

光源對仙履蘭花梗芽生長之影響

黃琳方¹⁾ 林瑞松²⁾

關鍵字：Maudiae type、成熟度、LED 光源、試管培養

摘要：本試驗利用芭菲爾鞋蘭斑葉單花子房基芽誘導芽體形成。不同 LED 光源培養對於子房基芽誘導率，以紅光配合藍光處理有最高 74%誘導率，紅光處理誘導率 45%。在白光環境下，S1 時期有 100%誘導率；藍光環境下 S3 時期有 83%誘導率；紅光環境下 S4 時期有 80%誘導率；紅光配合攔光處理在 S2 時期有 100%誘導率。

前 言

瑞典植物學家林奈(Linnaeus Carl)將蘭科植物中，花朵外型特徵呈囊袋唇瓣狀命名為 *Paphiopedilum*。在台灣由於它的外型酷似拖鞋，又稱「拖鞋蘭」，在 2003 年為了拓展版圖，重新以更高貴的名稱命名仙履蘭，並沿用至今。仙履蘭學名為「*Pedilum*」，在英國稱為「Lady's Slipper Orchid」(許，2007)。

台灣仙履蘭產業主要分為趣味栽培及商業栽培，商業上以芭菲爾鞋蘭(*Paphiopedilum*)和鬚拉密鞋蘭屬(*Phragmipedium*)為主。芭菲爾鞋蘭(*Paphiopedilum*)和鬚拉密鞋蘭屬(*Phragmipedium*)在 1989 年受華盛頓公約列管，禁止野生種的國際貿易。農委會在 1999 年公告「人工培植仙履蘭登記及輸出管理作業要點」並確切執行此政策後，台灣仙履蘭才得以在國際間貿易。芭菲爾鞋蘭屬中，現今育種主要以斑葉單花種(Maudiae Type)為主，因其具有幼年期短、育成率、開花率高及花與葉片皆具有觀賞價值(許，2007)。

仙履蘭經由瓶內或瓶外器官誘導再生之研究有許多：經由種子誘導原球體(林，2001)、建立芽體及根的增殖培養(黃，2001)、經由葉片誘導芽體(陳，2000)、葉片誘導芽體持續型態形成(Chen, *et al.*, 2004)、花梗芽誘導芽體(林，2010)、花苞誘導芽體形成(Liao, 2011)

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

等。仙履蘭繁殖在組織培養報告已被研究，但目前量化仍為問題之一。主要是因為仙履蘭芽體在瓶內誘導效率低、再生倍數少、且植株在瓶內生長期需時較久。除此之外，由於仙履蘭喜好高溫高濕的栽培環境，也造成培植體無菌化消毒不易、培植體培養期間易褐化等問題。

本研究以仙履蘭 *Paphio. 'In-Charm 2880'* 之花朵子房基芽為培植材料來進行培養，探討各光源條件對誘導子房基芽的影響，找出最佳適合光源條件。除了使用短縮莖外，建立花朵器官子房基芽作為另一培植體來源。

材料與方法

一、植物材料

本試驗材料選斑葉單花品系 '*Maudiae Type*' 已帶花苞之盆花，選購自台中縣大雅穎川蘭園品種 *Paph. (Magic Flame x Red Horizon)*，代號 '*In-Charm 2880*'。

二、試驗方法與培養基條件

仙履蘭盆花栽培介質為排水良好樹皮，已帶花苞植株於試驗前移至 25°C 室內環境停止澆水 3 天。將仙履蘭花梗自子房基部下距離 3 公分處剪下，自子房與花苞連接處去除花苞(圖 1)。將子房基芽外部包覆的苞片沿著中肋剪開 2/3，用防風打火機(弼臣，中國)以火苗去除子房外部之絨毛，置入含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液，手搖震盪滅菌 10 分鐘，再以蒸餾水清洗 5-7 次以上，至無泡沫殘留後，再將子房基部芽體接種於試管內。

本試驗使用滲透壓及銨態氮比例較低之全量 B5 (Sigma, USA)，額外添加 0.44 g·l⁻¹ CaCl₂ (聯工，台灣)、1 mg·l⁻¹ NAA (Sigma, USA)、4 mg·l⁻¹ Kinetin (Sigma, USA)、150 ml·l⁻¹ 椰子水、20 g·l⁻¹ 蔗糖(台灣精緻細砂，台灣)及 0.05 mM 硫代硫酸銀。培養基定量後，使用 KOH 及 HCl 調整 pH 至 5.5，再添加 Difco Bacto-Agar 7 g·l⁻¹，以 121°C 高壓滅菌 20 分鐘，再分裝於規格 27*55mm (OD*H) 試管中，每管填充 10ml 培養基，冷凝 3-5 天後使用。初代培養置於黑暗環境一個月後，再移至光週期 12/12 小時白光環境培養，溫度設定 25°C±1°C。每 2 週繼代培養至相同培養基，培養兩個月後拍照及調查。

三、培植體成熟度

已抽花梗且帶有花苞之花朵依照花苞開放程度分為四個等級，分別為：S1)花苞尚未完全展開，S2)花苞已稍微展開，上萼片與下萼片角度於 45° 以內，S3)花朵已展開，且上萼片與下萼片角度約 90°，S4)花朵展開，上萼片與下萼片角度約 180° (圖 2)。



圖 1. 仙履蘭子房基芽。

Fig. 1. *Paphiopedilum* ovary base bud.



圖 2. 仙履蘭不同花朵成熟度。

Fig. 2. *Paphiopedilum* different mature flower.

四、光源條件

子房基芽培養於黑暗一個月後，再移至各光源(光茵生物科技股份有限公司，台灣)環境進行光照處理；冷白光 W(型號：NBL-T84-K50W，色溫：5000~5500K，17W/110V，400-700nm)、藍光 B(型號：NBL-T84-B, 9B/17W/110V, 450nm)、紅光 R(型號：NBL-T84-R，9R/12W/110V，650nm)及混合光 P(型號：NBL-T84-6R3B，6R3B/14W/110V)，光度 700-1000 lux (8.54-12.2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。

五、分析與調查方法

1. 培植體生育調查:培植體黑暗環境培養 4 週後移置照光環境培養 4 週後進行芽體褐化數及誘導率調查。
2. 統計分析:葉綠素分析及根部活性試驗,採完全逢機設計(completely randomized design),試驗數據利用 CoStart 6.1 軟體(CoHort software, Monterey, CA, USA)以費雪爾氏 LSD 法(Fisher's Least Significant Difference test)比較 5 %差異顯著性。

結 果

不同花朵成熟度之'In-Charm 2880'子房基芽在黑暗下培養一個月,移置4種不同光源:白光 w(400-700nm)、藍光 B(450nm)、紅光 R(650nm)及混和光 P(6R3B)試驗光源對於芽體誘導率及褐化率的影響。各光源再培養一個月後,觀察芽體生長情形及記錄芽體誘導之影響(圖 3~6)。培養於白光(W)下對成熟度 S1-S4 子房基芽誘導芽體之調查,以成熟度最低的 S1 時期誘導率有最佳表現 100%,其次為 S2 及 S4(80%及 57%),S3 時期誘導率效果最差(20%)。S3 時期褐化率最高(80%),S4 時期褐化率 43%、S2 時期 20%,S1 時期之子房基芽則無褐化的發生(表 1)。

培養於藍光(B)下對成熟度 S1-S4 子房基芽誘導芽體之調查,誘導芽體率 S3 有最佳結果 83%,S1 誘導率 67%,S2 及 S4 誘導率為 33%及 29%。芽體褐化率 S3 為最低(17%),其次為 S1、S2 及 S4 分別為 33%、67%及 71%(表 2)。

培養於紅光(R)下對成熟度 S1-S4 子房基芽誘導芽體之調查,成熟度 S1-S3 芽體誘導率低(分別為 33%、25%及 43%),成熟度最高的 S4 有較高誘導率(80%)。芽體褐化率以 S4 時期最低(20%),S1、S2 及 S3 分別為 67%、75%及 57%(表 3)。

表 1. 白光對誘導仙履蘭'In-Charm 2880'不同成熟度子房基芽誘導芽體之影響。

Table 1. The induction of white light with different maturation ovary base bud on *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880'.

Maturation ^z	No. with total buds	Induction rate (%)	Browning rate (%)
S1	5	100	0
S2	5	80	20
S3	5	20	80
S4	7	57	43

Data were recorded after 2 month culture in B5 medium.

^zS1: still flower bud, S2: angle of sepals less than 45°, S3: angle of sepals about 90°, S4: angle of sepals about 180.

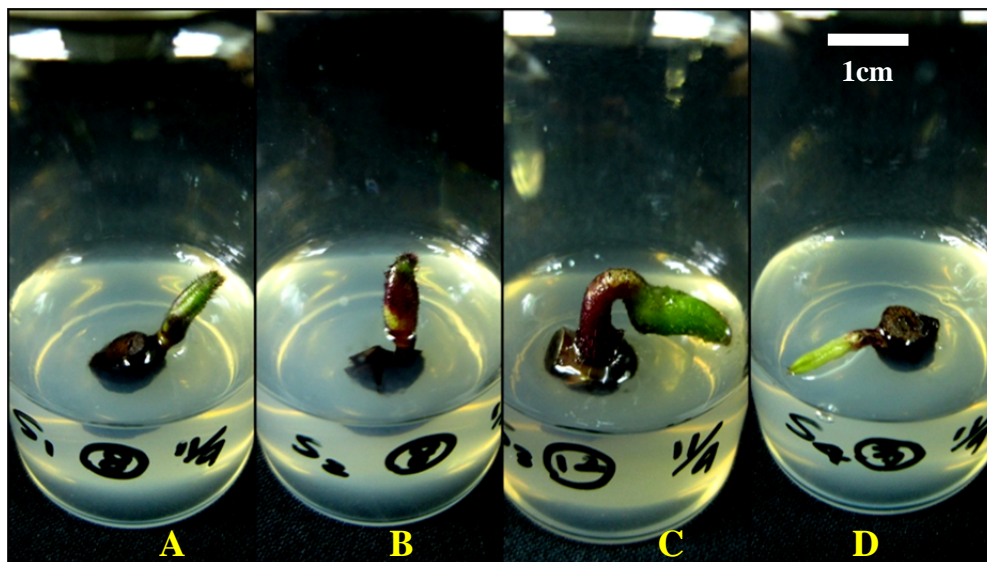


圖 3. 仙履蘭'In-Charm 2880' 白光培養一個月生長情形。

Fig. 3. *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880' under white light after 1 month cultured.

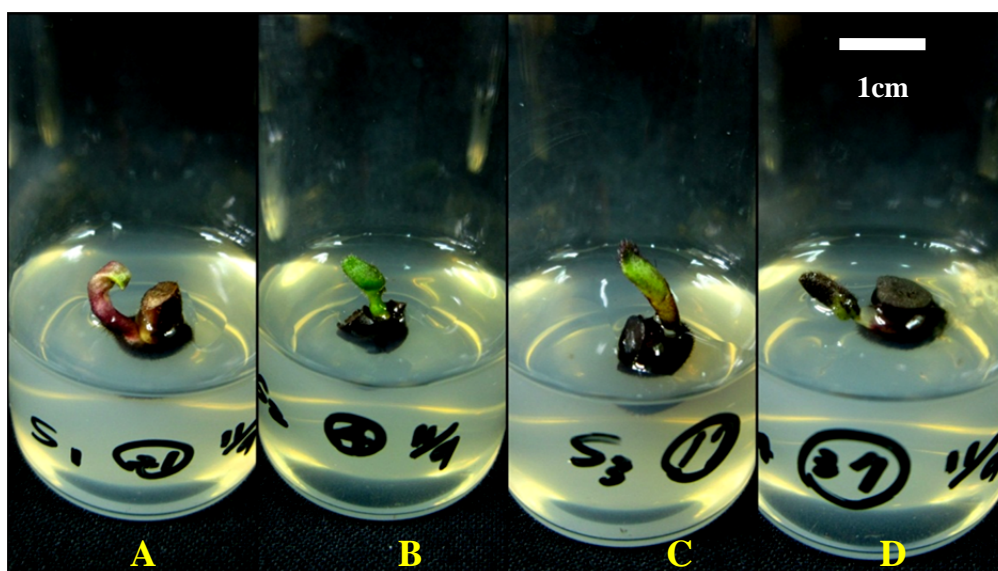


圖 4. 仙履蘭'In-Charm 2880' 藍光培養一個月生長情形。

Fig. 4. *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880' under blue light after 1 month cultured.

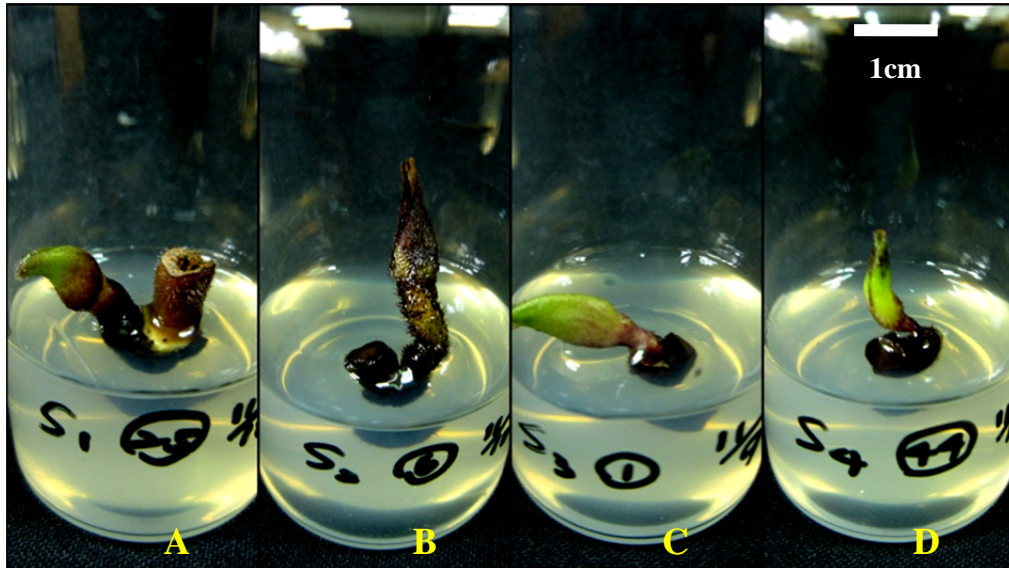


圖 5. 仙履蘭 'In-Charm 2880' 紅光培養一個月生長情形。

Fig. 5. *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880' under red light after 1 month cultured.

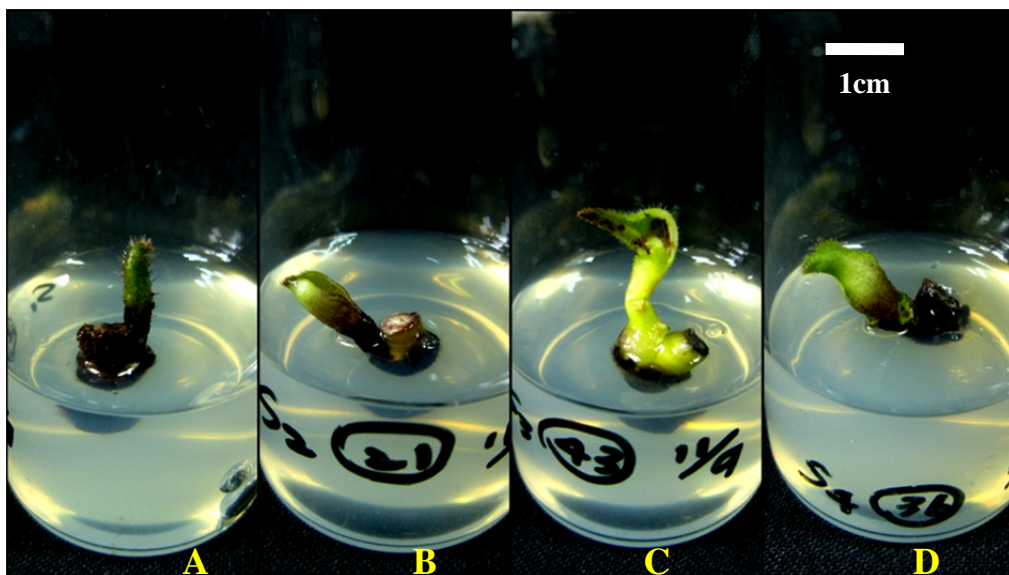


圖 6. 仙履蘭 'In-Charm 2880' 混合光培養一個月生長情形。

Fig. 6. *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880' under P(6R3B) light after 1 month cultured.

表 2. 藍光對誘導仙履蘭'In-Charm 2880'不同成熟度子房基芽誘導芽體之影響。

Table 2. The induction of blue light with different maturation ovary base bud on *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880'.

Maturation ^z	No. with total buds	Induction rate (%)	Browning rate (%)
S1	6	67	33
S2	3	33	67
S3	6	83	17
S4	7	29	71

Data were recorded after 2 month culture in B5 medium.

^zS1: still flower bud, S2: angle of sepals less than 45°, S3: angle of sepals about 90°, S4: angle of sepals about 180°

表 3. 紅光對誘導仙履蘭'In-Charm 2880'不同成熟度子房基芽誘導芽體之影響。

Table 3. The induction of red light with different maturation ovary base bud on *Paphiopedilum* 'In-Charm 2880'.

Maturation ^z	No. with total buds	Induction rate (%)	Browning rate (%)
S1	6	33	67
S2	4	25	75
S3	7	43	57
S4	5	80	20

Data were recorded after 2 month culture in B5 medium.

^zS1: still flower bud, S2: angle of sepals less than 45°, S3: angle of sepals about 90°, S4: angle of sepals about 180°.

培養在混合光 P(6R3B) 成熟度 S1-S4 子房基芽誘導芽體之調查，各成熟度子房基芽誘導率皆高於 50%，芽體褐化率較其他光源處理低。S2 有芽體最佳誘導率 100%，其次 S1 處理 80%、S3 及 S4 為 71%及 67%。芽體褐化率的發生以 S4 最高 33%，其次 S3 及 S1 分別 29%及 20%，S2 時期則沒有褐化率的發生(表 4)。

表 4. 組合光(6R3B)光對誘導仙履蘭'In-Charm 2880'不同成熟度子房基芽誘導芽體之影響。
Table 4. The induction of combination light(6R3B) with different maturation ovary base bud on
Paphiopedilum 'In-Charm 2880'.

Maturation ^z	No. with total buds	Induction rate (%)	Browning rate (%)
S1 ^z	5	80	20
S2	3	100	0
S3	7	71	29
S4	6	67	33

Data were recorded after 2 month culture in B5 medium.

^zS1: still flower bud, S2: angle of sepals less than 45°, S3: angle of sepals about 90°, S4: angle of sepals about 180°.

討 論

黑暗下培養抑制芽體生成，光線是芽體形成的關鍵要素，直接影響胚軸內部光敏素系統(Lercari *et al.*, 1999)。在 *Dendrobium* 誘導芽體試驗，黑暗僅有莖部的伸長，移置光照處理才有芽體的形成及生長(Ferreira *et al.*, 2010)。試驗不同光源對於子房基芽誘導之影響，期找到最適合光源。在四種光源白光、藍光、紅光及混合光(6R3B)培養一個月後進行調查，發現混合光(6R3B)有 76%誘導率，在白光(W)與藍光(B)效果也有 55%以上的芽體誘導率。紅光的處理組僅 45%，與其他三種光源處理顯著較低。芽體褐化率的發生與紅光(R)最高，超過半數的芽體褐化死亡，顯示在誘導芽體產生時不適合以紅光作為光源。推測可能含有藍光波長誘導氣孔開張，增加了二氧化碳在細胞尖細的擴散，使得芽體降低光合作用對系統得限制(Evans and Loreto, 2000)。在白光處理組中 S1-S4 的誘導(表 1)，誘導率以成熟度愈年輕之子房基芽芽體誘導率達 100%，隨著成熟度的提升誘導率下降。藍光處理誘導芽體中，S3 有 83%誘導率，提高了芽體誘導率，但 S4 仍低於 30%誘導率。推測可能藍光促進氣孔開張，間接提高光合作用速率(Evans and Loreto, 2000)，提升了誘導率，但 S4 的高量乙烯仍造成褐化的發生(表 2)。紅光處理一個月後，發現在 S1-S3 誘導率 25-43%，S4 時期的誘導率提高到 80%，此結果顯示與白光培養結果相反，紅光可提升 S4 時期芽體誘導率。但在 S1-S3 時期，則增加芽體褐化發生的比例(表 3)。若以紅光及藍光混合 P(6R3B)處理，四個時期誘導率均達 60%以上，芽體誘導率整體誘導較佳，且可抑制及降低褐化的發生(表 4)。此結果與朵麗蝶蘭組培苗培養在紅藍光混合下，葉片及根與碳水化合物有較佳影響的結果相似(吳及陳，2008)皆表示出生長情況以藍光混合紅光處理較佳，推測可能因紅光有助於節間伸長與株高，藍光與提升葉綠素合成及氣孔開張有關。

參考文獻

- 吳宣萱、陳福旗。2008。植物生長調節劑對蝴蝶蘭與朵麗蝶蘭花梗芽增殖之影響。台灣園藝 54:151-159。
- 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。p.31-34。
- 許伊琍。2007。仙履蘭巴菲爾鞋蘭屬賞花圖鑑。日月文化。台北。p.43-123。
- 陳婷玉。2000。六種芭菲爾鞋蘭之組織培養。台灣大學園藝學研究所碩士論文。55pp。
- 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. Cul.* 79: 11-15.
- Evans, J. R. and F. Loreto. 2000. Acquisition and diffusion of CO₂ in higher plant leaves. *Biomedical and Life Sci.* 321-351.
- Lercari, B., S. Moscatelli, E. Ghirardi, R. Niceforo and L. Bertram. 1999. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant Sci.* 140:53-61.
- 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: 702-709.

The Effect of Light Source on Flower Bud of *Paphiopedilum* Growth *in Vitro*.

Ling-Fang Huang¹⁾ Ruey-Song Lin²⁾

Key word: Maudiae type, maturation, Light-emitting diode (LED), *in vitro* culture.

Summary

This study took ovary base bud of *Paphiopedilum* maudiae type to induce shoot formation. The experiment of cultured in difference light-emitting diode, red light combination with blue light source treatment had the better induction rate 76%, red light source had 45% induction rate. In white light source, S1 stage had 100% shoot induction rate; blue light source presented 83% bud induction rate at S3 stage of angle of sepals about 90°; red light source presented 80% bud induction rate at S4 stage of angle of sepals about 180°; red light combination with blue light source treatment presented 100% bud induction rate at S2 stage of angle of sepals less than 45°, respectively.

1) Graduate student in M.S. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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