

孤挺花組織培養苗量產化繁殖技術簡介

農試所生技組 陳威臣 夏奇鈺 曹進義

一、前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 原產於熱帶中南美洲，主要分佈於巴西、祕魯、墨西哥、智利及阿根廷，為石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生鱗皮鱗莖花卉，又名百枝蓮、石蒜花及喇叭花，栽培品種之花朵色彩鮮豔碩大，具有多樣花色與花型變化，極常應用於盆花、切花及花壇植物，深受歐、美、日等國消費者喜愛。台灣的孤挺花種球供應多從荷蘭進口，近年來國內公民營單位也陸續推出新品種，但在推廣初期常面臨種苗不敷供應之困境，此一問題亟待解決。孤挺花種苗可利用有性繁殖之種子播種，以及無性 (營養) 繁殖之分球、切割、雙鱗片或組織培養等方式，其中組織培養法具有繁殖倍率高、生產週期短、可週年生產等優點，對於種苗數量不足的新品種而言，是快速量產種苗的有效方法。農業試驗所自2015年起執行孤挺花種苗繁殖相關計畫，已建立「台農1號」('Tainung No.1')、「紅獅」('Red Lion')及「千禧之星」('Blossom Peacock') 組培苗生產體系，茲將其組培苗繁殖方式簡介如下，作為新品種孤挺花種苗生產之參考應用。

二、孤挺花組織培養苗量產化繁殖技術

孤挺花組織培養苗量產化繁殖技術可分為四個階段：(一) 無菌組培苗建立階段、(二) 組培苗增殖階段、(三) 組培苗生長階段及 (四) 組培苗出瓶馴化與鱗莖養成階段。首先說明培植體取得與其消毒方法，藉以建立無菌組培苗；其次探討培植體大小、細胞分裂素及穀胱甘肽 (glutathione) 等對組培苗增殖的影響；接著針對蔗糖、活性炭與巴克素及液固態培養方式，進行其對組培苗的生長影響研究。最後介紹出瓶苗馴化方式，並利用穀胱甘肽噴施處理促進出瓶苗之生長。

(一) 無菌組培苗之建立階段

將孤挺花「紅獅」成熟鱗莖去除葉片、基盤、鱗皮及兩層鱗片後，將其十字縱切成1/4鱗莖，而後切除上半段鱗片，留下帶有部分鱗片與短縮莖之下半段，利用1.2%次

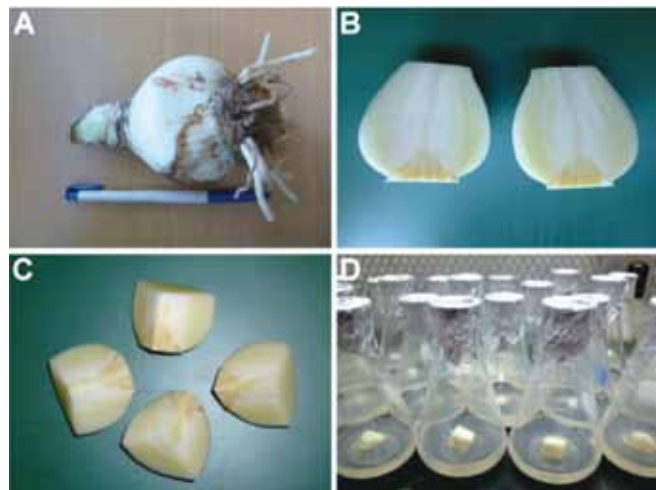
作者：陳威臣助理研究員
連絡電話：04-23317326

氯酸鈉 (NaOCl) 溶液消毒後，再橫切成適當大小後進行初代培養 (圖一)。比較「台農1號」上半部或下半部短縮莖之培植體消毒效率，結果顯示來自上半部短縮莖之培植體污染率顯著較低；此外，取自上、下部位短縮莖之培植體於含有 1 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzylamino purine, BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid, NAA) 之MS培養基培養8週後，分別約有57%與37%之培植體形成發根組培苗，每培植體約可得1.2苗，且每苗約有3-4條根。利用上述方法已建立「台農1號」、「紅獅」及「千禧之星」無菌組培苗，作為後續試驗的基礎材料。

(二) 組織培養苗之增殖階段

A. 培植體大小對組培苗增殖的影響：選取「紅獅」直徑約8 mm之組培鱗莖，以整顆鱗莖或1/2鱗莖為培植體，培養於含有 1 mg L^{-1} BA與 0.1 mg L^{-1} NAA之MS培養基，結果顯示1/2鱗莖培植體之每一鱗莖平均可形成2-3苗，而整顆鱗莖培植體僅形成1苗。以「千禧之星」1/2或1/4組培鱗莖作為培植體，培養於含有 0.2 mg L^{-1} 賽本隆 (thidiazuron, TDZ) 與 0.2 mg L^{-1} NAA之MS培養基，兩種培植體之組培苗誘導率均達100%，但以1/4鱗莖處理平均每一鱗莖可誘得4.4苗，顯著高於1/2鱗莖處理之2.0苗。利用「台農1號」直徑約為3、6及9 mm組培鱗莖之1/4鱗莖作為培植體，培

養於含有 0.2 mg L^{-1} TDZ與 0.2 mg L^{-1} NAA之MS培養基，培養達8週與12週時進行調查，結果顯示每一培植體可形成1.1-1.4苗，源自三種組培鱗莖大小之培植體間並無顯著差異，但以源自9 mm鱗莖之培植體生長最快，在培養8週後其組培苗具有最大鱗莖，而持續培養達12週時，則源自6 mm與9 mm鱗莖之培植體間已無顯著差異，但兩者仍顯著大於3mm處理。綜合上述結果，顯示以1/4鱗莖作為培植體的組培苗增殖效果較佳，但其組培苗之鱗莖大小會較1/2鱗莖培植體所得者為小；此外，若培植體來自於較大鱗莖材料，可在較短培養時間內，即獲得具有較大鱗莖之組培苗。圖二為「台農1號」源自不同大小鱗莖之1/4鱗莖培植體，在培養8週與12週後，組培苗增殖與生長的情形。



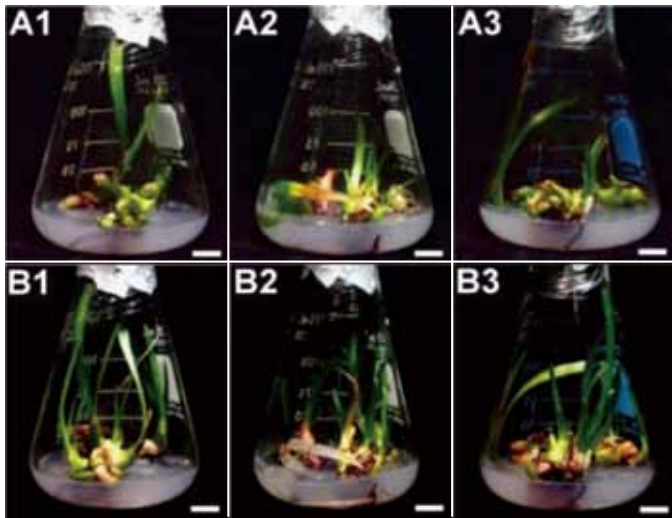
圖一、利用孤挺花「紅獅」成熟鱗莖建立無菌組織培養苗之情形。(A) 採自田間並洗淨後之成熟鱗莖、(B) 除去葉片、莖基盤及兩層鱗片後對切之1/2鱗莖、(C) 切除1/4鱗莖之上半部鱗片、(D) 上述材料經消毒並且切片後，將帶有短縮莖與鱗片基部之培植體，接種於125-mL三角瓶進行培養。

B. 細胞分裂素 (BA與TDZ) 對組培苗增殖的影響：利用「紅獅」與「千禧之星」直徑約8 mm組培鱗莖之1/2鱗莖培植體，探討BA對組培苗增殖效率之影響，結果顯示兩品種均以2 mg L⁻¹ BA處理較佳。而以「紅獅」1/4鱗莖培植體培養於含有不同濃度BA或TDZ 與0.2 mg L⁻¹ NAA組合之MS培養基，結果顯示BA或TDZ處理對組培苗增殖之影響並無顯著差異，但其中以0.1 mg L⁻¹ TDZ處理之組培苗增

殖率最高，經8週培養後可獲得11.6苗，可作為新品種種苗量化之用(表一)。

C. 穀胱甘肽 (glutathione) 對組培苗增殖的影響：利用直徑約7-8 mm之「紅獅」與「千禧之星」組培鱗莖為材料，探討穀胱甘肽對組培苗增殖之影響。結果顯示「紅獅」1/4鱗莖於65.0 μM還原態穀胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 或32.5 μM氧化態穀胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 溶液中振盪培養2小時

後，取出接種於1 mg L⁻¹ BA與0.1 mg L⁻¹ NAA之MS培養基，於照光環境下培養8週後，每一鱗莖可誘得約12.3苗最佳；但在黑暗環境下，則所有處理不具促進效果。此外，將「千禧之星」1/4鱗莖培養於含有不同濃度GSH或GSSG之液態培養基中，振盪培養4、8及12週後調查組培苗增殖情形，結果顯示65.0 μM GSH在4週之短期培養有助於提高組培苗增殖率，而在延長培養時間至12週時，則以65.0 μM GSH與162.5 μM GSSG處理具有較高之增殖率。



圖二、源自孤挺花「台農1號」不同大小鱗莖之培植體，其組培苗增殖與生長之情形。以鱗莖直徑約3 mm (A1, B1)、6 mm (A2, B2) 及9 mm (A3, B3) 組培苗之1/4鱗莖為培植體，培養於含有0.2 mg L⁻¹ TDZ與0.2 mg L⁻¹ NAA之MS培養基，培養達8週 (A1, A3) 與12週 (B1, B3) 後，組培苗之增殖與生長情形。Bars = 1 cm。

表一、BA與TDZ濃度對孤挺花「紅獅」1/4鱗莖組培苗增殖之影響

BA	TDZ	NAA	組培苗/培植體 (No.)	組培苗/鱗莖 (No.)
--- (mg L ⁻¹) ---				
-	-	0.2	1.8 ± 0.2 b	7.2 ± 0.8b
1	-	0.2	2.1 ± 0.4 ab	8.4 ± 1.6ab
2	-	0.2	2.2 ± 0.3 ab	8.8 ± 1.2ab
4	-	0.2	2.1 ± 0.3 ab	8.4 ± 1.2ab
-	0.1	0.2	2.9 ± 0.3 a	11.6 ± 1.2a
-	0.2	0.2	2.2 ± 0.4 ab	8.8 ± 1.6ab
-	0.4	0.2	2.1 ± 0.4 ab	8.4 ± 1.4 ab

綜合上述結果，顯示以1/4鱗莖培養於含有適量TDZ與NAA之MS培養基中對組培苗增殖效果較佳；此外，將1/4鱗莖培植體以65.0 μM GSH或32.5 μM GSSG溶液浸泡2小時候進行固態培養，或是將1/4鱗莖培養於含有65.0 μM GSH

或 $162.5 \mu\text{M}$ GSSG液態培養基中培養12週，皆可促進組培苗之增殖效率。

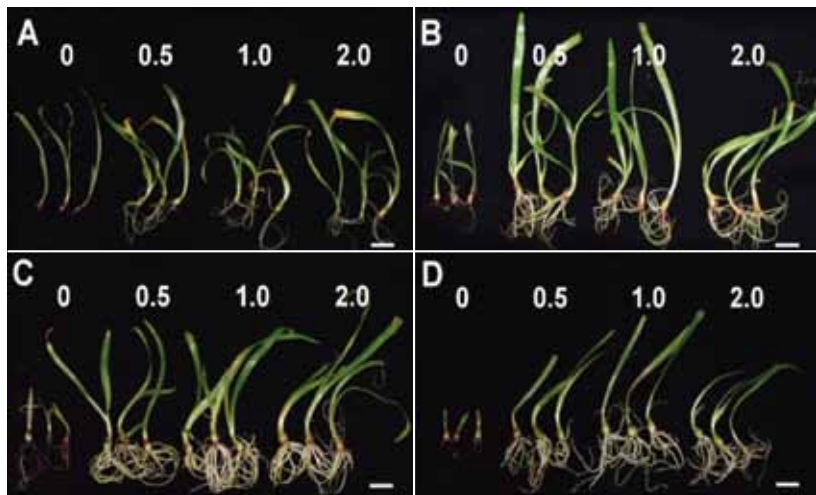
(三) 組織培養苗之生長階段

A. 蔗糖與活性炭對組培苗生長之影響：利用直徑約2-4 mm之「台農1號」組培鱗莖於含有不同蔗糖與活性炭濃度組合培養基中培養，結果顯示當培養基不含活性炭時，以1.5%與3%蔗糖處理對組培苗生長較有利，而6%與9%蔗糖處理對組培苗生長有抑制作用；但是當培養基含有 2 g L^{-1} 活性炭時，則是以3%與6%蔗糖處理顯著較1.5%與9%蔗糖處理有較高之組培苗鮮重。後續利用直徑約3-5 mm之組培鱗莖進行試驗，結果顯示6%蔗糖搭配 $1-2 \text{ g L}^{-1}$ 活性炭之處理組合，對於提高組培苗之鱗莖直徑與鮮重最為有利。顯示適當提高蔗糖濃度並添加適量活性炭的培養基組合，對於組培苗之鱗莖直徑、鮮重及根數而言，具有顯著之協同增效作用(圖三)。

B. 液固態兩階段培養方式對組培苗增殖與生長之影響：利用直徑約5 mm之「台農1號」組培鱗莖，培養於含有 1 mg L^{-1} BA與 0.1 mg L^{-1} NAA之液態或固態MS培養基中培養8週(第一階

段)，而後再將未經切割之叢生芽苗團塊作為培植體，直接繼代於相同組成之固態培養基中培養8週(第二階段)，結果顯示液固態兩階段培養對於組培苗鮮重、葉數及根數的增加具有明顯之效果(表二)。

C. 巴克素對組培苗增殖與生長之影響：利用直徑約10 mm「紅獅」與「千禧之星」鱗莖培養於含有不同濃度巴克素(paclobutrazol, PBZ)液態培養基中，結果顯示，對照組鱗莖培養至8週時，部分組培苗出現褐化現象，建議繼代培養間隔時間不宜超過8週。「紅獅」組培鱗莖在 $50-75 \text{ mg L}^{-1}$ PBZ培養條件下，根數顯著高於對照組，但PBZ處理間並無顯

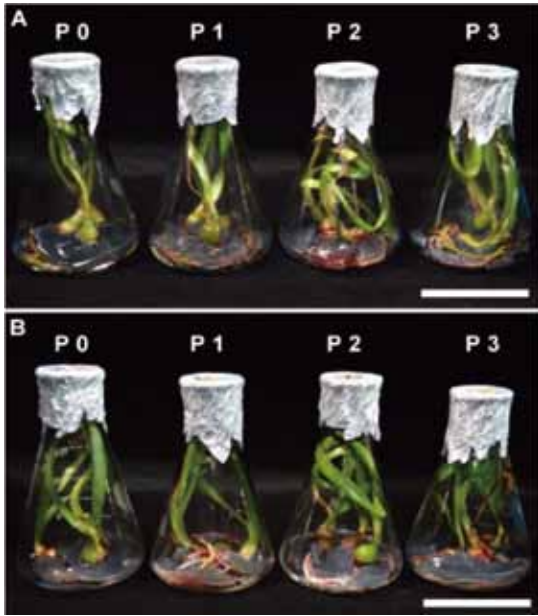


圖三、蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花「台農1號」組培苗生長之影響。以直徑約3-5 mm之組培鱗莖培養於含有 1 mg L^{-1} BA、 0.1 mg L^{-1} NAA、不同蔗糖濃度(1.5、3、6、9%) (A、B、C、D) 及不同活性炭濃度(0、0.5、1.0、 2.0 g L^{-1}) 之MS 培養基中，培養達10週時組培苗之生長情形。Bars=2cm。

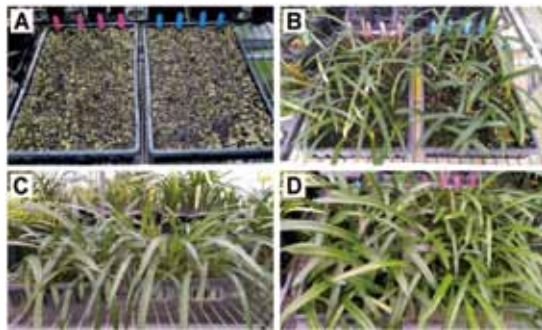
表二、液固態兩階段培養方式對孤挺花「台農1號」組培苗生長之影響

培養方式	鱗莖直徑 (mm)	組培苗鮮重 (g)	葉數 (No.)	根數 (No.)
固態-固態	$8.6 \pm 0.5 \text{ a}$	$1.3 \pm 0.2 \text{ b}$	$1.8 \pm 0.2 \text{ b}$	$7.4 \pm 0.6 \text{ b}$
液態-固態	$9.0 \pm 0.2 \text{ a}$	$2.2 \pm 0.1 \text{ a}$	$2.5 \pm 0.1 \text{ a}$	$9.9 \pm 0.4 \text{ a}$

著差異。然而，「千禧之星」鱗莖在25-75 mg L⁻¹ PBZ處理下，根系生長受到抑制，且隨著濃度提高根數減少，而75 mg L⁻¹ PBZ處理則較對照組具有顯著較短與較寬的葉片。後續進行另一組濃度較低



圖四、巴克素對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。「紅獅」(A)與「千禧之星」(B) 培養於含有1 mg L⁻¹ BA、0.2 mg L⁻¹ NAA、6%蔗糖及2g L⁻¹ 活性炭，並分別添加0、5、10及20 mg L⁻¹ 巴克素(P0、P1、P2及P3)之MS固態培養基，培養達8週後組培苗之生長情形。Bars=5 cm。



圖五、孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗種植於混合介質(泥炭苔:蛭石:珍珠石 2:1:1; v/v/v)，於溫室環境栽培達2週 (A)、6週 (B) 及18週 (C、D) 之生長情形。

之試驗，結果顯示，若將PBZ濃度降低至5 mg L⁻¹時，則有促進組培苗鱗莖增大與發根的效果 (圖四)。綜合上述結果顯示，以6%蔗糖並添加1-2 g L⁻¹ 活性炭的培養基組合，對於組培苗之鱗莖直徑、鮮重及根數而言，具有顯著的促進效果。此外，液固態兩階段培養方式可顯著提高組培苗鮮重、葉數及根數。將組培鱗莖培養於含有5 mg L⁻¹ PBZ之MS培養基，也具有促進組培苗之鱗莖增大與發根的效果。

(四) 組培苗之出瓶馴化與鱗莖養成階段

A. 組培苗之出瓶馴化：將組培瓶苗出瓶洗淨後，剪去部分的葉片與根部，留有約2 cm葉片與1 cm根系，先以免賴得 (benomyl) (50%可濕性粉劑) 1,000倍溶液浸泡30分鐘，取出晾乾後進行種植。利用混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石=2：1：1；v/v/v)，在28±4°C之溫室環境下栽培，結果顯示，「千禧之星」與「紅獅」之出瓶苗均可達100%存活率 (圖五)。

B. 穀胱甘肽 (glutathione) 對出瓶苗生長的影響：利用「紅獅」與「千禧之星」出瓶苗為材料，探討穀胱甘肽 (glutathione) 對組培苗瓶外生長之影響。結果顯示「紅獅」具有鱗莖直徑約12 mm之出瓶苗在栽培第9週開始以不同濃度GSH或GSSG溶液噴施處理，而後每4週噴施一次，共處理5次，於停止噴施7週後，調查植株生長情形；結果以162.8 μM GSSG處理之鱗莖直徑27.4 mm與總鮮重36.3 g顯著高於其他處理，顯示特定濃度之GSSG具有促進出瓶苗生

長的效果 (圖六)。綜合上述結果，顯示出瓶苗經殺菌劑溶液浸泡30分鐘並晾乾後，以混合介質種植後於溫室環境下生長，具有高存活率且植株後續生長狀況良好。此外，利用 $162.8 \mu\text{M}$ GSSG溶液對出瓶苗進行噴施處理，更對其鱗莖養成具有促進之效果。

四、結語

台灣目前栽植之孤挺花種球多由國外進口，在各試驗改良場與業者的努力下，已陸續推出許多優良品種，在推廣初期常面臨種苗不足的窘境需加以克服。本文針對孤挺花組織培養的初代培養、組培瓶苗增殖與出瓶苗馴化養成之相關技術進行介紹，提供育種者或種苗業者於種苗量產之參考應用。此外，能整合新品種、種苗量產技術及病原微生物檢測技術，進行無病原健康組培種苗生產，作為優質種球養成之基礎，將更進一步提升國產孤挺花產業之競爭力。

五、參考文獻

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈺。2019。培植體大小、蔗糖及活性炭對孤挺花組培苗增殖與生長之影響。台灣農業研究 68 : 137–147。
Amani, S. H., H. Zarei, A.

Mottallebi Azar, and K. Mashayekhi. 2015. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. Cumhuriyet Univ. Faculty , Sci. J. (CSJ) 36:594–605.

Siddique, M. N. A., J. Sultana, N. Sultana, and M. M. Hossain. 2007. *Ex vitro* establishment of *in vitro* produced plantlets and bulblets of *Hippeastrum (Hippeastrum hybridum)*. Int. J. Sustain. Crop Prod. 2:22-24.

Sultana, J., N. Sultana, M. N. A. Siddique, A. K. M. A. Islam, M. M. Hossain, and T. Hossain. 2010. *In vitro* bulb production in *Hippeastrum (Hippeastrum hybridum)*. J. Central European Agri. 11: 469-474.



圖六、孤挺花「紅獅」出瓶苗於不同穀胱甘肽處理條件下，在溫室生長達32週之植株。大苗 (Large ; 直徑約12 mm) 與小苗 (Small ; 直徑約8 mm) 以混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石 = 2 : 1 : 1，體積比) 種植8週後開始處理，每4週噴施純水 (Control)、GSH (162.8、325.7及651.4 μM ; GSH-a, -b, -c) 或 GSSG (81.4、162.8及325.7 μM ; GSSG-a, -b, -c)，共噴施5次，停止施用7週後調查與拍照；每處理3重複，每重複5株，每15株噴施50 mL穀胱甘肽溶液。Bars = 10 cm。