

文心蘭莖頂培養之研究¹

易美秀²

摘 要

本研究主要探討文心蘭*Onc. Gower Ramsey* 'Volcano Queen' 莖頂組織培養之最適當培養基。培植體取自頂芽、第一及第二側芽具二原體之生長點，比較不同鹽類濃度和生長調節物質對其初代培養之影響。培養60日後以含1 mg/l NAA、0.1 mg/l Kinetin、20 g/l蔗糖及9 g/l洋菜之全量鹽類濃度MS培養基在培植體存活率與類原球體數目上獲得最好的效果。此外，比較PLB去頂縱切成4片之培植體，在不同鹽類濃度和椰子水含量培養基中之增殖情形，結果以含20~25%椰子水之全量鹽類濃度MS固體培養基之增殖率最高。

關鍵字：類原球體、莖頂培養、培養基、增殖。

前 言

文心蘭屬(*Oncidium*)原產於中、南美洲，由美國南端佛羅里達至墨西哥、巴拉圭、秘魯、巴西至阿根廷等都有發現。原生種約有750種⁽¹¹⁾。文心蘭屬可和近緣屬交配，由二屬交配至六屬交配皆有^(5,12,15)。

文心蘭是台灣重要的外銷花卉，文心蘭商業栽培上的種苗供應，需經由組織培養法而達成。文心蘭的組織培養法所採用的培植體有葉⁽⁶⁾、花梗節間⁽⁷⁾、根端⁽¹⁷⁾、幼嫩花序之花原始體⁽¹⁾及腋芽⁽³⁾等。除了以上方法外，莖頂培養方法亦有其重要性，本文即在研究文心蘭的莖頂培養適用方法，黃⁽²⁾認為取生長點的大小，依目的不同而異，如為培養無毒素病苗為目的時，僅能取生長點本身，但以繁殖為目的時則採用較大的組織塊。本試驗以0.5 mm具二葉原體之生長點，做為培植體，目的在建立文心蘭的莖頂培養方法，改善腋芽培植體繁殖時只能將污染率控制在50%以下⁽³⁾的缺點，以作為優良單株繁殖及文心蘭重要種原繁殖時之方法。

材料與方法

一、植物材料及培養方法

(一)植物材料

本研究使用材料為台中區農業改良場蘭園所栽培的5~6年生之文心蘭成株，品種為*Onc. Gower Ramsey* 'Volcano Queen'。

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0675 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

(二)培養方法

MS (Murashige and Skoog)⁽¹⁶⁾鹽類中大量元素分別採用1/4、1/3、1/2及全量，再分別加上全量之微量元素、鐵源、有機酸和維生素，並添加20 g/l蔗糖，植物生長調節劑依試驗設計添加，培養基pH值調整為5.2後再加入9 g/l洋菜。初代培養以3 cm×10 cm之平底試管，內裝15 ml培養基加以培養，增殖培養以50 CC三角瓶內裝20 ml培養基加以培養。培養室溫度為25±2°C，光強度為2,000~2,500 Lux，每日光照16 hrs。

二、試驗方法

(一)初代培養

採取生長中之新芽，長約7~8 cm，以清水清洗後，外緣葉片剝掉2葉，露出葉腋基部芽體，切除多餘部分後以1% NaOCl加一滴Tween 20消毒10分鐘後，於無菌操作台內以無菌水清洗3次，再以95%酒精消毒30秒後，於解剖顯微鏡下，切取新芽頂芽及自頂部算起之第一側芽和第二側芽(以下稱頂芽、第一及第二側芽)，大小約0.5 mm具二葉原體之生長點，做為培植體。

1. MS鹽類濃度對初代培養之影響

將莖頂生長點植於1/4、1/3、1/2及全量鹽類濃度MS之固體培養基中培養，每處理各取頂芽、第一及第二側芽之10個生長點，即一新芽取3個生長點，培植體植入60日後調查其成活率及類原球體數目。

2. 生長調節物質對莖頂初代培養之影響

(1) NAA、BA組合對初代培養之影響

將莖頂生長點植入含不同濃度NAA (0、0.1、1.0 mg/l)及BA (0、0.1、1.0 mg/l)之全量鹽類濃度MS固體培養基上，每處理各取頂芽、第一及第二側芽之10個生長點，即一新芽取3個生長點，培植體植入60日後調查其成活率及類原球體數目。

(2) NAA濃度對初代培養之影響

將莖頂生長點植入含NAA (0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/l)之全量鹽類濃度MS固體培養基上培養，每處理各取頂芽、第一及第二側芽之10個生長點，培養60日後調查其成活率及類原球體數目。

(3) NAA、BA、Kinetin組合對初代培養之影響

將莖頂生長點植入含NAA 1.0 mg/l、BA (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)及Kinetin (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)組合之全量鹽類濃度MS固體培養基上培養，每處理各取頂芽、第一及第二側芽之20個生長點，培養60日後調查其成活率及類原球體數目。

(二)增殖培養

1. MS鹽類濃度對增殖培養之影響

初代培養所得之原球體，選取2 mm大小之原球體去頂後縱切成4等分為培植體，將培植體植於1/4、1/3、1/2及全量鹽類濃度MS之固體培養基中培養，每處理5瓶，每瓶含10個培植體，培養60日後調查死亡率、器官形成率、類原球體數目及增殖倍數。

2.椰子水含量對增殖培養之影響

初代培養所得之類原球體縱切成4等分後，於含1 mg/l NAA、0.1 mg/l Kinetin之MS培養基中增殖後，選取2 mm大小之類原球體去頂後縱切成4等分為培植體，將培植體於含椰子水(0、5、10、15、20、25%)之MS培養基中培養，每處理4瓶，每瓶含10個培植體，培養60日後調查死亡率、器官形成率、類原球體數目及增殖倍數。

結果與討論

一、初代培養

(一)MS鹽類濃度對初代培養之影響

以不同鹽類濃度之MS培養基，培養文心蘭*Onc. Gower Ramsey* 'Volcano Queen' 頂芽、第一及第二側芽之莖頂生長點，由試驗結果得知MS、1/2 MS、1/3 MS、1/4 MS之莖頂平均存活率分別為63.6、66.6、56.7及53.3%，平均一個新芽所產生之類原球體數分別為5.5、4.4、3.3及2.9個(表一)，綜合考量存活率及產生類原球體數，以全量MS做為初代培養之基本培養基較為適合。

表一、MS 鹽類濃度對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* 'Volcano Queen' 莖頂培養之影響

Table 1. Effect of MS basal salt strength on shoot tip culture of *Onc. Gower Ramsey* 'Volcano Queen'

Salt strength	Terminal bud		First lateral bud from the top		Second lateral bud from the top	
	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB
MS	40	1.0a	70	1.9a	80	2.6a
1/2MS	40	0.9a	90	2.4a	70	1.1b
1/3MS	20	0.2a	70	1.5a	80	1.6ab
1/4MS	30	0.4a	70	1.7a	60	0.8b

(二)生長調節物質對莖頂初代培養之影響

由NAA (0、0.1、1.0 mg/l)及BA (0、0.1、1.0 mg/l)之組合試驗結果得知於NAA之三濃度中添加BA，降低莖頂存活率亦減少類原球體的產生(表二)。單獨添加1.0 mg/l NAA最有益於提高莖頂存活率及增加類原球體的個數。

將NAA濃度範圍增加為0、0.1、0.5、1.0、1.5及2.0 mg/l等6種處理，由試驗結果得知其平均存活率分別為30、46.7、70、73.3、60及60%，存活率以NAA 1.0 mg/l為最高，一新芽所產生之類原球體數6種處理分別為3.8、6.7、7.7、9.9、6.9及7.7個(表三)，不論存活率或產生之類原球體數皆以NAA 1.0 mg/l為最高。

以NAA 1.0 mg/l與BA (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)或Kinetin (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)組合之7種處理，由試驗得知NAA 1.0 mg/l添加BA (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)之平均存活率分別71.7、55.0、51.7及71.7%，一新芽所產生之類原球體數分別為7.6、3.9、3.8及6.2個，NAA 1.0 mg/l添加Kinetin (0、0.1、0.5、1.0 mg/l)之平均存活率為71.7、70、60及50%，一新芽所產生之

類原球體數分別為7.6、8.6、7.6及5.6個(表四)，綜合上述結果得知以1.0 mg/l NAA添加0.1 mg/l Kinetin最適合文心蘭初代培養所需。

表二、NAA 和 BA 濃度對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’ 莖頂培養之影響

Table 2. Effects of NAA and BA on shoot tip culture of *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’

NAA (mg/l)	BA	Terminal bud		First lateral bud from the top		Second lateral bud from the top	
		Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB
0	0	40	0.6bc	90	2.3a	70	2.6a
0	0.1	40	0.3c	90	2.3a	60	2.2a
0	1.0	40	0.8bc	50	0.9a	40	0.9a
0.1	0	70	1.3b	80	2.3a	70	1.4a
0.1	0.1	60	0.6bc	60	2.3a	30	1.0a
0.1	1.0	80	0.8bc	60	1.9a	30	1.0a
1.0	0	90	2.8a	90	2.7a	80	2.3a
1.0	0.1	60	1.0bc	60	2.2a	30	1.8a
1.0	1.0	60	0.6bc	60	1.2a	40	1.2a

表三、NAA 濃度對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’ 莖頂培養之影響

Table 3. Effect of different concentrations of NAA on shoot tip culture of *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’

NAA (mg/l)	Terminal bud		First lateral bud from the top		Second lateral bud from the top	
	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB
0	10	0.3b	40	1.4b	40	2.1a
0.1	50	2.4a	30	1.9ab	60	2.4a
0.5	90	2.1ab	80	3.2ab	40	2.4a
1.0	70	1.5ab	80	3.9a	70	4.5a
1.5	90	2.6a	40	1.9ab	50	2.4a
2.0	80	2.2ab	30	1.7ab	70	3.8a

Kim and Kako (1982) 進行東亞蘭莖頂培養的研究，曾發現荷爾蒙對於莖頂的存活並非必要的，培植體只有兩個或更少的葉原基時若無外加荷爾蒙則生長受抑制，培植體有三個或更多葉原基時，則於葉綠素合成和器官分化上並不需外加荷爾蒙⁽¹³⁾。本研究所取生長點大小約0.5 mm，具有二葉原體，由試驗結果得知外加NAA可增加其成活率，與其試驗結果相符合。由試驗結果得知單獨添加BA (表二)降低莖頂成活率及類原球體形成數，BA與NAA組合，增加BA濃度也不利於莖頂培養，此結果與Begum等人(1994)所指東亞蘭以NAA和BA組合處理可獲得較多類原球體結果⁽⁴⁾不同，可能是由於種類不同，需求有所差異所致。試驗結果顯

示1 mg/l NAA添加0.1mg/l Kinetin最適合文心蘭莖頂初代培養，與Fonnesbech (1972)以10 μ M NAA和1 μ M Kinetin的組合最適合東亞蘭類原球體的生長和發育⁽¹⁰⁾類同。

表四、生長調節劑對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’莖頂培養之影響

Table 4. Effect of plant growth regulators on shoot tip culture of *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’

NAA	BA	Kinetin	Terminal bud		First lateral bud from the top		Second lateral bud from the top	
			Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB	Survival rate (%)	No. of PLB
1.0	0	0	75	1.9a	60	2.9a	80	2.8ab
1.0	0.1	0	65	1.0abc	55	1.8a	45	1.1c
1.0	0.5	0	35	0.4c	55	1.8a	65	1.6bc
1.0	1.0	0	60	1.0abc	75	2.5a	80	2.7ab
1.0	0	0.1	70	1.7ab	70	3.5a	70	3.4a
1.0	0	0.5	55	1.3ab	65	3.3a	60	3.0ab
1.0	0	1.0	40	1.0abc	50	2.0a	60	2.6ab

二、增殖培養

(一)MS鹽類濃度對增殖培養之影響

以不同鹽類濃度之MS培養基，培養文心蘭*Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’之PLB片段，結果以全量MS的PLB形成率，產生PLB的個數及增殖倍率為最高。1/3 MS及1/4 MS的PLB形成率低，產生之PLB個數也少，1/4 MS的增殖倍數最低，平均一個PLB只能增殖4.96倍(表五)。

表五、MS 鹽類濃度對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’之 PLB 切片的生長和器官分化的影響

Table 5. Effect of MS basal salt strength on the growth and organogenesis of PLB segments in *Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’

Salt strength	Organogenesis (%)				Number of PLB produced	Proliferation rate
	Plantlet	Plantlet+PLB	PLB	Dead		
MS	8.0 b	4.0 b	58.0 a	30.0 a	2.50 a	8.48 a
1/2MS	12.0 b	14.0 a	46.0 ab	28.0 a	1.62 ab	7.68 a
1/3MS	16.0 b	28.0 a	34.0 b	22.0 a	1.04 b	6.24 ab
1/4MS	34.0 b	6.0 b	36.0 b	24.0 a	0.82 b	4.96 b

(二)椰子水含量對增殖培養之影響

以不同椰子水含量之MS培養基，培養文心蘭*Onc. Gower Ramsey* ‘Volcano Queen’之PLB片段，結果添加20~25%椰子水可有效減少培植體的死亡，產生PLB的個數及增殖倍率隨椰子水含量增加而增加，但未達顯著差異。Kusumoto (1980)以不同椰子水含量之KC基本

培養基進行東亞蘭PLB的增殖培養，其試驗結果指出10~20%椰子水含量最適合東亞蘭PLB的增殖⁽¹⁴⁾，本試驗結果與其類同，椰子水有利於PLB的增殖，但適合之椰子水含量可能因蘭花種類不同而有所差異。

表六、椰子水含量對文心蘭 *Onc. Gower Ramsey 'Volcano Queen'* 之 PLB 切片的生長和器官分化的影響

Table 6. Effect of the amount of coconut water on the growth and organogenesis of PLB segments in *Onc. Gower Ramsey 'Volcano Queen'*

Amount of coconut water (%)	Organogenesis (%)				Number of PLB produced	Proliferation rate
	Plantlet	Plantlet+PLB	PLB	Dead		
0	2.5 a	5.0 a	40.0 a	52.5 a	1.38 a	5.8 a
5	7.5 a	7.5 a	45.0 a	40.0 ab	1.35 a	6.1 a
10	2.5 a	12.5 a	45.0 a	40.0 ab	1.95 a	8.4 a
15	5.0 a	20.0 a	37.5 a	37.5 abc	2.85 a	12.5 a
20	5.0 a	22.5 a	52.5 a	20.0 c	2.88 a	12.5 a
25	7.5 a	15.0 a	50.0 a	27.5 bc	2.95 a	12.7 a

參考文獻

1. 邱金春、林昭雄 1997 文心蘭健康種苗繁殖體系之研究 P.645-652 園藝種苗科技研發成果發表會專集 農林廳種苗改良繁殖場編印。
2. 黃敏展 1993 蘭花栽培藝術 p.278-284 銀河文化事業公司。
3. 陳耀煌、張翊袖、陳文輝 2001 文心蘭分生苗組培量產技術之研發 台灣糖業公司研究所研究彙報173:67-76。
4. Begum, A. A., M. Tamaki, and S. Kako. 1994. Formation of protocorm-like bodies(PLB) and shoot development through in vitro culture of outer tissue of *Cymbidium* PLB. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:663-673.
5. Carpenter, M. O. 1980. Cultivation of the *Oncidium* / *Odontoglossum* alliance intergeneric hybrids. Amer. Orchid Soc. Bull. 49:981-989.
6. Chen, J. T. chang and W. C. Chang. 1999. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey and subsequent plant regeneration. Plant Cell Rep. 19:143-149.
7. Chen, J. T. and W. C. Chang. 2000a. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower stalk explants of *Oncidium* Sweet Sugar. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 62:95-100.
8. Chen, J. T. and W. C. Chang. 2000b. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Sci. 160:87-93
9. Chen, J. T. and W. C. Chang. 2002. Effects of tissue culture conditions and explant characteristics of direct somatic embryogenesis in *Oncidium* Gower Ramsey. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69:41-44.

10. Fannesbech, M. 1972. Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro. *Physiol. Plant.* 27:310-316.
11. Gerald, D. and M, J. Parisot. 1993. *Oncidium*, In: *Orchids Care and Cultivation*. p.160-165. Cassell Publishers Ltd., U. K.
12. Liebman, Howard. 1983. *Odontoglossum-Oncidium-Miltonia* alliance complex intergeneric hybrids-Part I . *Amer. Orchid Soc. Bull.* 52:569-577.
13. Kim, K. W. and S. Kako. 1982. Effect of plant growth regulators on organ formation in the *Cymbidium* shoot apex culture in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 51:106-114.
14. Kusumoto, M. 1980. Effects of coconut milk agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 48:503-509.
15. Monnier, G. 1985. *Oncidium* intergenerics for all climates. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 54:1072-1079.
16. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
17. Wu, I. F., Chen, J. T. and Chang, W. C. 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium Gower Ramsey*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77:107-109.

Studies on the Shoot Tip Culture of *Oncidium*¹

Meei-Shiou Yih²

ABSTRACT

This study was to investigate the most suitable medium for the shoot tip culture of the *Oncidium*. Gower Ramsey 'Volcano Queen'. The explants with two leaf-primordia were harvested from terminal bud, the first lateral bud and the second lateral bud from the top. Comparing effects of the different salt levels and growth regulators in primary culture, shoot tips were cultured on solid medium with full strength Murashige and Skoog (MS) containing 1 mg/l NAA, 0.1 mg/l Kinetin, 20 g/l sucrose and 9 g/l agar possessed the best effect in survival rate of explants and numbers of PLB after 60 days. Furthermore, decapitated PLBs cut vertically into 4 segments were compared on the proliferation rate in different salt levels and coconut water percentages. The solid medium with full strength MS containing 20-25% coconut water have the highest proliferation rate.

Key words: PLB, shoot tip culture, medium, proliferation.

¹Contribution No. 0675 from Taichung DARES, COA.

²Assistant Horticulturist of Taichung DARES, COA.