

芭菲爾鞋蘭組織培養文獻回顧與進展

張 珈 錡¹⁾ 張 正²⁾

關鍵字: 芭菲爾鞋蘭、癒合組織、擬原球體、芽體增殖、根系誘導

摘要: 芭菲爾鞋蘭為我國重要的經濟花卉作物，然而其種苗繁殖有極高的比例仰賴無菌播種法或分株法，使得商業生產模式發展不易。本篇回顧了芭菲爾鞋蘭組織培養技術相關的研究進展，並從組織培養再生途徑、培養條件及物種差異性等不同面向進行整理及探討。事實上，近來的研究對改善芭菲爾鞋蘭組織培養效率有一些突破性的嘗試，包括: 培植體取樣、褐化抑制處理及增殖培養方式等，期望未來能有更多的研究資源投入發展芭菲爾鞋蘭組織培養技術，以加速建立有效率且穩定的種苗量化方法。

前 言

芭菲爾鞋蘭 (*Paphiopedilum*) 為仙履蘭 (slipper orchids) 的其中一屬，仙履蘭為蘭科 (Orchidaceae) 拖鞋蘭亞科 (Cypripediolideae) 下的一群植物，該群之植物特徵為有 2 個可孕雄蕊和 1 個假雄蕊、2 枚側萼片合生形成 1 枚合萼片，且花朵的唇瓣特化成囊袋狀。因其特殊的花型約自 1980 年代左右受到國內賞蘭玩家的重視，開始大量自國外引種栽培，並逐漸發展成為我國重要的經濟花卉作物，以盆花或切花型式流通於市場，而國內無論在雜交育種或商業栽培生產上多以芭菲爾鞋蘭屬之物種為主。該屬約有 80 餘種主要分布在熱帶亞洲，範圍包含東南亞、喜馬拉雅山低地到中國大陸西南部、馬來西亞、新幾內亞及索羅門群島等地，以地生型為主，少數著生型，分布於海拔 0-3000 公尺，主要生長在高山繁茂的樹林下，富有腐植質的森林地表和岩石裂縫中 (Cribb, 1998; Nash, 1985)。

關於芭菲爾鞋蘭之分類學研究，最早是由德國植物學家 E. H. Pfitzer 於 1886 年將原產於熱帶亞洲且具有二列基生葉的物種自喜普鞋蘭屬分離另歸類為芭菲爾鞋蘭屬。之後 Pfitzer (1894)、Hallier (1896) 分別將芭菲爾鞋蘭屬物種再細分成數個亞屬，惟此時分類的物

-
- 1) 國立中興大學園藝系博士班研究生、行政院農業委員會種苗改良繁殖場助理研究員。
 - 2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

種尚包含 Rolfe(1896)後才歸類為鬍拉密鞋蘭屬之南美洲硬葉種。之後歷經 Pfitzer(1903)、Brieger (1973)、Karasawa and Saito (1982)、Atwood (1984)和 Cribb (1997)對芭菲爾鞋蘭屬物種之重新定義及分類 (Cribb, 1998)。近來研究根據形態學、細胞學和分子系統發育學將芭菲爾鞋蘭屬分為三亞屬，包括:硬葉尖瓣亞屬 (*Parvisepalum*)、短瓣亞屬 (*Barchypetalum*)、芭菲爾亞屬 (*Paphiopedilum*)，其中芭菲爾亞屬又可分為 5 個節 (Section)，包括:綠葉多花 (*Coryopedilum*)、紅瓣多花 (*Pardalopetalum*)、續花 (*Cochlopetalum*)、斑葉單花(*Barbata*)、綠葉單花 (*Paphiopedilum*) (許，2007；Cribb, 1998；Chochai *et al.*, 2012)。本篇目的主要在回顧及探討國內、外有關芭菲爾鞋蘭屬物種組織培養技術之研究進展。

芭菲爾鞋蘭之組織培養研究始於 1973 年 Bubeck 嘗試以新生側芽之頂端分生組織進行培養，隨後 Morel (1974)、Stewart and Button (1975)亦陸續發表以綠葉單花物種 (*P. villosum*、*P. fairieanum*、*P. insigne*)及一些雜交種之莖基部作為培植體進行組織培養，然而其共同的結果顯示，芭菲爾鞋蘭培植體消毒不易且培養成功率低 (Yam and Arditti, 2017)。Huang (1988)也指出除了培植體汙染情形嚴重外，芭菲爾鞋蘭尚有培養材料取得困難以及在體外培養條件下培植體發育不良、生長緩慢之問題，其組織培養技術較之其他蘭花顯得難以突破，目前商業栽培使用的芭菲爾鞋蘭種苗主要仍仰賴無菌播種法 (Hong *et al.*, 2008)或分株法，然傳統分株法繁殖營養系植株之速率慢，而實生苗植株在株型、花色、花型表現上的不一致和開花整齊度不均，使得芭菲爾鞋蘭朝向商業量化生產發展面臨困境 (林，2013)。

芭菲爾鞋蘭組織培養的進展

關於芭菲爾鞋蘭組織培養的研究過去多集中在種子無菌播種技術的建立，以及利用無菌播種之實生苗進行後續芽體增殖或癒合組織、擬原球體再生之研究 (Zeng *et al.*, 2015)，此與芭菲爾鞋蘭試管外培植體消毒不易有極大的關係。而近來嘗試利用試管外植體進行組織培養之研究增加，主要選用之培植體以側芽 (Do *et al.*, 2019；Huang, 1988；Luan *et al.*, 2019；Nguyen *et al.*, 2018)及花芽 (林和林 2010；黃，2012；王和林，2017；Liao *et al.*, 2011)為主，相關研究除了探討提升繁殖效率之培養條件外，部分文章亦著重在改善培植體消毒及褐化抑制處理。本篇將依據文獻中使用之繁殖再生途徑、培植體類型、主要影響因子以及選用之芭菲爾鞋蘭物種進行歸納整理。

一、癒合組織 (callus)和擬原球體 (protocorm-like body, PLB)再生途徑

芭菲爾鞋蘭誘導癒傷組織或擬原球體再生植株之文獻，依其使用之培植體不同大致可分為兩類:

(一) 種子無菌播種形成之原球體、擬原球體

蘭花發芽過程中形成之原球體具有快速細胞分裂之能力，自然環境下原球體形成頂端

分生組織後迅速發育成芽體，然而在適當的培養下亦可自表面形成癒合組織或擬原球體，又或是形成癒傷組織後經器官發生誘導產生擬原球體 (Yeung, 2017)。

在此類型之研究中，所使用之物種包含芭菲爾亞屬斑葉單花節之原生種及雜交種，以及硬葉尖瓣亞屬 (*P. delenatii*)、短瓣亞屬 (*P. niveum*)之原生種。Lin 等 (2000)將 *P. callosum* 'Oakhi'×*Paph. lawrenceanum* 'Tradition'種子播種形成之原球體，培養於 1/2MS 添加 1 mg L^{-1} 2,4-D 和 0.1 mg L^{-1} TDZ 之培養基中，可成功誘導 55%的培植體形成癒合組織，癒合組織再於含有 NAA 和 TDZ 之芽體分化培養基培養，結果平均每 0.1g 癒合組織可誘導 3-7 個芽體形成，此研究成功自原球體誘導胚性癒合組織，且可維持 6 個月以上。Hong 等 (2008) 試驗 *P. Alma Gavaert* 種子培養在 1/2MS 添加 $22.6\text{ }\mu\text{M}$ 2,4-D 和 $4.54\text{ }\mu\text{M}$ TDZ 之培養基中可形成癒合組織，並以 2 個月繼代 1 次的頻度維持未分化狀態 2 年以上，之後將癒合組織移至含有 $2.69\text{ }\mu\text{M}$ NAA 和 $0.45\text{ }\mu\text{M}$ TDZ 之 1/2MS 培養基中，結果有 30% 形成擬原球體，每培植體形成 2.8 個擬原球體或芽。另外，*P. niveum*、*P. delenatii* 和 *P. callosum* 種子衍生之擬原球體經培養於含有 2,4-D 和 TDZ 組合之培養基方能獲得癒合組織，單獨使用任一種植物生長調節劑培植體皆褐化 (Luan *et al.*, 2012; Chaireok *et al.*, 2015)。

上述結果指出以種子無菌播種衍生之擬原球體進行癒合組織誘導，在芭菲爾亞屬、硬葉尖瓣亞屬、短瓣亞屬之原生物種都獲得成功，且僅在同時添加 2,4-D 和 TDZ 之培養基方能獲得癒合組織(相關研究未嘗試其他生長素及細胞分裂素種類)，而芭菲爾亞屬斑葉單花節雜交種以種子無菌播種形成之原球體，同樣表現出培養於 2,4-D 結合 TDZ 之培養基有助於癒合組織誘導，顯示不同亞屬之物種間，或原生種和雜交種間之培養結果無明顯差異。此方法透過大量增殖癒合組織、擬原球體，可達到快速量化種苗之目的，有助於提高發芽困難品種之種苗繁殖速率，惟缺點在於材料來源仍為實生苗，無法針對具有良好園藝性狀的材料個體進行繁殖，難以應用於商業生產上。

(二) 植體之組織、器官

除了以種子播種形成之原球體進行癒合組織或擬原球體誘導，研究也嘗試使用莖頂、莖節、根尖或葉片等作為培植體。Lin *et al.* (2000)嘗試以 *P. henryanum* '#1' × *P. philippinense* '#10' 實生苗之莖、根尖和嫩葉進行癒合組織誘導結果未能成功。同樣的 Long *et al.* (2010) 針對 4 個仙履蘭品種(*P. villosum* var. *densissimum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum*) 同時使用種子形成之原球體和實生苗葉片嘗試誘導癒合組織，結果僅由原球體形成少量癒合組織，葉片培植體全部褐化。Ng and Saleh (2011)取 *P. rothschildianum* 實生苗長約 0.5cm 之莖節培養於 1/2MS 添加 $4\text{ }\mu\text{M}$ kinetin、 2 g L^{-1} peptone、 170 mg L^{-1} NaH_2PO_4 和 30 g L^{-1} sucrose 之培養基，經過 8 週的培養觀察到癒合組織形成，至培養第 12 週約有 75%之莖節培植體形成癒合組織。之後經相同培養基培養癒合組織發育成擬原球體並持續增生二次、三次擬原球體，最後培養於添加 20% 椰子汁之培養基可誘導 67.9%之擬原球體再生芽體。另外，Borah *et al.* (2015)則嘗試自溫室生長之 *P. spicerianum* 植株取莖頂和葉片經培植體消毒處理後進行癒合組織誘導，其雖成功於培養 34 天、48 天後，分別自莖尖、葉片培植體

觀察到癒合組織形成，但指出癒合組織的形成和發育非常緩慢且生長不佳。上述文獻顯示芭菲爾鞋蘭利用植體器官進行癒合組織或擬原球體誘導，常表現誘導成功率不高、癒合組織及擬原球體繼代培養不易（生長緩慢、易褐化），以及植株再生率低之問題。目前僅在芭菲爾亞屬綠葉多花節 (*P. rothschildianum*)、綠葉單花節 (*P. spicerianum*)物種取得成功，且可誘導之培植體部位以含有芽分生組織之莖節、莖頂為主。

二、芽體誘導與增殖培養

前面提到多數研究係利用種子播種後之無菌植株、莖段、葉片等進行芽體增殖研究，此方式因不需經過培植體無菌化步驟較容易取得試驗材料。僅有少數的研究成功自試管外之植體材料建立無菌瓶苗。以下係針對芭菲爾鞋蘭組織培養文獻中主要探討的影響因子進行整理。

(一) 培植體消毒、褐化抑制處理

目前已知之文獻中，利用芭菲爾鞋蘭試管外植體進行組織培養主要選用之培植體以側芽、花芽為主。Huang (1988)取芭菲爾鞋蘭開花株之側芽作為培植體，側芽自植株分離後先以 pHisoHex 溶液 (含抗菌成分-六氯苯，現為禁用之持久性有機汙染物)清洗，再經蒸餾水沖洗後移除葉片，取頂芽以 0.5%次氯酸溶液消毒 15 分鐘，再以 0.005%次氯酸溶液替代一般常用滅菌水進行清洗後，培養於調整過之 MS 基礎培養基添加 100 mg L^{-1} myo-inositol、 0.1 mg L^{-1} NAA、 3 mg L^{-1} 2-ip、 30 mg L^{-1} adenine、 150 ml L^{-1} 椰子汁，並於培養基中加入抗生素 (350 mg L^{-1} carbenicillin)、殺菌劑 (100 mg L^{-1} benomyl) 以抑制細菌、真菌等微生物繁殖，此研究指出芭菲爾鞋蘭側芽培植體汙染率高且誘導成功率低。其他曾用於芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒之處理，除了次氯酸溶液和 70%酒精外，尚包含： 0.1 mg L^{-1} streptomycin 浸泡 30 分鐘 (Luan *et al.*, 2019)、0.1%氯化汞溶液消毒 10 分鐘 (Nguyen *et al.*, 2018)、浸泡 2%中性洗滌劑 30 分鐘 (Do *et al.*, 2019)。此外，研究發現取樣季節顯著的影響芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒成功率，2、5 月取得之側芽較 8、11 月表現出較高之存活率、低汙染率，甚至對後續繼代之芽體增殖同樣有促進之效果 (Do *et al.*, 2019)。而相較於側芽培植體表現消毒不易，花芽培植體在消毒步驟上較為簡單，多數研究顯示以 1.0%次氯酸鈉溶液消毒 10-15 分鐘可獲得無汙染之培植體，惟花芽培植體易褐化，成功誘導芽體之比例不高 (林和林, 2010; Liao *et al.*, 2011)。

對於芭菲爾鞋蘭培植體褐化抑制處理，Huang (1988)曾嘗試將莖頂培植體以 100 mg L^{-1} 抗壞血酸及 150 mg L^{-1} 檸檬酸浸泡以抑制培植體褐化發生。而近年來之研究顯示芭菲爾鞋蘭植株先以 $900 \mu\text{g L}^{-1}$ 1-MCP 前處理 24 小時再取花芽進行消毒處理，或於初代培養基中添加 25 mg L^{-1} 半胱胺酸 (黃, 2012)，以及取花芽培植體預先於 100 mg L^{-1} 抗壞血酸加上 4 mg L^{-1} Kinetin 溶液中手搖震盪 25 分鐘後進行消毒及初代培養 (王, 2016)，皆有助於提高花芽培植體之芽體誘導率。王 (2016)更進一步證實培養基中添加半胱胺酸 ($50\sim 100 \text{ mg L}^{-1}$)能有效降低芭菲爾鞋蘭培植體在培養初期之多酚氧化酶、苯丙胺酸脫氫酶之活性，以

及酚類化合物-香豆酸之含量，改善培植體因發生酵素型褐化之影響。

(二) 基本鹽類培養基

關於芽體誘導與增殖培養基中基本鹽類培養基之濃度，Nguyen 等 (2018) 以 *P. vietnamense* 成熟植株側芽消毒建立之母瓶為材料，試驗 MS、1/2MS、RE、1/2RE 四種鹽類濃度對其芽體增殖之影響，結果以培養於 1/2MS 芽體再生率達 66.67% 為最佳。而 *P. Hsinying Rubyweb* 實生苗芽體經縱切培養於 MS、1/2MS、VW、P2-AC 培養基，結果培養於 1/2MS 每培植體產生 28.8 芽顯著高於其他處理 (Udomdee *et al.*, 2012)。其他同樣曾被發表使用 1/2MS 作為基本鹽類培養基進行芽體誘導及增殖之品種尚有：*P. philippinense* (hybrid PH59 and hybrid PH60)、*P. Alma Gavaert*、*P. rothschildianum*、*P. callosum* (Chen *et al.*, 2002；Hong *et al.*, 2008；Ng *et al.*, 2010；Wattanawikkit *et al.*, 2011)。上述研究中包含了硬葉尖瓣亞屬原生種 (*P. vietnamense*)、芭菲爾亞屬之原生種 (*P. rothschildianum*、*P. callosum*) 及雜交種。另外，亦有使用其他基本鹽類培養基如：Hyponex (*P. 'Delrosi'*)、MS- $\frac{1}{4}$ N (*P. Armeni White*、*P. Deperle*)、KC (*P. villosum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum*) (Long *et al.*, 2010；Liao *et al.*, 2011；Thongpukdee *et al.*, 2013)。整體來說，芭菲爾鞋蘭對基本鹽類濃度的需求似乎較低。

而近來王 (2016) 之研究發現鹽類中氮源之比例及型態對芭菲爾鞋蘭斑葉單花品種 (*P. Hsinying Web 'Giant'* × *P. Pulsar 'Hsinying Flame'*) 芽體增殖會產生顯著之影響，其比較全量 MS 及 MS 減銨態氮 (NH_4NO_3) 處理 (僅添加 0.83、0.55、0.41、0 g L⁻¹ 之 NH_4NO_3)，結果於 MS 無添加硝酸銨之培養基有最佳之芽體增殖率 (100%)、芽體形成數 (2.9 芽)，顯示銨態氮含量與培植體褐化比例呈正相關，且如將氮源改為硫酸銨、氯化銨等會造成植株葉綠素含量降低，並對芽體增殖與根部生長產生抑制效果；反之以硝酸態氮 (尤其是硝酸鉀) 為主要氮源，對提高芽體增殖、降低培植體褐化有最佳之效果。此結果暗示芭菲爾鞋蘭除了可能偏好低鹽類濃度培養基外，亦可能是對銨態氮的濃度及銨鹽在植體內的累積較敏感，進而影響芽體誘導與增殖結果。

(三) 植物生長調節劑

在植物生長調節劑 (PGR) 使用方面，相關研究主要試驗單獨處理細胞分裂素 (TDZ、BA、Kinetin) 或搭配生長素 (2,4-D、NAA) 對芭菲爾鞋蘭芽體誘導與增殖之影響。*P. Alma Gavaert* 由癒合組織再生之芽體，以 IAA、NAA、Kinetin、Zeatin 各三種濃度進行繼代培養，結果於 4.65 μM (1 mg L⁻¹) Kinetin 之芽體增殖率達 3 倍為最佳 (Hong *et al.*, 2008)。*P. callosum* 實生苗經培養於添加 10 μM (2.25 mg L⁻¹) BA 或 0.5 μM (0.11 mg L⁻¹) TDZ 之培養基 3 個月後，平均每培植體可形成 2.3、1.6 芽，較無 PGR 或 2,4-D 和 TDZ 之組合僅形成 1.0-1.4 芽為佳 (Wattanawikkit *et al.*, 2011)；*P. 'Delrosi'* 實生苗芽體培養於 0.45 μM (0.1 mg L⁻¹) TDZ 或 0.45 μM TDZ 加 4.52 μM (1 mg L⁻¹) 2,4-D，或 8.88 μM (2 mg L⁻¹) BA 加 13.56 μM (3 mg L⁻¹) 2,4-D 15 週後，芽體形成率達 80.0-90.0%，平均形成芽數為 1.1-1.5 芽，而無 PGR 之對照組芽體形成率僅 30.0%、每培植體形成 0.3 芽 (Thongpukdee *et al.*, 2013)。*P.*

vietnamense 芽體於添加 2.0 mg L⁻¹ BA 和 1.0 mg L⁻¹ NAA 之培養基培養 5 週，有最佳之芽體形成率達 85%、每培植體形成 2.83 芽，然而當 BA 濃度超過 2.0 mg L⁻¹ 時，芽體形成率和增殖數皆顯著下降 (Nguyen *et al.*, 2018)。Long *et al.* (2010) 以四種芭菲爾鞋蘭原生種 *P. villosum*、*P. insigne*、*P. bellatulum*、*P. armeniacum* 之實生苗培養於 TDZ 加 NAA、BA 加 NAA 之培養基，結果以培養於 BA 加 NAA 之組合有最佳之每培植體形成芽數和芽長度，其適宜之 BA 濃度範圍為 0.2-6.0 mg L⁻¹，NAA 為 0.1-1.0 mg L⁻¹，其中 *P. insigne* 於低濃度不超過 1.0 mg L⁻¹ BA 較佳，而 *P. armeniacum* 則在多數濃度組合下都可增殖。

綜合上述結果顯示，以單獨細胞分裂素或細胞分裂素加生長素組合皆可誘導芽體增殖。而不同亞屬間對植物生長調節劑的反應，似乎無明顯差異，例如：*P. vietnamense* (硬葉尖瓣亞屬)、*P. bellatulum* (短瓣亞屬)、*P. insigne* (芭菲爾亞屬綠葉單花節) 之芽體增殖皆於低濃度 BA 處理 (1.0~2.0 mg L⁻¹) 較佳；而 *P. armeniacum* (硬葉尖瓣亞屬)、*P. villosum* (芭菲爾亞屬斑葉單花節) 則較能適應高濃度 BA (最高至 6.0 mg L⁻¹)。

(四) 培植體切傷處理及培養方式：

植物利用切頂方式去除頂芽優勢增加腋芽形成 (Tanaka *et al.*, 2006)，以及創傷能引發植物再生能力已被證實 (Chen *et al.*, 2016)。張 (2010) 以 *P. Daisy Barclay* 試驗切頂方式配合 3.0 mg L⁻¹ BA 之培養基進行芽體增殖培養，每培植體可誘導 5.13 個不定芽，高於不切頂之 2.24-2.92 個芽，且研究顯示 *P. Ruby Leopard* 和 *P. In Charm Silver Bell* 二品種經切頂處理較不切頂處理可大幅縮短誘導不定芽增生之時間 (張，2010)。Udomdee *et al.* (2012) 以 *P. Hsinying Rubyweb* 試驗將芽體進行縱切、橫切及十字切處理，結果以縱切有最高之芽體分化數可達 10.5 芽顯著高於橫切之 1.0 芽和十字切之 2.5 芽。Nhut *et al.* (2005) 於 *P. delenatii* 實生苗芽體基部以針製造 3-4 個直徑約 0.3mm 之傷口培養於固體或液體培養基，結果無創傷處理之對照組皆無芽體增殖，經創傷處理及固體培養基可產生 2.3 個芽，若以創傷處理加液體培養基處理最高產生 5.2 個芽，顯示創傷處理搭配液體培養基能有更佳之芽體增殖效果。Luan *et al.* (2019) 試驗除去頂葉、針尖創傷處理對 *P. delenatii*、*P. callosum*、*P. gratixianum* 三品種芽體增殖之影響，結果除去頂葉之培植體於 SH 添加 0.4-0.6 mg L⁻¹ TDZ 之液體培養基培養 90 天後，三品種之平均芽體增殖數為 5.48-6.00 個芽；而在同樣培養條件以針尖創傷處理，三品種之平均芽體增殖數為 4.48-5.37 個芽。上述研究顯示切傷處理 (切頂、縱切、除葉、針刺傷) 較對照組皆能提高芭菲爾鞋蘭芽體增殖數，此結果在三種亞屬之原生種或雜交種皆可觀察到，此外切傷處理若搭配液體培養對芽體增殖數似有加乘的效果。

三、根系誘導：

生長素、有機添加物及活性碳常使用作為促進組培苗根系誘導之培養基成份。Zeng *et al.* (2013) 試驗 NAA 和香蕉泥不同濃度對 *P. hangianum* 根系誘導之影響，當培養基中僅添加 NAA 隨著其濃度由 0 增加到 2.0 mg L⁻¹，發根率由 15.33% 提高至 51.00%，若單獨添加

100 g L⁻¹ 香蕉泥之發根率為 54.67%，而以 2.0 mg L⁻¹ NAA 加上 100 g L⁻¹ 香蕉泥可將發根率提高至 91.00%、平均根數 4.60 根。Nguyen *et al.* (2018) 於培養基中添加 0.5 mg L⁻¹ NAA，顯著提高 *P. vietnamense* 之發根率由 10% (對照組) 提高為 70.0%，超過 0.5 mg L⁻¹ 則發根率反而降低；另以 0.5 mg L⁻¹ NAA 加上 1.0-1.5 g L⁻¹ 活性碳發根率最高可達 88.89%。Luan *et al.* (2019) 試驗指出 *P. callosum*、*P. gratixianum*、*P. delenatii* 三品種皆以培養於 1.0 mg L⁻¹ NAA 有最佳之根數 (4.15-4.50 條根)、根長 (5.10-5.29cm) 以及植株鮮重 (1.65-3.13g)。由上述研究結果可知，芭菲爾鞋蘭組培苗以低濃度 NAA (不超過 2.0 mg L⁻¹)，並搭配活性碳或香蕉泥可獲得良好之發根率。

結 論

自前面的文獻回顧得知，芭菲爾鞋蘭組織培養技術較之其他蘭花顯得難以突破，包括存在芽體增殖褐化比例偏高 (15-30%)、增殖倍率不穩定 (1.0-28.8 芽)、繼代培養時間長 (90 天)，以及自器官或組織誘導癒合組織/擬原球體形成困難等問題。近來部分研究提出一些有助於提高芽體增殖率、降低培植體褐化之可行方式，包括：取樣季節影響芭菲爾鞋蘭側芽培植體消毒成功率及後續繼代培養之芽體增殖效果；對培養前植株、培植體消毒前或增殖培養期間進行褐化抑制處理，有助抑制培植體褐化發生；切傷處理搭配液體培養有助於提高芭菲爾鞋蘭芽體增殖數量等，皆對芭菲爾鞋蘭組織培養技術進展有所突破。而本篇探討芭菲爾鞋蘭不同亞屬間物種對組織培養的反應，其結果並未呈現出明顯之差異，此可能受限於文獻未同時比較不同物種，且所選用之培植體條件、試驗條件不盡相同，因此目前要歸納出差異較為困難，然而此初步之結果是否也暗示有機會建立符合多數芭菲爾鞋蘭物種之組織培養條件，亦值得期待並投入更多的研究加以印證。

參 考 文 獻

- 王美琪。2016。培植體抗氧化劑前處理及培養基成分對仙履蘭芽體再生之研究。國立中興大學園藝學研究所博士論文。118pp。
- 王美琪、林瑞松。2017。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。興大園藝 42(2):109-123。
- 林德承、林瑞松。2010。仙履蘭之器官培養。興大園藝 35(4):87-98。
- 林宗榮。2013。仙履蘭分生技術對產業之影響。苗栗區農業專訊 62:22-24。
- 許伊琄。2007。仙履蘭芭菲爾亞屬賞花圖鑑。日月文化出版股份有限公司。229pp。
- 張曉媛。2010。芭菲爾鞋蘭離體繁殖之研究。國立嘉義大學園藝系研究所碩士論文。190pp。
- 黃琳方。2012。1-MCP 前處理、光源與半胱氨酸對仙履蘭花梗芽生長之影響。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。64pp。
- Borah, N. J., S. Chakraborty, S. Roy Choudhury, and B. K. Dutta. 2015. *In vitro* propagation of

- Paphiopedilum spicerianum* (Reichb. f.) Pfitz.-a rare and endangered orchid species from northeast India. *J. Orchid Soc. India* 29:85-90.
- Chaireok, S., K. Thammaviri, and U. Meesawat. 2015. Optimization of protocorm-like bodies tissue culture and clonal propagation condition for endangered lady's slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Stein). *Pak. J. Biotechnol.* 12(2): 105-114.
- Chochai, A., I. J. Leitch, M. J. Ingrouille, and M. F. Fay. 2012. Molecular phylogenetics of *Paphiopedilum* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on nuclear ribosomal ITS and plastid sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 170: 176-196.
- 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, L., B. Sun, L. Xu, and W. Liu. 2016. Wound signaling: the missing link in plant regeneration. *Plant Signal. Behav.* 11(10): e1238548 (3pp.).
- Cribb, P. 1998. The Genus *Paphiopedilum*. 2nd ed. Natural History Publications (Borneo). Kota Kinabalu, Royal Botanic Gardens, Kew. 427pp.
- Do, V. N. T., S. T. Hsu, and Y. I. Lee. 2019. Clonal propagation *in vitro* of *Paphiopedilum* Hybrids from adult plants. *HortScience*. 54(9): 1565-1569.
- Hong, P. I., J. T. Chen, and W. C. Chang. 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: 755-59.
- Huang, L. C. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum in vitro*. *Am Orchid Soc. Bull.* 57: 274-8.
- 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 buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell. Dev- Bio. Plant* 47(6): 702-09.
- Lin, Y. H., C. Chang, and W. C. Chang. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 62: 21-25.
- Long B, A. X. Niemiera, Z. Y. Cheng, and C. L. Long. 2010. *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 101: 151-62.
- Luan, L.Q., N. H. P. Uyen, and V. T. T. Ha. 2012. *In vitro* mutation breeding of *Paphiopedilum* by ionization radiation. *Sci Hortic.* 144: 1-9.
- Luan, V. Q., L. K. Guong, H. T. Tung, V. T. Hien, T. Hien, and D. T. Nhut. 2019. Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Sci. Hortic.* 256: 108648.
- Morel, G. 1974. Clonal multiplication of orchid. In: Withner CL, ed. *The orchid. Scientific studies.*

- New York: Wiley Interscience.
- Nash, N. 1985. *Paphiopedilum* Culture for Beginners-2. American Orchid Society Bulletin. 54 (5): 533-539.
- Nhut, D. T., P. T. T. Trang, N. H. Vu, D. T. T. Thuy, D. Van Khiem, N. Van Binh, and K.T.T. Van. 2005. A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation. Propag. Ornam. Plants 5: 158-163.
- Ng, C. Y., N. M. Saleh., and F. Q. Zaman. 2010. *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). Afr. j. biotechnol. 9(14): 2062-2068.
- Ng, C. Y. and N. M. Saleh. 2011. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm like bodies. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 105: 193-202.
- Nguyen, T. T., T. D. Nguyen, X. T. Dao, T. D. Chu, and X. B. Ngo. 2018. *In vitro* propagation of a Vietnam endemic lady's slipper orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O. Gruss & Perner). Journal of Horticulture and Plant Research. 1: 1-8.
- Stewart, J. and J. Button. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. Am. Orchid Soc. Bull.44: 591-599.
- Tanaka, M., K. Takei, M. Kojima, H. Sakakibara, and H. Mori. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J.45: 1028-1036.
- Thongpukdee, A., E. Nisayan, and C. Thepsithar. 2013. Multiple shoot formation of *Paphiopedilum* 'Delrosi'. World Academy of Science, Engineering and Technology.7(6): 399-402.
- Udomdee, W., P. J. Wen, S. W. Chin, and F. C. Chen. 2012. Shoot multiplication of *Paphiopedilum* orchid through *in vitro* cutting methods. Afr. J. Biotechnol. 11: 14077-14082.
- Wattanawikkit, P., E. Bunn, K. Chayanarit, and S. Tantiwiwat. 2011. Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. Kasetart J. Nat. Sci. 45: 12-19.
- Yam, T. W. and J. Arditti. 2017. *Paphiopedilum*. In: Micropropagation of orchids (3rd ed.). Wiley. pp.1322-1399.
- Yeung, E. C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. Bot. Stud. 58:33.
- Zeng, S., J. Wang., K. Wu., J. A. Teixeira da Silva, J. Zhang, and J. Duan. 2013. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum hangianm* Perner & Gruss. Sci. Hortic.151: 147-156.
- 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, Early Online: 1-14.

A Review on Tissue Culture Technology of *Paphiopedilum*

Jia-Qi Zhang¹⁾ Chen Chang²⁾

Key Word: *Paphiopedilum*, Callus, Protocorm-like body, Shoot multiplication, Rooting

Summary

Paphiopedilum is an important economic flower crop in Taiwan, but its seedling propagation has a very high proportion of relying on asymbiotic seed germination or division, which makes the development of commercial production mode difficult. This article reviews the research progress related to tissue culture technology of *Paphiopedilum*, and sorts out it from the directions of regeneration pathways, culture conditions, and species. In fact, recent studies have made some breakthroughs in improving the propagation efficiency of *Paphiopedilum in vitro*, including: explant sampling, browning inhibition treatments, and shoot proliferation methods. It is hoped that more research resources can be invested in the development of *in vitro* propagation of *Paphiopedilum* in the future, and the establishment of efficient and stable seedling propagation methods will be accelerated.

-
- 1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Assistant Researcher, Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, council of Agriculture, Executive.
 - 2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.