

石斛蘭瓶內開花之研究 (文獻報告)

郭嫻婷、劉明宗

蘭花因種類繁多、形態特殊，在市場上受歡迎的程度與日俱增，不論在亞洲、美洲或歐洲，蘭花的產業皆持續的擴展。隨著市場對切花、盆花的需求增加，新品種的需求亦大增，而傳統的育種方法往往耗日費時，加上建立量產體系所需的時間，新品種的育成至推出，往往需時5年以上。而影響育種時間的長短，主要因素在於蘭花具有長時間的「幼年期」(juvenility)，必需發育至成熟才能感應外在誘導進而開花，蘭花當中幼年期長達30個月以上者不在少數，為此，許多學者皆希望藉由「瓶內開花」之研究縮短蘭花幼年期，使其早熟 (precocious) 開花。瓶內開花之相關研究在蕙蘭 (*Cymbidium*) (Kostenyuk *et al.*, 1999; Chang and Chang, 2003)、文心蘭 (*Oncidium*) (Kerbaudy, 1984)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) (Duan and Yazawa, 1995; 邱和張, 2011) 及五唇蘭 (*Doriella*) (Duan and Yazawa, 1994) 等蘭花皆曾被研究過。石斛蘭 (*Dendrobium*) 則是蘭花當中瓶內開花相關研究最多的 (Wang *et al.*, 1997; Hee *et al.*, 2007; Sim *et al.*, 2007, 2008; Tee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013; Lee and Chen, 2014)，其參試種類繁多，包含藥用類如霍山石斛 (*D. huoshanase*)、金釵石斛 (*D. nobile*)、鐵皮石斛 (*D. candidum*) 等，觀賞類如貝殼石斛 (*D. primulinum*)、金沙江石斛 (*D. wangliangii*) 及秋石斛 (*D. Madame Thong-In*、*D. Chao Praya Smile* 及 *D. Sonia 17*) 等，皆曾被成功誘導瓶內開花或結莢 (圖 1)。而研究的範疇除了生長調節劑之效應外，亦包含其他添加物、培養基類型甚至溫度等對瓶內開花的影響。主要的應用方向除了育種、挽救瀕臨絕種的種類外，一個良好的瓶內開花體系同時也是解開「開花」分子及遺傳機制的重要工具。

一、植物生長調節劑

在石斛蘭的瓶內開花研究當中，生長調節劑的誘導效應是主軸之一，所參試的生長調節劑類型廣泛，包含：

1. 生長素 (auxin)：NAA (1-naphthaleneacetic acid)、2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)；
2. 細胞分裂素 (cytokinin)：BA (benzylaminopurine)、TDZ (thidiazuron)、Kin (kinetin)、Zea (Zeatin)；
3. 激勃素 GA3 (gibberelic acid)；
4. 脫落酸 ABA (abscisic acid)；
5. 生長抑制劑：TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)、PBZ 或稱 PP333 (paclobutrazol) 等。

上述種類單獨施用皆可誘導瓶內開花 (Sim *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014)，與其他生長調節劑配合施用則效果各異。各種生長調節劑當中，以 BA 及 TDZ 應用於石斛蘭的相關研究較多，誘導效果也較佳，二者皆

屬細胞分裂素。BA 在某些情況下為開花之必須條件 (Hee *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009), TDZ 在各試驗結果中則顯示其誘導開花的效果更好, 且施用濃度較低。Wang 等人 2009 的試驗中, 提高 TDZ 濃度至 $0.5\sim 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 即導致金釵石斛開花率急劇下降, 但以 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之濃度參試於金沙江石斛則可提昇開花率達 100%, 且相較於未經處理之野生植株每個花序僅開一朵花, TDZ 可誘導產生 2 朵花以上的花序, 可見不同種類之石斛蘭對於 TDZ 的反應各異。生長素 NAA, 依據研究顯示單獨施用會導致開花率下降, 推測是 NAA 具有促進根生長之效果, 而根為合成細胞分裂素的主要部位, 因而降低了植體對外施細胞分裂素的反應程度、降低開花誘導之效果 (Zhao *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014)。然而在不同試驗當中, 也有利用低濃度 NAA 與 BA 搭配, 以達較佳誘導效果者, 可見生長調節劑間的交互作用亦會影響石斛蘭之瓶內開花。

而在植物生長抑制劑 PBZ 的測試方面, 於金釵石斛有良好的誘導效果, 除了單獨使用可誘導開花外, 以「預培養」方式先將瓶內小苗或原球體 (protocorm) 栽培於含 PBZ 配合 ABA 或 NAA 的培養基中, 再移至開花誘導培養基, 可有效提高花芽誘導率 (Wang *et al.*, 2009)。也有試驗指出, 石斛蘭栽培於含 PBZ 的培養基當中, 可促進花朵形態正常, 若單獨利用 BA 誘導所得者, 反而皆為畸型花 (Te-chato *et al.*, 2009)。除 PBZ 外, 將擬原球體預培養於含 ABA 的培養基、再移至含 BA 的開花誘導培養基, 也可提高花芽誘導至 80% (Wang *et al.*, 1997)。PBZ 與 ABA 的效應除了生長調節劑間複雜的拮抗作用等因素外, 也可能促進「成熟度」進而提昇培植體對開花誘導的反應。

二、其他添加物

除了生長調節劑外, 無機鹽類也會影響石斛蘭瓶內開花誘導率, 在 Tee 等人 2008 年的試驗當中, 以 BA 誘導開花之培養基中, 調整其磷 (P) 及氮 (N) 的比例, 高 P、低 N 可提高開花誘導率。反之, 則出現大量誘導營養芽的情形, 這樣的反應符合了磷肥促進開花、氮肥促進營養生長的概念。此外, Zhao 等人在 2013 年的試驗當中, 參試了胡蘿蔔泥、馬鈴薯泥、番茄泥、椰子汁及李子泥等, 添加於含生長調節劑之培養基當中, 測試其對金沙江石斛瓶內開花的影響, 結果以馬鈴薯泥的促進效果最佳, 可達 71% 花序誘導率。而在 Ranjan Deb 等人 2009 年之試驗中, 將貝殼石斛預培養於含椰子汁、蘋果汁及芒果汁的培養基中, 僅於含 10% 蘋果汁之培養基當中, 培植體頂端分生組織有腫大的情形, 再移至含適當生長調節劑的培養基中, 即快速的朝花芽分化。在 Sim 等人 2007 年的試驗當中, 不添加椰子水的培養基, 即使含 BA 也無法誘導 *D. Madame Thong-In* 開花, 推測椰子水中含肌醇及細胞分裂素氧化酶抑制劑, 可以促進培植體對細胞分裂素的誘導反應。然而, 天然萃取物之內含成份複雜, 因此, 其對開花的影響實非單一效應可以說明的。

三、培養基類型

在石斛蘭瓶內開花的多數文章當中，都是利用固態的水晶洋菜（Gelrite）、瓊脂（Agar）或植物凝膠（Phytigel）作為培養基基質。但 Sim 等人及 Hee 等人分別於 2007 年以雙層培養基誘導秋石斛 *D. Madame Thong-In* 及 *D. Chao Praya Smile* 瓶內開花，試驗當中於液態可維持及增生的原球體，若不移至雙層培養基（上層液態、下層固態）中，則無法發育為正常的花朵。同時，液態培養基的添加量也會影響正常花的產生比例（Sim *et al.*, 2007）。一般而言，雙層培養基多應用於原生質體（protoplast）培養，與上述利用原球體培養的情形相似，原生質體雖然可以液態培養維持或增殖，但若要正常發育，通常必需要有一固態的基質提供固著點，可能牽涉到其「極性生長」（polar growth）的需求，而上層液體培養基量的多寡則會影響容器之通氣程度及含氧量，故而影響培植體後續的發育。

四、溫度

Wang 等人在 2009 以金釵石斛瓶內實生苗誘導開花之試驗中，比較於日夜溫 25°C/25°C 及 23°C/18°C 的培養下，花苞產生的情形及花朵的正常比例。在 23°C/18°C 的日夜溫下，不僅花苞誘導率高，形成正常花的比率也顯著提高，可達到 82%，同時在此環境下，花朵的壽命也較長，可持續 3-4 周。在自然情況下低溫即為金釵石斛最主要的開花誘導因素之一，加上其原生環境多於海拔 500-1700 公尺，年均溫約在 18-21 度，因此以適當的生長調節劑組合來提高瓶內植株之「成熟度」，進一步再配合低溫，以獲得較佳的誘導效果及高比例的正常花。

結論

綜而言之，植物開花的過程複雜且牽涉極廣，各研究當中甚至無法歸納出一個單一方向與處理方式。但就石斛蘭而言，瓶內誘導開花之技術具備有克服不利開花之條件、節省大量空間、時間及人力等特性，因此，此一技術開展了石斛蘭快速育種的新模式。如秋石斛 *D. Chao Praya Smile*，除了瓶內誘導開花外，甚至可進行瓶內授粉、生產種子，當傳統育種方式於 70 個月可進行 2 次育種程序，「瓶內育種」則可以進行 6 次，有效縮短漫長的育種時間、提高育種的效率（圖 2）。此外，這也是石斛蘭開花機制研究的最佳工具，誘導過程因生長調節劑影響所產生的不正常花（圖 3）更可加以應用於相關形態發育的研究。而開花過程之內生荷爾蒙變化及分子生物層次的分析，皆可藉此操控開花所需條件來促進研究的進展。除此之外，多種珍貴的藥用石斛亦可利用此技術來進行保存及相關研究。而瓶內開花的精巧模樣更具備開發成為禮品的潛力。可見對石斛蘭而言，瓶內開花確實為極具應用性的技術之一。



圖 1、不同種的石斛瓶內開花 (A-F) 及結果莢 (G) 的情形。a.鐵皮石斛 (*D. officinale*)；b.霍山石斛 (*D. huoshanense*)；c.天宮石斛 (*D. aphyllum*)；d.獨角石斛 (*D. unicum*)；e.始興石斛 (*D. Shixingense*)；f. *D. Shixingense* X *D. crystallinum*。(Silva *et al.*, 2014)

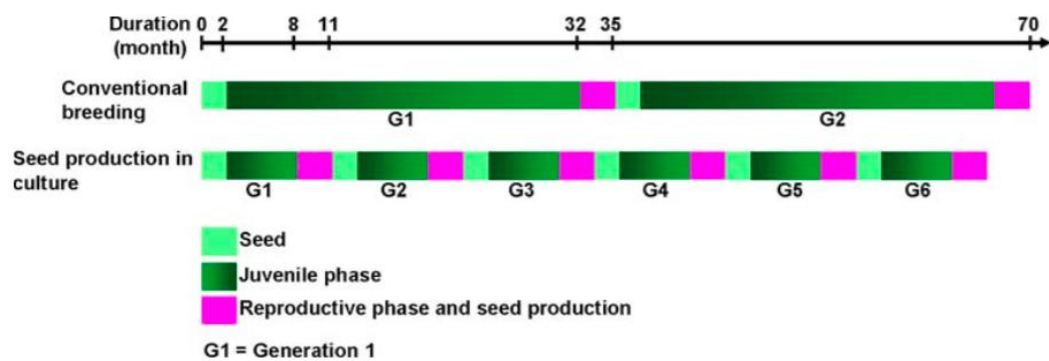


圖 2、傳統育種方式與瓶內生產種子所需時間之比較，傳統方式於 70 個月內可進行 2 次育種程序，瓶內生產種子 (育種) 則可進行 6 次。(Hee *et al.*, 2007)

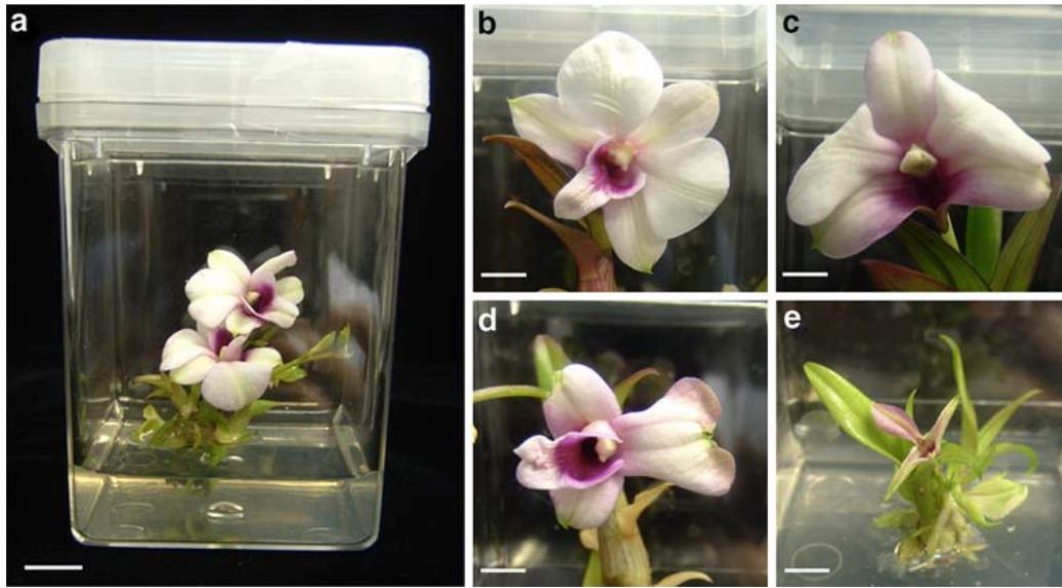


圖 3、秋石斛 *D. Chao Praya Smile* 經瓶內誘導開花產生的正常花 (a、b) 及異常花 (c-e) 之形態。(a, bar=1cm; b-e, bar=5mm) (Hee *et al.*, 2007)