

金草蘭微體繁殖技術之研究

李淑真、廖芳心、鄭隨和

摘 要

本研究目的在建立原生金草蘭之微體繁殖技術。試驗以側芽為培植體，消毒方法為 1%次氯酸鈉加入 Tween 20 消毒 10 分鐘。基本培養基為 1/2 MS 添加 20 g/ℓ蔗糖、2.5 g/ℓ水晶洋菜、2 g/ℓ活性炭或不加入活性炭，pH 5.2。參試植物生長調節劑為 BA、2iP、TDZ 或組合 Auxin (NAA) 與 Cytokinins (BA、2iP 或 TDZ)。試驗結果顯示，初代微體繁殖培養 4 個月後，基本培養基添加 5 ppm BA 誘導不定芽發生頻率最高，添加 TDZ 增生之不定芽最多，其次為添加 2iP，但添加 TDZ 增生之不定芽多為畸形芽，添加 2 g/ℓ活性炭誘導不定芽發生頻率會降低。經繼代培養於生長培養基（基本培養基添加 0.1 ppm NAA 及 3 ppm 2iP）2 次，每次 2 個月，此時添加 TDZ 增生之不定芽多數褐化。切取小苗置入發根培養基（基本培養基添加 30 g/ℓ蔗糖、2 g/ℓ活性炭、0.5 ppm NAA 及 1 ppm 2iP）培養 1 個月後，再移至基本培養基添加 0.5 ppm IBA 組合 0.2 ppm BA、30 g/ℓ蔗糖、2 g/ℓ活性炭之發根培養基，培養 1 個月後，有不定根形成。經 10 個月的培養，以基本培養基添加 3 ppm 2iP 平均一個側芽培養可得到 18.8 個芽為最高。

關鍵詞：金草蘭、微體繁殖、BA、2iP、TDZ。

前 言

金草蘭為台灣原生石斛蘭，屬蘭科 (Orchidaceae) 石斛蘭屬 (*Dendrobium*) 植物，分布於本島 1000 ~ 1500 m 的原始闊葉林。植株呈叢生狀，莖呈圓柱形。葉黃綠色具光澤，狹長橢圓形，互生。新芽及花芽均包被於呈黑紫色之苞片內，其上佈有許多小斑點。花序由頂端之節長出，甚短。花金黃色，帶香味，是台灣原生石斛蘭屬花朵最大且美的物種（林，1988；周，1986；董，1980）。

台灣原生石斛蘭有 12 種，其中金草蘭 (*Dendrobium clavatum* Lindl.) 是石斛來源產量較豐富的物種（行政院農業委員會，1992）。石斛是常見的中藥，性味甘淡鹹平，入脾腎二經，益精強陰，為養胃聖藥，神農本草經將其列為上品，具有清熱生津、滋陰清胃之功效，並以新鮮品之效果較佳（李，1959）。因此，金草蘭兼具花大，豔麗又是中藥材之一種，利用組織培養微體繁殖技術，大量繁殖種苗，可供發展為新興花卉或中藥材。

材料與方法

一、試驗材料與培養環境

供試材料為種植於溫室之台灣原生金草蘭。培養基製備為 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 基本鹽類，添加 20 g/ℓ 蔗糖，殺菌前 pH 值以 KOH 或 HCl 調至 5.2，再加入 2.5 g/ℓ 水晶洋菜，經高溫高壓滅菌釜滅菌後使用。培養室溫度為 25±1℃，光照 16 小時，暗期 8 小時，光強度為 23 μmol/m²/sec。

二、微體繁殖系統之建立

(一) 消毒時間對金草蘭側芽培養之影響：剪取具 10 節左右的金草蘭枝條，去除葉片，以 70% 酒精擦拭表面消毒，以含 3~4 節的枝條及含 1 節的枝條為一消毒單位，分別以 1% 次氯酸鈉加入展著劑消毒 10、15、20 分鐘，無菌操作台下以無菌水沖洗後，切取側芽置入 1/2 MS 培養基，一星期後調查污染率。

(二) Cytokinins 對金草蘭側芽培養之影響：以 1/2 MS 培養基添加 6-Benzylaminopurine (BA) (3、5 ppm)；N6-2-Isopentenyl adenine (2iP) (3、5 ppm)；1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazurol-5-yl) urea (TDZ) (1、3、5 ppm)，並以 1/2 MS 為對照，共八種處理。或相同處理再加入活性炭。以 1% 次氯酸鈉加入展著劑消毒 10 分鐘後置入試管內培養，每支試管置入 1 側芽。

(三) 1-Naphthalene acetic acid (NAA) 組合 Cytokinins 對金草蘭側芽培養之影響：以 0.5 ppm NAA 組合 5 ppm BA、2iP、TDZ，共 3 處理；或相同處理再加入活性炭。以 1% 次氯酸鈉加入展著劑消毒 10 分鐘後置入試管內培養，每支試管置入 1 側芽。

(四) 初代微體繁殖分生苗繼代培養：金草蘭繼代培養採 1/2 MS 添加 0.1 ppm NAA 及 3 ppm 2iP。經側芽繁殖之不定芽置入 125 ml 三角瓶內，培養 2 個月後再繼代一次於相同之培養基，每支 125 ml 三角瓶置入再生不定芽約 20 叢。

(五) 微體繁殖分生苗誘導發根：金草蘭微體繁殖分生苗發根培養基為 1/2 MS 添加 0.5 ppm NAA 組合 1 ppm 2iP、30 g/ℓ 蔗糖、2.5 g/ℓ 水晶洋菜、2 g/ℓ 活性炭，pH 5.2，培養 1 個月後，再置入另一發根培養基配方，為 1/2 MS 添加 0.5 ppm IBA 組合 1 ppm 2iP、30 g/ℓ 蔗糖、2.5 g/ℓ 水晶洋菜、2 g/ℓ 活性炭，pH 5.2。

(六) 組織培養苗之馴化與栽培：微體繁殖分生苗置入發根培養基培養 2 個月後，取有發根之分生苗進行馴化與栽培，栽培介質為 100% 水苔，出瓶定植後置於有遮蔭網之溫室下馴化栽培。

結果與討論

一、消毒時間對金草蘭側芽培養之影響

如圖 1，取金草蘭著生於枝條上之節的側芽進行培養。結果顯示，以含有 3~4 節的枝條為 1 消毒單位，於消毒 5、10 及 15 min 約有 10~20% 的污染率。以含有 1 節的枝條為 1 消毒單位，於消毒 10、15 及 20 min 污染率均為 0。

二、Cytokinins 種類對金草蘭側芽培養之影響

結果顯示如表 1，初代微體繁殖均有芽體褐化及白化情形，側芽培養 4 個月後，於培養基未添加或添加活性炭，均以添加 5 ppm BA 的再生不定芽率達 66.6% 最高。但培養於 BA、2iP 或 TDZ 之芽體生長情形不同，如圖 2，培養於 BA 下再生不定芽數較少，培養於 2iP 下再生不定芽數較多，培養於 TDZ 下，產生畸形的不定芽。因此，本試驗金草蘭初代微體繁殖培養基為 1/2 MS 添加 5 ppm BA 的再生不定芽發生率最高，於芽體形態發生而言，以培養基添加 3 ppm 2iP 的處理最佳。於石斛蘭頂芽及側芽培養使用 VM 加椰子乳 150 g/l 的液體培養基或採 MS 及 H 基本培養基，添加 BA 5 mg/l 或椰子乳 150 g/l，固體或液體培養均可獲得幼苗（園藝世界出版社，1984）。本試驗顯示添加 BA、2iP 或 TDZ 均有芽體生長，如同四季蔥的莖頂培養中指出，培養於含有 BAP、TDZ、2iP 及 kinetin 的培養基，其芽體形態發生因細胞分裂素種類不同而異（李和許，1998；Sujatha and Raddy, 1998）。

三、NAA 組合與 Cytokinins 對金草蘭側芽培養之影響

NAA 組合 Cytokinins 對金草蘭側芽培養 4 個月後，結果如表 2 所示，於培養基未添加活性炭下，以 0.5 ppm NAA 組合 5 ppm 2iP 或 5 ppm TDZ 不定芽再生率達 50%，較 0.5 ppm NAA 組合 5 ppm BA 效果佳。此結果與表 1 相較顯示，NAA 的加入並無促進的效果。顏（1989）於石斛蘭莖頂培養使用修正的 MS 培養基加入椰子乳 15%、BA 5 mg/l、NAA 1 mg/l 或 Kinetin 1 mg/l，或以 KC 培養基加入椰子乳 20% 或 NAA 1 mg/l 之固體培養基，或 White 培養基加入椰子乳 20%，以 160 rpm 的振盪連續培養 2 星期，再更換至新培養基在 60 rpm 液體培養或固體培養 2~3 星期，有原球體形成。Alla and Staden（1997）於 *Yucca aloifolia* 莖頂培養中，NAA 可促進芽體增生；但於金草蘭側芽培養，培養基添加 NAA 無促進誘導的效果

四、活性炭對金草蘭側芽培養之影響

如表 1 及 2 顯示，於金草蘭側芽培養之培養基中添加活性炭，於添加 Cytokinins 或 NAA 組合 Cytokinins 均明顯抑制不定芽發生率，顯示金草蘭側芽培養不宜添加活性炭。Wann, et al.（1997）、Fridborg, et al.（1978）及 Owen, et al.（1991）指出培養基添加活性炭可以改善多數植物種類組織培養苗的生長、形態的發生及單雄生殖，但會阻礙過多的癒合組織生長；許等（1999）於報歲蘭組織培養指出活性炭可提高根莖之重量；方（1989）於黃花蝴蝶蘭葉片培養顯示活性炭可促進原球體之生長。但由本試驗結果顯示金草蘭側芽培養添加活性炭會降低不定芽發生率。

五、初代微體繁殖分生苗繼代培養

初代微體繁殖培養 4 個月後繼代至繼代培養基，培養 2 個月後再將叢不定生芽分切，置入相同培養基再繼代 1 次。初代微體繁殖側芽培養於添加 TDZ（1、3、5 ppm）或 0.5 ppm NAA 組合 5 ppm TDZ 的培養基，其再生之畸形不定芽，經繼代後褐化。但於添加 5 ppm BA、2iP（3、5 ppm）或 NAA 組合 5 ppm 2iP 的培養基，其再生之不定芽，經繼代後可正常生長，且發育成小苗。

六、微體繁殖分生苗誘導發根

初代微體繁殖培養 4 個月後，分生苗繼代培養 2 次各 2 個月，較大的不定芽移至發根培養基 1/2 MS 添加 0.5 ppm NAA 組合 1 ppm 2iP，小的不定芽繼續繼代培養。培養 1 個月後明顯有葉片黃化現象，且不定根發生情形不佳。改採繼代培養至另一種發根培養基，為 1/2 MS 添加 0.5 ppm IBA 組合 1 ppm

2iP，培養 1 個月後，不定根發生率表現良好，可出瓶馴化栽培。此試驗顯示不定芽移至含 NAA 的培養基不定根發生率差，於含有 IBA 的培養基不定根發生率良好。Bonfill, et al. (2002) 及 Klerk, et al. (1997) 於誘導於人參 (*Panax ginseng*) 及蘋果 (*Malus "Jork9"*) 不定根的形成指出，IBA 誘導不定根的發生率較 NAA 高。顯示金草蘭不定芽移至含 NAA 發根培養基，會有葉片黃化現象，發根情形不佳，移至含 IBA 發根培養基，則發根情形良好。

七、組織培養苗之馴化與栽培

不同生長調節劑經初代微體繁殖培養 4 個月後，經繼代培養 2 個月及發根培養 2 個月，出瓶馴化栽培，其流程如圖 3。計算不同初代微體繁殖培養基所得的小苗，結果如表 3，以最適側芽培養之初代培養基為 1/2 MS 添加 3 ppm 2iP、20 g/ℓ 蔗糖、2.5 g/ℓ 水晶洋菜，pH 5.2，經 10 個月的培養，平均 1 個側芽培養可得到 18.8 個芽為最高。

表 1. Cytokinins 種類對金草蘭側芽培養之影響

Table 1. Effect of Cytokinins on lateral bud culture in *Dendrobium clavatum* Lindl.

處理 Treatment			不定芽發生率	褐化率	白化率
活性炭	Cytokinins 種類	濃度	Adventitious bud	Browning	Albino
Charcoal	Kind of Cytokiniins	Concentration	formatio		
		ppm	%	%	%
0 g/ℓ	0	0	0	83.3	16.07
	BA	3	0	100	0
	BA	5	66.6	16.7	16.7
	2ip	3	40	20	40
	2ip	5	40	40	20
	TDZ	1	60	40	0
	TDZ	3	60	40	0
	TDZ	5	50	16.7	33.3
2 g/ℓ	0	0	25	25	50
	BA	3	25	75	0
	BA	5	25	50	25
	2ip	3	25	75	0
	2ip	5	0	75	25
	TDZ	1	0	100	0
	TDZ	3	25	75	0
	TDZ	5	0	75	25

基本培養基：以 1/2 MS、20 g/ℓ 蔗糖及 2.5 g/ℓ 水晶洋菜，pH 5.2。

Basal medium: 1/2 MS, 20 g/ℓ sucrose, 2.5 g/ℓ gerlite, pH 5.2.

表 2. NAA 組合 Cytokinins 對金草蘭側芽培養之影響

Table 2. Effect of NAA combined with Cytokinins on lateral bud culture in *Dendrobium clavatum* Lindl.

處理 Treatment				不定芽發生率	褐化率	白化率
活性炭 Charcoal	Cytokinins 種類 Kind of Cytokiniins		濃度 Conceration	Adventitious bud formatio	Browning	Albino
				%	%	%
0 g/l	BA	5	ppm	0	100	0
	2ip	5	ppm	50	50	0
	TDZ	5	ppm	50	33.3	16.7
2 g/l	BA	5	ppm	0	33.3	66.7
	2ip	5	ppm	0	100	0
	TDZ	5	ppm	0	100	0

基本培養基：以 1/2 MS、0.5 ppm NAA、20 g/ℓ蔗糖及 2.5 g/ℓ水晶洋菜，pH 5.2。

Basal medium: 1/2 MS, 0.5 ppm NAA, 20 g/ℓ sucrose, 2.5 g/ℓ gerlite, pH 5.2.

表 3. 植物生長調節劑對金草蘭側芽培養再生不定芽數之影響

Table 3. Effect of growth regulator on lateral bud culture in *Dendrobium clavatum* Lindl.

處理 Treatment	誘導培植體數 No. of explant	再生不定芽數 Adventitious bud	平均再生不定芽數 Ave. of adventitious bud
no.		no.	no.
BA 5 ppm	6	25	4.7
2ip 3 ppm	5	94	18.8
2ip 5 ppm	5	48	9.6
NAA 0.5 ppm + 2ip 5 ppm	6	30	5

基本培養基：以 1/2 MS、20 g/ℓ蔗糖及 2.5 g/ℓ水晶洋菜，pH 5.2。

Basal medium: 1/2 MS, 20 g/ℓ sucrose, 2.5 g/ℓ gerlite, pH 5.2.

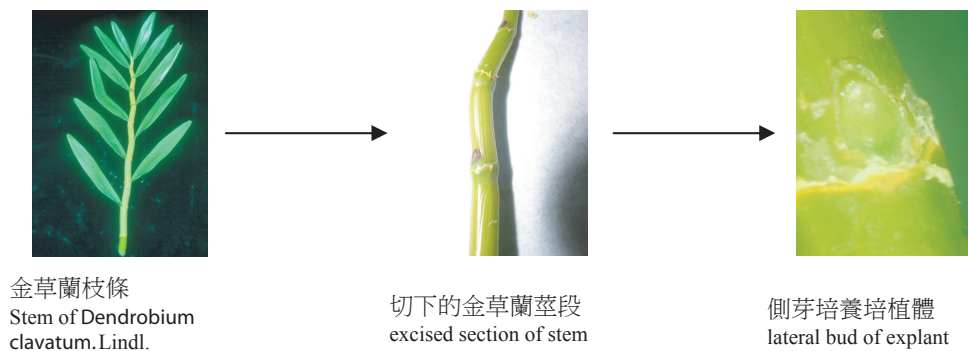


圖 1. 金草蘭側芽培養培植體

Fig 1. Explant of lateral bud culture on *Dendrobium clavatum* Lindl.

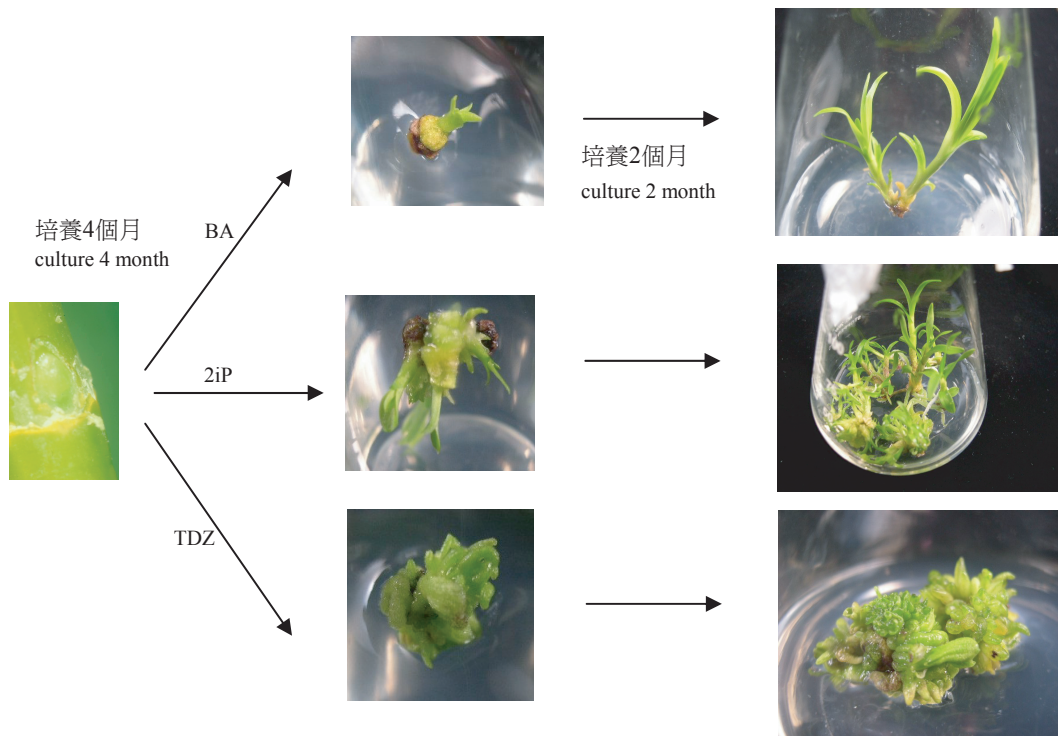


圖 2. Cytokinins (BA、2iP、TDZ) 對金草蘭側芽培養之影響

Fig. 2. Effect of Cytokinins (BA, 2iP, TDZ) on the proliferation of adventitious bud in *Dendrobium clavatum* Lindl.

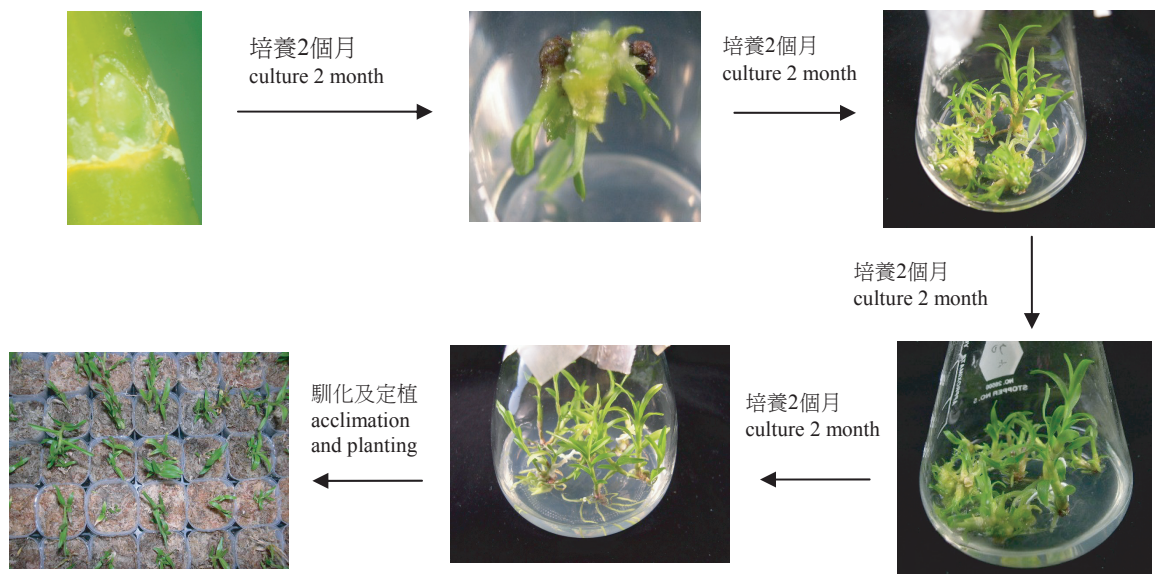


圖 3. 金草蘭側芽培養流程

Fig. 3. Flow chart of lateral bud culture in *Dendrobium clavatum* Lindl.

誌 謝

本計畫承行政院農業委員會 92 年科技計畫 92-農科-桃-4.1.2-Y2 經費補助，謹此致謝。

參考文獻

- 方惠卿。1989。蝴蝶蘭葉片組織培養的研究。嘉義農專學報 19:241-245。
- 行政院農業委員會。1992。臺灣維管束植物簡誌，第伍卷。行政院農業委員會。臺北。
- 李阿嬌、許苑培。1998。四季蔥莖頂培養之探討。桃園區農業改良場研究報告 34:1-8。
- 李時珍（明）。1959。本草綱目。文友書局。台北。p.799-800。
- 林讚標。1988。台灣蘭科植物（2）。南天書局。台北。p.68-100。
- 周鎮。1986。台灣蘭圖鑑—地生蘭篇。周鎮出版。台中。p.107-141。
- 許文章、蔡智賢、廖成康。1999。報歲蘭利用根莖組織繁殖種苗之研究。嘉義技術學院學報 67:1-12。
- 園藝世界出版社編著。1984。圖解蘭花組織培養入門。園藝世界雜誌社。台北。167pp。
- 董新堂。1980。新養蘭學（第二冊）。三民書局。台北。p.39-40。
- 顏東敏編著。1989。蘭花繁殖技術。淑馨出版社。台北。320pp。
- Alla, H.A., and J.V. Staden. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48(3):209-212.
- Bhat, S.R., K.P.S. Chandel, and S.K. Malik. 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper species*. Plant Cell Rep. 14:398-402.
- Bonfill, M., C.M. Rosa, P. Javier, M.T. Pinol, and C. Morales. 2002. Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 68(1):73-78.
- Fridborg, G., M. Pedersen., L.E. Landstrom, and T. Eriksson. 1978. The effect of activated charcoal on tissue culture : Adsorption of metabolites inhibiting. Physiol. Plant. 43:104-106.
- Klerk, G.J.D., T.B Jolanda, and S. Marinova. 1997. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus "Jork9". Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49(1):39-44.
- Mursashiage, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:472-473.
- Owen. H.R., D. Wengerd and A.R. Miller. 1991. Culture medium pH is influenced by basal, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. Plant Cell Rep. 10:583-586.
- Sujatha, M., and T.P. Reddy. 1998. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). Plant Cell Rep. 17:561-566.
- Wann. S.R., R.L. Veazey, and J. Kaphammer. 1997. Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolysis in tissue culture media during autoclaving. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50:221-224.

Study on Micropropagation of *Dendrobium Clavatum* Lindl.

Shu-Jen Lee, Fang-Shin Liao, and Shui-Ho Cheng

Summary

The objective of this study was to establish a micropropagation method for *Dendrobium clavatum* Lindl. Lateral bud was used as explant and sterilized with 1% NaOCl + Tween 20 for 10-minute. Basal medium contained 1/2 MS medium, 20 g/l sucrose, 2.5 g/l gerlite, 2 g/l charcoal, and no charcoal at pH 5.2. Various media were prepared by basal medium supplemented with BA, 2iP, TDZ and combinations NAA. Through 4-month culture, the induction percentage of adventitious buds was found highest in basal medium + 5 ppm BA, but decreased in media with 2 g/l charcoal. Adventitious buds proliferated most in basal medium + TDZ and the next in basal medium + 2iP. However, most of the proliferated buds obtained from the medium with TDZ were found abnormal. Through two subculture with basal medium + 0.1 ppm NAA + 3 ppm 2iP, two months each, most of the proliferated buds in basal medium + TDZ became browning. Plantlets were transferred to the rooting media for 2-month, adventitious roots were formed. The recovered plants were hardened and planted in the greenhouse. In average, one lateral bud can be proliferated up to 18.8 adventitious buds in 10 month culture.

Key words: *Dendrobium clavatum* Lindl., Micropropagation, BA, TDZ, 2iP.