

穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響

陳威臣¹ 曹進義¹ 吳姿穎² 夏奇鈺^{3,*}

摘要

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈺。2020。穀胱甘肽對孤挺花組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響。台灣農業研究 69(4):312–325。

本研究以孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 「紅獅」(‘Red Lion’) 與「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 組培鱗莖與出瓶苗為材料，探討穀胱甘肽 (glutathione) 對組培苗瓶內增殖與瓶外生長之影響。利用「紅獅」1/4 組培鱗莖於含有不同濃度之還原態穀胱甘肽 (reduced glutathione; GSH) 或氧化態穀胱甘肽 (oxidized glutathione; GSSG) 之液態培養基中，於 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照光環境下振盪處理 1 h 或 2 h，再將培植體接續培養於含有 3% 蔗糖、 1.0 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS 固態培養基中，培養於 $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光環境下進行試驗。結果顯示，以 $65.00 \mu\text{M}$ GSH 溶液振盪處理 2 h，再於照光環境下培養 12 wk 後，每個鱗莖可得 14.7 苗為最多。將「千禧之星」1/4 組培鱗莖培養於含有不同濃度 GSH 或 GSSG 液態培養基中，於 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照光環境下進行振盪培養試驗，結果顯示 $65.00 \mu\text{M}$ GSH 4 wk 培養有助於提高組培苗之增殖效率；延長培養至 8 wk 時，則 GSH 與 GSSG 處理組與對照組之間並無顯著差異；再延長培養至 12 wk 時，則以 $16.25 \mu\text{M}$ GSSG 處理組每個組培鱗莖可誘得 8.7 苗，顯著高於對照組。以鱗莖直徑約 12 mm 或 8 mm 之「紅獅」出瓶苗於溫室栽培，並於第 9 週開始噴施不同濃度穀胱甘肽溶液，而後每 4 週噴施一次，共處理 5 次。停止噴施 7 wk 後，調查植株生長情形。結果顯示大苗鱗莖方面，僅 $162.80 \mu\text{M}$ GSSG 處理組之葉片鮮重與全株鮮重顯著高於對照組；在小苗鱗莖方面，則以 $162.80 \mu\text{M}$ 與 $325.70 \mu\text{M}$ GSSG 處理組之全株鮮重顯著高於對照組。綜合上述結果顯示，「紅獅」培植體以 $65.00 \mu\text{M}$ GSH 溶液搭配 2 h 振盪處理，可獲得最高之瓶苗增殖率。「紅獅」組培苗於出瓶 8 wk 後，每 4 週噴施一次 $162.80 \mu\text{M}$ GSSG 溶液，總計噴施處理 5 次後，可增大鱗莖直徑與提高植株鮮重。

關鍵詞：華胄蘭、氧化態穀胱甘肽、還原態穀胱甘肽、光照處理、馴化。

前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 為石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生鱗皮鱗莖花卉，別稱百支蓮、華胄蘭及喇叭花；栽培品種具有多樣化之花型與花色，其花朵碩大且色彩豔麗，廣泛應用於盆花、切花及花壇植物 (De Bruyn 1997; Chen & Wang 2000; Liu *et al.* 2005; Sultana *et al.* 2010)。近年來，台灣公民營單位陸續推出孤挺花新品種，但在推廣初期常面臨種苗

不敷供應之困境。植物組織培養技術具有高繁殖倍率之優點，是快速量產孤挺花新品種種苗的有效方法 (Siddique *et al.* 2007; Shao & Shi 2008; Sultana *et al.* 2010; Chen *et al.* 2017)。Chen *et al.* (2017) 以孤挺花「紅獅」(*H. hybridum* ‘Red Lion’)、「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 及「台農 1 號」(‘Tainung No.1’) 之鱗莖為材料，成功建立其組培繁殖方式。並利用添加多效唑 (paclobutrazol; PBZ)、添加蔗糖與活性炭及

投稿日期：2020 年 4 月 7 日。接受日期：2020 年 9 月 29 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

液態培養等方式，促進組培鱗莖之生長，然而在組培苗增殖與鱗莖養成效率上仍有改善空間 (Chen *et al.* 2018; Chen *et al.* 2019)。前人研究指出，孤挺花組培苗在量化過程中，培植體容易出現玻璃質化與褐化現象亦有待克服 (De Bruyn 1997; Chen & Wang 2000; Chen *et al.* 2018)。

植物培植體在組織培養繁殖過程中受到遺傳與環境因子的影響，常出現細胞頑抗化 (recalcitrance)、玻璃質化 (hyperhydricity) 及體細胞變異 (somaclonal variation) 等現象，阻礙培植體之生長、分化或增殖，推測係因培養基或培養環境之逆境所造成 (Cassells & Curry 2001; Şen 2012)。Nomura *et al.* (1998) 指出，植物細胞在培養過程係處於氧化逆境狀態，導致細胞生長與增殖受抑制，若能增加細胞對逆境的抗性，可減少上述生理障礙，進而提升細胞分化與增殖能力。穀胱甘肽 (glutathione) 是維持細胞氧化還原平衡的重要物質，其抗氧化能力具有緩解極端溫度或重金屬離子對植物造成之傷害 (Cassells & Curry 2001; Yeung *et al.* 2005; Tyburski & Tretyn 2010; Şen 2012; Yan *et al.* 2013)。據此推論，施用 GSH 應該有助於細胞維持於還原狀態，進而降低氧化逆境對植物造成的傷害。

過去研究指出，施用 GSH 可有效降低蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 組培苗、蘋果 (*Malus pumila*) 及開心果 (*Pistacia vera*) 莖頂培植體之褐化率，同時促進蝴蝶蘭、蘋果及開心果組培苗之生長與增殖 (Nomura *et al.* 1998; Liu *et al.* 2005; Tabiyeh *et al.* 2006)。施用 GSH 具有增加菸草 (*Nicotiana tabacum*) 組培苗鮮重的效果 (Son *et al.* 2014)。過去研究均以施用還原態穀胱甘肽 (reduced glutathione; GSH) 居多，而在氧化態穀胱甘肽 (oxidized glutathione; GSSG) 的研究則相對較少。本研究以不同濃度之 GSH 或 GSSG 溶液處理孤挺花組培鱗莖培植體，或添加於培養基進行共培養，探討穀胱甘肽對組培苗生長與增殖的影響。此外，利用不同濃度之 GSH 或 GSSG 溶液噴施溫室栽培的出瓶苗，探討穀胱甘肽對出瓶苗生長之影響，期能開發提升組培苗繁殖與生長效率之方法，進而加速新品種之上市與推廣。

材料與方法

材料來源、培養基配製及培養條件

本研究利用孤挺花「紅獅」(‘Red Lion’) 與「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 組培苗為材料。培養基配製與組培苗繁殖方法參閱 Chen *et al.* (2017)、Chen *et al.* (2018)、Chen *et al.* (2019)。穀胱甘肽具有還原態 (GSH) 及氧化態 (GSSG) 兩種型態，均由台灣鐘化股份有限公司 (台灣台北市) 提供。由於 2 個 GSH 可經由穀胱甘肽氧化酵素 (glutathione peroxidase; GSH-Px) 氧化成 GSSG，而 GSSG 則透過穀胱甘肽還原酵素 (glutathione reductase; GSH-Rx) 還原成 2 個 GSH。因此，本研究中 GSH 處理濃度係以 GSSG 處理濃度之 2 倍為其對應濃度，進行穀胱甘肽相關濃度試驗。培植體接種於含 20 mL 固態或液態培養基之 125 mL 三角瓶中，培養環境為 $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，液態培養則置於水平迴轉式振盪器 (SK-302AB，三寬有限公司，台灣台中市) 以 100 rpm 速度進行培養。

穀胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響

選取鱗莖直徑約為 7–8 mm 之「紅獅」組培苗為材料，切除葉片與根部後，將鱗莖十字縱切成 1/4 鱗莖作為培植體，穀胱甘肽溶液以 0.22 μm 微孔濾膜 (Millex[®], Merck, Darmstadt, Germany) 過濾備用。將培植體接種於無菌水 (對照組)、32.50 μM 、65.00 μM GSH 或 16.25 μM 、32.50 μM GSSG 溶液中，在 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光或黑暗環境下振盪培養 1 h 或 2 h，而後接續培養於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} 6-苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 固態培養基，再置於 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光或黑暗環境下培養。培養達 8 wk 或 12 wk 後，調查每一鱗莖誘導形成之組培苗數。本試驗採 3 重複，每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖為 1 重複。

穀胱甘肽於低照度環境下液態振盪培養對孤挺花「千禧之星」組培苗增殖之影響

利用與上述試驗相同方法以「千禧之星」

1/4 鱗莖為培植體，接種於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 液態培養基，分別添加穀胱甘肽使濃度為 32.50 μM、65.00 μM GSH 或 16.25 μM、32.50 μM GSSG。培植體於 10 μmol m⁻² s⁻¹ 低照度環境下振盪培養達 4、8 與 12 wk 後，調查具有綠葉之組培苗數。本試驗採 3 重複，每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖為 1 重複。

穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響

選取直徑約 5–6 mm 鱗莖之「紅獅」組培苗為材料，切除部分葉片與根系後（葉與根均保留約 3–5 mm）為培植體，培植體接種於含有 6% 蔗糖、1.0 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 固態培養基中培養 12 wk 後，將出瓶苗洗淨後，先以免賴得 (Benomyl) (50% 可濕性粉劑) 1,000× 溶液浸泡 30 min，取出晾乾後再進行種植。依出瓶苗鱗莖大小分為大苗（鱗莖直徑約 12 mm）與小苗（鱗莖直徑約 8 mm），切除部分葉片與根系後（葉片與根系分別保留 5 cm 與 3 cm），種植於盛裝混合介質（泥炭苔：蛭石：珍珠石 = 2：1：1；v/v/v）之 35 孔穴盤，栽培於具有風扇與水牆之溫室環境下，第 9 週開始進行穀胱甘肽處理，分別為 0.0、162.8、325.7、651.4 μM GSH 與 0.0、81.4、162.8、325.7 μM GSSG，每 4 週噴施一次，直到第 25 週共處理 5 次，每 15 株噴施量約為 50 mL。處理結束 7 wk 後，調查鱗莖直徑與鮮重、葉重、葉數、葉長及葉寬。本試驗自 7 月開始至隔年 1 月結束，溫室環境於 7 月至 9 月利用雙層（80% 與 60%）黑網遮光，高低溫分別約 32°C 與 25°C，而 10 月至隔年 1 月則為單層 60% 黑網遮光，高低溫分別約 27°C 與 18°C。本試驗採用 3 重複，每重複為 5 株出瓶苗。

試驗設計和統計分析

本研究採完全隨機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 比較各處理平均值間之差異。

結果

穀胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響

鱗莖培植體以不同形態與濃度之穀胱甘肽溶液於 10 μmol m⁻² s⁻¹ 低照光環境下，振盪處理 1 h 或 2 h 後接種於固態培養基，接續培養於 38 μmol m⁻² s⁻¹ 照光或黑暗環境下，對「紅獅」組培苗增殖影響結果如表 1 所示。照光下培養之變方分析 (ANOVA) 顯示，在培養 8 wk 後，振盪處理時間與穀胱甘肽處理對組培苗增殖分別具有顯著 ($P < 0.05$) 與非常顯著 ($P < 0.001$) 的影響，但兩者間並無顯著交感效應；而在培養 12 wk 後，振盪處理時間與穀胱甘肽處理對組培苗增殖分別具有極顯著 ($P < 0.01$) 與非常顯著的影響，且兩者間具有極顯著交感效應。組培苗增殖結果顯示，照光培養 8 wk 後，65.00 μM GSH 與 32.50 μM GSSG 振盪 2 h 處理組可得最高之 12.3 苗，但和 32.50 μM GSSG 振盪 1 h 處理組與對照組之間並無顯著差異；而在培養 12 wk 後，仍以 65.00 μM GSH 振盪 2 h 處理組保有最高苗數為 14.7 苗，與 32.50 μM GSSG 振盪培養 2 h 處理組雖無顯著差異，但仍顯著大於其餘處理組與對照組 (表 1)。

黑暗下培養之變方分析 (ANOVA) 結果顯示，在培養 8 wk 後，振盪處理時間對組培苗增殖具有顯著的影響，而穀胱甘肽處理與兩試驗因子間交感效應均無顯著影響。培養 12 wk 後，穀胱甘肽處理對組培苗增殖並無顯著影響，但振盪處理時間與兩試驗因子間交感效應分別有非常顯著與顯著影響。組培苗增殖結果顯示，黑暗培養環境下之組培苗增殖較照光環境為差，培養 8 wk 後之苗數約在 5.7–7.3 苗之間，各處理組與對照組間並無顯著差異；培養 12 wk 後，65.0 μM GSH 振盪 1 h 處理組所得苗數達 9.7 苗，顯著高於其餘處理組與對照組，而其餘處理組與對照組間之差異均不顯著 (表 1)。

圖 1 係 1/4 鱗莖於不同濃度穀胱甘肽溶液振盪處理後於固態培養基中，分別於照光或黑暗環境下培養 8 wk 後之組培苗生長情形，顯

表 1. 穀胱甘肽處理濃度與時間在照光或黑暗條件下對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響。

Table 1. Effect of glutathione and shaking time on *in vitro* proliferation of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plantlets under light or dark culture condition^z.

Illumination	Shaking culture time (h)	Treatment (μM)	No. of plantlets per bulb	
			8 wk	12 wk
Light	1	Control	10.7 ± 0.3 abc ^y	12.3 ± 0.9 bcd
		GSH 32.50	8.7 ± 0.3 d	9.3 ± 0.3 f
		GSH 65.00	9.7 ± 0.9 cd	11.7 ± 0.3 cde
		GSSG 16.25	9.3 ± 0.3 cd	11.0 ± 0.2 de
		GSSG 32.50	12.0 ± 0.6 ab	12.7 ± 0.3 bc
	2	Control	10.0 ± 0.6 cd	11.7 ± 0.3 cde
		GSH 32.50	10.3 ± 0.3 bcd	11.0 ± 0.6 de
		GSH 65.00	12.3 ± 0.9 a	14.7 ± 0.8 a
		GSSG 16.25	9.3 ± 0.7 cd	10.7 ± 0.3 ef
		GSSG 32.50	12.3 ± 0.3 a	13.7 ± 0.3 ab
Source		<i>F</i> -test ^x		
Shaking culture time		*	**	
Treatment		***	***	
Shaking culture time × treatment		ns	**	
Dark	1	Control	7.3 ± 0.3 A	7.3 ± 0.3 BC
		GSH 32.50	7.3 ± 0.9 A	8.0 ± 0.6 B
		GSH 65.00	7.3 ± 0.3 A	9.7 ± 0.7 A
		GSSG 16.25	7.0 ± 0.1 A	8.0 ± 0.1 B
		GSSG 32.50	7.3 ± 0.3 A	8.0 ± 0.2 B
	2	Control	6.7 ± 0.9 A	7.3 ± 0.3 BC
		GSH 32.50	6.7 ± 0.7 A	6.7 ± 0.9 BC
		GSH 65.00	6.0 ± 0.6 A	6.0 ± 0.6 C
		GSSG 16.25	5.7 ± 0.9 A	6.7 ± 0.2 BC
		GSSG 32.50	6.7 ± 0.3 A	6.9 ± 0.3 BC
Source		<i>F</i> -test ^x		
Shaking culture time		*	***	
Treatment		ns	ns	
Shaking culture time × treatment		ns	*	

^z One-quarter bulb explants were shaking cultured in autoclaved water (control), reduced glutathione (GSH) or oxidized glutathione (GSSG) solution for 1 h or 2 h before inoculated on a MS (Murashige & Skoog 1962) medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA) under light (38 μmol m⁻² s⁻¹) or dark condition for 8 wk and 12 wk of culture.

^y Means of plantlets per flask with four 1/4-bulb explants in each column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

^x *F*-test of ANOVA. ns: non-significant; *, ** and *** are significant at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

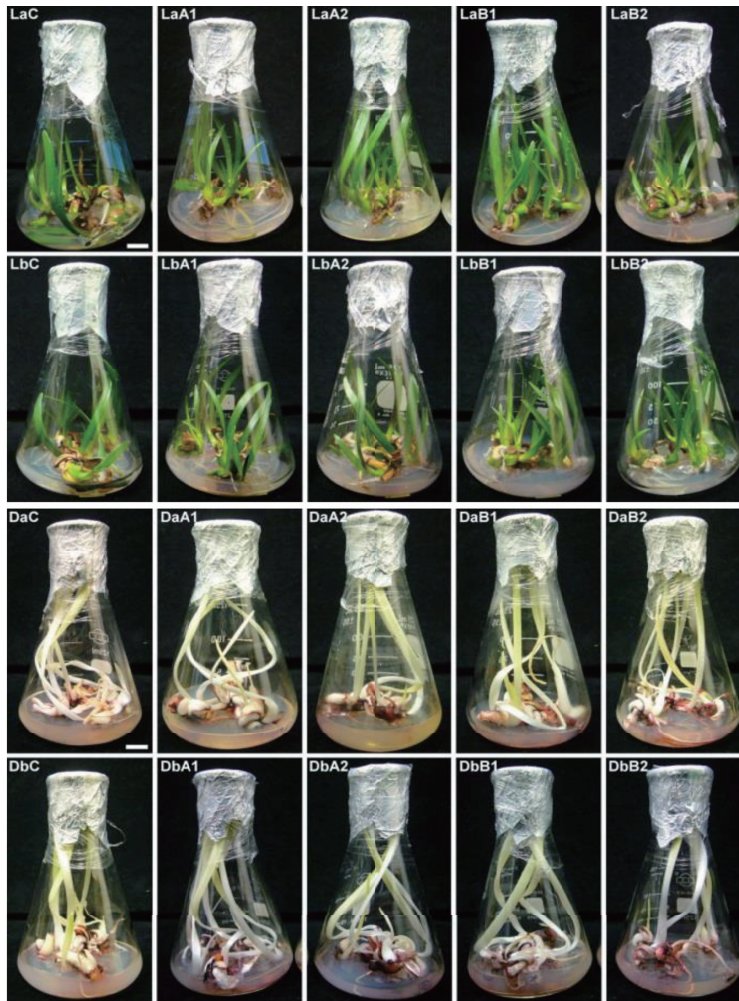


圖 1. 孤挺花「紅獅」1/4 組培鱗莖培植體經不同濃度之穀胱甘肽溶液浸泡後，培養於照光或黑暗環境下之組培苗增殖與生長情形。將培植體經無菌水 (C)、32.50 μM 或 65.00 μM GSH (A1、A2) 及 16.25 μM 或 32.50 μM GSSG (B1、B2) 浸泡 1 h (a) 或 2 h (b) 後，接種於含有 3% 蔗糖、1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基，置於照光 ($38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (L) 或黑暗 (D) 環境下培養 8 wk 後，組培苗之增殖與生長情形。Bar = 1 cm。

Fig. 1. Proliferation and growth of *in vitro* *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plantlets. One-quarter bulb was immersed in 32.50 μM and 65.00 μM reduced glutathione (GSH) (A1, A2), 16.25 μM and 32.50 μM oxidized glutathione (GSSG) (B1, B2) or autoclaved water (C) for 1 h (a) or 2 h (b), before inoculated on a MS (Murashige & Skoog 1962) medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} 1-naphthylacetic acid (NAA) under light ($38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (L) or dark (D) condition for 8 wk of culture. Bar = 1 cm.

示照光處理可形成綠色苗，培植體與培養基褐化情形並不明顯；而黑暗處理則形成白化苗，且莖基部之褐化現象較為明顯。

穀胱甘肽於低照度環境下液態振盪培養對孤挺花「干禧之星」組培苗增殖之影響

本試驗分別在培養 4、8 及 12 wk 後進行

調查，培養 4 wk 後之結果顯示，以 65.00 μM GSH 處理每個鱗莖可得約 6.0 苗，顯著高於 32.50 μM GSSG 處理組與對照組，但與 32.50 μM GSH 和 16.25 μM GSSG 處理組之間無顯著差異。在培養 8 wk 後，65.00 μM GSH 與 16.25 μM GSSG 處理組顯著高於 32.50 μM GSSG 處理組，但是與 32.50 μM GSH 處理組

和對照組之間無顯著差異。而培養 12 wk 後，16.25 μM GSSG 處理組得約 8.7 苗為最高，雖與 65.00 μM GSH 處理組之間無顯著差異，但顯著高於其餘穀胱甘肽處理組與對照組 (表 2)。圖 2 為 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照度環境下，組培苗於不同濃度穀胱甘肽培養液中培養 8 wk 後之生長情形，穀胱甘肽處理組與對照組之培養液皆呈現褐化情形。

穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響

本試驗依據出瓶苗鱗莖大小，分為直徑約 12 mm 之大苗與直徑約 8 mm 之小苗兩組試驗材料，出瓶苗在溫室中生長至第 9 週開始噴施不同濃度之穀胱甘肽溶液，每 4 週噴施 1 次至第 25 週，共噴施 5 次，並於停止噴施 7 wk 後進行調查，結果如表 3 所示。就大苗噴施穀胱甘肽溶液之結果而言，鱗莖直徑係以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異；鱗莖直徑生長指數 (growth index; GI) 以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘各處理組和對照組之間無顯著差異。鱗莖鮮重以 162.8 μM GSSG 處理組最高，顯著高於 651.4 μM GSH、81.4 μM GSSG 與 325.7 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。葉片鮮重以

162.8 μM GSSG 處理組顯著高於其餘處理組與對照組，而 651.4 μM GSH 處理組顯著低於對照組，其餘處理組與對照組之間則無顯著差異。全株鮮重以 162.8 μM GSSG 處理組顯著高於其餘處理組與對照組，而 651.4 μM GSH 與 81.4 μM GSSG 處理組則顯著低於對照組，其餘處理組與對照組之間無顯著差異。全株鮮重生長指數以 325.7 μM GSH 最高，顯著大於 81.4 μM GSSG 處理組，而與其餘處理組和對照組之間無顯著差異 (表 3)。

就小苗噴施 GSH 或 GSSG 溶液之結果而言，各處理組與對照組之鱗莖直徑約為 21.7–23.7 mm，生長指數則在 1.7–2.0 之間，均無顯著差異。鱗莖鮮重以 651.4 μM GSH 處理組顯著低於 162.8 μM GSH、162.8 μM GSSG 及 325.7 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。葉片鮮重以 325.7 μM GSSG 處理組顯著高於 325.7 μM GSH、651.4 μM GSH 及 81.4 μM GSSG 處理組，但與其餘處理組和對照組之間無顯著差異。全株鮮重以 162.8 μM 與 325.7 μM GSSG 處理組最高，與 162.8 μM GSH 處理組無顯著差異，但是顯著高於其餘處理組與對照組。全株鮮重之生長指數約在 15.5–19.4 之間，各處理組與對照組之間均無顯著差異 (表 3)。

針對穀胱甘肽處理對植株葉片生長而言，除葉片鮮重已列於表 3 外，其他如葉數、葉長及葉寬在各處理組與對照組之間的差異並不明

表 2. 穀胱甘肽於低照光環境下液態振盪培養對孤挺花「千禧之星」組培苗增殖之影響。

Table 2. Effect of glutathione on proliferation of *in vitro* *Hippeastrum hybridum* 'Blossom Peacock' plantlets in liquid medium under lower light (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) condition^f.

Treatment ^y	No. of plantlets per bulb		
	4 wk	8 wk	12 wk
Control	4.3 ± 0.3 b ^x	6.7 ± 0.3 ab	6.7 ± 0.3 bc
GSH 32.50 μM	4.7 ± 0.7 ab	6.7 ± 0.7 ab	7.0 ± 0.6 bc
GSH 65.00 μM	6.0 ± 0.2 a	7.7 ± 0.3 a	8.0 ± 0.6 ab
GSSG 16.25 μM	5.7 ± 0.7 ab	8.0 ± 0.6 a	8.7 ± 0.8 a
GSSG 32.50 μM	4.3 ± 0.3 b	5.7 ± 0.7 b	6.0 ± 0.4 c

^z One-quarter bulb (about 7–8 mm diameter) explant was cultured on a MS (Murashige & Skoog 1962) liquid medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA) with 100 rpm under lower light (10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) condition for 4, 8 and 12 wk of culture.

^y GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione.

^x Means of plantlets per flask with four 1/4-bulb explants in each column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

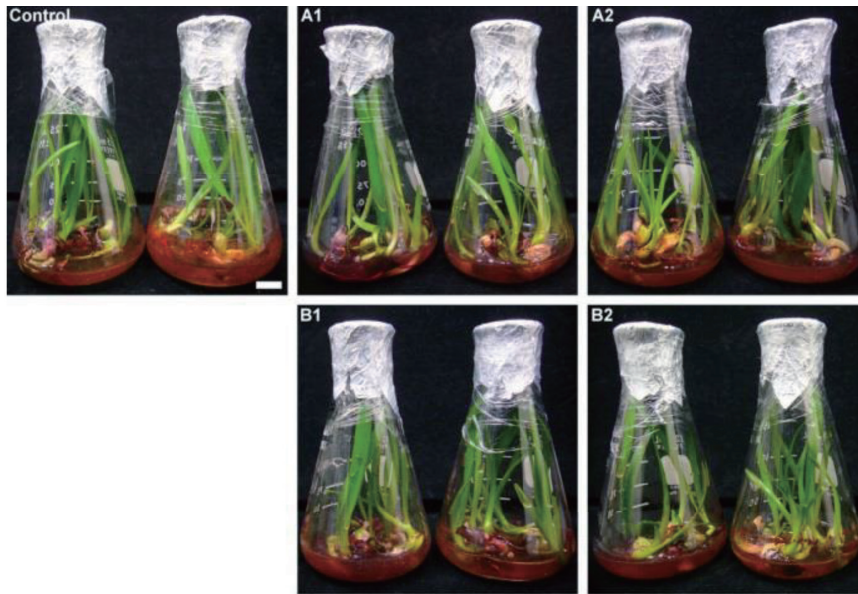


圖 2. 孤挺花「千禧之星」1/4 組培鱗莖培養於含有穀胱甘肽之液態培養基中，於低照光環境下組培苗之增殖與生長情形。將 1/4 鱗莖培養於含有 1.0 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 液態培養基 (Control)、32.50 μM、65.00 μM GSH (A1、A2) 或 16.25 μM、32.50 μM GSSG (B1、B2)，於低照光 (10 μmol m⁻² s⁻¹) 環境下培養 8 wk 後，組培苗之增殖與生長情形。Bar = 1 cm。

Fig. 2. Proliferation and growth of *in vitro* *Hippeastrum hybridum* 'Blossom Peacock'. One-quarter bulb was cultured on MS (Murashige & Skoog 1962) liquid medium containing 3% sucrose, 1.0 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA) (Control), 32.50 μM and 65.00 μM reduced glutathione (GSH) (A1, A2) or 16.25 μM and 32.50 μM oxidized glutathione (GSSG) (B1, B2) under low light condition (10 μmol m⁻² s⁻¹) for 8 wk of culture. Bar = 1 cm.

顯，葉數約 4.9–6.2 片，葉長為 42.0–49.3 cm，葉寬約 17.4–20.2 mm (資料未列)。圖 3 顯示出瓶苗經不同濃度穀胱甘肽溶液噴施處理，於溫室環境生長達 32 wk 後，其植株葉片、鱗莖大小與根系生長之結果。

討論

穀胱甘肽 (glutathione) 是植物細胞中普遍存在的一種物質，具有調節細胞氧化還原狀態的功能。植物生理和代謝過程中，GSH 與 GSSG 含量及兩者比率 (GSH/GSSG ratio) 扮演重要角色，比值較高即表示 GSH 含量較高，具有較佳抗氧化能力。近年來相當多研究結果顯示，穀胱甘肽處理可調節植物生長、發育及耐逆境反應，施用 GSH 可維持植物之正常功能並促進生長，藉以對抗非生物性逆境 (Yeung *et al.* 2005; Şen 2012; Yan *et al.* 2013; Çevik & Ünyayar 2015)。植物組織培養過程中，初

代或繼代培養之切割操作，抑或培養基的物理或化學環境，對培植體均會造成氧化逆境 (oxidative stress)。培植體的氧化還原狀態對於植物器官形成、分化及再生均有所影響，多數芽體形成需要還原態環境 (reducing environment)，而體胚形成則需要氧化因子 (oxidizing factors) (Cassells & Curry 2001; Tyburski & Tretyn 2010)。

Son *et al.* (2014) 於菸草 (*Nicotiana tabacum*) 研究結果顯示，100 μM GSH 處理組與對照組之間無顯著差異，但提高濃度至 1,000 μM 時，則增加組培苗鮮重。Liu *et al.* (2005) 於蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 組培苗研究顯示，200 mg L⁻¹ (651.4 μM) GSH 處理組具有最佳之增殖與生長促進效果，但提高濃度至 300 mg L⁻¹ 時，雖培養初期具有顯著效果，但延長培養至 60 d 時，則與對照組之間無顯著差異。唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 芽體再生研究結果顯示，100 μM GSH 處理組具有促進芽體形成 (shoot

表 3. 穀胱甘肽對溫室栽培孤挺花「紅獅」出瓶苗生長之影響。

Table 3. Effect of glutathione on growth of de-flask plantlets of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' in greenhouse¹.

Bulb size	Treatment	Concentration (µM)	Diameter of bulb (mm)	Growth index ² of diameter	Fresh weight of bulb (g)	Fresh weight of leaf (g)	Total fresh weight (g)	Growth index of total fresh weight
Large	Control	0.0	25.3 ± 0.4 abc ³	1.10 ± 0.04 abc	14.6 ± 1.0 abc	16.8 ± 0.2 bcd	31.4 ± 1.0 bc	9.4 ± 2.0 ab
	GSH	162.8	26.0 ± 0.3 ab	1.20 ± 0.02 ab	15.8 ± 0.5 ab	17.3 ± 0.1 bc	33.1 ± 0.5 b	9.5 ± 0.8 ab
	GSH	325.7	26.1 ± 0.3 ab	1.20 ± 0.03 ab	15.0 ± 0.7 ab	18.2 ± 0.0 b	33.2 ± 0.8 b	10.6 ± 1.2 a
	GSH	651.4	24.5 ± 0.8 bc	1.00 ± 0.06 bc	12.7 ± 0.3 cd	13.7 ± 1.2 e	26.4 ± 1.3 e	8.1 ± 0.5 ab
	GSSG	81.4	23.1 ± 1.3 c	0.90 ± 0.11 c	11.9 ± 0.7 d	15.7 ± 0.4 d	27.6 ± 1.2 de	7.0 ± 0.8 b
	GSSG	162.8	27.4 ± 1.2 a	1.30 ± 0.10 a	16.3 ± 0.5 a	20.1 ± 0.2 a	36.3 ± 0.6 a	10.0 ± 0.7 ab
Small	GSSG	325.7	25.3 ± 0.7 abc	1.10 ± 0.06 abc	13.9 ± 0.1 bc	16.2 ± 0.1 cd	30.1 ± 0.2 cd	8.8 ± 0.6 ab
	Control	0.0	22.8 ± 0.7 A	1.90 ± 0.08 A	11.7 ± 0.5 AB	18.9 ± 0.5 AB	30.6 ± 0.4 BC	18.6 ± 0.9 A
	GSH	162.8	23.7 ± 0.4 A	2.00 ± 0.05 A	12.7 ± 0.2 A	18.8 ± 0.3 AB	31.4 ± 0.2 AB	16.6 ± 0.2 A
	GSH	325.7	22.6 ± 0.6 A	1.80 ± 0.07 A	11.6 ± 0.7 AB	17.1 ± 0.6 C	28.7 ± 0.8 C	19.4 ± 3.7 A
	GSH	651.4	21.7 ± 0.7 A	1.70 ± 0.09 A	10.5 ± 0.7 B	18.5 ± 0.6 B	29.0 ± 1.3 C	15.5 ± 2.7 A
	GSSG	81.4	22.8 ± 1.3 A	1.80 ± 0.17 A	11.0 ± 0.6 AB	18.6 ± 0.2 B	29.7 ± 0.6 BC	16.5 ± 1.6 A
GSSG	162.8	23.5 ± 1.1 A	1.90 ± 0.13 A	12.6 ± 0.6 A	19.4 ± 0.2 AB	32.1 ± 0.8 A	19.1 ± 2.9 A	
GSSG	325.7	23.5 ± 0.6 A	1.90 ± 0.08 A	12.2 ± 0.3 A	20.0 ± 0.3 A	32.2 ± 0.1 A	18.7 ± 1.0 A	

¹ *In vitro* rooted large (about 12 mm in bulb diameter) and small (about 8 mm in bulb diameter) plantlets of *H. hybridum* 'Red Lion' were planted on a mixed substrate (peat moss : vermiculite : perlite = 2 : 1 : 1, v/v/v) for 8 wk of culture, before spraying various concentrations of glutathione [0.0, 162.8, 325.7 and 651.4 µM reduced glutathione (GSH) and 0.0, 81.4, 162.8 and 325.7 µM oxidized glutathione (GSSG)] every 4 wk for a total of 5 times application. Data were collected 7 wk after the last application. Each treatment had 3 replications, 5 plants per replication and 50 mL solution was sprayed on 15 plants.

² Growth index = [final diameter (or fresh weight) - initial diameter (or fresh weight)]/initial diameter (or fresh weight).

³ Means in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by the least significant difference (LSD) test.

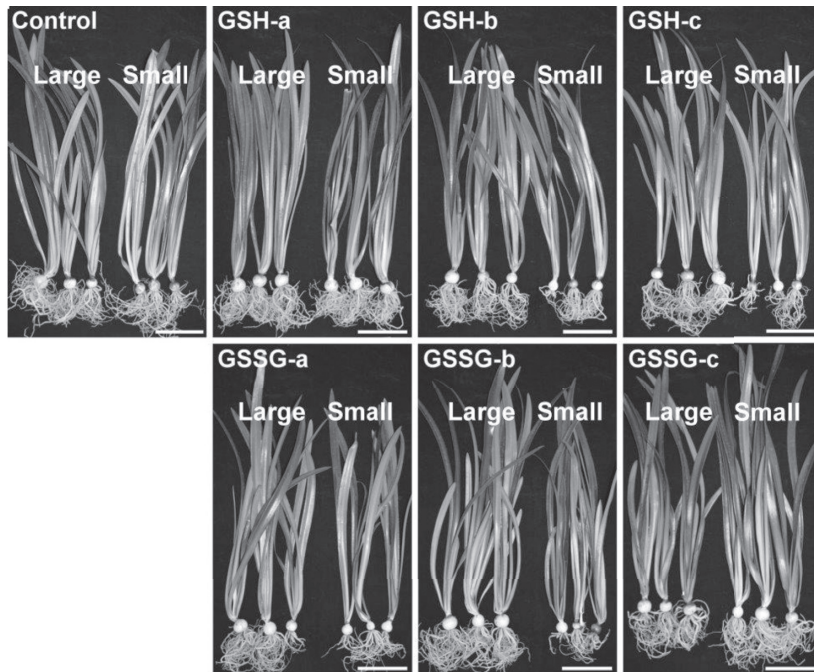


圖 3. 孤挺花「紅獅」出瓶苗於不同穀胱甘肽處理條件下，在溫室生長達 32 wk 之植株。大苗 (Large；直徑約 12 mm) 與小苗 (Small；直徑約 8 mm) 以混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石 = 2 : 1 : 1，體積比) 種植 8 wk 後開始處理，每 4 wk 噴施純水 (Control)、GSH (162.8、325.7 及 651.4 μM ；GSH-a, -b, -c) 或 GSSG (81.4、162.8 及 325.7 μM ；GSSG-a, -b, -c)，共噴施 5 次，停止施用 7 wk 後調查與拍照；每處理 3 重複，每重複 5 株，每 15 株噴施 50 mL 穀胱甘肽溶液。Bar = 10 cm。

Fig. 3. *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' plants grew under various glutathione treatments for 32 wk in greenhouse condition. *In vitro* rooted large (bulb diameter about 12 mm) and small (bulb diameter about 8 mm) plantlets of *H. hybridum* 'Red Lion' were planted in a mixed substrate (peat moss : vermiculite : perlite = 2 : 1 : 1, v/v/v) for 8 wk of culture, before spraying pure water (Control), reduced glutathione (GSH) (162.8, 325.7 and 651.4 μM) (GSH-a, -b and -c), and oxidized glutathione (GSSG) (81.4, 162.8 and 325.7 μM) (GSSG-a, -b and -c) solutions every 4 wk for a total of 5 times application. Data and photos were collected 7 wk after the last application. Each treatment had 3 replications, 5 plants per replications and 50 mL glutathione solution was sprayed on 15 plants. Bar = 10 cm.

organogenesis) 效果，但提高濃度至 500 μM 或 1,000 μM GSH 時，則產生抑制結果 (Gupta & Datta 2003)。千日菊 (*Acmella oleracea*) 組培苗研究顯示，對照組在存活率、芽數及芽長均顯示高於 1–25 mg L^{-1} (3.26–81.40 μM) GSH 處理組，顯示添加 GSH 不利於芽體生長與增殖 (Shankar *et al.* 2012)。本研究利用「紅獅」1/4 鱗莖作為培植體，經穀胱甘肽處理後，分別於照光與黑暗環境進行試驗。照光培養之變方分析結果顯示，「紅獅」組培苗增殖之影響因子受到振盪處理時間與穀胱甘肽處理兩因子之影響，且振盪處理時間與穀胱甘肽處理之交感效應隨著培養時間延長而更加顯著。而在黑

暗環境下培養 8 wk 時，僅振盪處理時間具有顯著影響，延長培養至 12 wk 時，振盪處理時間之影響更為顯著，其與穀胱甘肽處理之交感效應從不顯著變為顯著 (表 1)。上述結果顯示，穀胱甘肽對培植體影響之時間相當長久，這個觀點在以往研究中因為較少被長期追蹤以致往往被忽略。Foyer & Noctor (2011) 評論報告指出，GSH 參與植物光訊息傳遞 (signal transduction) 與適應強光的電生理訊息傳遞路徑，而且與光感受器訊息具有鏈結關係。此外，GSH 可藉由調控細胞生長素轉運 (auxin transportation) 和訊息傳遞等機制而達到增殖目的。本研究結果顯示，穀胱甘肽處理對培植

體之促進效果，在照光環境較黑暗環境具有較顯著之影響。

本研究瓶內試驗穀胱甘肽使用濃度為 16.25–65.00 μM 之間，在 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光環境下培養 12 wk 後，65.00 μM GSH 處理具有促進「紅獅」組培苗增殖之效果。在 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照度環境下培養，「千禧之星」組培苗在 4 wk 短期培養時之增殖效果，亦以 65.00 μM GSH 處理為佳，但延長培養至 12 wk 時則以 16.25 μM GSSG 處理最佳。上述結果顯示，在不同培養環境與時間條件下，穀胱甘肽對促進組培苗增殖之最佳型態與濃度並不相同，推測不同型態穀胱甘肽在植物體內經過較長時間的轉換後，其作用可能具有不同表現，因此其型態與濃度處理效果的長效性值得進一步探討。此外，固態培養之「紅獅」試驗在 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光環境培養 8–12 wk 時，其組培苗增加率在 7–21% 之間 (表 1)，顯示可延長其繼代培養期間至 12 wk。而液態培養之「千禧之星」試驗於 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照度環境培養 8–12 wk 時，組培苗增加率僅 0–9%，而且若就每週之芽體增殖率而言，培養達 4 wk 時約為 1.1–1.5，而在 8 wk 培養後降為 0.7–1.0，培養達 12 wk 後僅為 0.5–0.7 (表 2)。此外，在低照度環境下液態培養 4 wk 時之芽體增殖率最高，而培養 8 wk 後之培植體與培養液均出現嚴重褐化現象 (圖 2)，因此建議其繼代培養期間以 4–8 wk 之間為宜。

Nomura *et al.* (1998) 以蘋果 (*Malus pumila*) M26 品系為材料，以 100 μM GSH 溶液浸泡莖頂，再培養於不含 GSH 之培養基，不僅可抑制培植體褐化現象，並促進其生長與增重。但若接續培養於含 GSH 之培養基中，則造成基部癒合組織大量生長，且無法促進芽體生長。開心果 (*Pistacia vera*) 研究結果顯示，莖頂因切割導致嚴重褐化而死亡，但以 100 μM GSH 溶液浸泡後再培養於增殖培養基，可促進其生長與增重。同時伴隨酚類化合物的減少，以及苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonialyase; PAL) 與過氧化酶 (peroxidase; POD) 活性之降低，亦即 GSH 處理可提升莖頂之抗氧化能力 (Tabiyeh *et al.* 2006)。Liu *et al.* (2005) 於蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 研究

顯示，添加 GSH 於培養基中不僅可抑制組培苗褐化現象，並促進其增殖與生長。本研究穀胱甘肽處理在 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 照光環境下，培植體褐化現象並不明顯，但黑暗固態培養環境或 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 低照度液態培養環境下，則可見明顯褐化現象 (圖 1–2)。亦即穀胱甘肽處理對於抑制培植體褐化之效果，在黑暗或低照光培養環境下之效果並不明顯，但特定濃度如 16.25 μM GSSG 處理組仍有顯著高於對照組之增殖倍率 (表 2)。

Bařková *et al.* (2008) 指出，組培苗在瓶內階段與出瓶馴化過程中，面對不同逆境的考驗，包括水分逆境與光抑制現象，導致活性氧族 (reactive oxygen species; ROS) 大量形成與抗氧化酵素 (antioxidative enzymes) 逐漸增加，顯示組培苗在此期間遭受嚴重的氧化逆境 (oxidative stress) 傷害。Yan *et al.* (2013) 評論報告指出，GSH 是植物體內重要抗氧化物質，具有清除活性氧自由基、減輕膜損傷與脂質過氧化，以及緩解極端溫度、乾旱、重金屬及鹽分等逆境傷害。Çevik & Ünyayar (2015) 於鷹嘴豆 (*Cicer* spp.) 研究結果顯示，葉片噴施 GSH 可提高 *Cicer arietinum* 之 GSH 含量，因此較能夠耐乾旱逆境。Ding *et al.* (2016) 於胡瓜 (*Cucumis sativus*) 研究結果顯示，250 μM GSH 噴施處理可促進種子苗之株高、鮮乾重及光合作用。小麥 (*Triticum aestivum*) 研究結果顯示，利用 50 ppm 或 100 ppm (162.8 μM 或 325.6 μM) GSH 溶液噴施葉面，可增加營養生長期 (vegetative stage) 與生殖生長期 (heading stage) 之鮮重、乾重及產量 (El-Awadi *et al.* 2014)。金盞花 (*Calendula officinalis*) 研究結果顯示，利用 50、100 或 150 mg L^{-1} (162.8、325.6 或 488.5 μM) GSH 溶液噴施 50 日齡種子苗後，對株高、分枝數及葉重均有顯著提高的效果，且濃度越高的效果越大 (Mahgoub *et al.* 2006)。Lai *et al.* (2016) 於文心蘭 (*Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel') 研究結果顯示，以 5 mM GSH 溶液澆灌處理可顯著促進植株之營養生長，達到提早開花與增進品質的效果，但是 10 mM GSH 處理組與對照組之間則無顯著差異。Wang *et al.* (2011) 於大麥 (*Hordeum vulgare*) 幼苗水耕試驗結果則顯

示，施用 GSH 對其乾重增加無顯著效果。本研究「紅獅」大苗試驗結果顯示，對照組鱗莖直徑和鮮重與部分穀胱甘肽處理組之間無顯著差異，甚至高於部分處理組；僅有 162.8 μM GSSG 處理組之葉片與全株鮮重顯著高於對照組，顯示噴施穀胱甘肽只在特定濃度如 162.8 μM GSSG 處理下，才能促進出瓶苗生長；小苗試驗亦顯示同樣趨勢的結果（表 3）。本研究之穀胱甘肽處理顯示在特定濃度處理下具有促進效果，但某些處理條件卻抑制生長，推測原因可能是受到植物體內生（endogenesis）抗氧化物質與酵素含量高低，造成氧化還原狀態差異所導致的結果，此問題仍有待進一步探討。

此外，本研究僅調查在穀胱甘肽停用 7 wk 後之表現，因此無法對更長久之影響進行討論。本研究中大苗對照組在經 32 wk 的溫室栽培後，鱗莖直徑、鱗莖鮮重及全株鮮重僅稍高於小苗對照組（表 3），主要係因小苗鱗莖直徑與全株鮮重之生長指數均大幅度高於大苗，亦即小苗生長速率較快，在栽培一段時間後，其生長量即與大苗相當（表 3）。依據上述結果建議，組培苗鱗莖直徑若已達約 8 mm 時，即可將其移出瓶外進行栽培。

Zhu *et al.* (2005) 於孤挺花「雙紀錄」（‘Double Record’）雙鱗片繁殖研究結果顯示，周徑約 3.6 cm（直徑約 11 mm）之子球經 60 wk 栽培後，可得直徑約 70 mm 的子球，但其直徑介於 48–113 mm 之間。Ephrath *et al.* (2001) 以「紅獅」進行雙鱗片繁殖試驗，也顯示相同的趨勢，子球經 52 wk 栽培後，81% 子球周徑約為 10 cm（直徑約 32 mm），但多數介於 6–8 cm（直徑約 19–25 mm）之間，而有 19% 子球周徑大於 12 cm（直徑約 38 mm），同樣顯示子球大小差異極大的結果。上述結果顯示，雙鱗片繁殖所得子球若以鱗莖大小分級進行試驗，常造成同一處理內之變異偏高。本研究利用鱗莖直徑分別約為 12 mm 及 8 mm 之「紅獅」出瓶苗進行試驗，兩組試驗材料鱗莖直徑分別在 7.1–9.3 mm 與 10.2–13.6 mm 之間，結果顯示處理內變異較小，有效避免試驗材料所造成的誤差。依據 Ephrath *et al.* (2001) 於「紅獅」研究結果顯示，經由雙鱗片繁殖法產生的子球經 52 wk 的栽培後，所得直徑介於 19–38 mm

之間，平均約 32 mm。本研究結果顯示，「紅獅」出瓶苗經 32 wk 栽培後之鱗莖直徑約為 22–27 mm，若以單位栽培時間之生長而言，本研究之結果應與上述研究相似或更佳，顯示利用組培出瓶苗進行栽培，其生長效率並不低於慣用之雙鱗片繁殖法，而且組培苗更具有較高的種苗整齊度。

誌謝

本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助審閱，特此申謝。

引用文獻

- Bařková, P., J. Pospíšilová, and H. Synková. 2008. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biol. Plant.* 52:413–422. doi:10.1007/s10535-008-0085-5
- Cassells, A. C. and R. F. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 64:145–157. doi:10.1023/A:1010692104861
- Çevik, S. and S. Ünyayar. 2015. The effects of exogenous application of ascorbate and glutathione on antioxidant system in cultivated *Cicer arietinum* and wild type *C. reticulatum* under drought stress. *J. Nat. Appl. Sci.* 19:91–97.
- Chen, T. C. and T. Y. Wang. 2000. Effect of salt strength and sucrose concentration on bulblet growth of *Hippeastrum hybridus* Hort. *in vitro*. *Hort. NCHU* 25:83–94. (in Chinese with English abstract)
- Chen, U. C., I. Din, T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2017. Effect of disinfection method, explant type, and plant growth regulator on establishment *in vitro* bulblet proliferation of *Amaryllis*. *J. Taiwan Agric. Res.* 66:286–297. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2017.06604.03
- Chen, U. C., T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2018. Effects of two-stage culture and paclobutrazol on *in vitro* bulblet growth and rooting of *Hippeastrum hybridum*. *J. Taiwan Agric. Res.* 67:44–53. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201803_67(1).0005
- Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2019. Effect of explant size, sucrose and activated charcoal on *in vitro* plantlet proliferation and growth in *amaryllis*. *J. Taiwan Agric. Res.* 68:137–147.

- (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201906_68(2).0004
- De Bruyn, M. H. 1997. Micropropagation of amaryllis (*Hippeastrum hybridum*). p.3–13. in: Biotechnology in Agriculture and Forestry 40: High-Tech and Micropropagation VI. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer. New York, NY. 397 pp. doi:10.1007/978-3-662-03354-8
- Ding, X., Y. Jiang, L. He, Q. Zhou, J. Yu, D. Hui, and D. Huang. 2016. Exogenous glutathione improves high root-zone temperature tolerance by modulating photosynthesis, antioxidant and osmolytes systems in cucumber seedlings. *Sci. Rep.* 6:35424. doi:10.1038/srep35424
- EI-Awadi, M. E., S. R. EI-Lethy, and K. G. EI-Rokiek. 2014. Effect of the two antioxidants; glutathione and ascorbic acid on vegetative growth, yield and some biochemical changes in two wheat cultivars. *J. Plant Sci.* 2:215–221. doi:10.11648/j.jps.20140205.20
- Ephrath, J. E., J. Ben-Asher, F. Baruchin, C. Alekperov, E. Dayan, and M. Silberbush. 2001. Various cutting methods for the propagation of *Hippeastrum* bulbs. *Biotronics* 30:75–83.
- Foyer, C. H. and G. Noctor. 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155:2–18. doi:10.1104/pp.110.167569
- Gupta, S. D. and S. Datta. 2003. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biol. Plant.* 47:179–183. doi:10.1023/B:BIOP.0000022248.62869.c7
- Lai, S. L., K. Ogawa, S. Ichihashi, and W. T. Tsai. 2016. Effects of glutathione on the growth and flowering of *Oncidesa* Gower Ramsey 'Honey Angel'. *J. Taiwan Soc. Hort. Sci.* 62:163–172. (in Chinese with English abstract)
- Liu, Z., H. Ge, S. Guo, H. Liu, C. Cao, Y. Zhou, and Q. Li. 2005. Studies of antibrowning in the tissue culture of *Phalaenopsis*. *Acta Hort. Sin.* 32:732–734. (in Chinese with English abstract) doi:10.3321/j.issn:0513-353X.2005.04.039
- Mahgoub, M. H., N. G. Abd El Aziz, and A. A. Youssef. 2006. Influence of foliar spray with paclobutrazol or glutathione on growth, flowering and chemical composition of *Calendula officinalis* L. *Plant. J. Appl. Sci. Res.* 2:879–883.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nomura, K., S. Matsumoto, K. Masuda, and M. Inoue. 1998. Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26. *Plant Cell Rep.* 17:597–600. doi:10.1007/s002990050449
- Şen, A. 2012. Oxidative stress studies in plant tissue culture. p.59–88. in: *Antioxidant Enzyme* (El-Missiry, M. A., ed.) IntechOpen. Rijika, Croatia. 400 pp. doi:10.5772/2895
- Shankar, V., V. Thekkeetil, G. Sharma, and V. Agrawal. 2012. Alleviation of heavy metal stress in *Spilanthes calva* L. (antimalarial herb) by exogenous application of glutathione. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 48:113–119. doi:10.1007/s11627-011-9409-9
- Shao, S. J. and Y. M. Shi. 2008. *In vitro* micro-propagation from *Hippeastrum*'s little aseptic bulb and its effecting factors. *J. Shanghai Jiaotong Univ. (Agric. Sci.)* 26:5–8. (in Chinese with English abstract) doi:10.3969/j.issn.1671-9964.2008.01.002
- Siddique, M. N. A., J. Sultana, N. Sultana, and M. M. Hossain. 2007. *Ex vitro* establishment of *in vitro* produced plantlets and bulblets of *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). *Intl. J. Sustain. Crop Prod.* 2:22–24.
- Son, J. A., D. P. Narayanankutty, and K. S. Roh. 2014. Influence of exogenous application of glutathione on rubisco and rubisco activase in heavy metal-stressed tobacco plant grown *in vitro*. *Saudi J. Biol. Sci.* 21:89–97. doi:10.1016/j.sjbs.2013.06.002
- Sultana, J., N. Sultana, M. N. A. Siddique, A. K. M. A. Islam, M. M. Hossain, and T. Hossain. 2010. *In vitro* bulb production in *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). *J. Cent. Eur. Agric.* 11:469–474. doi:10.5513/JCEA01/11.4.867
- Tabiyeh, D. T., F. Bernard, and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA₃ effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Hort.* 726:201–204. doi:10.17660/ActaHort.2006.726.31
- Tyburski, J. and A. Tretyn. 2010. Ascorbate and glutathione in organogenesis, regeneration and differentiation in plant *in vitro* cultures. p.55–90. in: *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. (Anjum, N. A., S. Umar, and M. T. Chan, eds.) Springer. Dordrecht, Nederland. 443 pp. doi:10.1007/978-90-481-9404-9
- Wang, F., F. Chen, Y. Cai, G. Zhang, and F. Wu. 2011. Modulation of exogenous glutathione in ultrastructure and photosynthetic performance against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Biol. Trace. Elem. Res.* 144:1275–1288. doi:10.1007/s12011-011-9121-y
- Yan, H. F., P. S. Mao, and F. S. Xia. 2013. Research progress in plant antioxidant glutathione. *Acta Agrestia*

- Sin. 21:428–434. (in Chinese with English abstract)
doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2013.03.003
- Yeung, E. C., M. F. Belmonte, L. T. T. Tu, and C. Stasolla. 2005. Glutathione modulation of *in vitro* development. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41:584–590. doi:10.1079/IVP2005683
- Zhu, Y., K. S. Liu, and J. C. Yiu. 2005. Effect of cutting method on bulb production of *Hippeastrum hybridum* in Taiwan. *Acta Hort.* 673:531–535. doi:10.17660/ActaHortic.2005.673.71

Effect of Glutathione on *In Vitro* Proliferation and *Ex Vitro* Growth of *Hippeastrum hybridum* Plantlets

Uei-Chern Chen¹, Jhin-Yi Tsao¹, Tzu-Ying Wu², and Chi-Ni Hsia^{3,*}

Abstract

Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2020. Effect of glutathione on *in vitro* proliferation and *ex vitro* growth of *Hippeastrum hybridum* plantlets. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(4):312–325.

Effects of glutathione on *in vitro* proliferation and *ex vitro* growth of plantlets of *Hippeastrum hybridum* Hort. ‘Red Lion’ or ‘Blossom Peacock’ were investigated in this study. One-quarter *in vitro* bulb of ‘Red Lion’ was taken as an explant treating with various concentrations of reduced (GSH) or oxidized (GSSG) glutathione for 1 h or 2 h before culturing on a MS solid medium supplemented with 3% sucrose, 1.0 mg L⁻¹ benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) for 12 wk under 38 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light condition. The best proliferation rate of 14.7 plantlets per bulb was obtained by using 65.00 μM GSH solution for 2 h shaking. *In vitro* one-quarter bulb of ‘Blossom Peacock’ used as explant was cultured in a liquid medium containing various concentration of GSH or GSSG under 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light condition for various duration. Result showed that the highest proliferation rates were from 65.00 μM GSH treatment in a 4-wk-span culture and no significant difference was found among all glutathione treatments with the control after 8-wk culturing. However, prolonging culture time to 12 wk, the highest proliferation rate of 8.7 plantlets per bulb was obtained from 16.25 μM GSSG treatment. The effect of glutathione on growth was conducted using the 9-wk-old de-flask plantlets of ‘Red Lion’ in either 12 mm or 8 mm bulb diameter by spraying with various concentrations of GSH and GSSG solution every 4 wk for consecutive five times in greenhouse. Growth data of plants was collected at 7 wk after the last glutathione application. Results showed that larger plantlets (with 12 mm bulb diameter) sprayed with 162.80 μM GSSG having higher fresh weight on leaves and whole plant than that of the control. In respect of the smaller plantlets (with 8 mm bulb diameter), higher whole plant weights were found from treatments of 162.80 μM and 325.70 μM GSSG than that of the control. In conclusion, *in vitro* explants of ‘Red Lion’ treated with 65.00 μM GSH solution for 2 h were found to have the highest proliferation rate. In regard to *ex vitro* plantlet growth, the 9-wk-old de-flask plantlets of ‘Red Lion’ spraying with 162.80 μM GSSG solution at 4 wk interval for 5 times in total had the largest bulb diameter and fresh weight.

Key words: Amaryllis, Reduced glutathione, Oxidized glutathione, Illumination, Acclimation.

Received: April 7, 2020; Accepted: September 29, 2020.

* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.