

除葉及刺傷處理對仙履蘭芽體增殖之影響

丁昭伶*、何超然

行政院農業委員會苗栗區農業改良場

摘 要

仙履蘭花型、花色奇特多變，是一極具市場發展潛力的蘭科植物，惟其微體繁殖技術尚未建立致產業發展受限。本研究先以市場上商業流通較普及之仙履蘭斑葉單花中的 *Paphiopedilum Hung Sheng Red Apple* 及 *Paph. Hung Sheng Magic* (Maudiae type) 開花株側芽建立分生芽體，再以其為培植體探討除葉及刺傷處理對芽體增殖之影響。結果顯示，‘Magic’ 分生芽體經除葉處理後培養於添加 3 mg/L BA 之 1/4 MS 可誘導多芽體，每一培植體平均可獲得 2.6 個芽體，顯著高於未除葉之處理；只除葉而不添加 BA 之處理其平均芽體數為 2.2 亦高於未除葉之處理，惟差異不顯著。刺傷處理亦可提高 ‘Magic’ 分生芽體之增殖數，芽體莖基部位經刺傷處理後培養於不論是否添加 3 mg/L BA 之 1/4 MS，其芽體增殖數均高於未刺傷之處理，其中又以刺傷組合 BA 處理之平均芽體數最多達 2.4 個，顯著高於未刺傷之處理；另比較刺傷處理對 ‘Red Apple’ 及 ‘Magic’ 兩品種芽體增殖之影響顯示，刺傷處理可顯著提高兩品種之芽體增殖數，且對兩品種芽體增殖之差異不顯著，其中 ‘Red apple’ 刺傷處理之平均芽體數為 2.4，未刺傷之對照為 1.1；‘Magic’ 刺傷處理之平均芽體數亦為 2.4，未刺傷之對照為 1.5。本試驗採用之仙履蘭品種經除葉或刺傷處理增殖所得之芽體均生育良好。

關鍵詞：仙履蘭、除葉處理、刺傷處理、芽體增殖

前 言

仙履蘭為蘭科杓蘭亞科植物的總稱，包含芭菲爾鞋蘭屬 2017 苗栗縣樂活長青會員名冊 (*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 (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora; CITES, 2008) 保護之植物。仙履蘭花朵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。其中芭菲爾鞋蘭屬

*論文聯繫人
e-mail: ding@mdais.gov.tw

的種類及商業化栽培最多，目前商業栽培仍以無菌播種實生苗為主，此法可獲得大量植株，但無法維持親本特性且個體間差異大；而無性分株繁殖雖可維持親本性狀，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生產方式，然仙履蘭組織培養困難，相關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仙履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)或頂芽(Chen *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001)等培植體成功誘導植株，惟仙履蘭品種間之特性差異極大，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研究。

早期仙履蘭微體繁殖之培植體大都取自無菌播種實生瓶苗，以實生瓶苗為繁殖材料可避免培植體消毒殺菌不易之問題，但相對無法確保植株性狀是否良好，近來因應產業需求以優良單株之花芽(Liao *et al.*, 2011)或側芽為材料的研究日受重視。但因取自田間的培植體消毒困難、易污染及褐化且增殖速率及倍數低等問題，導致仙履蘭至今尚無法建立具商業價值的分生苗生產技術。前人研究指出變葉木培植體經除葉處理之側芽數顯著高於未除葉之對照(Orlikowska, *et al.*, 2000)，而 *Paph. delenatii* 無菌播種實生苗組合創傷、液體培養及 TDZ 處理可得到最高之芽體增殖率(Nhut, *et al.*, 2005)。本研究以目前市面流通較普及的

斑葉單花(*Maudiae* type)為試驗材料，探討除葉處理及刺傷處理對仙履蘭芽體增殖之影響，以期提供仙履蘭分生繁殖技術之參考。

材料及方法

一、植物材料

本研究之試驗材料為購自彰化縣妙華蘭園編號 3992 之 *Paphiopedilum* Hung Sheng Red Apple (Pulsar x Shin-Yi Apple)，簡稱 ‘Red Apple’ 及編號 4031 之 *Paph.* Hung Sheng Magic (Shin-Yi Heart x Hung Sheng Star)，簡稱 ‘Magic’ 兩個斑葉單花種 (*Maudiae* type)具側芽之開花株。

二、試驗方法

(一) 初代培養

取 ‘Red Apple’ 及 ‘Magic’ 開花株之側芽為培植體，先用清水洗淨再以 1% 次氯酸鈉加 2 滴 Tween-20 展著劑消毒 10~15 分鐘，於無菌操作臺用無菌水沖洗 3~4 次，再剝除外葉並切取含有頂芽之莖基段，移植於 1/4 量 MS (Murashige and Skoog, 1962)、添加 20 g/L 蔗糖、8 g/L 洋菜(Difco Bacto-agar)及 3 mg/L BA(6-benzyladenine)，pH 5.7 之初代培養基，進行初代培養。

培養環境之光強度為 18~26 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Gro-Lux 生長燈)，光週明期為 16 小時，暗期為 8 小時，溫度 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ ，待芽體增殖後進行下列試驗。

(二) 除葉處理及 BA 對 'Magic' 芽體增殖之影響

以初代增殖培養高約 2 cm 之芽體進行下列試驗處理：1、將分生芽體短縮莖上方約 0.5 cm 以上的葉片切除，培養於無添加或 3 mg/L BA 之 1/4 MS 培養基；2、芽體不除葉培養於無添加或 3 mg/L BA 之 1/4 MS 培養基，以不除葉且不添加 BA 之處理為對照，共 4 處理，每處理 5 重複，每重複 3 個培植體，培養環境之光照及溫度同初代培養。每月調查芽體生育情形（包括芽體數、芽體高度、芽體寬度、根數及根長）。

(三) 刺傷處理及 BA 對 'Magic' 芽體增殖之影響

以初代增殖培養高約 2 cm 之芽體進行下列試驗處理：1、以直徑約 0.3 mm 之細針刺傷分生芽體短縮莖部位，每培植體刺傷 4~5 次後培養於無添加或 3 mg/L BA 之 1/4 MS 培養基；2、芽體

不行刺傷處理直接培養於無添加或 3 mg/L BA 之 1/4 MS 培養基，以不刺傷且不添加 BA 之處理為對照，共 4 處理，每處理 4 重複，每重複 3 個培植體，培養環境之光照及溫度同初代培養。每月調查芽體增殖情形。

(四) 刺傷處理對不同品種仙履蘭芽體增殖之影響

將 'Red apple' 及 'Magic' 兩品種初代增殖培養高約 2 cm 之芽體，以直徑約 0.3 mm 之細針刺傷莖節部位，每培植體刺傷 4~5 次，以不刺傷為對照，培養於添加 3 mg/L BA 之 1/4 MS 培養基，共 4 處理，每處理 4 重複，每重複 3 個培植體，培養環境之光照及溫度同初代培養。每月調查芽體增殖情形。

三、統計分析

試驗採完全隨機設計，統計軟體為 SAS，以最小顯著差異法 (LSD, least significant different) 分析各處理有無顯著性差異 ($P \leq 0.05$)。

結果與討論

一、除葉處理及 BA 對 'Magic' 芽體增殖之影響

仙履蘭 'Magic' 行除葉及 BA 處理

經 3 個月培養後，其芽體增殖以除葉配合 3 mg/L BA 處理之芽體增殖數最高，每一培植體之平均芽體數為 2.6 顯著高於未除葉之處理，只行除葉未添加 BA 處理之平均芽體數為 2.0 亦高於未除葉之處理，但差異不顯著，而 BA 添加與否對未除葉培植體之芽體增殖亦無顯著差異。只行除葉處理之平均芽體高度為 2.22 cm，顯著低其他處理，其中除葉並添加 3 mg/L BA 之平均芽體高度為 3.42 cm、不除葉但添加 BA 處理之平均芽體高度為 3.40 cm，不除葉也不添加 BA 之對照為 3.32 cm，三者間差異不顯著。芽體寬度部分，各處理間差異不顯著，但以只行除葉處理之 3.32 cm 較寬。而在根數和根長方面，除葉配合 3 mg/L BA 處理之平均根數及根長均為 0 顯著低於其他處理（表一）。

二、刺傷處理及 BA 對 'Magic' 芽體增殖之影響

'Magic' 以刺傷及 BA 處理經 2 個月培養後，由複因子變方分析結果顯示刺傷處理及 BA 兩因子對 'Magic' 之芽體增殖不具交感作用。各處理之芽體增殖以刺傷組合 BA 處理之芽體數最高，每一培植體之平均芽體數為 2.4 顯著高於未刺傷之處理，但與單獨刺傷處理未具顯著差異。單獨刺傷處理其每一培植體之平均芽體數為 1.8 亦顯著高於未刺傷及不添加 BA 之對照（平均芽體數為 1），但和只添加 BA 處理之 1.5 個芽體數未具顯著差異，另單獨 BA 處理之平均

芽體數雖和對照不具顯著差異但芽體數較高（圖一）。

三、刺傷處理對不同品種仙履蘭芽體增殖之影響

'Red apple' 及 'Magic' 芽體經刺傷處理後培養於添加 3 mg/L BA 之 1/4 MS，以不刺傷為對照，經 2 個月培養後調查其芽體增殖情形，結果以刺傷處理可獲得較多之芽體數，'Red apple' 經刺傷處理其每一培植體之平均芽體數為 2.4 顯著高於未刺傷對照之 1.1 個芽體；'Magic' 經刺傷處理其每一培植體之平均芽體數為 2.4 亦顯著高於未刺傷對照之 1.5 個芽體，另刺傷與否對兩品種根長之表現不具顯著差異，但 'Magic' 刺傷處理之根長較不刺傷之對照長（表二）。

本試驗之仙履蘭 'Magic' 只行除葉處理或除葉配合 BA 處理可獲較多之芽體數，芽體經除葉後可促進莖節部位側芽之萌發（圖二），且經繼代培養之芽體生育情形良好，此結果和前人研究除葉有利芽體增殖之結果相同。一般認為植物體內之生長素及其向基部運移之特性，與植物體之頂芽優勢有關並進而控制其形態發生和作用，藉由降低生長素含量可打破頂芽優勢並促進側芽及不定芽之活性。前人研究指出聖誕紅利用去頂處理可移除植株頂端葉片對側芽活性所產生之抑制作用(Wilkins, 1988)。變葉木培植體經除葉處理獲得之側芽數顯著高於未除葉之對照，另由除葉配合外加 IAA 處理而降低培植體總芽數之結果證實 IAA 會抑制側芽之發生，去除葉片則能降低內生 IAA 的總量，而有利側芽

airiti

之發生(Orlikowska, *et al.*, 2000)。 *Paph. delenatii* 無菌播種 6 個月大之實生苗於創傷及液體培養之組合條件下，有高頻度不定芽之發生，當再添加 1.0 mg/L TDZ 時可得到最高之芽體增殖率，其認為培養基中的刺激物質如植物生長調節劑會讓創傷細胞產生不定芽(Nhut, *et al.*, 2005)，另利用垂直、水平及十字等不同切割方式處理培植體皆可有效提高芽體增殖率，其中以垂直切法之芽體增殖數最高(Udomdee *et al.*, 2012)，創傷有利芽體增殖和本文利用莖基刺傷而促進芽體增殖之結果一致。

本研究 ‘Magic’ 在刺傷與 BA 處理試驗中，單獨添加 BA 處理之平均芽體增殖數雖然比不刺傷也不添加 BA 之對照高，但不具顯著差異。

‘Magic’ 開花株分生芽體短縮莖以細針進行創傷處理其芽體增殖數顯著高於未刺傷且未添加 BA 之對照，其中又以刺傷配合 BA 處理獲得之芽體數最多，但與單獨刺傷處理之差異不顯著，另單獨刺傷處理雖然與只添加 BA 處理之差異不顯著，但芽體數較多，綜合結果顯示刺傷對芽體增殖之效益大於 BA，而 BA 有提高刺傷對芽體增殖作用之趨勢。細胞分裂素常被應用於組織培養中以提高芽體增殖數，但其作用會因細胞分裂素種類（如：BA、TDZ、Kinetin 等）、濃度、作物種類、培植部位（如芽、莖、葉等）及培植方式等不同而有差異，適宜之條件可促進芽體增殖，反之也有可能降低或抑制芽體之增殖，仙履蘭 Delrosi 品種實生苗芽體培養於單獨添加不同濃度之 TDZ、BA 及 Kinetin 或

各別組合不同濃度之 2,4-D 其芽體增殖表現不同，其中以單獨添加 0.45 μ M TDZ 之芽體增殖數最高且顯著高於完全不添加植物生長調節劑之對照，而添加 4.44 或 8.88 μ M BA 之芽體增殖數雖然較對照高但差異不顯著(Thongpukdee *et al.*, 2013)。

本研究採用之刺傷及除葉處理對仙履蘭兩品種芽體增殖均具有顯著促進作用（除葉對 ‘Red apple’ 芽體增殖之數據本文中未顯示），且刺傷對兩雜交品種芽體增殖之效應並無顯著差異，兩品種莖基部位經刺傷後可顯著刺激側芽之發生（圖三），且增殖之芽體經分切繼代培養後生育情形良好。Chen 等人（2002）指出不同品種之仙履蘭在相同培植條件下之表現差異大，這也是仙履蘭微體繁殖不易建立商業生產體系的主因之一，個體間差異大不僅造成試驗因子不好控制亦難以類推適用於不同品系（種）作物，本研究採行之除葉及刺傷方法對供試之兩仙履蘭品種均可顯著提高芽體增殖數不受品種差異之影響。

表一 除葉處理及添加 BA 對仙履蘭 *Paphiopedilum Hung Sheng Magic* 芽體增殖之影響
 Table 1. Effect of defoliation and BA on shoot propagation of the *Paphiopedilum Hung Sheng Magic*

Treatment	BA (mg/L)	No. shoots	High of shoot(cm)	Width of shoots (cm)	No. of roots	Length of root (cm)
Defoliation	3	2.6 ± 0.5 ^Y a ^Z	3.42 ± 0.22 a	2.38 ± 0.22 a	0.0 ± 0.0 b	0.00 ± 0.00 b
Defoliation	0	2.0 ± 0.6 ab	2.22 ± 0.52 b	3.32 ± 0.17 a	1.0 ± 0.5 a	1.98 ± 0.63 a
Non-defoliation	3	1.0 ± 0.0 b	3.40 ± 0.30 a	2.46 ± 0.07 a	1.0 ± 0.3 a	1.66 ± 0.45 a
Non-defoliation	0	1.2 ± 0.2 b	3.32 ± 0.16 a	2.50 ± 0.23 a	1.0 ± 0.3 a	1.52 ± 0.44 a

^Y Average ± S.E.

^Z Mean separation within columns by LSD at $P \leq 0.05$

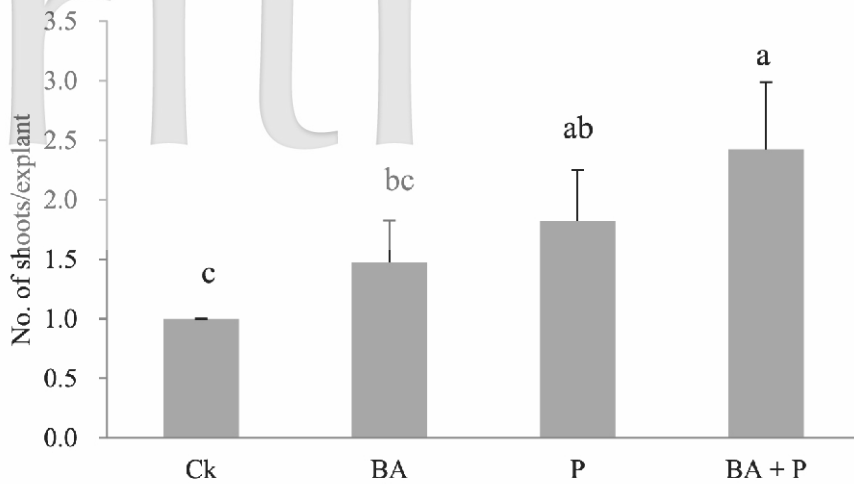
表二 刺傷處理對仙履蘭 *Paphiopedilum Hung Sheng Red apple* 及 *Paph. Hung Sheng Magic* 芽體增殖之影響

Table 2. Effect of pierced on shoot propagation of the *Paphiopedilum Hung Sheng Red apple* and *Paph. Hung Sheng Magic*

Treatment	Cultivar	No. of shoots	No. of roots (cm)
Pierced	Red apple	2.4 ± 0.3 ^Y a ^Z	0.3 ± 0.11 a
Pierced	Magic	2.4 ± 0.2 a	0.4 ± 0.21 a
Non-pierced	Red apple	1.1 ± 0.1 b	0.3 ± 0.11 a
Non-pierced	Magic	1.5 ± 0.1 b	0.1 ± 0.1 a

^Z Mean separation within columns by LSD at $P \leq 0.05$

^Y Average ± S.E.



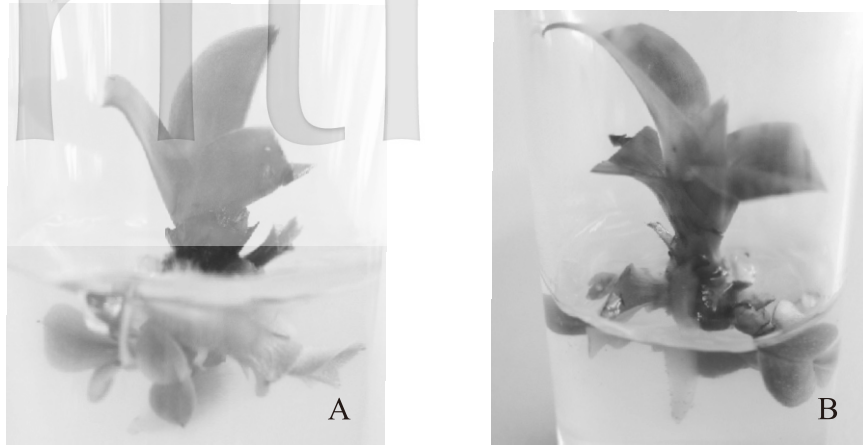
圖一 短縮莖刺傷及 BA 處理對仙履蘭 *Paphiopedilum* Hung Sheng Magic 芽體增殖之影響 (Ck: 對照組不添加 BA 及刺傷; BA: 添加 3 mg/L BA; P: 刺傷處理; BA+P: 刺傷處理並添加 3 mg/L BA)。

Fig. 1. Effect of pierced on shoot propagation of the *Paphiopedilum* Hung Sheng Magic (Ck: without BA and pierced; BA: addition of 3 mg/L BA; P: pierced; BA + P: pierced combinations with 3 mg/L BA)



圖二 仙履蘭 *Paphiopedilum* Hung Sheng Magic 除葉處理 (B) 及未除葉 (A) 經三個月培養後芽體生長之情形。

Fig. 2. The growth of *Paphiopedilum* Hung Sheng Magic with (B) or without (A) defoliation for 3 months.



圖三 仙履蘭 *Paphiopedilum* Hung Sheng Red Apple (A) 及 *Paph.* Hung Sheng Magic (B) 雜交品系刺傷處理經二個月培養後芽體生長之情形。

Fig. 3. The growth of *Paphiopedilum* Hung Sheng Red Apple (A) and *Paph.* Hung Sheng Magic (B) with pierced for 2 months.

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：102農科-9.2.3-苗-M2；103農科-9.1.1-苗-M2），何慧姨小姐在實驗上之協助及妙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.

Nhut, D. T., P. T. T. Trang, N. H. Vong, D. T. T. Thuy, and D. V. Khiem. 2005. A wounding method and liquid culture in *paphiopedilum delenatii* propagation. *Propagation of Ornamental Plants.* 5(3): 158-163.

Orlikowska, T., I. Sabala, and D.

Kucharska. 2000. The effect of leaf and shoot tip removal and explants orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. Cv. Excellent. *Scientia Hort.* 85: 103-111.

Thongpukdee, A., E. Nisayan, and C. Thepsithar. 2013. Multiple shoot formation of *Paphiopedilum* 'Delrosi'. *Int'l Schol. Sci. Res. & Innov.* 7(6): 399-402.

Udomdee, W., P. J. Wen, S. W. Chin, and F. C. Chen. 2012. Shoot multiplication of *Paphiopedilum* orchid through in vitro cutting methods. *Afr. J. of Bio.* 11(76): 14077-14082.

Wilkins, H. F. 1988. Techniques to maximize cutting production. *Acta Hort.* 226: 137-143..

Effect of defoliation and pierced treatment on *Paphiopedilum*

Chao-Ling Ting* and Chao-Jan Ho

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

ABSTRACT

Paphiopedilum is charming for its flower shape and color diversity and is a potential orchid crop in the market; however, the mass propagation is a bottleneck limited the industry development. In this study, side bud of *Paphiopedilum* Hung Sheng Red Apple and *Paph.* Hung Sheng Magic (Maudae type) flowering plant, commonly seen in the market, were choose to establish meristem plantlet as explants and was being used to study the effect of defoliation and pierced treatment. Results showed that the bud proliferation number of Magic cultivar explants was 2.6 and 2.2 after defoliation and incubation with and without 3 mg/L BA for 3 months, respectively, but only the previous were higher than that of un-defoliation control significantly. Stem base pierce treatment could increase number of the meristem plantlet in Red Apple cultivar and Magic cultivar. The plant proliferation number of Magic cultivar in pierced treatment was higher than that of un-pierced one no matter it was culture with or without 3 mg/L BA in 1/4 MS medium. The highest proliferation number was 2.43 in pierce treatment and culture in 3 mg/L medium, and was higher than that of un-pierced control significantly. The proliferation number of Red Apple and Magic cultivars was 2.40 and 2.42 higher than that of the untreated control 1.12 and 1.48, respectively. Bud after defoliation and pierce treatment were well development in this study.

Keywords: *Paphiopedilum*, defoliation, periced, propagation

*Corresponding author, ding@mdais.gov.tw