

芭菲爾鞋蘭之微體繁殖

丁昭伶¹ 王仁助³ 施佳宏¹ 何超然¹ 吳倩芳^{*2}

¹行政院農業委員會苗栗區農業改良場 ²行政院農業委員會高雄區農業改良場

³國軍退除役官兵輔導委員會武陵農場

摘 要

芭菲爾鞋蘭屬為仙履蘭植物中種類及商業栽培最多之屬，極具市場發展潛力，惟其微體繁殖技術尚無法突破致產業發展受限。本研究以4個芭菲爾鞋蘭雜交品系之無菌播種實生瓶苗探討培植體部位、鹽基濃度、植物生長調節劑(TDZ)及光照等因子對芽體誘導及增殖之影響。結果顯示，不同部位培植體除了PA6291頂芽培植體之誘導率高於莖節培植體外，餘3品系皆以莖節培植體之誘導情形較好，其中PA5909莖節培植體於花寶1號培養基不添加TDZ經3個月培養之芽體誘導率最高(2.2倍)。另鹽基及生長調節劑部分，PA5909及PA6166以不添加TDZ之誘導情形較好，而PA6045及PA6291則分別以1/6 MS及1/2 MS添加0.5 mg/L TDZ之芽體誘導情形較佳，所有品系皆以光照較黑暗環境培養好。芽體增殖以PA5909莖節培植體之3.3倍表現最佳。

關鍵詞：芭菲爾鞋蘭、微體繁殖、芽體誘導

前 言

仙履蘭包含芭菲爾鞋蘭屬(*Paphiopedilum*)、喜普鞋蘭屬(*Cypripedium*)、鬚拉密鞋蘭屬(*Phragmipedium*)及西麗妮鞋蘭屬(*Selenipedium*)等4屬，有些種類因瀕臨滅絕而列入華盛頓公約保護之植物。仙履蘭植物特化為囊袋狀的唇瓣是其最奇特迷人的特徵，且花型及花色特殊多變，近年來廣受消費者青睞，極具市場

潛力。上述4屬中以芭菲爾鞋蘭屬的種類及商業化栽培最多，商業栽培仍以無菌播種實生苗為主，可獲得大量植株，但無法維持親本特性且個體間差異大，有些園藝業者利用無性分株繁殖可維持親本性狀，但其繁殖速率慢且倍數低無法達到量產需求(Ng *et al.*, 2010 ; 2011)。因此，利用植物組織培養大量分生繁殖為一具發展潛力的繁殖方法。

然芭菲爾鞋蘭組織培養困難，相關

*論文聯繫人

e-mail: wcfmail@mail.kdais.gov.tw

研究報告亦較其他作物少 (Chen *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2010)，前人研究指出雖有少數芭菲爾鞋蘭可利用無菌播種之原球體、苗株莖節 (Ng *et al.*, 2010)、葉 (Chen *et al.*, 2004)、種子 (Hong *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2010)、頂芽 (Chen *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001) 或花芽 (Liao *et al.*, 2011) 等培植體成功誘導植株，惟芭菲爾鞋蘭品種特性之差異極大，相同培植條件下之表現受基因影響顯著 (Chen *et al.*, 2002)，因此相關培植條件尚待進一步之研究。

本文以4個仙履蘭商業雜交品系 (PA5909、PA6045、PA6166及

PA6291) 為試驗材料，分別探討品系、培植體部位、培養基鹽基濃度、植物生長調節劑及光照等條件對芽體誘導與增殖之影響。

材料與方法

一、植物材料

供試材料之取得係向臺南市新營區清華蘭園購買8個芭菲爾鞋蘭雜交品系之無菌播種實生瓶苗，經一年培育後從中選取4個生長表現較佳品系之無性苗 (帶有3個莖節) 做為試驗材料，其4個品系代號分別為PA5909 (多花型)、PA6045 (原生種)、PA6166 (紫紅花) 及 PA6291 (綠花) (表一)。

表一 本研究供試之芭菲爾鞋蘭材料

Table 1. Plant materials of *Paphiopedilum* used in this study

<i>Paph.</i> Type	Symbol	Genus Name
<i>Paph.</i> Multiflora	PA5909	Honey fma. Album (<i>primulinum</i> var. <i>album</i> × <i>philippiense auream</i> 'Hamana Angel')
<i>Paph.</i> Species	PA6045	<i>urbanianum</i> × <i>sib</i> ('Ching Hua' × 'C.H. #3')
<i>Paph.</i> Mottled Leaf (<i>Vinicolor</i> ; <i>Coloratum</i>)	PA6166	Tristar Mabo (Hsinying Web 'Giant' × <i>Macabre</i> 'Magic Wings')
<i>Paph.</i> Mottled Leaf (Albino Type)	PA6291	Hsinying Citron 'C.H.#15' × Hsinying Dragon 'Double Trouble'

二、試驗方法

(一) 培植體部位、鹽類濃度及植物生長調節劑對4種芭菲爾鞋蘭品系無性苗芽體誘導之影響

- 1.培植體部位：選取頂芽(帶1莖節)及莖節(帶2莖節)2個部位為培植體，以探討芽體誘導之最佳培植體部位。
- 2.鹽類濃度：以市售之花寶1號(Hyponex #1)、1/6 MS (Murashige & Skoog 1962)及1/2 MS 三種鹽類濃度為試驗處理。
- 3.植物生長調節劑：1/6 MS 及1/2 MS 之鹽類濃度培養基添加 TDZ (Thiadiazol; 0.5 mg/L)及不添加植物生長調節劑處理。
- 4.樣本數：每一個處理10個樣本數。

(二) 光照環境對4種芭菲爾鞋蘭品系無性苗芽體誘導之影響

- 1.光照環境：培植體分別培養於完全黑暗(以黑布遮光)及弱光($18\sim 26 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 光照週期為16小時，暗期為8小時；東亞植物栽培燈 FL40BR/38 115V 60HZ 40W)環境為處理組別，培養溫度為 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。
- 2.樣本數：每一個處理10個樣本數。

(三) 芽體增殖試驗

- 1.以前述5種不同培養基誘導所

得之芽體進行增殖試驗。

- 2.培養基配方：以花寶1號(Hyponex #1)為基本配方，不添加任何生長調節劑。

(四) 調查方法：

- 1.調查時間：每1個月調查1次。
- 2.調查項目：調查培植體褐化率、死亡率、芽體萌發率、平均芽體數、增殖倍率及發根等情形。

結 果

(一) 培植體部位、鹽類濃度及植物生長調節劑對4種芭菲爾鞋蘭品系無性苗芽體誘導之影響：

以4個商業品系[PA5909(多花型)、PA6045(原生種)、PA6166(紫紅花)、PA6291(綠花)]無性苗之「頂芽」及「莖節」為培植體，分別培養於 Hyponex #1(H1)、1/6 MS 及1/2 MS 三種不同鹽類濃度之基礎配方中，以進行芽體誘導試驗。結果顯示，3個品系 (PA5909、PA6045及PA6166)以「莖節」培植體能誘導獲得較多之芽體數，尤以PA5909之莖節培植體培養於H1培養基不添加植物生長調節劑可獲得最多之芽體數(2.2個)。PA6291則是以「頂芽」培植體培養於1/2 MS + TDZ 0.5 mg/L 之培養基中可獲得較多的芽體(1.3個)(表二, 圖一, 圖二)。

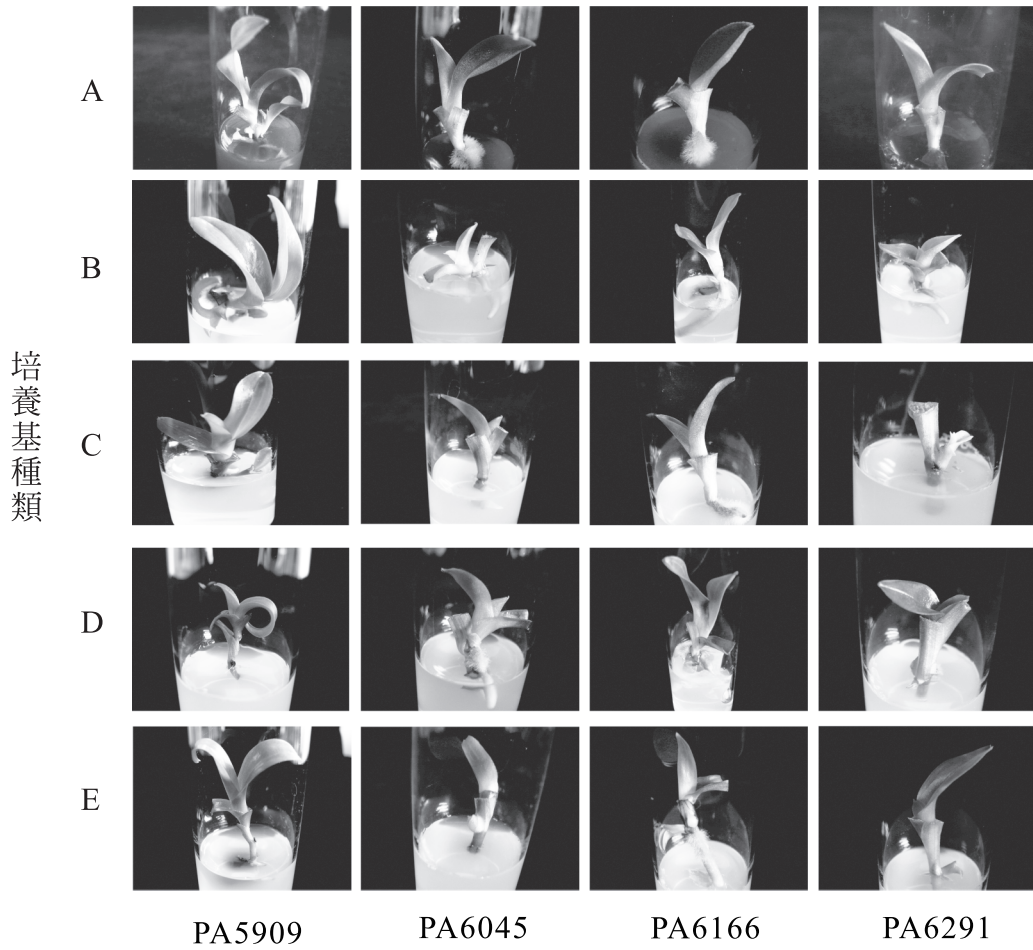
表二 鹽類濃度及培植體部位對4種芭菲爾鞋蘭雜交品系芽體誘導之影響

Table 2. Effects of salt based and explants on shoot formation from tip bud and stem of four *Paphiopedilim*

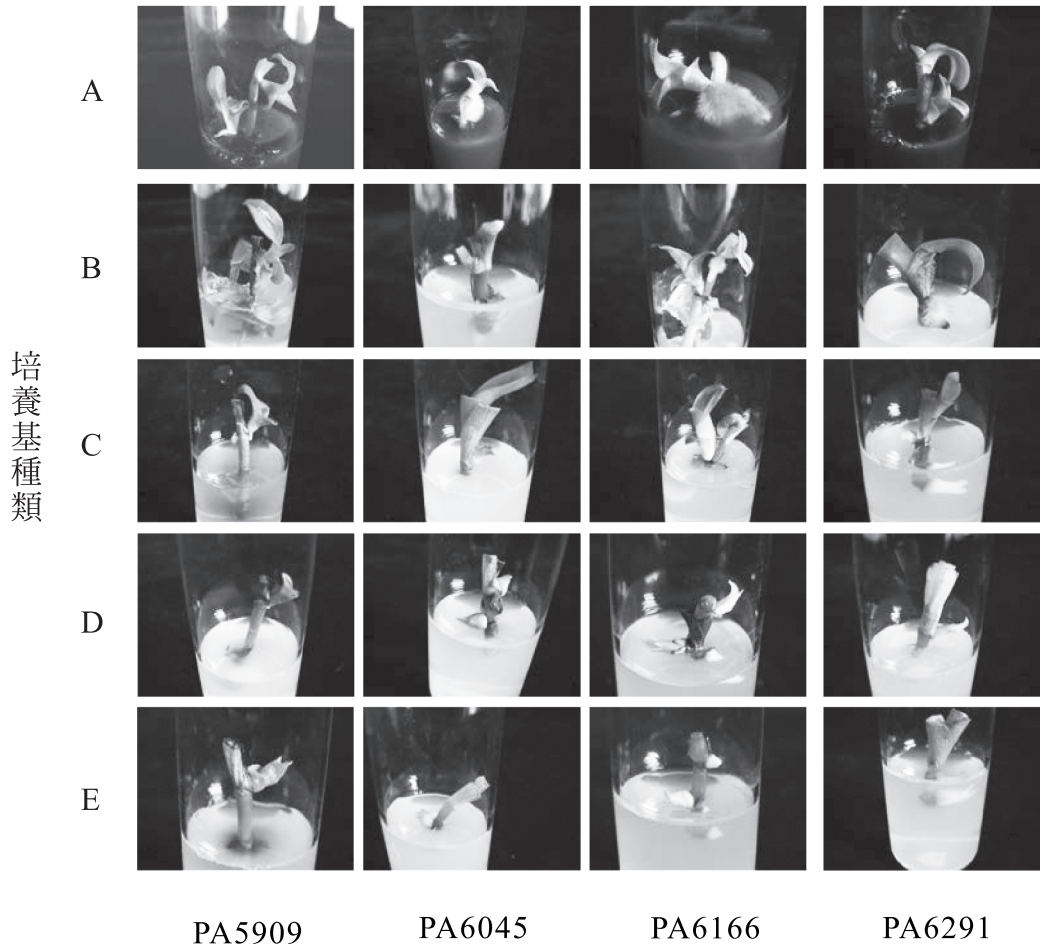
Lines	Shoot tips					Stems				
	A ^x	B	C	D	E	A	B	C	D	E
PA5909	1.7 a ^y	1.6 a	1.4 a	1.0 a	1.0 a	2.2 a	1.7 a	1.1 ab	1.1 ab	0.5 b
PA6045	1.2 a	1.4 a	1.3 a	0.9 a	1.4 a	1.2 a	1.1 a	1.6 a	1.1 a	1.1 a
PA6166	1.1 a	1.5 a	1.0 a	1.5 a	1.3 a	1.3 a	1.1 a	1.5 a	1.8 a	1.3 a
PA6291	1.1 a	0.9 a	1.0 a	1.1 a	1.3 a	1.1 a	1.1 a	0.9 a	1.0 a	1.2 a

^xA: Hyponex #1 Free PGR, B: 1/6MS Free PGR, C: 1/6MS + TDZ 0.5mg/L, D: 1/2MS Free PGR, E: 1/2MS + TDZ 0.5mg/L.

^yMeans (n=10) with the same letter(s) of the same row are not significantly different at 5% level by LSD test.



圖一 鹽類濃度對芭菲爾鞋蘭4個雜交品系頂芽'培植體'不定芽誘導之情形。
 Fig1. Effect of concentration of salt base on shoot induction from Shoot tips of four *Paphiopedilum* hybrids. A: Hyponex #1 Free PGR, B: 1/6MS Free PGR, C:1/6MS + TDZ 0.5mg/L, D: 1/2MS Free PGR, E: 1/2MS + TDZ 0.5mg/L.



圖二 鹽類濃度對仙履蘭4個雜交品系'莖節'培植體不定芽誘導之情形。
 Fig2. Effect of concentration of salt base on shoot induction from stem in four *Paphiopedilum* hybrids. A: Hyponex #1 Free PGR, B: 1/6MS Free PGR, C:1/6MS + TDZ 0.5mg/L, D:1/2MS Free PGR, E: 1/2MS + TDZ 0.5mg/L.

(二) 光照環境對4種芭菲爾鞋蘭品系無性苗芽體誘導之影響：

此試驗之培植體取自於培養1年之無性苗，第1年培養時因置於18小時完全光照/6小時黑暗的環境下，發現培植體褐化情形嚴重，故為降低第1年培植體褐化情形之產生，設計以黑暗及弱光處理來進行莖節培植體芽體誘導最適光照環境調查。結果顯示，黑暗處理雖可誘導出芽體，但之後培植體褐化情形嚴重，除PA6045(褐化率20~60%)外，其餘3個品系之培植體褐化率達90%以上；且所誘導獲得之芽體呈現白化現象，後續之生長情形不佳。將培植體置於弱光環境下培養，培植體褐化情形大幅降低，尤以PA6166的表現最好，培

植體無褐化現象產生。4個品系之培植體誘導獲得之芽體正常，後續之生長發育狀況良好(表3)。

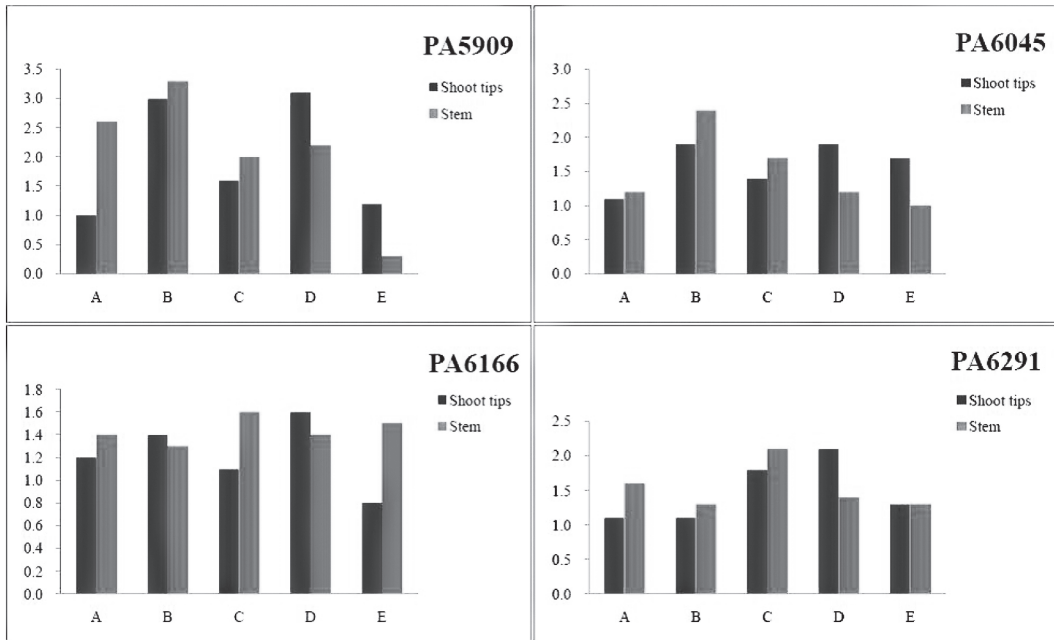
(三) 芽體增殖試驗：

將誘導獲得之芽體移至不添加植物生長調節劑之 H1 培養基，經 84 天培養，結果 PA5909 及 PA6045 兩品系皆以莖基培植體移自 1/6 MS 不添加 TDZ 培養基之增殖率最高分別為 3.3 倍及 2.4 倍；PA6166 及 PA6291 兩品系以頂芽培植體移自 1/2 MS 不添加 TDZ 培養基與莖基培植體 1/6 MS 添加 0.5 mg/L 培養基之芽體增殖率最高分別為 1.6 倍及 2.1 倍。4 品系頂芽培植體之增殖皆以培養在 1/2 MS 不添加 TDZ 之增殖表現較好，其中又以 PA5909 之增殖率最高達 3.1 倍。(圖三)

表三 光照對4種芭菲爾鞋蘭雜交品系芽體誘導之影響 (莖節培植體; n=10)
 Table3. Effects of light on shoot formation from stem of four *Paphiopedilim* (stem explants ; n=10)

	Dark			Light		
	Browning (%)	Death (%)	No.shoots (%)	Browning (%)	Death (%)	No.shoots (%)
PA5909						
A ^x	—	—	—	20.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2
B	100.0 ± 0.0	10.0 ± 10.0	0.6 ± 0.2	10.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.3
C	90.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.2	30.0 ± 30.0	10.0 ± 10.0	1.1 ± 0.1
D	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.3	10.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3
E	100.0 ± 0.0	50.0 ± 16.7	0.2 ± 0.1	60.0 ± 20.0	20.0 ± 20.0	0.5 ± 0.1
PA6045						
A	—	—	—	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0
B	20.0 ± 13.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1
C	50.0 ± 16.7	10.0 ± 10.0	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.6
D	60.0 ± 16.3	10.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1
E	40.0 ± 16.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1
PA6166						
A	—	—	—	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1
B	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0
C	100.0 ± 0.0	10.0 ± 10.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.2
D	90.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.2
E	90.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	15.0 ± 9.6	1.3 ± 0.1
PA6291						
A	—	—	—	10.0 ± 10.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1
B	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3
C	100.0 ± 0.0	20.0 ± 13.3	0.3 ± 0.2	10.0 ± 10.0	10.0 ± 10.0	0.9 ± 0.3
D	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	20.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
E	100.0 ± 0.0	10.0 ± 10.0	0.4 ± 0.2	10.0 ± 10.0	10.0 ± 10.0	1.2 ± 0.2

A: Hyponex #1 Free PGR, B: 1/6MS Free PGR, C:1/6MS + TDZ 0.5mg/L, D:1/2MS Free PGR, E: 1/2MS + TDZ 0.5mg/L.



圖三. 4種芭菲爾鞋蘭芽體移至花寶1號培養基經84天培養芽體增殖之情形。

Fig3. Multiplication performance of four *Paphiopedilim* explants after 84 days culture on Hyponex #1 medium. A: Hyponex #1 Free PGR, B: 1/6MS Free PGR, C: 1/6MS + TDZ 0.5mg/L, D: 1/2MS Free PGR, E: 1/2MS + TDZ 0.5mg/L.

討 論

本研究 4 個供試芭菲爾鞋蘭品系中以 PA5909 之芽體誘導及增殖表現最佳，培植體部位除了 PA6291 以頂芽為培植體之誘導數高於莖節培植體外，其他 3 品系皆以莖節培植體之誘導情形較好，其中又以 PA5909 培養於不添加植物生長調節劑之 H1 培養基的誘導率最高 (2.2 倍)，芽體誘導數因品系及培植體部位之不同而有差異，此結果和 Chen *et al.* (2002) 及 Long *et al.* (2010) 之研究相似，Chen 等人以相同培養基進行 'PH59' 及 'PH60' 兩不同品種之芽體誘導，其誘導率及各培植體之芽體數亦因品種不同而有差異，Long 等人以 *P. var. densissimum*、*P. insigne*、*P. bellatulum* 及 *P. armeniacum* 4 種芭菲爾鞋蘭進行芽體誘導，結果 *P. insigne* 及 *P. bellatulum* 兩品種最高芽體誘導之培養條件組合相同，另兩品種則不同且各異，其中 *P. armeniacum* 在任何組合中均可誘導出芽體，品種間差異極大。鹽基部分 PA5909 以 H1，PA6045 以 1/6 MS，PA6166 及 PA6291 以 1/2 MS 鹽基濃度之芽體誘導率較佳，顯示不同品系間對鹽基濃度之喜好不同。在植物生長調節劑部分，PA5909 及 PA6166 以不添加 TDZ 之誘導情形較好；而 PA6045 及 PA6291 則分別以 1/6 MS 及 1/2 MS 添加 0.5 mg/L TDZ 之芽體誘導情形較好。Huang *et al.* (2001) 指出，TDZ 會抑制芭菲爾鞋蘭雜交種芽體之增生及發根，Long *et al.* (2010) 亦表示 TDZ 濃度在 0.02-0.5

mg/L 時，葉培植體的褐化率會隨濃度之提高而增加，Chen *et al.* (2002) 亦指出相同荷爾蒙對不同基因型芭菲爾鞋蘭之作用差異極大。

Chen 等人研究指出不同光照條件 (黑暗或光照) 均有芽體誘導成功之例子 (Chen *et al.*, 2002 ; 2004)。本研究供試 4 品系於黑暗及弱光之環境中亦均能誘導出芽體，但以弱光環境中之誘導較多，且芽體生長發育正常，培植體褐化率亦低，而黑暗環境中誘導之芽體呈現白化現象，後續生長情形不好，且培植體褐化嚴重。

本試驗結果顯示品系、培植體部位、鹽基濃度及植物生長調節劑等因子，均會影響芭菲爾鞋蘭組織培養之表現，各因子間是否存在相互作用則有待進一步探討，另 Ng *et al.* 指出由現階段之研究顯示，芭菲爾鞋蘭組織培養於不同培養基之表現明顯受植物體基因型所支配 (Ng *et al.*, 2010)。

芭菲爾鞋蘭為一極具市場潛力的蘭科植物，惟因品種差異性及複雜且不明的培養條件，致目前尚無法同蝴蝶蘭及文心蘭利用組織培養技術建立分生苗量產體系，而僅能以無菌播種量產及傳統分株法繁殖，故市場發展受限。本試驗係以實生瓶苗做為芭菲爾鞋蘭組織培養條件之初探，期提供爾後分生苗組織培養研究之參考。

誌 謝

本研究承蒙行政院農業委員會農業科技計畫經費補助 (計畫編號：98-99 農科-1.1.1-苗-M1)，感謝何慧媛小姐在實

驗上之協助及清華蘭園提供試驗植株材料，謹致謝忱。

引用文獻

- 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. Cult.* 76: 11-15.
- 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: 755-759.
- Huang, L. C., C. J. Lin, C. I. Kuo, B. L. Huang, and T. Murashige.** 2001. *Paphiopedilum* cloning in vitro. *Sci. Hortic.* 91:111-121.
- Liao, Y. J., Y. C. Tsai, Y. W. Sue, 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: 702-709.
- Lin, Y. H., C. Chang, and W. C. Chang.** 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell, Tiss. Org. 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 Tiss. Org. Cult.* 101: 151-162.
- 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. of Bio.* 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 Org. Cult.* 105:193-202.

Micropropagation of *Paphiopedilum*

Chao-Ling Ting¹, Ran-Juh Wang³, Chia-Hung Shih¹, Chao-Jan Ho¹, and Chien-Fang Wu^{*2}

¹Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli, Taiwan, R. O. C.

²Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Kaohsiung, Taiwan, R. O. C.

³Wuling Farm, Veterans Affairs Council, Taichung, Taiwan R. O. C.

ABSTRACT

Paphiopedilum is one of the slipper orchids that famous for its various species and most cultivated category that has great potential in the flower market. However, its micropropagation skill is hard to breakthrough that limited the industry development. This study focuses on the effect of plant position, medium salt concentration, plant regulators, and light on bud induction and multi-propagation of *Paphiopedilum* by using four hybrid seedlings. Results showed that shoot bud cultivation was better than stem cultivation on PA6291, vice versa for others. PA5909 stem three weeks cultivation in Hyponex No.1 without TDZ had the best induction rate of 2.2. In medium salt and plant regulators, PA5909 and PA6166 had better results without TDZ in cultivating medium, PA6045 and PA6291 had better bud induction results in 1/6 MS and 1/2 MS with 0.5mg/L TDZ medium, respectively. All of the cultivars cultured under light were better than in dark environment. PA5909 stem cultivation had the best but induction rate of 3.3 among all treatments.

Key words: *Paphiopedilum* spp; micropropagation; shoot induction

* Corresponding author, email:wcfmail@mail.kdais.gov.tw