

# 培養基成分對四季蘭‘金荷’根莖生育及分化之影響<sup>1</sup>

陳季呈<sup>2</sup>

## 摘 要

四季蘭‘金荷’根莖於 MS 基礎培養基中添加 40 g/l 蔗糖處理下生育情形良好，其外觀較為粗壯，且繁殖倍率較高，而香蕉泥及蘋果泥處理雖會造成培植體褐化，但新生之根莖較為粗壯，有利於日後芽體之誘導與生成。植物生長調節劑 NAA 可促進根莖生育，BA 及 TDZ 則可促進根莖分化芽體，其中以 BA 0.5-1 mg/l 或 TDZ 0.1 mg/l 搭配 NAA 0.1 mg/l 組合處理較為適宜，芽體外觀呈細長狀；當 BA 處理濃度達 5 mg/l 時培植體易發生褐化，而不利芽體形成，且其無褐化之芽球外觀與 TDZ 0.5-1 mg/l 所誘導之芽體均呈短圓形，無法正常生長，比較 TDZ 與 BA 處理之效果，TDZ 誘導根莖分化芽體較 BA 顯著。

(關鍵詞：四季蘭、組織培養、植物生長調節劑、器官分化)

---

1. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場研究報告第 225 號。

2. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場蘭陽分場副研究員。

## 前 言

國蘭為報歲蘭 (*Cymbidium sinense*)、四季蘭或稱建蘭 (*Cym. ensifolium*)、春蘭 (*Cym. formosanum*)、寒蘭 (*Cym. kanran*) 及九華蘭 (*Cym. faberi*) 等複合族群所構成之統稱，其原生地分布於印度、緬甸、泰國、越南、寮國、中國、香港、台灣、琉球、韓國與日本等地，在植物分類上屬蘭科蕙蘭屬 (*Cymbidium spp.*) 之 *section Jensoa*、*section Nanula* 植物，為小花地生蘭，在直立花莖上有一至數朵小花，多數具清新高雅的芳香氣味，深受愛花者的喜愛 (陳、張 2004；張 2010)。小花蕙蘭為台灣重要之經濟花卉作物，2000 年後之出口值均達 1.5 億元以上，2009 年海關統計值約 2.6 億元，僅次於蝴蝶蘭，主要外銷至韓國市場，佔總出口值 90% 以上，而日本、香港及北美亦有零星出口，近年來中國為另一重要之市場 (洪等 2010；周等 2005)。

由於小花蕙蘭以分株繁殖為主，每株每年只能繁殖 2 至 3 株種苗，繁殖速率緩慢，並有病毒感染與傳播之虞，利用組織培養技術則可加快種苗繁殖速度。小花蕙蘭無菌繁殖之方法有二，一是種子無菌播種，種子發芽後先形成根莖，再由根莖誘導分化為芽體 (Chung *et al.*, 1985)，研究指出報歲蘭、素心蘭、四季蘭已成功利用無菌播種獲得根莖，惟其發芽率低，但利用超音波震盪，配合 pH 3 無菌水處理，可提高種子發芽率 (呂等 1992；李等 1991；李等 1997)；另一方法為取芽體組織進行培養以獲取根莖，但芽體組織培養成功率不高，研究指出春蘭、寒蘭及素心蘭已成功由頂芽、側芽、花芽、花莖培養獲得根莖 (Hasegawa and Goi, 1987；Shimasaki and Uemoto, 1991；孔等 2009；黃等 2008)。然而，小花蕙蘭根莖之生長良好與否會直接影響日後芽體分化，生育良好之根莖其分化快且芽體可以順利成長；反之生育不良之根莖在培養過程中容易褐化死亡 (廖等 1997)，因此培養生育旺盛、外觀粗壯之根莖為首要課題。此外，植物生長調節劑為小花蕙蘭根莖生長與分化之重要調控因子，研究指出 NAA (1-naphthaleneacetic acid) 可促進根莖生長與再生，BA ( $N^6$ -benzyladenine) 則可誘導根莖直接分化為芽體 (Nayak *et al.*, 1998；Peak and Yeung, 1991)，且芽體分化時所需之 auxin 及 cytokinin 的濃度會因不同品種與各個分化階段而有所不同 (蕭、李 2000)，因此本試驗針對外銷量大之四季蘭探討其根莖生長、芽體分化之適宜培養基組成，以培養粗壯之根莖與健壯之芽體與種苗，加速四季蘭之種苗生產效率，提升種苗品質。

## 材料與方法

### 一、植物材料及培養方法

本試驗材料四季蘭 (*Cymbidium ensifolium*) ‘金荷’ (Jin-he) 根莖之建立，是將蒐集之四季蘭予以自花授粉，於授粉後 6 個月，取其果莢經 70% 酒精及 1% 次氯酸鈉配合消毒後進行無菌播種，種子發芽後生育為根莖，於培養根莖之基本培養基內繼代培養 1 至 2 年後，方進行以下試驗。培養根莖之基本培養基為含 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 大量元素，全量 MS 微量元素，蔗糖 20 g/l，活性炭 1 g/l、洋菜 8.5g/l (Difco)，pH 值 5.2。試驗進行以 500 ml 之蘭花瓶內裝培養基 100 ml 行固體培養，或以 100 ml 之三角瓶內 10 ml 行液體培養。配置完成之培養基以壓力 1.05 kg/cm<sup>2</sup>、121°C 殺菌 20 分鐘。所有試驗材料之根莖均切除頂端之生長點後，以每段長 1.5 cm 之根莖為培植體，平放於固體培養基表面。培養環境以日光燈為照明光源，根莖增殖之固體培養光度約為 100 lux；根莖分化芽體之液體培養光度則約為 2000 lux，光照日長為 12 小時，培養溫度為 25±2°C。

## 二、試驗處理及培養方法

### (一) 大量元素濃度對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響

本試驗以 MS 配方為基礎，試驗處理為大量元素 MS、1/2 MS、1/4 MS、1/8 MS 等 4 種處理，而微量元素均採全量、蔗糖 20 g/l、活性碳 1 g/l、洋菜 8.5 g/l，pH 值 5.2。本試驗材料如上述之植物材料及培養方法所述，每瓶 6 段根莖，每處理 6 重複，培養環境與上述根莖繼代培養環境相同。培養經 3 個月後調查根莖鮮重 (g)、新生根莖數。

### (二) 蔗糖濃度對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響

本試驗以 MS 配方為基礎，大量元素 1/2 MS、全量微量元素、活性碳 1 g/l、洋菜 8.5 g/l，pH 值 5.2，試驗處理為蔗糖 20、30、40、60 g/l 等 4 種。本試驗材料如上述之植物材料及培養方法所述，每瓶 6 段根莖，每處理 6 重複，培養環境與上述根莖繼代培養環境相同。培養經 3 個月後調查根莖鮮重 (g)、新生根莖數。

### (三) 有機添加物對四季蘭‘金荷’根莖生育與分化之影響

本試驗以 MS 配方為基礎，大量元素 1/2 MS、全量微量元素、活性碳 1 g/l、洋菜 8.0 g/l，pH 值 5.2，試驗處理分別為 50、100 g/l 之蘋果泥、香蕉泥及馬鈴薯泥等 6 種，以不添加有機物質為對照。本試驗材料如上述之植物材料及培養方法所述，每瓶放入 10 段根莖，每處理 5 重複，培養環境與上述根莖繼代培養環境相同。培養經 3 個月後調查鮮重 (g)、新生根莖數、芽數、褐化率。

### (四) 植物生長調節劑 NAA 及 BA 組合處理對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響

本試驗以 MS 配方為基礎，大量元素 1/2 MS、全量微量元素、蔗糖 20 g/l、椰子水 100 ml/l，pH 值 5.2，試驗處理為植物生長調節劑 0-5 mg/l BA ( $N^6$ -benzyladenine; Sigma, St. Louis, MO, USA) 與 0-1 mg/l NAA (1-naphthaleneacetic acid; Sigma, St. Louis, MO, USA) 組合處理。本試驗材料如上述之植物材料及培養方法所述，每瓶放入 10 段根莖，每處理 10 重複，以 100 ml 之三角瓶內 10 ml 行液體培養，振盪器轉速為 80 rpm，培養環境與上述根莖分化芽體培養環境相同。培養經 12 週後調查鮮重 (g)、新生根莖數、芽數、直徑 2 mm 以上之芽球數、直徑 2 mm 以下之芽球數、褐化率。

### (五) 比較植物生長調節劑 TDZ 及 BA 對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響

本試驗以 MS 配方為基礎，大量元素 1/2 MS、全量微量元素、蔗糖 20 g/l、椰子水 100 ml/l、tryptone 1 g/l、 $KH_2PO_4$  10 mM，pH 值 5.2，試驗處理為植物生長調節劑 0-1 mg/l BA 或 TDZ ( $N$ -phenyl- $N'$ -1,2,3-thiazol-5-ylurea; Sigma, St. Louis, MO, USA) 0-1 mg/l 與 0.1 mg/l NAA 組合處理。本試驗材料如上述之植物材料及培養方法所述，每瓶放入 10 段根莖，每處理為 5 重複，以 100 ml 之三角瓶內 10 ml 行液體培養，振盪器轉速為 80 rpm，培養環境與上述根莖分化芽體培養環境相同。培養經 8 週後調查鮮重 (g)、新生根莖數、芽數、直徑 2mm 以上之芽球數、直徑 2 mm 以下之芽球數。

## 三、統計分析方法

試驗設計採完全隨機設計 (Completely Randomized Design)，試驗結果以變方分析 (ANOVA) 測定其顯著性，若處理間差異顯著則利用 Fisher's Least Significance Difference (LSD) test 比較各處理平均值間之差異。

## 結果與討論

小花蕙蘭生育緩慢且幼年性時間長，其種子發芽後先形成根莖，根莖在植物學歸類為變態莖，具節間及節位，節上腋芽原體由鱗片葉所覆蓋，經由培養基的調控可使腋芽形成根莖或分化為芽體，根莖之生長情形會直接影響日後芽體分化，生育良好之根莖其分化快且芽體可以順利成長；反之生育不良之根莖在培養過程中容易褐化死亡（廖等 1997），因此如何培養生育良好、外觀粗壯之根莖為首要課題。在大量元素濃度對四季蘭根莖生長之影響試驗，高濃度大量元素處理有促進四季蘭根莖生長之效果，當四季蘭根莖在 MS 處理下根莖鮮重為 0.99 g 較 1/2 MS 處理之 0.81 g、1/4 MS 處理之 0.48 g 及 1/8 MS 處理之 0.46 g 為高，且差異顯著；新生根莖數則以 MS 及 1/2 MS 處理為 7.6 枝較其他處理為高（表一）；各處理無芽體生成且培植體無褐化情形發生。觀察各處理之根莖外觀，以 MS 處理最為粗壯、生育情形最好；而 1/4 MS 與 1/8 MS 處理其根莖外觀較細，故其鮮重表現不如 MS 及 1/2 MS 處理（圖一）。因此四季蘭根莖培養大量元素濃度以 MS 處理為最佳，1/2MS 次之，低於 1/2MS 以下根莖生育較差則不建議。研究報告指出報歲蘭、素心蘭及四季蘭之種子於低濃度鹽類下發芽情形較好（李 1997），但素心蘭則以 1/2 MS 至 MS 對其根莖繁殖與分化最為適宜，報歲蘭根莖則於 1/4 MS 至 1/3 MS 生育最佳（廖等 1997），故四季蘭及素心蘭根莖生育適宜之大量元素濃度較報歲蘭為高，且與種子無菌發芽時需低濃度鹽分不同。

表一、大量元素濃度對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響

Table 1. Effects of major salt concentrations on growth of rhizome of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’.\*<sup>1</sup>

Treatments	Fresh weight/section (g)	No. of rhizomes/Section
MS	0.99 <sup>a*2</sup>	7.6 <sup>a</sup>
1/2MS	0.81 <sup>b</sup>	7.6 <sup>a</sup>
1/4MS	0.48 <sup>c</sup>	6.4 <sup>ab</sup>
1/8MS	0.46 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup>

\*<sup>1</sup> All medium were supplemented with MS minor elements, sucrose 20 g/l and activated charcoal 1 g/l, pH 5.2. Data were collected after at 3 months after treated.

\*<sup>2</sup> The same letters are not significantly different 5% by LSD.

在蔗糖濃度對四季蘭根莖生育之影響試驗，結果顯示以蔗糖 40 g/l 處理之根莖生育情形最為良好，其根莖鮮重為 0.84 g、新生根莖數為 7.2 枝均較其他處理為高，且具顯著差異；蔗糖 60 g/l 及 30 g/l 處理次之，鮮重分別為 0.74 g 及 0.71 g；蔗糖 20 g/l 表現最差（表二）；且各處理培植體無褐化情形發生。在植物組織培養過程中，碳水化合物為供應培植體能量之來源，其可促進培植體之存活與生長，然而不同碳源及濃度對培植體生長發育亦有不同之影響，其中蔗糖為組織培養最常使用之碳源，Huang and Okubo (2005) 指出 5% 葡萄糖為報歲蘭 (*Cym. sinense* ‘Shue Pai Tsoa’) 最佳碳源處理，可產生最多小苗；潘等 (2009) 指出不同碳源如蔗糖、葡萄糖及果糖之單一或組合處理對白花報歲蘭及金華山之根莖整體生長並沒有顯著影響，觀察其外觀以果糖為碳源處理報歲蘭‘金華山’再生之根莖較細，而以蔗糖處理者再生根莖較粗且根莖前端分化為芽體數較多。本試驗結果顯示，供給較高濃度的大量元素 (MS) 及蔗糖有助於根莖的生育，但過高的蔗糖 (60 g/l) 對四季蘭‘金荷’根莖生育則無相對之促進效果，但於部分根莖前端有芽體分化之情形，因此四季蘭‘金荷’根莖生育以 MS、40 g/l 蔗糖處理效果最為良好，可獲得生育良好、外觀較為粗壯之根莖，且繁殖倍率較高，有利於日後芽體之誘導與生成。

表二、蔗糖對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響

Table 2. Effects of sucrose concentrations on growth of rhizome of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’. \*1

Sucrose (g/l)	Fresh weight/ Section (g)	No. of rhizomes/ Section
20	0.59 <sup>c*2</sup>	5.0 <sup>c</sup>
30	0.71 <sup>b</sup>	6.0 <sup>b</sup>
40	0.84 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>
60	0.74 <sup>b</sup>	5.3 <sup>bc</sup>

\*1 Basal medium contained 1/2 MS major elements, MS minor elements, activated charcoal 1 g/l, pH 5.2. Data were collected after at 3 months after treated.

\*2 The same letters are not significantly different 5% by LSD.

在蘭科植物組織培養過程中，添加椰子水、香蕉泥、馬鈴薯泥、鳳梨汁等有機添加物可促進種子發芽或培植體之生長與分化 (Ernst *et.al.*, 1970)。孔等人 (2009) 指出有機添加物番茄汁、馬鈴薯汁、蛋白脲、酵母抽出物等均對春蘭根莖之生長與增殖有所助益。本試驗以蘋果泥、香蕉泥及馬鈴薯泥處理四季蘭根莖，結果顯示於蘋果泥及香蕉泥之處理下，培植體有褐化情形發生，且隨著處理濃度增加，褐化情形更趨嚴重，其中以香蕉泥 100 g/l 之處理，根莖褐化率高達 47% 最為嚴重，而添加馬鈴薯泥及對照組處理培植體發生褐化之情形則低於 6%，與蘋果泥及香蕉泥處理呈顯著差異。在鮮重調查結果顯示，添加 100 g/l 之馬鈴薯泥、蘋果泥及香蕉泥處理之鮮重分別為 2.38 g、2.22 g 及 2.22 g，處理間無顯著差異，當處理濃度降低至 50 g/l 時，鮮重表現則以馬鈴薯泥處理為 1.98 g 及香蕉泥處理為 1.89 g，表現較蘋果泥 1.53 g 及對照組 1.65 g 為佳且差異顯著，而新生根莖數及根莖尖端生成之芽數，以馬鈴薯泥處理表現較其他處理好 (表三)。但比對鮮重調查結果及培植體褐化率之表現，並觀察各處理未發生褐化根莖之生育情形，香蕉泥及蘋果泥處理之根莖外觀較粗且根莖上有許多的絨毛發生，相對於馬鈴薯泥之處理雖然褐化率很低，但其再生根莖外觀較細。綜合以上結果顯示，馬鈴薯泥雖不會造成四季蘭根莖發生褐化，但其再生之根莖較細，對於日後做為誘導芽體之根莖可能效果較差，而香蕉泥及蘋果泥處理雖會造成培植體褐化，但新生之根莖較為粗壯，對於日後誘導芽體較為有利。周及余 (2009) 以 100 g/l 香蕉泥處理春蘭根莖可獲得較高之鮮重，與本試驗結果相似，且張等 (2009) 在大花蕙蘭原球體增殖以混和有機添加物 50 g/l 馬鈴薯泥與 50 g/l 香蕉泥處理下，原球體可增殖 16.6 倍效果最好，本試驗參考其結果將香蕉泥降低至 40 g/l 搭配馬鈴薯泥 60 g/l，可養成外觀較粗且褐化率低之根莖 (數據未發表)，利於日後芽體誘導所需。

表三、有機添加物對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響

Table 3. Effects of organic additions on growth of rhizome of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’. \*1

Organic matters(g/l)	Fresh weight(g)	No. of rhizomes	No. of shoots*2	Browning(%)
Apple 50	1.53 <sup>c*3</sup>	43.6 <sup>cd</sup>	1.0 <sup>b</sup>	32.0 <sup>a</sup>
Apple 100	2.22 <sup>a</sup>	39.8 <sup>de</sup>	1.2 <sup>b</sup>	40.0 <sup>a</sup>
Banana 50	1.89 <sup>b</sup>	43.6 <sup>cd</sup>	0.6 <sup>b</sup>	37.0 <sup>a</sup>
Banana 100	2.22 <sup>a</sup>	33.2 <sup>e</sup>	0.4 <sup>b</sup>	47.0 <sup>a</sup>
Potato 50	1.98 <sup>b</sup>	54.8 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>a</sup>	2.0 <sup>b</sup>
Potato 100	2.38 <sup>a</sup>	64.4 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>
CK	1.65 <sup>c</sup>	51.4 <sup>bc</sup>	0.6 <sup>b</sup>	6.0 <sup>b</sup>

\*1 Basal medium contained 1/2 MS major elements, MS minor elements, sucrose 20 g/l, activated charcoal 1 g/l, pH 5.2. Data were collected after at 3 months after treated.

\*2 Shoots' appearance was long and thin, and there was root formation.

\*3 The same letters are not significantly different 5% by LSD.

小花蕙蘭自種子發芽形成根莖需再經 1-2 年的培養，待根莖成熟後，其前端生長點可自然分化為芽體，惟有自然萌發芽體率低、芽體生長不一致且耗時之情形。利用液體培養可使培植體快速繁殖，且研究指出植物生長調節為主要控制小花蕙蘭芽體生成之因子（李 1997；廖等 1997），為了解植物生長調節劑對四季蘭芽體分化之影響，並得到生育整齊之芽體，本試驗以 NAA 及 BA 組合處理來探討其最適四季蘭根莖分化芽體之配方。試驗結果顯示 NAA 有助於四季蘭根莖之生育，隨著處理濃度之提高，其促進之效果亦隨之增加，當四季蘭根莖於不含 NAA 及 BA 處理下培養 12 週後，其鮮重為 4.99 g，0.1 mg/l NAA 處理下其鮮重提高至 5.52 g，1 mg/l NAA 處理其鮮重則提高至 6.12 g（圖二），且以上 3 種處理下其新生根莖數可達 73.6 至 80.4 枝，顯示 NAA 有助於根莖之生長與增殖（表四），與過去學者研究結果相似（Nayak *et al.*, 1998；Peak and Yeung, 1991）。在 NAA 與 BA 組合處理下試驗結果顯示，以 5 mg/l BA 處理培植體褐化嚴重達 100%，調查其鮮重僅為 1.40 g，可誘導獲得芽球但無芽體生成，培養基褐化造成培植體生育不良最後死亡，而 5 mg/l BA 與 0.1 及 1 mg/l NAA 之組合處理亦有相同之結果，其褐化率分別為 80% 及 50%（表四），雖可誘導無褐化之芽球生成，但其外觀呈扁圓形之異常芽，將其繼代於固體培養基下，觀察其芽體生長情形，多數會持續褐化或生育遲緩且異常，故高濃度（5 mg/l）BA 處理易造成培植體褐化，且獲得之芽球多為異常芽，不利日後生長。芽體誘導最佳的處理以 1 mg/l BA 處理與 NAA 濃度為 0、0.1、1 mg/l 之組合處理，分別可獲得 9.0、9.2、7.0 個芽體，與 50 個以上之芽球生成，其中以 0.1 mg/l NAA 搭配 1mg/l BA 表現最佳，其鮮重為 4.98 g、直徑 2 mm 以上之芽球有 33.8 個（表四；圖三）。

表四、植物生長調節劑 BA 及 NAA 組合處理對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響

Table 4. Effects of BA and NAA combined treatments on shoot differentiation of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ rhizome sections in shoot differentiation medium.\*1

Plant regulators		Fresh weight (g)	No. of rhizomes	No. of shoots*2	No. of buds that diameters were over 2 mm*3	No. of buds that diameters were less 2 mm	Browning (%)
NAA (mg/l)	BA (mg/l)						
0.0	0	4.99 <sup>b*4</sup>	73.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0
0.1	0	5.52 <sup>ab</sup>	79.6 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0
1.0	0	6.12 <sup>a</sup>	80.4 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0
0.0	1	3.52 <sup>c</sup>	0.0 <sup>b</sup>	9.0 <sup>a</sup>	28.6 <sup>a</sup>	22.0 <sup>a</sup>	0
0.1	1	4.98 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	9.2 <sup>a</sup>	33.8 <sup>a</sup>	21.8 <sup>a</sup>	0
1.0	1	4.92 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	7.0 <sup>a</sup>	32.6 <sup>a</sup>	21.0 <sup>ab</sup>	5
0.0	5	1.40 <sup>d</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	12.2 <sup>bc</sup>	3.8 <sup>bc</sup>	100
0.1	5	2.05 <sup>d</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	21.6 <sup>ab</sup>	23.8 <sup>a</sup>	80
1.0	5	2.29 <sup>d</sup>	0.0 <sup>b</sup>	2.4 <sup>b</sup>	26.8 <sup>ab</sup>	22.0 <sup>a</sup>	50

\*1 Basal medium contained 1/2 MS major elements, MS minor elements, sucrose 20 g/l, pH 5.2. Data were collected after at 12 weeks after treated.

\*2 Shoots' appearance was long and thin, and there was root formation.

\*3 Buds' appearance was short and round, and there was no root formation.

\*4 The same letters are not significantly different 5% by LSD.

為了更瞭解四季蘭根莖分化芽體時 BA 之最適處理劑量，本試驗依據上述之結果，將 NAA 處理濃度固定於 0.1 mg/l，與 0-3 mg/l 之 BA 細分為 7 個等級作組合，每處理並添加椰子水，期望獲得快速、整齊之四季蘭芽體。試驗結果顯示，四季蘭‘金荷’之根莖在上述之組合處理下，除僅含 0.1 mg/l NAA 處理可促進根莖與生長及增殖外，其他處理經 4 週之液體培養後可獲得直徑 2 mm 以上之芽球生成，經 6 週之液體培養後則有芽體之生成，8 週處理後可觀察到少數芽體兩側已有根形成，經 12 週處理後之調查結果顯示，不含 BA 僅含 0.1 mg/l NAA 處理其新生根莖數為 66.5 枝，且根莖可自然萌發芽體，芽體數為 1.9 個，顯示 NAA 可促進根莖生長，而根莖自然萌芽率低。然而在 NAA 0.1 mg/l 與所有 BA 組合處理中，

以 1.0 mg/l BA 處理獲得芽體 14.3 個最高，0.5 mg/l BA 處理之 10.5 個次之，處理間具顯著差異，之後隨著 BA 處理濃度提高所獲得之芽數隨之降低，當 BA 濃度提高至 1.5 mg/l 時，除誘導之芽數減少外，培植體亦出現褐化情形，以 3mg/l BA 處理下所獲得之芽數為 3.4 個為最低，褐化率為 13.5%（表五）；然而在植物生長調節劑之處理下，腋芽在發育為芽體之前，會先形成芽球，故調查其芽球大小，在直徑 2 mm 以上之芽球形成數 BA 0.5 及 2.5 mg/l 處理為 27.8、27.4 個最多，BA 1 mg/l 處理之 23.7 個次之，顯示其未來發育為芽體之機會最高（表五）。綜合以上結果顯示，BA 促進四季蘭根莖分化芽體之處理濃度以 0.5 至 1 mg/l 較適宜，且比較表四及表五之 NAA 0.1 mg/l 與 BA 1 mg/l 試驗結果，添加椰子水有利其芽體之形成。廖等（1997）研究指出素心蘭及報歲蘭根莖在 BA 1 mg/l 處理下，芽體較為細長，且抽長最快，亦無褐化導致培植體死亡情形發生，而 BA 處理濃度超過 3 mg/l 以上時，所誘導獲得之芽體呈叢生狀且肥胖矮短，生長點混亂有停滯生長的現象，後續成長不良，培養基褐化嚴重等現象與本試驗結果相似。

表五、不同濃度之植物生長調節劑 BA 對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響

Table 5. Effects of BA concentrations on shoot differentiation of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ rhizome sections in shoot differentiation medium.\*1

BA (mg/l)	Fresh weight (g)	No. of rhizomes	No. of shoots*2	No. of buds that diameters were over 2mm*3	No. of buds that diameters were less 2mm	Brownin g (%)
0.0	4.69 <sup>a*4</sup>	66.5 <sup>a</sup>	1.9 <sup>e</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0
0.5	4.56 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>b</sup>	10.5 <sup>b</sup>	27.8 <sup>a</sup>	45.6 <sup>ab</sup>	0.0
1.0	4.97 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	14.3 <sup>a</sup>	23.7 <sup>ab</sup>	54.9 <sup>a</sup>	0.0
1.5	3.93 <sup>c</sup>	0.0 <sup>b</sup>	7.3 <sup>c</sup>	16.2 <sup>b</sup>	57.4 <sup>a</sup>	5.5
2.0	3.80 <sup>cd</sup>	0.0 <sup>b</sup>	6.7 <sup>c</sup>	14.8 <sup>b</sup>	40.1 <sup>b</sup>	9.5
2.5	3.98 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>	5.6 <sup>cd</sup>	27.4 <sup>a</sup>	39.9 <sup>b</sup>	8.0
3.0	3.29 <sup>d</sup>	0.0 <sup>b</sup>	3.4 <sup>de</sup>	20.8 <sup>ab</sup>	46.0 <sup>ab</sup>	13.5

\*1 Basal medium contained 1/2 MS major elements, MS minor elements, sucrose 20 g/l, coconut milk 100ml/l, NAA 0.1 mg/l, pH 5.2. Data were collected after at 12 weeks after treated.

\*2 Shoots' appearance was long and thin, and there was root formation.

\*3 Buds' appearance was short and round, and there was no root formation.

\*4 The same letters are not significantly different 5% by LSD.

在植物生長調節劑運用於小花蕙蘭根莖分化方面，多僅限於 BA 與 NAA 之組合處理（廖等 1997），然而 TDZ（Thidiazuron）其具高的 cytokinin 活性，相關的研究指出 TDZ 可促進蝴蝶蘭花梗芽形成不定芽（Chen and Piluek, 1995），及誘導報歲蘭根莖抽芽但抑制根莖之增殖（Chang and Chang, 2000），以 TDZ 與 2,4-D（2,4-dichlorophenoxyacetic acid）處理可誘導素心蘭形成癒傷組織（Chang and Chang, 1998）及促進花莖型態發生，分化成芽體、根莖及花序（黃等 2008）。本試驗比較 BA 及 TDZ 對四季蘭根莖誘導芽體之效果，試驗結果顯示四季蘭根莖於 TDZ 處理下其形成芽球之時間較 BA 處理為早，但 TDZ 處理於培養 6 週後其芽球生育速度逐漸趨緩，且 0.5、1 mg/l TDZ 處理所誘導之芽球外觀呈短圓形，相較於 BA 處理及 0.1mg/l TDZ 處理所誘導之芽球外觀較為細長。經處理 8 週後，芽數以處理 13.2 個最高，與 1mg/l BA 處理 9.0 個及 0.5mg/l BA 處理為 7.8 個具顯著差異，而 0.5、1 mg/l TDZ 處理則僅為 1.4 個芽數表現較差，鮮重表現方面，亦以 0.1 mg/l TDZ 處理 2.67g 最多，1 mg/l TDZ 處理 2.30g 最少，且差異顯著；而在 2 mm 以上之大芽球則以 0.5 mg/l BA 處理 48.4 個最高，1 mg/l TDZ 處理 33.8 個最低，且差異顯著（表六）。故以低濃度（0.1 mg/l）TDZ 處理四季蘭‘金荷’之根莖分化芽體之效果最佳，且外觀細長與 BA 處理相似，過高劑量的 TDZ 處理所誘導獲得的芽球外觀短圓（圖四），本試驗結果與 Chang 及 Chang（2000）於報歲蘭根莖誘導芽體分化結果相似，低濃度（0.01-0.1 mg/l）之 TDZ 處理可誘導芽

體分化並正常抽長為植株，過高濃度（1 mg/l）之 TDZ 處理誘導之芽體其後續抽長情形不良，株高矮且無根形成，廖等（1997）亦指出過高劑量的 cytokinin 處理如 BA 對素心蘭及四季蘭所誘導獲得的芽體其生長點混亂有停滯生之情形。綜合以上結果顯示利用低濃度 0.1 mg/l TDZ 來處理四季蘭根莖可縮短芽體誘導之時間，其效果優於 BA 處理。

表六、TDZ 與 BA 對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響

Table 6. Effects of TDZ and BA treatments on shoot differentiation of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ rhizome sections in shoot differentiation medium. \*<sup>1</sup>

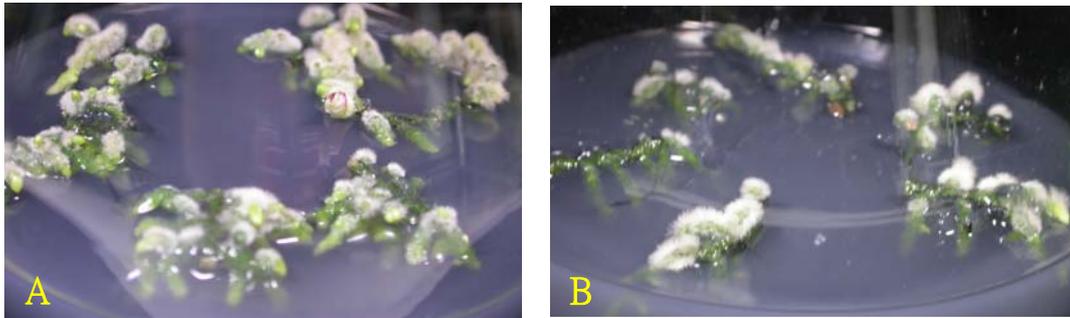
Cytokinins (mg/l)	Fresh weight (g)	No. of shoots * <sup>2</sup>	No. of buds that diameters were over 2mm * <sup>3</sup>	No. of buds that diameters were less 2mm
BA 0.5	2.38 <sup>ab*4</sup>	7.8 <sup>b</sup>	48.4 <sup>a</sup>	32.8 <sup>b</sup>
BA 1.0	2.50 <sup>ab</sup>	9.0 <sup>b</sup>	36.8 <sup>ab</sup>	46.6 <sup>ab</sup>
TDZ 0.1	2.67 <sup>a</sup>	13.2 <sup>a</sup>	38.6 <sup>ab</sup>	53.2 <sup>a</sup>
TDZ 0.5	2.48 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>c</sup>	41.8 <sup>ab</sup>	44.2 <sup>ab</sup>
TDZ 1.0	2.30 <sup>b</sup>	1.4 <sup>c</sup>	33.8 <sup>b</sup>	56.2 <sup>a</sup>

\*<sup>1</sup> Basal medium contained 1/2 MS major elements, MS minor elements, sucrose 20 g/l, tryptone 1 g/l, coconut milk 100ml/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, NAA 0.1 mg/l, pH 5.2. Data were collected after at 8 weeks after treated.

\*<sup>2</sup> Shoots' appearance was long and thin, and there was root formation.

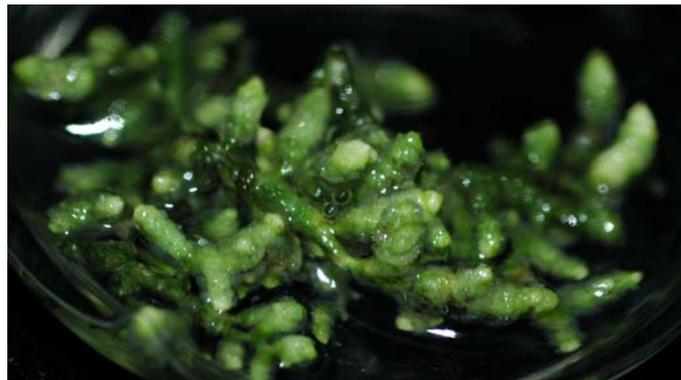
\*<sup>3</sup> Buds' appearance was short and round, and there was no root formation.

\*<sup>4</sup> The same letters are not significantly different 5% by LSD.



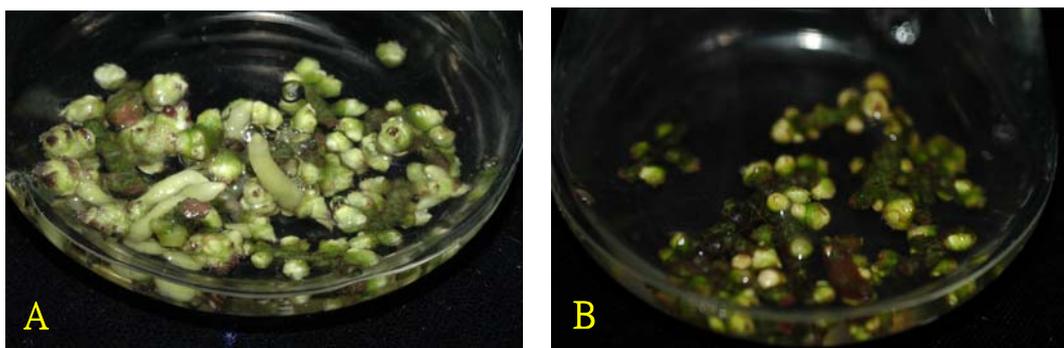
圖一、大量元素濃度對四季蘭‘金荷’根莖生育之影響。A：MS 處理；B：1/4 MS 處理

Fig. 1. Effects of major salt concentrations on growth of rhizome of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’. A: MS treatment. B: 1/4 MS treatment.



圖二、四季蘭‘金荷’根莖於 1 mg/l NAA 處理下之生育情形

Fig. 2. The rhizome growth condition of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ in 1 mg/l NAA medium.



圖三、植物生長調節劑 BA 及 NAA 組合處理對四季蘭‘金荷’根莖分化芽體之影響。A：1 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 組合處理；B：5 mg/l BA 及 0.1 mg/l NAA 組合處理

Fig. 3. Effects of BA and NAA combined treatments on shoot differentiation of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ rhizome sections in shoot differentiation medium. A: 1 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA combined treatment. B: 5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA combined treatment.



圖四、四季蘭‘金荷’根莖於 0.5 mg/l TDZ 及 0.1 mg/l NAA 組合處理 8 週後之芽體外觀

Fig.4. The shoots’ appearance of *Cym. ensifolium* ‘Jin-he’ rhizome sections cultured in 0.5 mg/l TDZ and 0.1 mg/l NAA combined treatment after 8 weeks.

## 結 論

綜合以上結果，如何獲得外觀粗壯、生育良好之根莖為小花蕙蘭微體繁殖之首要課題，大量元素、蔗糖濃度及有機添加物等培養基配方均可影響根莖之生育與日後芽體之分化，四季蘭之根莖於 MS、40 g/l 蔗糖培養下，可獲得外觀粗壯、生育良好之根莖；然而適宜之有機添加物亦有促進根莖生育與增殖之效果，本試驗結果顯示馬鈴薯泥處理雖不會促使培植體褐化，惟其新生之根莖細，對於日後芽體分化較為不利；香蕉泥及蘋果泥處理雖會造成培植體褐化發生，但未發生褐化之培植體其新生之根莖外觀粗壯，因此調整有機添加物之種類與濃度，可有效降低褐化與促進根莖生育，例如以香蕉泥 40 g/l 搭配馬鈴薯泥 60 g/l，即可養成外觀較粗且褐化率低之四季蘭根莖。小花蕙蘭之芽體多由成熟根莖之前端生長點自然分化而得，惟其自然萌發芽體率低，致芽體生長不一致且耗時。本試驗結果顯示，利用液體培養可使培植體快速繁殖，解決耗時問題，而適宜之植物生長調節劑組合處理可使根莖之腋芽分化成芽體，有效解決芽體萌發率低與生長不一致之問題。其中以 BA 0.5-1 mg/l 或 TDZ 0.1 mg/l 搭配 NAA 0.1 mg/l 組合

處理所獲得之芽體數最多，且芽體外觀呈細長狀，可正常生育為植株；但高劑量的 cytokinin 處理如 BA、TDZ 對四季蘭所誘導獲得的芽體外觀短圓，其生長點混亂，有停滯生長之情形。透過以上之研究，可瞭解適宜四季蘭根莖之生育至芽體分化各階段之培養基配方與培養方法，期望能供給其他研究者或組培業者之參考。然而在獲得整齊之芽體或芽球後，芽體要能順利且整齊的抽長與發根方能獲得生育整齊之組培苗，筆者在順利獲得芽體後，觀察到若將芽體繼代於不適宜之培養基下，只有部分芽體抽長，使得生育不整齊、芽體又長出根莖，或芽體只長根而不抽長等情形，因此本課題仍有待進一步的試驗探討。

## 參考文獻

1. 呂依倫、李志仁、李岷 1992 培養基成分對素心蘭種子無菌發芽之影響 中國園藝 38:161-169。
2. 孔凡龍、賈玉芳、柴明良、錢曉薇、李芳 2009 春蘭離體根狀莖生長和分化的研究 核農學報 23:253-256。
3. 李志仁、李岷 1991 報歲蘭和素心蘭種子無菌發芽 中國園藝 37:289。
4. 李岷 1997 素心蘭、四季蘭和報歲蘭之無菌發芽 海峽兩岸森林生物技術及環境變遷對森林生態系之影響研討會論文集 p500-509。
5. 周明燕、張定霖、何陽修 2005 台灣國蘭產銷概況 種苗科技專訊 51:17-23。
6. 周全、余平 2009 春蘭根狀莖的增殖與分化條件優化 湖北農業科學 48:27-30。
7. 洪惠娟、魏芳明、郭瓊榛 2010 產業發展與產銷現況 國蘭生產作業手冊 行政院農業委員會台中區農業改良場編印 p3-11。
8. 陳裕星、張莉欣 2004 台灣原生蘭屬植物遺傳資源之分類與生育特性 台中區農業改良場研究彙報 82:51-60。
9. 張正 2010 國蘭的分類、形態與品系 國蘭生產作業手冊 行政院農業委員會台中區農業改良場編印 p12-24。
10. 張超、張茜茜、樓楠男、榮松 2009 有機添加物對大花蕙蘭原球莖及幼苗生長發育的影響 安徽農業科學 37:8866-8868,8903。
11. 黃杰豐、王光輝、沈榮壽 2008 素心蘭花莖培養之形態發生 嘉大農林學報 5:64-73。
12. 潘貞葵、李岷、張耀乾 2009 碳源及氮素濃度對報歲蘭根莖生長及分化之影響 台灣園藝 55:219-228。
13. 廖曼利、張莉欣、李岷 1997 素心蘭和報歲蘭根莖之器官分化與大量繁殖 園藝種苗科技技術研究成果發表會專集 p593-629。
14. 蕭宇倫、李岷 2000 報歲蘭‘十八學士’與其雜交種根莖生長與植物生長調節劑之相互關係 中國園藝 46:493。
15. Chang, C. and W. C. Chang. 1998. Plant regeneration from callus of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. *Plant Cell Reports* 17:251-255.
16. Chang, C. and W. C. Chang. 2000. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 30:171-175.
17. Chen, Y. and C. Piluek. 1995. Effect of thidiazuron and N<sup>6</sup>-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regulation* 16:99-101.
18. Chung, J. D., D. K. Chun, and S. O. Choi. 1985. Asymbiotic germination of *Cymbidium ensifolium*. II. Effects of several supplements to the medium, pH values and light and/or dark culture periods on rhizome growth and organogenesis from the rhizome. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 26:186-192.
19. Ernst, R., J. Arditti, and P. L. Healey. 1970. The nutrition of orchid seedlings. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 39:691-700.
20. Hasegawa, A. and M. Goi. 1987. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. and *Cymbidium kanran* Makino in shoot-tip culture. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 56:70-78.
21. Huang, C. L. and H. Okubo. 2005. Effect of carbon sources *in vitro* morphogenesis from rhizomes of *Cymbidium sinense*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 50:35-40.
22. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
23. Nayak, N. R., P. K. Chand, S. P. Rath, and S. N. Patnaik. 1998. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:185-188.
24. Peak, K. Y. and E. C. Yeung. 1991. Effects of 1-naphthaleneacetic acid and N<sup>6</sup>-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 24:65-71.
25. Shimasaki, K. and S. Uemoto. 1991. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:49-52.