

## 芭菲爾鞋蘭無菌培養之建立

黃 慧 宜<sup>1)</sup> 朱 建 鏞<sup>2)</sup>

關鍵字: 芭菲爾鞋蘭、初代培養、存活率

**摘要：**本試驗以芭菲爾鞋蘭雜交種(*Paph. delenatii* × *Paph. armeniacum*)已開過花之分植株營養系苗株作為試驗材料，成功地培養去葉植株之短縮莖，並從腋芽發育小苗。試驗中將培養材料在滅菌前先預處理乾燥 2 週，可提高成功率。而以含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液震盪滅菌 9 分鐘成活率較高。培養材料以選擇帶葉片 5 片者，成活率較高。另外培養基無生長調節劑者，初代培養之成功率可提高至 66.7%。

### 前 言

芭菲爾鞋蘭屬(*Paphiopedilum*)內蘭花為杓蘭亞科(Cypripedioideae)內最具經濟價值的作物。芭菲爾鞋蘭於 1989 年被列為華盛頓公約(CITES)附錄一內的物種後，進出口交易嚴格地受政府控制，全面禁止野生植株進行國際商業行為。台灣收集有大量的種源且育種經驗豐富，在芭菲爾鞋蘭市場中有極大的機會。民國 96 年台灣仙履蘭的出口產值約為 3,000 萬新台幣(蔡，2007)。目前商業上繁殖方法是以無菌播種為主。但由於芭菲爾鞋蘭實生苗不整齊，且營養系繁殖苗株的技術仍停留在分株方法，無法大量生產具有優良開花性狀的植株。因此，建立芭菲爾鞋蘭之分生繁殖系統是極迫切的課題。目前對於芭菲爾鞋蘭組織培養之研究大多使用瓶苗為材料(林，1998; 洪，2004; 陳，2000; Kawase, 1995a; Yasugi and Yagi, 1995; Tanaka *et al.*, 1995、1996)，少數採用成熟株的短縮莖與花梗芽做增殖的材料(Huang, 1988; Kawase, 1990、1994、1997; Stewart and Button, 1975)。但芭菲爾鞋蘭的初代培養過程中會面臨滅菌不易與褐化嚴重的問題，因此成功率低。

本文以芭菲爾鞋蘭已開過花之植株短縮莖為培養材料，探討組織培養中芭菲爾鞋蘭培體汙染與褐化的問題，期能建立芭菲爾鞋蘭快速繁殖的方法。

---

1) 國立中興大學園藝系研究生。

2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

芭菲爾鞋蘭(*Paphiopedilum delenatii* × *Paphiopedilum armeniacum*)之實生苗，將已開過花的植株，分別以分株法繁殖成營養系，供作試驗材料植株。栽培於台中縣霧峰鄉國立中興大學園藝試驗場之水牆玻璃溫室中，夏天以風扇及水牆降低溫度。植株以 BVB (BVB Substrates, A18016 PEATMOSS 3 P0330168, the Netherlands) 商業介質，種植於 3 吋盆中，每週澆水 1-2 次，每月以含 200 ppm 氮的新百得肥二號(N 20- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>20- K<sub>2</sub>O 20, J.R. Peters, INC., U.S.A.)澆灌 1 次，病蟲害防治則依發生之情形進行防治。

### 二、試驗方法

初代培養之基本培養基含 2.2 g/l MS 配方(Sigma, USA)、tryptone 5 g/l、馬鈴薯 34 g/l、椰子汁 150 ml/l、活性碳 2 g/l、蔗糖(台糖精緻細砂，台灣) 30 g/l 和 甲苯胺 (Benzyadenine; BA) 5 mg/l。

馬鈴薯於賣場中購得，於購買當天去皮，切成小塊，秤取 340g 後，再加去離子水至 500 g，以果汁機打成泥狀，分裝成每 50 g 混合物為 1 包冷凍保存備用，即每包內共含有馬鈴薯 34 g。使用時每升培養基中添加 1 包馬鈴薯。椰子汁於賣場中選取數個綠色的新鮮椰子，剖開取汁後，混合所有液體，再分裝成每包 150 ml 冷凍保存備用。使用時每升培養基添加 1 包椰子汁。

上述培養基先調整 pH 值用至 5.3，再加入洋菜(Difco Bacto-agar) 6 g/l，最後培養基經融解後分裝於培養試管中，每試管裝填 10 ml，以 121°C(1.1 kg/cm<sup>2</sup>)滅菌 20 分鐘。

初代培養共有四個試驗，分別為：

1. 滅菌前處理：包括採樣前植株是否已停止澆水 2 週，以及植株滅菌前一天先除根或滅菌前才除根等共四個處理。植株經去根剝除葉片，再將短縮莖上不清潔的表皮削乾淨，然後置入含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液中手搖震盪滅菌 9 分鐘，再以無菌水沖洗 10 次以上，至莖塊上無泡沫後，放入試管中培養。
2. 滅菌時間試驗：浸漬於含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液的時間分別為 4.5、9 或 18 分鐘，計 3 個處理。
3. 培養基中 BA 的濃度：分別調整為 0 或 5 ppm，其餘成分同基本培養基。
4. 培養材料大小：培養的材料分別取自具有 5、6 和 7 片葉的植株之短縮莖塊。

上述初代培養的試驗選用長度大於 0.3 cm 且具有 3 個芽以上之莖塊培植體。培植體接種後，先放在暗處培養 3 週至芽體突出後，再置於以冷白螢光燈(FL40D/38，旭光，台灣)提供 1800 lux 的光照下，每日照光 16 小時的培養架上培養。培養室溫度為 25±2°C。培養 1 個月後，記錄其污染率、褐化率與存活率。

試驗採用完全隨機設計( completely randomized design)。每一容器視為 1 重複，每處理皆進行 3 重複，使用 CoStat 6.1 (CoHort software, Minneapolis, USA)軟體，以 ANOVA 判別顯著性並進行 Duncan 氏多變域分析(p=0.05)。

## 結 果

### 一、初代培養

#### (一) 滅菌前處理

在所有前處理試驗，汙染率皆有 60% 以上(圖 1)。前處理為未經乾燥 2 週且及去除根再乾燥一天者(R)，汙染率最高，達 85%。乾燥 2 週後且滅菌前一天先行去根者(DR)，存活率最高，可達 30%，汙染率降至 63.56%，為最佳的前處理方式。雖然，乾燥 2 週且滅菌前再去根者(D)的處理成功率有 23%，但相較於 DR 處理而言，汙染率仍高出約 14%。然而 D 處理的褐化率為 0%，為所有處理產生最低褐化率者。比較有或無乾燥 2 週之處理方式可發現，有乾燥 2 週者之存活率皆高於沒有乾燥的處理。而去根時間對於兩者之間未有明顯地差異。

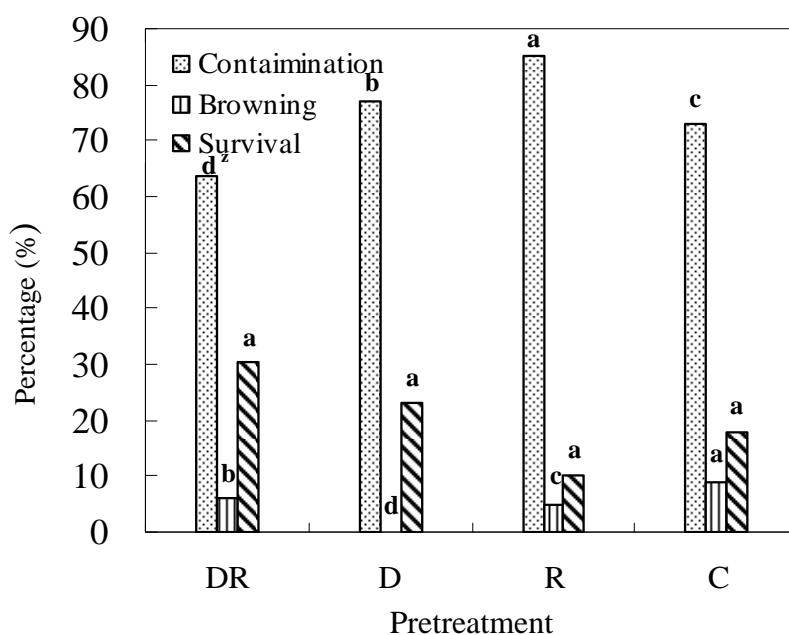


圖 1. 前處理對芭菲爾鞋蘭(*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*)初代培養的影響。

DR:乾燥 2 週後，去根後再乾燥 1 天。D:乾燥 2 週。

R:不乾燥，取下後去根再乾燥 1 天。C: 不乾燥。

z:相同字母者表示經 Duncan's 多變域分析後沒有顯著差異

Fig. 1. Effect of different pretreatments on explant survival rate, browning rate, and contamination rate in initial culture of *Paphiopedilum* (*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*).

DR:dry 2 weeks and excised root then day for 1 day. D: dry 2 weeks only.

R: excised root and dry for 1 day. C: without pretreatment.

z: Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple test at 5% level.

### (二) 滅菌時間

以含有 0.01% Tween 20 之 1% NaOCl 分別滅菌 4.5、9 或 18 分鐘，發現滅菌 4.5 分鐘者汙染率最高，達 70%，滅菌 18 分鐘者存活率為 20%(圖 2)。存活率最佳之處理為震盪滅菌 9 分鐘的處理，有 40% 的成功率。至於褐化率則以震盪處理 18 分鐘，褐化率最高(70%)。隨著滅菌時間減少，褐化率也有減少的現象。震盪滅菌 4.5 分鐘後，褐化率更只有 20%。因此，整體看來芭菲爾鞋蘭短縮莖培植體最適合滅菌之時間應是以含有 0.01% Tween 20 之 1% NaOCl 震盪處理 9 分鐘。

### (三) 培養材料的大小

以 5 片葉的植株作為培植體時，存活率可達 55%(圖 3)，為最佳處理，若用 6 片葉或 7 片葉時，存活率分別是 43% 或 12%。在此顯示培養材料之大小對於初代培養之存活率有相關，隨著葉片數的增加，存活率會有減少的現象。材料來自 7 片葉的植株存活率皆會低於 6 片葉的植株。而從初代培養後所發生的褐化反應發現，使用 5 或 6 片葉的芭菲爾鞋蘭植株進行初代培養時，褐化率為 0%。但若選用 7 片葉的植株時，褐化率則有 37%。隨著葉片數之增加，褐化率亦會有增加的情形產生。至於 3 種處理之汙染率間並無明顯地差異產生，約在 45%~60% 之間。

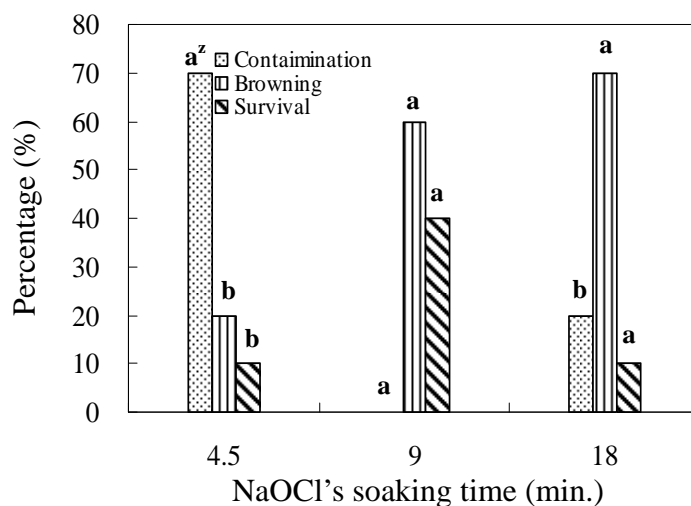


圖 2. 浸漬 1% NaOCl 對芭菲爾鞋蘭(*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*)初代培養的影響。

z: 相同字母者表示經 Duncan's 多變域分析後沒有顯著差異

Fig. 2. Effect of time in 1% NaOCl on explant survival rate, browning rate, and contamination rate in initial culture of Paphiopedilum (*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*).

z: Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple test at 5% level.

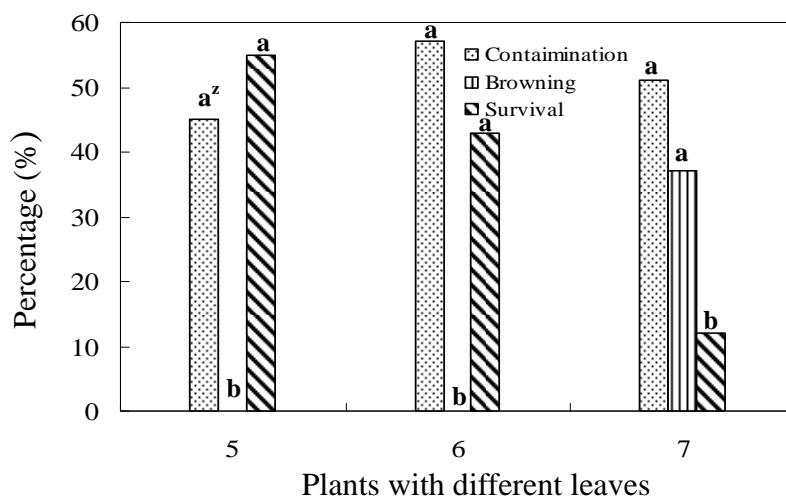


圖 3. 芭菲爾鞋蘭(*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*)植體大小對初代培養之影響。

z:相同字母者表示經 Duncan's 多變域分析後沒有顯著差異

Fig. 3. Effect of different number of leaf on explant survival rate, browning rate, and contamination rate in initial culture of Paphiopedilum (*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*).

z: Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple test at 5% level.

#### (四) BA 對初代培養的影響

初代培養中有無添加 5 ppm BA 對於選用 7 片葉植株的短縮莖培植體而言，有顯著性的差異。沒有添加 BA 者的成功率是 56.67% 比有添加者(12.33%)高。至於若選用 6 片葉植株之短縮莖培養，發現雖然培養基中有無添加 BA 對成功率而言沒有顯著性差異，但沒有添加 BA 的處理之成功率為 66.67%，仍比有添加者的成功率(43%)高，且沒有添加 5 ppm BA 的 6 片葉處理之成功率較高，為所有處理中較佳的處理(圖 4)。

在所有初代培養試驗中，暗室培養 3 週後，培植體才約有白色芽體突起(圖 5A)。待有芽體形成時，移出暗室照光培養約 1 個月後，才有淺綠色的展開葉形成(圖 5B)。芭菲爾鞋蘭植株之芽體存在於葉基部內側，且一葉基位置只會有一個腋芽，莖塊經培養之後，大部份腋芽只長一個新芽，僅少數腋芽有分化形成多芽的情形出現(圖 5C 和 D)。

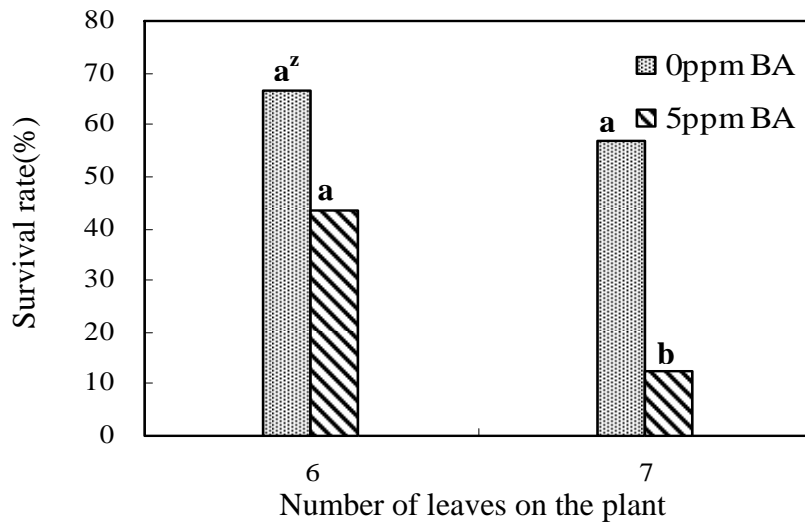


圖 4. BA 和植體大小對芭菲爾鞋蘭(*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*)初代培養的影響。

z:相同字母者表示經 Duncan's 多變域分析後沒有顯著差異

Fig. 4. Effect of BA and the numbe of leaves on explant survival rate in initial culture of *Paphiopedilum* (*Paph. delenatii*×*Paph. aremniacum*).

z: Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple test at 5% level.

## 討 論

對於芭菲爾鞋蘭組織培養而言，滅菌處理是重要的影響因子。Stewart and Button(1975)進行芭菲爾鞋蘭之組織培養時，初代培養的成功率為 23%。本試驗中先將材料斷水處理 2 週且又在滅菌前一天去除根者的成功率有 30%(圖 1)，即斷水處理可降低汙染率，此結果與蕭(2002)的研究相似。利用刀片削去不清潔的表面雖然可以提高成功率，但汙染率仍有 60% 以上(圖 1)。

芭菲爾鞋蘭初代培養之褐化反應會因滅菌之時間與次數以及培養材料大小而有不同的影響。本試驗中，以含 0.1% Tween 20 之 1% 次氯酸鈉溶液震盪滅菌 9 分鐘的效果最好，成功率有 40%，且沒有汙染產生，但褐化率則為滅菌 4.5 分鐘者之 3 倍。隨著滅菌時間之增加，褐化率也會隨之增加(圖 2)。此也與李(1995)試驗結果一致。即滅菌時間太長會造成銀葉桉培植體褐化死亡。

從結果中得知以 6 片葉植株作為培植體之成功率較 7 片葉植株者高(圖 4)。以具有 5、6 或 7 片葉之植株作為培植體之材料，則會發現 5 或 6 片葉的植株並不會產生褐化反應(圖 3)。Durand-Cresswell (1977)試驗結果顯示採用活性較佳的幼年培植體可以減少桉樹的

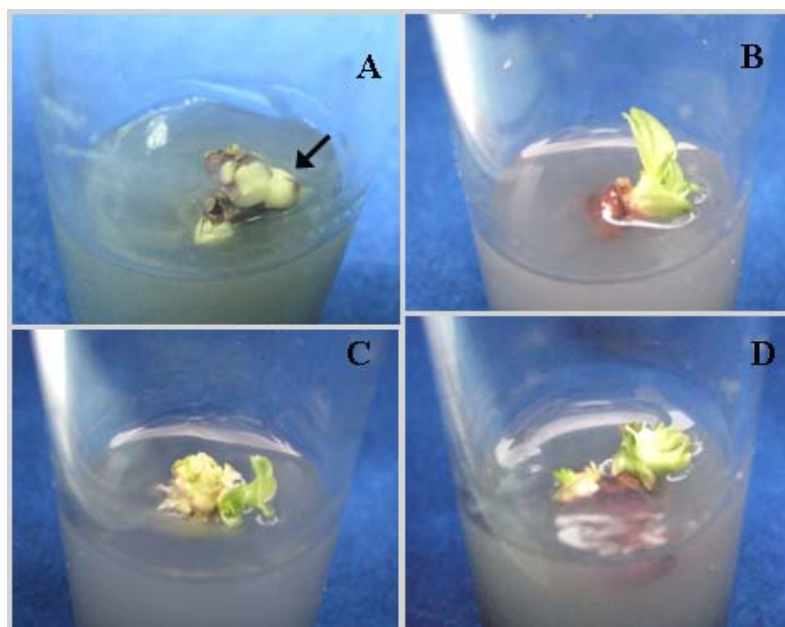


圖 5. 芭菲爾鞋蘭(*Paph. delenatii* × *Paph. aremniacum*)短縮莖初代培養在基本培養基之芽體生長狀況(A)白色芽體突起 (B)照光培養 1 個月 (C) (D)多芽之形成

Fig. 5. The growth of Paphiopedilum (*Paph. delenatii* × *Paph. aremniacum*) stem explant on the basic medium of initial culture.(A) Whiten bud sprouted.(B) Leaf growth after lighting for 1 month.(C) (D) Multiple shoots from explant.

褐化反應，然在本試驗中發現初代培養較佳的材料為發育有 5 片葉的植株。Warrag *et al.*(1990)將 *Eucalyptus grandis* hybrid 莖段培養在不含生長調節劑的培養基中，暗室培養 5 天後，可減少酚類化合物之形成且降低其對培植體生長之影響。當培植體培養在不含 BA 之初代培養基時，初代培養之成功率會優於培養在含 BA 5 mg/l 之培養基者(圖 3)。在初代培養的過程中發現，當培植體較小時，褐化情形會越嚴重。所以在進行初代培養預備試驗時，切取 2~5 mm 之莖頂培養皆有褐化之情形。此結果亦與 Yasgi and Yagi(1995)之研究相似。因此在進行芭菲爾鞋蘭之微體繁殖時，建議所選取的培植體體積越大越好，以避免嚴重的褐化反應產生。

## 參 考 文 獻

- 李秋梅. 1995. 銀葉桉微體繁殖之研究. 碩士論文. 國立中興大學園藝研究所. 107pp.
- 蔡瑜卿. 2007. 仙履蘭種苗出口現況. 仙履蘭產品發展座談會書面資料. p.8-15.
- 林永浩. 1998. 芭菲爾鞋蘭與石斛蘭之組織培養. 碩士論文. 中國文化大學生物科技研究所. p.20-30.
- 洪寶瑩. 2004. 芭菲爾鞋蘭、文心蘭、軛瓣蘭及堇蜘蛛蘭之微體繁殖. 碩士論文. 國立台灣大學園藝研究所. p.5-12
- 陳婷玉. 2000. 六種芭菲爾鞋蘭之組織培養. 碩士論文. 國立台灣大學園藝研究所. 55pp.
- 蕭伊芸. 2002. 乳羅黛粉葉誘變種之微體繁殖與再誘變. 碩士論文. 國立中興大學園藝所. 61pp.
- Duran-Cresswell, R. and C. Nitsch. 1977. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. *Acta Hort.* 78:149-155.
- Huang, L.C. 1988. A procedure for asexual multiplication of paphiopedilums in vitro. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 57 : 274-278.
- Kawase, K. 1990. Clonal propagation of paphiopedilum by tissue culture.
3. Effect of flower age on PLB formation and vegetative growth of undeveloped buds. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 59(Suppl. 2):666-667.
- Kawase, K. 1994. Clonal propagation of paphiopedilum by tissue culture.
4. Formation and culture of knot-like-tissues and shoots from ovaries and flower stalks. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63(Suppl. 2):514-515.
- Kawase, K. 1995a. Induction of embryoids in shoot apex culture of *Paphiopedilum*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64(Suppl. 2):52-53.
- Kawase, K. 1995. Inflorescence culture in species of *Paphiopedilum*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66(Suppl. 1):512-513.
- Kawase, K. 1997. Inflorescence culture in species of *Paphiopedilum*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 66(Suppl. 1):512-513.
- Stewart, J. and J. Button. 1975. Tissue culture studies in paphiopedilum. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 44:591-599.
- Tanaka, M., M. Tsutsui, E. Ohno, T.S. Zhou, and T. Takamura. 1995. Micropropagation of *Paphiopedilum*. 1. Plantlet formation in cultured transverse thin sections from seedlings grown in vitro. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64(Suppl. 2):596-597.
- Tanaka, M., E. Ohno, T. Takamura, and T.S. Zhou. 1996. Micropropagation of *Paphiopedilum*. 2. Induction of plantlets as the TTS sources from cultured terminal buds of flower stalks. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 65(Suppl. 2):630-631.



- Warrag, E. I., M. S. Lesney, and D. L. Rockwood. 1990. Microproagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrid. *New Forests* 4:67-79.
- Yasugi, S. and N. Yagi. 1995. Mericlinal plantlet formation in *Paphiopedilum* by shoot tip culture. 1. Some effecting factors on shoot and root formation. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64(Suppl. 1):516-517.

## The Establishment of *Paphiopedilum in Vitro*.

Hui-I Huang<sup>1)</sup> Chien-Young Chu<sup>2)</sup>

Key words: *Paphiopedilum*, Initial culture, Survival rate

### Summary

The clonal plants of blossomed *Paphiopedilum* (*Paph. delenatii* × *Paph. armeniacum*) hybrids propagated by division were used as materials for initial culture. It succeeded to develop lateral shoots from the stem explants. When the material drought for two weeks before culture, the survival rate increased. To sterile by 10% NaOCl with 0.1% Tween 20 for 9 minutes resulted in higher survival rate. Also, material with five leaves resulted in higher survival rate. Moreover, explants cultured on hormone free medium enhanced the survival rate to 66.7%.

---

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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