S1花梗芽經培養後，能從一個培植體同時誘導2個再生芽體的形成(圖 6E)。事實上，這些S1花梗芽的再生芽體，經過繼代培養幾次後，清楚觀察到前處理抗壞血酸配合BA溶液的芽體增殖數及生長勢都較前處理抗壞血酸配合KT的差，生長遲滯，葉片明顯會黃化，而非正常的綠色。

表 4. 抗壞血酸 100 mg/L 和不同細胞分裂素前處理對仙履蘭 S1 花梗芽培植體芽體再生之影響。

Table 4. Effect of 100 mg/L ascorbic acid and different cytokinins pretreatment on shoot regeneration of *Paph.* S1 lateral flower bud explants.

Ascorbic acid +cytokinin	S1 stage			
	Total explants	No. shoot per responding explant	Browning or microbial contamination rate (%)	Shoot induction rate (%)
BA5	16	2	88	13
KT5	16	4	69	25
KT4	16	3	44	38

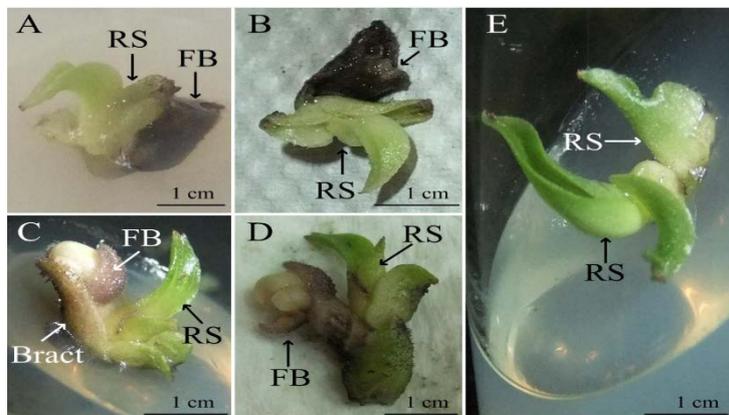


圖 6. 仙履蘭 S1 花梗芽培植體前處理抗壞血酸和不同細胞分裂素後培養六個月的再生芽體。A:抗壞血酸和 5 mg/L BA 前處理的再生芽體，B:放大的 A 圖芽體，C:抗壞血酸和 4 mg/L 激動素前處理的再生芽體，D:放大的 C 圖芽體，E:抗壞血酸和 5 mg/L 激動素前處理的再生芽體。

Fig. 6. RS from S1 explants of *Paph.* lateral flower buds after AA and different cytokinins of incubating 6 months. A: RS from S1 explant pre-treated with AA+ BA5, B: A close-up view of A, C: RS from S1 explants pre-treated with AA+KT4, D: A close-up view of C, E: RSs from S1 explants pre-treated with AA+KT5.

討 論

一、抗壞血酸前處理對仙履蘭花梗芽培植體的影響

在植物組織培養的研究中，微體繁殖的第一步驟就是選擇植物材料，也就是母本(株)培植體的選擇，而試管植物的建立往往會受到組織或器官年齡之影響，如母本的年齡、生理的年齡(易受環境因子影響的特定時期)、生長的年齡(幼年期或成年期)、分化的程度(未分化的分生組織或是已分化的器官)及起始培養的時期，這些因子攸關能否成功的誘導植株之再生 (George *et al.*, 2008)。從試驗結果得知，培植體的年齡以花朵尚未完全綻放者為佳，也就是花朵發育尚在初期階段，其芽體誘導率較高，這個結果與黃 (2012)和楊 (2013)的研究一致，未成熟的花朵依然保有未分化的分生組織，且經過適當培養後其培植體之再生誘導率也越高。

抗壞血酸在組織培養的功能除了被用在防止培植體切割後產生之褐化外，也被作為抗氧化劑之使用；它在煙草的組織培養中可能與細胞的分裂和伸長有關 (de Pinto *et al.*, 1999)，或是能促進新的或老的煙草癒傷組織芽體之形成 (Joy *et al.*, 1988)。此外，抗壞血酸濃度為 0.005%-0.02% (50-200 mg/L)添加於固體培養基，不僅能夠抑制香蕉培植體的褐化且能增加健康苗的數量 (Ko *et al.*, 2009)。一般培植體處理抗壞血酸溶液的最佳時間會隨植物材料而不同，本研究中抗壞血酸溶液浸泡處理的時間以 25 min 的結果最好 (表 1，25%)，花梗芽培植體不會因為處理時間越長 (40 min)，培植體的抗氧化力就越好，可以延緩褐化，反而和短時間 (5、10 min)處理一樣，培植體依然會出現 100%褐化。有研究指出抗壞血酸的有效使用濃度約 0.01% (100 mg/L)就有抑制香蕉培植體褐化的效果 (Ko *et al.*, 2009)，因此在仙履蘭紅花 *Paph. Hsinying Web 'Giant' × Paph. Pulsar 'Hsinying Flame'* 與綠花 *Paph. Alma Gevaert* 的 S1 花梗芽培植體試驗中，證實 100 mg/L 的抗壞血酸前處理能提高花梗芽培植體的存活率及誘導芽體再生。紅花的 S1 花梗芽培植體較綠花的 S1 培植體的存活率高，原因可能是因為本次試驗的綠花花梗芽都突出於大苞片之外 (圖 2B)，有可能在酒精表面殺菌、火烤絨毛或消毒殺菌液處理時較容易受到傷害，所以縱使前處理抗壞血酸也無法挽救已經受傷的培植體，導致其褐化率高亦無法存活。

二、不同前處理對仙履蘭花梗芽培植體的影響

前人研究發現培養基中添加 KT 對仙履蘭的再生增殖有益 (林, 2010)，因此為了提高花梗芽培植體的再生誘導率，本試驗施用 100 mg/L 的抗壞血酸搭配 KT 浸泡培植體，並探討不同前處理對仙履蘭花梗芽培植體的影響。試驗結果顯示前處理抗壞血酸配合 KT 溶液的 S1 花梗芽培植體之芽體誘導率比單獨浸泡抗壞血酸的芽體誘導率較高 (60%)；而 S2 花梗芽培植體前處理抗壞血酸配合 KT 溶液的芽體誘導率 (20%)亦較其它處理組效果佳。此外，對照組或無菌水前處理試驗亦證實花朵成熟度低的 S1 花梗芽培植體比成熟花朵的 S2 培植體較能誘導芽體的產生。在相同的培養條件下，經過抗壞血酸配合 KT 溶液前處理的再生植株之平均芽體長度也較其它組長且發育佳，這或許是因為抗壞血酸加上 KT 的助

益，促使芽體增殖生長，且不易褐化。此外，抗壞血酸配合 KT 溶液處理後，雖然 S2 花梗芽培植體誘導的再生芽體不如 S1 的多，但其植株生長勢較快 (圖 4E)，經長根後移盆栽種的存活率較 S1 再生的植株高，且斑葉特徵容易重現。

三、抗壞血酸與細胞分裂素前處理對仙履蘭 S1 花梗芽培植體的影響

細胞分裂素有促進芽體生長的特性，培養基中添加細胞分裂素如 KT 或 BA 可促使培植體之芽體萌發 (Premkumar *et al.*, 2011)。先前試驗已知抗壞血酸配合 KT 能增加培植體再生芽體的誘導率，而 BA 是目前最常被使用的人工合成細胞分裂素 (Beyl and Trigiano, 2011)，本試驗 S1 花梗芽培植體以抗壞血酸配合 BA 組較配合 KT 處理組的芽體誘導率低，推測原因或許是因為 5 mg/L BA 的施用濃度太高了；前人研究顯示 BA 使用的濃度約為 KT 的 1/2 就能增加蝴蝶蘭的花朵數及花梗數 (Wu and Chang, 2012)。此外，經抗壞血酸配合 BA 溶液處理的 S1 花梗芽之再生芽體生長緩慢，葉片呈淡綠色，此和洋桔梗噴施較高濃度的 BA 後，位在頂梢節位之葉片會變淡色，且植株生長發生停滯現象相似 (陳和蔡, 2012)；再者，從花梗芽內長出的花苞容易產生褐化現象，有研究對抽梗的蝴蝶蘭以 BA 處理後，雖能增加花朵數，但花苞夭折 (abortion) 的比例也提高 (林, 1994)，而從花梗芽培植體長出的花苞出現褐化或許是與 BA 處理有關，但還需要進一步研究。

張 (2000) 分析夜來香在花芽分化與發育期時，細胞分裂素的含量都較營養生長期高，因此外加細胞分裂素就能有效誘導花芽分化及其發育；經過抗壞血酸配合細胞分裂素處理的 S1 花梗芽培植體較單獨抗壞血酸處理組更容易發生花苞發育與再生芽體同時生長的情形，與額外施用細胞分裂素所造成的效果有關，此仍須進一步試驗。花芽誘導在早期階段，花原體可以逆分化成葉原體，若在發育的過程中達到一個不可逆的點，就是花原體的分生組織已進入花朵發育階段，花朵構造各部份的原生細胞 (primordia cell) 已朝向發育為一朵成熟花朵之路徑 (Polowick and Sawhney, 1986)。從花梗芽培植體同時誘導的花苞與再生芽體得知，花梗芽內原本就存在的花原體分生組織已進入花朵發育的不可逆階段，所以可見花苞的雛型，但也存在葉原體的分生組織，Liao 等 (2011) 觀察到花梗芽內藏有迷你的小花苞及圓頂型的分生組織類似結構，而本試驗證實仙履蘭花梗芽內已經存在之花原體分生組織及葉原體分生組織能夠分別誘導花苞與芽體的再生。

參 考 文 獻

- 林育如。1994。光、溫度與生長調節劑對蝴蝶蘭生長與開花之影響。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。189pp。
- 林瑞松。2006。文心蘭栽培生理與產品處理。國立中興大學農業暨自然資源學院農業推廣中心編印。104pp。
- 林德承。2010。仙履蘭之器官培養。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。92pp。

- 麥奮。1987。拖鞋蘭-芭菲爾鞋蘭屬。淑馨出版社。台北 284pp。
- 許伊琍。2007。仙履蘭芭菲爾鞋蘭屬賞花圖鑑。日月文化出版股份有限公司。台北。229pp。
- 張碩蒼。2000。夜來香花芽分化前、中、後cytokinins及gibberellins含量變化之研究。國立中山大學生物科學系碩士論文。50pp。
- 陳彥樺、蔡宛育。2012。葉面噴施細胞分裂素對洋桔梗夏季切花生長形態之影響。臺中區農業改良場研究彙報 117: 25-37。
- 黃琳方。2012。1-MCP前處理、光源與半胱胺酸對仙履蘭花梗芽生長之影響。中興大學園藝學研究所碩士論文。64pp。
- 楊采凌。2013。添加 α -胺基異丁酸、活性碳、硝酸鉀對仙履蘭內花芽發育及光源、硫胺素對出瓶苗生長之影響。中興大學園藝學研究所碩士論文。68pp。
- Bernier, G. A., C. Havelange, A. Houssa, Petitjean, and P. Lejeune 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5(10): 1147-1155.
- Beyl, C. A., and R. N. Trigiano. 2011. *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press. Florida. pp. 323-324.
- De Pinto, M. C., D. Francis, and L. De Gara. 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* 209(1-2): 90-97.
- George, E. F., M. A. Hall, and G. J. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd ed. Vol. 1, Springer.
- Hervé, P., A. Jauneau, M. Pâques, J. N. Marien, A. M. Boudet, and C. Teulieres. 2001. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Sci.* 161(4): 645-653.
- Joy, R. W., K. R. Patel, and T. A. Thorpe. 1988. Ascorbic Acid Enhancement of Organogenesis in Tobacco Callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 13(3): 219-228.
- Ko, W. H., C. C. Su, C. L. Chen, and C. P. Chao. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 96(2): 137-141.
- Liao, Y. J., Y. C. Tsai, Y. W. Sun, R. S. Lin, and F. S. Wu. 2011. In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47(6): 702-709.
- Luo, J. P., C. Wawrosch, and B. Kopp. 2009. Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: the effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. *Sci. Hortic.* 123(2): 258-262.
- Mok, D. W. S., and M. C. Mok. 1994. *Cytokinins—Chemistry, activity, and function*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 155-166.

- Mok, M. C., R.C. Martin, and D. W. S. Mok. 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36(2): 102-107.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro* culture of higher plant. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Polowick, P. L., and V. K. Sawhney. 1986. A scanning electron-microscopic study on the initiation and development of floral organs of *Brassica napus* (cv. Westar). *American Journal of Botany* 73: 254-263.
- Premkumar, G., R. Sankaranarayanan, S. Jeeva, and K. Rajarathinam. 2011. Cytokinin induced shoot regeneration and flowering of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae) – an ethnomedicinal herb. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1(3): 169-172.
- Wu, P. H., and D. C. N. Chang. 2009. The use of N-6-benzyladenine to regulate flowering of *Phalaenopsis* orchids. *HortTechnology* 19(1): 200-203.
- Wu, P. H., and D. C. N. Chang. 2012. Cytokinin treatment and flower quality in *Phalaenopsis* orchid: comparing N-6-benzyladenine, kinetin and 2-isopentenyl adenine. *Afr. J. Biotechnol.* 11(7): 1592-1596.

Effect of Antioxidant and Cytokinin Pretreatment on Shoot Regeneration of *Paphiopedilum* Explants

Mei-Chi Wang ¹⁾ Ruey-Song Lin ²⁾

Key words: Lateral flower bud explant, Ascorbic acid, Kinetin

Summary

Lateral flower bud (LFB) explants collected from the Maudiae Type *Paphiopedilum* (*Paph.*) Hsinying Web 'Giant' × *Paph.* Pulsar 'Hsinying Flame' were divided into two flowering stages, floral bud (S1) and unfolded flower (S2). They were presoaked with an antioxidant solution containing ascorbic acid (AA) of 200 mg/L for 5, 10, 25, and 40 min before explant sterilization. The results showed that only S1 explants treated with antioxidant for 25 min exhibited shoot regeneration at a rate of 25%. The survival rate of S1 explants from the red *Paph.* Hsinying Web 'Giant' × *Paph.* Pulsar 'Hsinying Flame' was slightly enhanced when they were treated with AA of 100 mg/L for 25 min. Pretreatment of S1 and S2 explants with 100 mg/L AA + 4 mg/L kinetin (AA+KT) displayed 60% and 20% shoot induction rate, respectively; the regenerated plantlets were subsequently vitalized with vigorous growing and rooting. However, only S1 explants but not S2 explants induced shoot formation in the control and double distilled water pretreatments. The explant survival and shoot induction rates of S1 LFBs presoaked with AA+KT were found to be superior to those in the AA + 6-benzyladenine treatment. Conclusively, pretreatment with AA+KT seemed to be an effective protocol for the shoot regeneration of *Paph.* LFB explants. Moreover, LFB explants excised from floral buds grew better than those from mature flowers in terms of lower explant browning rate and higher shoot induction rate.

1) Student in Ph. D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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

