

表面消毒、培植體及植物生長調節劑對建立孤挺花 組織培養小鱗莖繁殖之影響

陳威臣¹ 丁一² 吳姿穎³ 曹進義¹ 夏奇鈺^{4*}

摘要

陳威臣、丁一、吳姿穎、曹進義、夏奇鈺。2017。表面消毒、培植體及植物生長調節劑對建立孤挺花組織培養小鱗莖繁殖之影響。台灣農業研究 66(4):286–297。

本研究以孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 「紅獅」(‘Red Lion’)、「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 及「台農 1 號-紅粉佳人」(‘Tainung No.1-Pink Lady’) 等 3 個品種之鱗莖為材料，探討消毒方法、培植體部位及生長調節劑組合對消毒效率與小鱗莖增殖之影響。結果顯示，「紅獅」短縮莖培植體 (2 cm × 1 cm × 1 cm) 以 1.2% NaOCl 處理 15 min 之消毒效果較佳，且以靜置隔夜處理相對於直接處理的污染率較低。比較「台農 1 號」上半部與下半部短縮莖培植體 (6 mm × 6 mm × 2 mm) 之消毒結果顯示，上半部培植體不僅污染率低且小鱗莖誘導率較高。利用「千禧之星」小鱗莖 (周徑約 2.5 cm) 之 1/2 縱切或 1/4 縱切鱗莖作為培植體進行試驗，1/4 鱗莖處理之每個鱗莖可形成 5.2 個小鱗莖，顯著高於 1/2 鱗莖處理之 2.0 個小鱗莖。「紅獅」1/4 鱗莖培養於 1–4 mg L⁻¹ 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 或 0.1–0.4 mg L⁻¹ 賽本隆 (thidiazuron; TDZ) 配合 0.2 mg L⁻¹ 奈乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS 培養基，結果顯示 0.1 mg L⁻¹ TDZ 處理可獲得較高之小鱗莖增殖率，經 8 wk 培養後共獲得 11.6 個小鱗莖。本研究結果可提供新品種孤挺花在種苗量化參考。

關鍵詞：朱頂紅、消毒、離體繁殖、賽本隆。

前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 為石蒜科 (Amaryllidaceae)、孤挺花屬 (*Hippeastrum*) 多年生球根花卉，又名朱頂紅、華胄蘭、柱頂紅及喇叭花，其花色鮮豔、花朵碩大，具多樣花色與花型變化而深受消費者喜愛，廣泛應用於盆花、切花及花壇 (Chu *et al.* 2001; Ilczuk *et al.* 2005; Liu 2005; Lou *et al.* 2009; Shen & Yu 2011; Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)。孤挺花之園藝品種繁多，一般以雙鱗片法繁殖種苗供應市場需求 (Yanagawa & Osaki 1996; De Bruyn 1997; Liu 2005; Zhu *et al.* 2005; Lou *et al.* 2009; Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)。台灣近年來在各試驗改良場與業者努力下，已陸續推出許多優良品種，然卻面臨種苗量產不易而無法推廣的窘境。

孤挺花繁殖可利用分球、種子、雙鱗片或組織培養等方式，分球法最為簡單快速，經 1–2 年栽培後即可開花，但因子球數量有限而繁殖率低。種子播種後需 2–3 年可發育成開花球，雖然種苗數量較多，卻無法保有母本優良特性，通常僅育種者採用 (De Bruyn 1997; Smith *et al.* 1999; Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)。雙鱗片繁殖是目前量產種苗的主要方式，但存有遭受病原污染以致品種弱化

投稿日期：2016 年 06 月 14 日；接受日期：2016 年 12 月 28 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 農委會農業試驗所花卉研究中心助理研究員。台灣 雲林縣。

³ 農委會農業試驗所生物技術組約僱助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

的風險，且開花球養成也需 2–3 年 (De Bruyn 1997; Chu *et al.* 2001; Liu 2005; Zhu *et al.* 2005)。此外，本研究先期試驗結果顯示，雙鱗片繁殖僅適用於較大周徑鱗莖 (> 25 cm)，而較小周徑鱗莖 (約 10 cm) 的效率往往不佳 (資料未列)。組織培養具有繁殖倍率大、週期短、週年生產等優點，是種苗量產的主要技術之一，尤其對於初期種苗數量稀少的新品種而言，組織培養無疑是快速量產種苗的有效方法 (Yanagawa & Osaki 1996; De Bruyn 1997; Chang & Wang 1999; Zhang *et al.* 2002, 2006; Ilczuk *et al.* 2005; Liu *et al.* 2007; Shao & Shi 2008; Lou *et al.* 2009; Shen & Yu 2011; Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)。

孤挺花組織培養量產種苗的影響因子主要有：基因型、培植體種類，以及建立初代培養之消毒方式與培養基組成等 (Shen & Yu 2011)。雖然孤挺花組培技術自 1970 年代已被著手研究 (Hussey 1975; Seabrook & Cumming 1977)，然而時至今日仍有許多報告持續發表，顯然新品種、新藥劑或新方法均可被用以探討其種苗繁殖效率 (Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)。本研究以孤挺花鱗莖為材料，針對建立初代無菌培養之消毒方法、不同部位培植體及生長調節劑組成等因子進行測試，期能建立孤挺花組培小鱗莖增殖的方法，提供產業界在種球量化與新品種推展時之用。

材料與方法

材料來源、培養基配製及培養條件

本研究利用採自行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心試驗田之孤挺花單瓣品種「紅獅」(‘Red Lion’) 與重瓣品種「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 鱗莖 (周徑約 25 cm，2011 年 11 月採收)，以及農業試驗所育成之單瓣品種「台農 1 號-紅粉佳人」(‘Tainung No.1-Pink Lady’) 鱗莖 (周徑約 12 cm，2012 年 6 月採收) 進行試驗。培植體培養於含有 3% 蔗糖、不同濃度之苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine, Sigma B-3408, USA) 或賽本隆 (thidiazuron, Sigma P-6186, USA)，配合 0.1 或 0.2 mg L⁻¹

奈乙酸 (α -naphthalene acetic acid, Sigma N-0640, USA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基，培養基加入 9 g L⁻¹ 洋菜 (Difco Bacto-agar) 前以 0.1–1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調為 5.7 ± 0.1，再利用 121°C、1.05 kg cm⁻² 滅菌 15 min 後冷卻備用。培植體接種於內含 20 mL 培養基之 125-mL 三角瓶 (Erlenmeyer flask) 後置於 26°C ± 2°C、光照 14 h、光強度 38 μ mol m⁻² s⁻¹ [T29R85 (FL40D-EX/38), China Electric, Taiwan] 的環境培養。

消毒方式對孤挺花「紅獅」成熟鱗莖建立初代培養之影響

將「紅獅」之成熟鱗莖去除葉片、基盤、鱗皮及兩層鱗片 (圖 1A、1B)，先縱切成 1/2 鱗莖後再縱切為 1/4 鱗莖 (圖 1C、1D)，接著切除上半部鱗片後留下帶有鱗片基部與短縮莖之 1/4 鱗莖 (圖 1D)，而後橫切使每個培植體 (2 cm × 1 cm × 1 cm) 均帶有短縮莖 (圖 1E)，最後接種於 125-mL 三角瓶 (圖 1F)。培植體分立即處理與隔日處理兩種方式，隔日處理係將 1/4 縱切鱗莖靜置於濾紙上過夜，次日進行消毒處理與接種。消毒方式係利用 75% 酒精浸漬 15 s，或以 0.6%、1.2% 次氯酸鈉 (NaOCl，稀釋自 Clorox[®], USA) 處理 15 或 30 min，再以無菌水洗淨後接種於含有 1 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基，培養 8 wk 後調查培植體污染情形。試驗採用 4 重複，每重複接種 12 個培植體。

培植體部位對孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」鱗莖建立初代培養之影響

利用周徑約 12 cm 之孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」鱗莖為材料，依上述方式進行前處理，將 1/4 鱗莖靜置過夜後，於隔日進行消毒處理與接種。將帶有鱗片基部之短縮莖橫切分為上、下兩部分，再橫切塊作為培植體 (6 mm × 6 mm × 2 mm)；利用 1.2% NaOCl 處理 15 min，再以無菌水洗淨後接種於含有 1 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基，培養 8 wk 後調查培植體污染率，以及小鱗莖與根部形成情形。試驗採用 4 重複，每重複接種 15 個培植體。

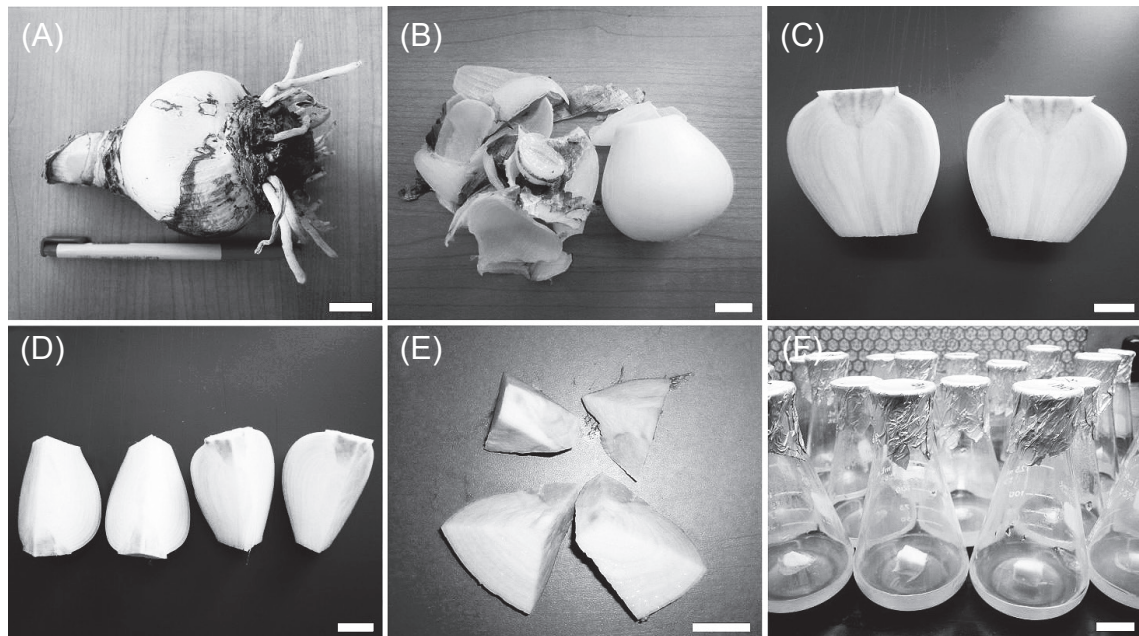


圖 1. 孤挺花「紅獅」成熟鱗莖建立組織培養無菌化之培植體取得情形。採自田間之成熟鱗莖 (A)；切除葉片、莖盤、鱗皮及兩層鱗片之鱗莖 (B)；1/2 鱗莖 (C)；1/4 鱗莖 (D)；帶有短縮莖與鱗片基部之 1/4 鱗莖 (E)；接種於三角瓶之短縮莖培植體 (F)。Bar = 2 cm。

Fig. 1. Explant obtained from field-grown bulb for establishment *in vitro* culture of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion'. Field-grown matured bulb (A), the bulb had been removed leaf, stem disc, tunic, and two leaf scales (B), half-bulb (C), quarter-bulb (D), quarter-bulb with stem and basal scale (E), and stem explant (2 cm × 1 cm × 1 cm) inoculated in 125-mL Erlenmeyer flask (F). Bar = 2 cm.

BA 對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」小鱗莖增殖之影響

將切除根與葉之「紅獅」與「千禧之星」瓶內鱗莖(周徑約 2.5 cm) 作為材料，以完整鱗莖與 1/2 縱切鱗莖(1/2 鱗莖) 為培植體進行試驗。每處理 4 重複，亦即 4 個鱗莖(1 鱗莖/重複)；因此，完整鱗莖處理係每瓶接種 1 個鱗莖，1/2 鱗莖處理則是每瓶接種 2 個 1/2 鱗莖。培植體培養於含有 0、1、2、4 mg L⁻¹ BA 配合 0.2 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基進行試驗，培養 8 wk 後調查小鱗莖與根部形成之情形。

培植體切法對孤挺花「千禧之星」小鱗莖增殖之影響

將切除根與葉之「千禧之星」瓶內鱗莖(周徑約 2.5 cm) 作為材料，以 1/2 鱗莖與 1/4 鱗莖(quarter-bulb) 為培植體進行試驗。每處理 4 重複，亦即 4 個鱗莖(1 鱗莖/重複)；因此，

1/2 鱗莖處理係每瓶接種 2 個 1/2 鱗莖，1/4 鱗莖處理則每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖。培植體培養於含有 0.2 mg L⁻¹ TDZ 與 0.2 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基，經 4、8 及 12 wk 培養後調查小鱗莖與根部形成之情形。

BA 與 TDZ 對孤挺花「紅獅」小鱗莖增殖之影響

將切除根與葉之「紅獅」瓶內鱗莖(周徑約 2.5 cm) 作為材料，以 1/4 鱗莖為培植體進行試驗。每處理採用 4 重複，每瓶接種 4 個 1/4 鱗莖，即每重複為 1 個鱗莖。培植體培養於含有 0.2 mg L⁻¹ NAA 配合 TDZ (0.1、0.2、0.4 mg L⁻¹) 或 BA (1、2、4 mg L⁻¹) 之 MS 培養基，經 8 wk 培養後調查小鱗莖與根部形成之情形。

試驗設計和統計分析

本研究採用完全隨機設計 (completely

randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 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 ($P < 0.05$)，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

消毒方式對孤挺花「紅獅」成熟鱗莖建立初代培養之影響

利用「紅獅」進行消毒試驗結果顯示，75% 酒精處理 15 s 無法達到消毒效果，培植體全數污染。比較立即處理與隔日處理的污染率結果顯示，1.2% NaOCl 處理之污染率明顯較低於 0.6% NaOCl 處理；而 1.2% NaOCl 處理 15 min 的污染率較低於 30 min 處理 (表 1)。因此，經過前處理之 1/4 鱗莖於濾紙上靜置過夜後，短縮莖培植體在隔天再以 1.2% NaOCl 處理 15 min 的消毒效果最佳，污染率僅 16.7%。此外，培植體培養於含有 1 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基 8 wk 後，每個培植體可獲得 1–2 個小鱗莖 (資料未列)。

培植體部位對孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」鱗莖建立初代培養之影響

比較「台農 1 號-紅粉佳人」上、下部位短縮莖培植體之消毒試驗結果顯示，上半部培植體污染率僅 3.3%，顯著優於下半部培植體之 36.7%。上、下兩部位培植體於 1 mg L⁻¹ BA 配合 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基中經培養 8 wk 後，培植體的生長分化呈現 4 種型態，分別為有根小鱗莖、無根小鱗莖、未分化培植體及僅長根的培植體 (圖 2)。其中就發根小鱗莖的比率而言，取自上半部培植體之 57.3% 誘導率顯著高於下半部的 37.4%，但兩部位之每個培植體均可形成約 1.2 個小鱗莖；培植體的平均根數則以取自上半部培植體之 4.0 條根，顯著高於取自下半部之 2.7 條根 (表 2)。無根小鱗莖與只長根之培植體的比率，皆以取自上半部培植體顯著高於下半部培植體。

本研究利用上述方法已分別建立「紅獅」、「千禧之星」及「台農 1 號」之無菌瓶苗，並利用瓶內小鱗莖做為後續增殖試驗的培植體來源。

BA 對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」小鱗莖增殖之影響

本研究在先期試驗中利用完整鱗莖或 1/2

表 1. 消毒方法對孤挺花「紅獅」成熟鱗莖建立無菌培植體之影響。

Table 1. Effect of surface disinfection methods on aseptic *in vitro* culture using mature bulb of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion'^z.

Explant treatment	Disinfection method			Contamination (%)
	75% Ethanol	0.6% NaOCl	1.2% NaOCl	
Disinfected	15 s			100.0 a
immediately		15 min		83.3 ± 8.35 ab ^y
		30 min		66.7 ± 11.80 ab
			15 min	41.6 ± 10.50 b
			30 min	58.3 ± 8.35 ab
Disinfected	15 s			100.0 a
after left on filter paper for overnight		15 min		83.3 ± 4.80 ab
		30 min		75.0 ± 12.50 ab
			15 min	16.7 ± 4.80 c
			30 min	33.3 ± 6.80 bc

^z Explants cultured on MS medium containing 1 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA for 8 wk. Twelve explants were used in each treatment.

^y Means in each column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

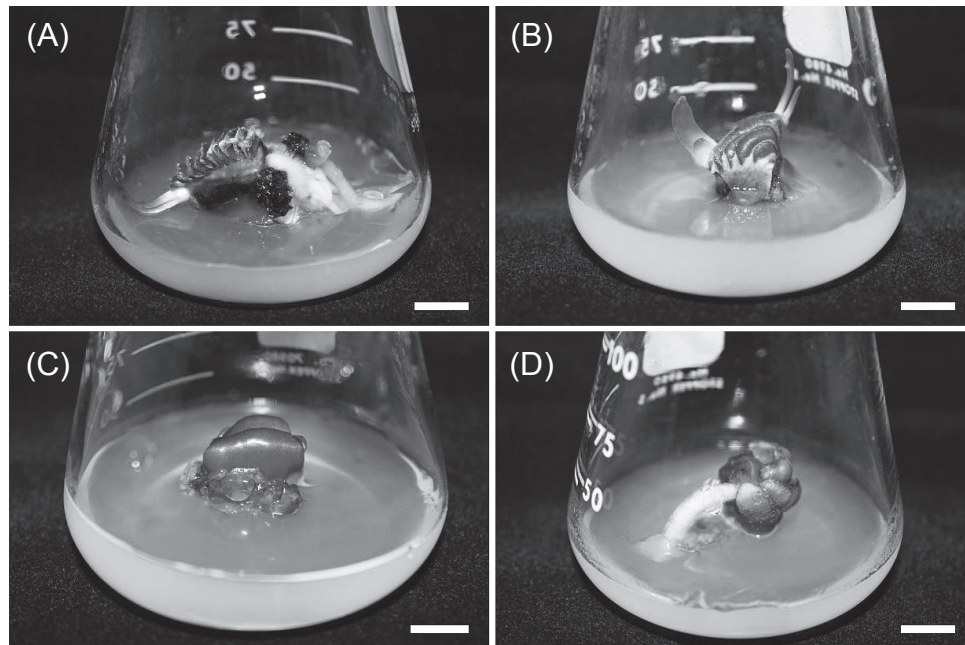


圖 2. 孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」鱗莖培植體培養於含有 1 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基 8 wk 時培植體的反應。發根小鱗莖 (A)、無根小鱗莖 (B)、未分化之培植體 (C) 及僅長根之培植體 (D)。Bar = 1 cm。

Fig. 2. Growth conditions of *in vitro* cultured of *Hippeastrum hybridum* 'Tainung No.1-Pink Lady'. Stem explants were cultured on MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA after 8 wk of culture. Rooting bulblet (A), bulblet without root (B), explant without bulblet and root (C), and explant with only root (D). Bar = 1 cm.

表 2. 孤挺花「台農 1 號」鱗莖不同部位短縮莖培植體對消毒效率與小鱗莖形成之影響。

Table 2. Position of stem explant on disinfection efficiency and bulblet formation of *Hippeastrum hybridum* 'Tainung No.1-Pink Lady'^z.

Explant position	Contamination (%)	Bulbing explant (%)		Rooting explant without bulbing (%)	No response (%)	Bulblets/explant (No.)	Roots/explant (No.)
		With roots	Without root				
Upper part	$3.3 \pm 1.92 \text{ b}^y$	$57.3 \pm 6.29 \text{ a}$	$12.1 \pm 5.17 \text{ a}$	$6.8 \pm 2.72 \text{ a}$	$23.8 \pm 6.14 \text{ b}$	$1.2 \pm 0.07 \text{ a}$	$4.0 \pm 0.52 \text{ a}$
Lower part	$36.7 \pm 6.38 \text{ a}$	$37.4 \pm 10.43 \text{ b}$	$6.3 \pm 3.72 \text{ b}$	$0.0 \pm 0.00 \text{ b}$	$56.2 \pm 12.40 \text{ a}$	$1.2 \pm 0.10 \text{ a}$	$2.7 \pm 0.46 \text{ b}$

^z Explants cultured on MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 8 wk. Each treatment had 4 replications, and 15 explants per replication.

^y Means in each column followed by different letter(s) are significantly different at 5% level by LSD test.

鱗莖作為培植體，培養於含有適量 BA 與 NAA 之 MS 培養基中，若以每鱗莖可產出的小鱗莖為計算基準，則 1/2 鱗莖處理可形成 2-3 個小鱗莖苗，而完整鱗莖處理僅形成 1 個小鱗莖苗 (資料未列)；因此，本試驗以 1/2 鱗莖作為培植體，且為使小鱗莖形成後能發根良好成為小鱗莖苗，於是不同濃度 BA 搭配 0.2 mg L^{-1} NAA 進行試驗。

利用「紅獅」與「千禧之星」1/2 鱗莖培養於含有不同濃度 BA 配合 0.2 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基進行試驗，表 3 結果顯示，就「紅獅」而言， $1-4 \text{ mg L}^{-1}$ BA 處理之小鱗莖增殖效果相當，3 種 BA 濃度間並無顯著差異為 1.1-1.2 個/培植體，但顯著高於對照組，其中以 2 mg L^{-1} BA 處理較佳；1 與 2 mg L^{-1} BA 兩處理在小鱗莖發根表現並無顯著差異，分別為 3.4 與 2.9

表 3. BA 對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」1/2 鱗莖培植體形成小鱗莖之影響。

Table 3. Effect of BA on *in vitro* bulblet formation by using half-bulb explant of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' and 'Blossom Peacock'^z.

BA (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Red Lion		Blossom Peacock	
		Bulblets/explant	Roots/explant	Bulblets/explant	Roots/explant
0	0.2	1.0 ± 0.00 b ^y	9.6 ± 0.39 a	1.1 ± 0.07 b	6.3 ± 0.27 a
1	0.2	1.1 ± 0.07 ab	3.4 ± 0.78 b	1.4 ± 0.19 a	3.9 ± 0.30 b
2	0.2	1.2 ± 0.06 a	2.9 ± 0.53 b	1.6 ± 0.16 a	1.3 ± 0.28 c
4	0.2	1.1 ± 0.07 ab	1.3 ± 0.27 c	1.0 ± 0.00 b	1.3 ± 0.00 c

^z Explants were cultured on MS medium containing various concentrations of BA in combination with 0.2 mg L⁻¹ NAA for 8 wk of culture. Each treatment had 4 replications, and 4 explants were used in each replication.

^y Means in each column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

根培植體，但只含 0.2 mg L⁻¹ NAA 的對照組，發根效果最佳達 9.6 根/培植體，4 mg L⁻¹ BA 處理之發根效果最差，每個培植體僅形成 1.3 條根。就「千禧之星」而言，1 與 2 mg L⁻¹ BA 處理之小鱗莖增殖效果約為 1.4 與 1.6 個/培植體，兩處理間並無顯著差異，而 0 與 4 mg L⁻¹ BA 兩處理間亦無顯著差異，分別為 1.1 與 1.0 個/培植體；小鱗莖發根效率以對照組最佳，每個培植體可達 6.3 條根，其次為 1 mg L⁻¹ BA 處理之 3.9 根/培植體，而 2 與 4 mg L⁻¹ BA 處理發根效果最差，每個培植體均僅形成 1.3 條根。

培植體切法對孤挺花「千禧之星」小鱗莖增殖之影響

利用「千禧之星」1/2 鱗莖與 1/4 鱗莖作為培植體進行試驗，培養 4 wk 的結果顯示，1/2 鱗莖處理之小鱗莖形成率達 87.5%，顯著高於 1/4 鱗莖處理的 56.3%；但兩處理形成之小鱗莖數分別為 0.9 與 0.6 個小鱗莖/培植體，兩處理間並無顯著差異；但若以每瓶為計算基準時，則 1/4 鱗莖處理形成 2.4 個小鱗莖顯著高於 1/2 鱗莖處理之 1.8 個小鱗莖；此外，每個培植體之根數則以 1/2 鱗莖處理之 4.3 條根顯著高於 1/4 鱗莖處理的 1.9 條根（表 4、圖 3A、圖 3C）。當培養達 8 wk 時，兩個處理的小鱗莖誘導率均可達到 100%，但是每個培植體形成之小鱗莖數也無顯著差異；同樣若是以每瓶為計算基準時，則 1/4 鱗莖處理可形成 4.4 個小鱗莖顯著高於 1/2 鱗莖處理之 2.0 個小鱗

表 4. 不同鱗莖切法對孤挺花「千禧之星」小鱗莖形成之影響。

Table 4. Effect of bulb cutting method on *in vitro* bulblet formation of *Hippeastrum hybridum* 'Blossom Peacock'^z.

Explant treatment	Bulbing explant (%)	Bulblets/explant (No.)	Roots/explant (No.)	Bulblets/original bulb (No.)
4 wk after inoculated				
Half-bulb	87.5 ± 12.50 a ^y	0.9 ± 0.18 a	4.3 ± 0.35 a	1.8 ± 0.4 b
Quarter-bulb	56.3 ± 11.95 b	0.6 ± 0.26 a	1.9 ± 0.48 b	2.4 ± 1.0 a
8 wk after inoculated				
Half-bulb	100.0 a	1.0 ± 0.00 a	5.1 ± 0.50 a	2.0 ± 0.0 b
Quarter-bulb	100.0 a	1.1 ± 0.17 a	3.1 ± 0.43 b	4.4 ± 0.7 a
12 wk after inoculated				
Half-bulb	100.0 a	1.0 ± 0.00 a	6.4 ± 0.53 a	2.0 ± 0.0 b
Quarter-bulb	100.0 a	1.3 ± 0.30 a	4.8 ± 0.74 b	5.2 ± 1.2 a

^z Explants cultured on MS medium containing 0.2 mg L⁻¹ TDZ and 0.2 mg L⁻¹ NAA for 4, 8 and 12 wk. Each treatment had 4 bulblets in a treatment, and half-bulb treatment with 2 explants and quarter-bulb treatment with 4 explants in each Erlenmeyer flask.

^y Means in each column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

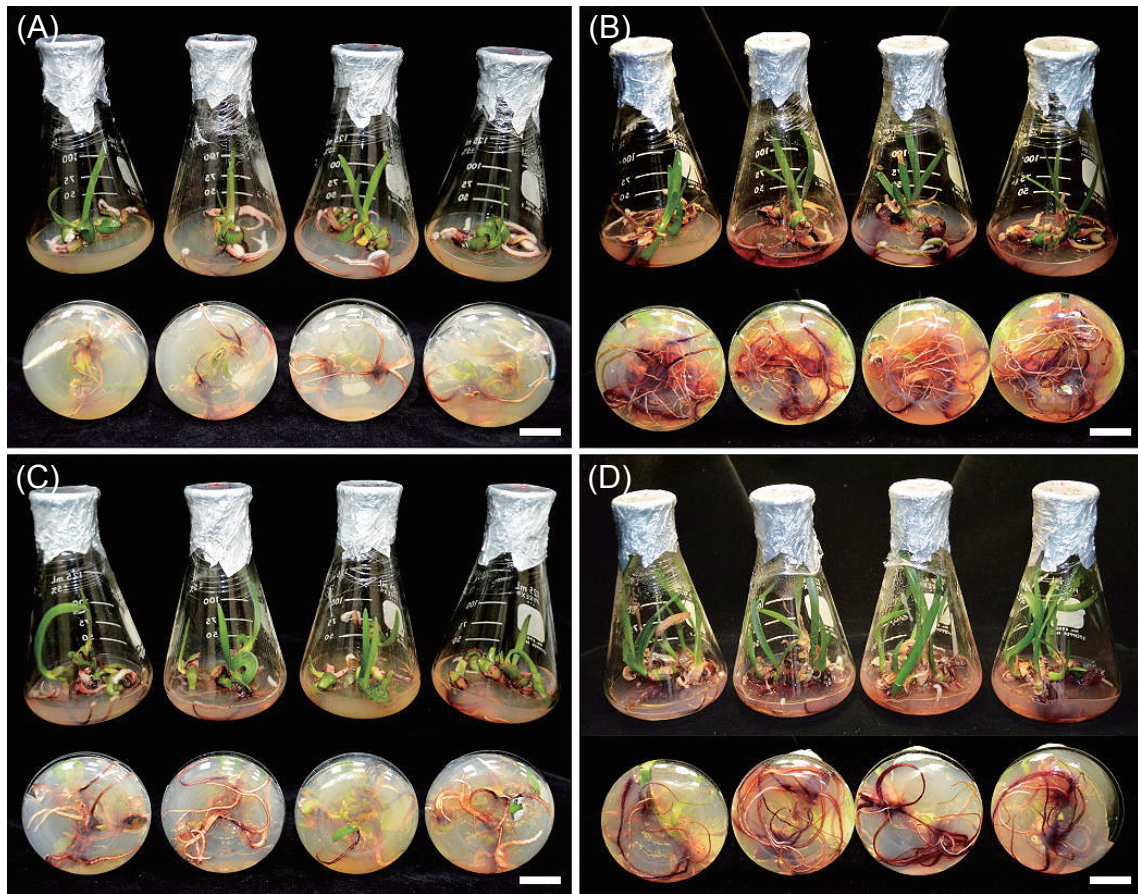


圖 3. 孤挺花「千禧之星」以 1/2 鱗莖 (A)、(B) 與 1/4 鱗莖 (C)、(D)；培植體培養於含有 0.2 mg L^{-1} TDZ 與 0.2 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基 4 wk (A)、(C) 與 12 wk (B)、(D) 之小鱗莖增殖、生長與發根情形。Bar = 2 cm。

Fig. 3. Bulblet growth and rooting condition of *in vitro* cultured *Hippeastrum hybridum* 'Blossom Peacock' using half-bulb explants (A), (B) or using quarter-bulb explants (C), (D). Explants were cultured on MS medium containing 0.2 mg L^{-1} TDZ in combination with 0.2 mg L^{-1} NAA after 4 wk (A), (C), and 12 wk (B), (D). Bar = 2 cm.

莖；此外，每個培植體根數以 1/2 鱗莖處理之 5.1 條根顯著高於 1/4 鱗莖處理的 3.1 條根 (表 4)。延長培養時間至 12 wk 時，則 1/4 鱗莖處理可形成 5.2 個小鱗莖/瓶，顯著高於 1/2 鱗莖處理之 2 個小鱗莖/瓶；根的形成方面仍以 1/2 鱗莖處理之 6.4 條根/培植體，顯著高於 1/4 鱗莖處理的 4.8 條根/培植體 (表 4、圖 3B、圖 3D)。上述結果顯示，「千禧之星」1/4 鱗莖培養於含 0.2 mg L^{-1} TDZ 配合 0.2 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基的小鱗莖增殖效果較佳，每個周徑約 2.5 cm 的小鱗莖經 12 wk 培養後可獲得約 5.2 個小鱗莖。

BA 與 TDZ 對孤挺花「紅獅」小鱗莖增殖之影響

利用「紅獅」1/4 鱗莖作為培植體，比較 BA 與 TDZ 對小鱗莖增殖之影響，結果顯示培養 8 wk 後兩處理之小鱗莖增殖效率並無顯著差異，其中以 0.1 mg L^{-1} TDZ 處理較佳，每個培植體可誘得 2.9 個小鱗莖，而對照組較差僅得 1.8 個小鱗莖，其餘處理可得 2.1–2.2 個小鱗莖。若以每瓶為計算基準，則 0.1 mg L^{-1} TDZ 處理可誘得約 11.6 個小鱗莖的效果較佳。就每個培植體形成根數而言，以 1 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} TDZ 配合 0.2 mg L^{-1} NAA 之處

理較佳，每個培植體分別可得 11.6 與 10.4 條根，較高於其餘處理之 7.4–9.3 條根，所有處理中以 4 mg L⁻¹ BA 配合 0.2 mg L⁻¹ NAA 之處理顯著最差，僅得 7.4 條根/培植體 (表 5)。綜合上述結果顯示，「紅獅」1/4 鱗莖培養於含有 0.1 mg L⁻¹ TDZ 與 0.2 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基，小鱗莖的增殖效果較佳，每個周徑約 2.5 cm 的鱗莖經 8 wk 培養可獲得約 11.6 個小鱗莖。

討論

在組織培養的無菌化過程中，若培植體取自於土壤中較易受微生物污染，因而嚴重影響消毒效率，孤挺花鱗莖的初代培養就是典型例子 (Seabrook & Cumming 1977; De Bruyn *et al.* 1992; Chang & Wang 1999; Smith *et al.* 1999; Aslam *et al.* 2012)。前人研究為獲得孤挺花無菌苗進行量化繁殖，往往採取許多費時且複雜的操作步驟，例如利用熱水浸泡 (De Bruyn *et al.* 1992; De Bruyn 1997; Chang & Wang 1999; Smith *et al.* 1999; Shao & Shi 2008; Amani *et al.* 2015)、氯氣燻蒸 (Smith *et al.* 1999) 或是植物保護混合劑 (plant preservative mixture; PPM) (Smith *et al.* 1999; Aslam *et al.* 2012) 進行前處理，而後再將培植體表面消毒與接種；消毒大多採用酒精、次氯酸鈉或次氯酸鈣 [Calcium hypochlorite, Ca(ClO)₂] 溶

液浸泡處理 (Hussey 1975; Seabrook & Cumming 1977; De Bruyn *et al.* 1992; Yanagawa & Osaki 1996; Chang & Wang 1999; Smith *et al.* 1999; Ilczuk *et al.* 2005; Shao & Shi 2008; Lou *et al.* 2009; Shen & Yu 2011; Aslam *et al.* 2012; Amani *et al.* 2015)，少數利用氯化亞汞 (mercuric chloride; HgCl₂) 溶液浸泡消毒 (Zhang *et al.* 2002, 2006; Lou *et al.* 2009; Shen & Yu 2011)。然而任何消毒方式均需利用合適濃度配合適當時間，才能達到較佳的消毒效果。本研究結果顯示，將洗淨且去除根與 2–3 層鱗片之 1/4 縱切鱗莖靜置隔夜，次日再以 1.2% NaOCl 處理 15 min 後可得最佳的消毒效果 (表 1)。推測鱗莖在縱切後立即進行消毒處理，培植體容易因為富含黏液而影響藥劑效果，當培植體在靜置過夜後，可能由於黏液量減少而有較佳的消毒效果。

Yanagawa & Osaki (1996) 與 Zhang *et al.* (2002) 的研究結果顯示，培植體越接近於基盤 (extreme base)，其不定芽誘導效率越高。Lou *et al.* (2009) 於孤挺花「蘋果」(‘Apple’) 與「蘇州雜交 18 號」(‘Filial generation No. 18’) 的報告也顯示，不同鱗莖部位的小鱗莖誘導率明顯不同；比較上、中、下部鱗莖培植體 (均帶有莖盤) 的結果顯示，下部誘導率最高，中部次之，上部則無法誘得小鱗莖。本研究結果顯示，短縮莖之上半部培植體的污染率顯著低於下半部培植體，且上半部培植體之小鱗莖誘導

表 5. BA 與 TDZ 對孤挺花「紅獅」1/4 鱗莖培植體形成小鱗莖之影響。

Table 5. Effect of BA and TDZ concentration on *in vitro* bulblet formation by using quarter-bulb explant of *Hippeastrum hybridum* var. ‘Red Lion’^z.

BA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Bulblets/explant (No.)	Roots/explant (No.)	Bulblets/original bulb (No.)
		0.2	1.8 ± 0.2 b ^y	9.3 ± 0.8 bc	7.2 ± 0.8 b
1		0.2	2.1 ± 0.4 ab	11.6 ± 0.4 a	8.4 ± 1.6 ab
2		0.2	2.2 ± 0.3 ab	9.1 ± 0.4 bc	8.8 ± 1.2 ab
4		0.2	2.1 ± 0.3 ab	7.4 ± 0.8 d	8.4 ± 1.2 ab
	0.1	0.2	2.9 ± 0.3 a	10.4 ± 0.2 ab	11.6 ± 1.2 a
	0.2	0.2	2.2 ± 0.4 ab	9.2 ± 0.4 bc	8.8 ± 1.6 ab
	0.4	0.2	2.1 ± 0.4 ab	7.9 ± 0.5 cd	8.4 ± 1.4 ab

^z Explants were cultured on MS medium containing various concentrations of BA and TDZ in combination with 0.2 mg L⁻¹ NAA for 8 wk of culture. Each treatment had 4 replications, and 4 explants were used in each replication.

^y Means in each column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

率顯著高於下半部培植體，但是每個培植體形成小鱗莖數則無顯著差異 (表 2)。就污染率而言，可能因為上半部培植體距離根部較遠造成污染率較低的結果；另就小鱗莖誘導率而言，本研究結果與上述研究有所不同，推測其原因可能係因為鱗莖大小不同、下半部培植體污染率過高，以及對於上、中、下部培植體之定義不同所導致。

De Bruyn *et al.* (1992) 與 De Bruyn (1997) 的研究結果均顯示，含有 5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基為誘導南非孤挺花 (*Amaryllis belladonna*) 小鱗莖形成的最佳處理。Chang & Wang (1999) 於「紅獅」初代培養結果顯示， 4 mg L^{-1} BA 處理雙鱗片雖可誘得最多小鱗莖，但其生長受抑制且發育異常，建議利用較低濃度處理 ($0.5\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$ BA) 的效果較佳。「紅獅」與「橙王」(‘Orange Sovereign’) 的研究結果顯示， $1\text{--}4 \text{ mg L}^{-1}$ BA 處理之鱗莖誘導率極低，但以 2 mg L^{-1} BA 搭配 $1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$ NAA 則有較佳效果 (Zhang *et al.* 2006)。本研究之初代培養結果顯示，短縮莖培植體於 1 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基培養 8 wk 後，每個培植體平均可得 1–2 個小鱗莖；因此，本研究依上述方法已分別建立「紅獅」、「千禧之星」及「台農 1 號」之無菌苗，所得小鱗莖可做為後續試驗的培植體來源。

南非孤挺花 (De Bruyn *et al.* 1992) 與「橙王」(Shao & Shi 2008) 的研究結果均顯示，鱗莖增殖率以四分切的效率為最高，其次為二分切，完全未切之效果最差。Shen & Yu (2011) 的評論也有類似結果。此外，Chu *et al.* (2001) 以不同切割方式誘導「紅獅」鱗莖子球形成的研究結果顯示，其切割數較少者所形成之子球數亦較少，但其形成的子球則較大。Zhu *et al.* (2005) 於孤挺花「雙紀錄」(‘Double Record’) 的研究也顯示相似的結果。本研究利用「千禧之星」 $1/2$ 鱗莖與 $1/4$ 鱗莖進行試驗之結果與上述結果一致，就每個培植體形成的小鱗莖數而言，兩種切割處理並無顯著差異，但若以每瓶小鱗莖數進行比較，則 $1/4$ 鱗莖處理增殖率顯著高於 $1/2$ 鱗莖處理；此外，本研究追蹤培養

期間至 12 wk 的結果顯示， $1/2$ 鱗莖處理於 4 wk 後之小鱗莖數即不再增加，但 $1/4$ 鱗莖處理仍持續形成小鱗莖，因此若以培養 4 wk 的數據來看，可能誤判 $1/2$ 鱗莖處理與 $1/4$ 鱗莖處理之繁殖率相當 (表 4)。因此推論，較小培植體之再生鱗莖可能需要較長時間的生長發育；此外，在單一培植體繁殖率相當時，若每個鱗莖縱切越多培植體，則每個鱗莖的繁殖總量會因而增加，然是否會因培植體太小而無法誘得鱗莖，則需要進一步試驗證實。

孤挺花「紅孔雀」研究結果顯示， $1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$ BA 搭配 0.1 mg L^{-1} NAA 是鱗莖增殖的最佳處理 (Liu *et al.* 2007)。「蘋果」與「蘇州雜交 18 號」的鱗莖增殖率以 2 mg L^{-1} BA 配合 0.2 mg L^{-1} NAA 的效果較好 (Lou *et al.* 2009)。Shen & Yu (2011) 於評論報告指出，孤挺花組織培養苗增殖多以 $2\text{--}8 \text{ mg L}^{-1}$ BA 或 0.5 mg L^{-1} TDZ 搭配 $0.1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$ NAA，其最佳組合則因品種不同而異。本研究以「紅獅」與「千禧之星」 $1/2$ 鱗莖進行試驗結果顯示，兩品種誘導率均以 2 mg L^{-1} BA 配合 0.2 mg L^{-1} NAA 之處理效果較佳，較低與較高濃度 (1 或 4 mg L^{-1} BA) 的處理效率不佳 (表 3)，與前人研究結果相類似。Lou *et al.* (2009) 於「蘋果」與「蘇州雜交 18 號」的研究結果顯示，TDZ 對鱗莖增殖較 BA 效率為佳，最佳增殖培養基為 0.5 mg L^{-1} TDZ 搭配 0.2 mg L^{-1} NAA 之組合。本研究以「千禧之星」 $1/2$ 鱗莖進行試驗結果顯示，每個鱗莖培養於 2 mg L^{-1} BA 處理 8 wk 後誘得 3.2 個小鱗莖 (表 3)；然而 0.2 mg L^{-1} TDZ 處理僅得到 2 個小鱗莖 (表 4)；顯示 0.2 mg L^{-1} TDZ 處理效果較 2 mg L^{-1} BA 處理為低；若提高 TDZ 濃度是否具有較佳增殖效果，尚需進一步試驗證實。但是「紅獅」 $1/4$ 鱗莖的試驗結果顯示， $1\text{--}4 \text{ mg L}^{-1}$ BA 與 $0.1\text{--}0.4 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ 對增殖均有良好效果，其中以 0.1 mg L^{-1} TDZ 搭配 0.2 mg L^{-1} NAA 的處理較佳 (表 5)。

Ilczuk *et al.* (2005) 利用孤挺花 (*Hippeastrum × chmielii* Chm.) $1/4$ 鱗莖 (周徑約 1.8 cm) 培養於含有 0.5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基的結果顯示，每個鱗莖在 4 wk 後可得 3.9 個小鱗莖。本研究「千禧之星」 $1/4$

鱗莖 (周徑約 2.5 cm) 於 0.2 mg L⁻¹ TDZ 配合 0.2 mg L⁻¹ NAA 處理 4 wk 時可形成 2.4 個小鱗莖，當培養至 8 wk 與 12 wk 時分別達 4.4 與 5.2 個小鱗莖 (表 4)；顯示培養 4 wk 後仍有小鱗莖持續形成。此外，「紅獅」1/4 鱗莖培養於 TDZ 配合 NAA 處理之每個鱗莖在 8 wk 後可得 8.4–11.6 個小鱗莖 (表 5)。因此顯示，「紅獅」小鱗莖增殖效果較「千禧之星」為高。Lou *et al.* (2009) 於「蘋果」與「蘇州雜交 18 號」研究結果顯示，在相同培植體與培養基組成情況下，「蘋果」較「蘇州雜交 18 號」具有較高的小鱗莖誘導率。上述結果亦印證前人研究結果，Shen & Yu (2011) 評論指出，孤挺花小鱗莖增殖效率在品種間具有極大差異的觀點。此外，本研究結果也顯示，培養調查時間也是影響小鱗莖增殖率高低的因子之一。

Zhang *et al.* (2002) 的研究結果顯示，孤挺花不定芽培養於 MS 培養基即可達到 100% 發根率。Shen & Yu (2011) 評論指出，小鱗莖培養於含有 0.1–0.5 mg L⁻¹ NAA 之培養基均具有良好發根效果。此外，孤挺花之單鱗片或雙鱗片於 1–2 mg L⁻¹ BA 處理下也會有良好發根率，作者推論係因 BA 誘導小鱗莖形成後而變得容易發根 (Amani *et al.* 2015)。本研究結果顯示，小鱗莖於 0.2 mg L⁻¹ NAA 處理之根系最佳，較低濃度之 BA (1–2 mg L⁻¹) 或 TDZ (0.1–0.2 mg L⁻¹) 處理亦發根良好，但 4 mg L⁻¹ BA 或 0.4 mg L⁻¹ TDZ 之較高濃度處理則會抑制根的生長發育 (表 5)。由此可知，當孤挺花新生鱗莖形成後即可伴隨發根，因此其組織培養繁殖體系可能無需再進行誘導發根。

本研究利用孤挺花「紅獅」、「千禧之星」及「台農 1 號-紅粉佳人」之田間鱗莖，經過清洗、切割並靜置隔夜後，以 1.2% NaOCl 進行 15 min 處理的消毒效果最佳，其中又以短縮莖上半部培植體的污染率最低，本研究以上述方法獲得 3 品種無菌鱗莖進行試驗。「紅獅」1/4 鱗莖培養於含有 0.1 mg L⁻¹ TDZ 與 0.2 mg L⁻¹ NAA 之 MS 培養基，每個周徑約 2.5 cm 鱗莖培養 8 wk 後，可獲得 11.6 株發根良好的小鱗莖苗，對於加速新品種繁殖具有相當大的效益。

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

- Amani, Sh., H. Zarei, A. Mottallebi Azar, and K. Mashayekhi. 2015. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. *Cumhuriyet Sci. J.* 36:594–605.
- Aslam, F., S. Habib, and S. Naz. 2012. Effect of different phytohormones on plant regeneration of *Amaryllis hippeastrum*. *Pak. J. Sci.* 64:55–60.
- Chang, S. T. and T. Y. Wang. 1999. Study on twin-scaling of *Hippeastrum hybridum* Hort. *in vitro*. *Bull. Taoyuan Dist. Agric. Improve. Sta.* 37:29–37. (in Chinese with English abstract)
- Chu, Y., L. D. Hu, H. Y. Chang, H. F. Chang, H. J. Yu, and Y. C. Pan. 2001. Effect of cutting method of mother bulb on bulblet formation of *Hippeastrum*. *Bull. Ilan Technol.* 7:1–7. (in Chinese with English abstract)
- De Bruyn, M. H. 1997. Micropropagation of *Amaryllis (Hippeastrum hybridum)*. p.179–184. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI* (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag, Berlin, Germany. 397 pp.
- De Bruyn, M. H., D. I. Ferreira, M. M. Slabbert, and J. Pretorius. 1992. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 31:179–184.
- Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. *J. Exp. Bot.* 26:253–262.
- Ilczuk, A., T. Winkelmann, S. Richartz, M. Witomska, and M. Serek. 2005. *In vitro* propagation of *Hippeastrum × chmielii* Chm.-Influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 83:339–346.
- Liu, M. C. 2005. *Amaryllis*. p.761–764. *in: Taiwan Agriculture Encyclopedia, Crop Edition 2. 3rd ed.* (Hung, J. H., T. D. Fan, and L. N. Lin, eds.) Council of Agriculture. Taipei, Taiwan. 926 pp. (in Chinese)
- Liu, Q. L., G. F. Duan, and L. Zhou. 2007. Establishment of *in vitro* bulb bud induction and regeneration system of *Amaryllis vittata*. *Acta Bot. Boreal-Occident. Sin.* 27:2551–2554. (in Chinese with English abstract)
- Lou, X. M., Y. C. Chou, C. Kon, W. T. Lu, and W. C. Zhang. 2009. Study on adventitious bud induction

- of *Hippeastrum hybridum* bulb. J. Anhui Agric. Sci. 37:16769–16770. (in Chinese with English abstract)
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Seabrook, J. E. A. and B. G. Cumming. 1977. The *in vitro* propagation of amaryllis (*Hippeastrum* spp. Hybrids). *In Vitro.* 13:831–836.
- Shao, S. J. and Shi Y. M. 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)
- Shen, M. M. and X. N. Yu. 2011. Research advances on tissue culture of *Amaryllis vittata*. *Heilongjiang Agric. Sci.* 10:135–138. (in Chinese with English abstract)
- Smith, R. H., J. Burrows, and K. Kurten. 1999. Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippesatrum* sp. (Amaryllidaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35:281–282.
- Yanagawa, T. and T. Osaki. 1996. *In vitro* propagation of bulblets and elimination of viruses by bulb-scale cultures of *Hippeastrum hybridum* bulbs. *Plant Tissue Cult. Lett.* 13:147–152.
- Zhang, S., K. Da, C. Cao, L. Jiang, R. Zhu, and L. Wu. 2002. Rapid micropropagation system via *in vitro* culture in *Amaryllis vittata* and its embryogenesis. *Acta Hort. Sin.* 29:285–287. (in Chinese with English abstract)
- Zhang, Y. L., Y. L. Zhang, and Y. L. Yuan. 2006. The influence of 6-BA and NAA on the propagation through tissue culture of *Amaryllis (Hippeastrum hybridum)*. *Shaanxi For. Sci. Technol.* 1:7–9. (in Chinese with English abstract)
- 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.

Effect of Surface Disinfection, Explant Type, and Plant Growth Regulators on Establishment of *In Vitro* Bulblet Proliferation of *Amaryllis*

Uei-Chern Chen¹, I. Din², Tzu-Ying Wu³, Jhin-Yi Tsao¹, and Chi-Ni Hsia^{4,*}

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(4):286–297.

Field-grown bulbs of *Amaryllis* (*Hippeastrum hybridum*) ‘Red Lion’ (about 25 cm circumference), ‘Blossom Peacock’, and ‘Tainung No. 1-Pink Lady’ (about 12 cm circumference) were used as culture materials. Effects of surface disinfection, explant type, and plant growth regulators combinations on establishment *in vitro* bulblet proliferation were investigated. Stem explants (2 cm × 1 cm × 1 cm) of ‘Red Lion’ left on a filter paper overnight before using 1.2% sodium hypochlorite solution for 15 min resulted in the least contamination. Stem explants (6 mm × 6 mm × 2 mm) cut from the upper or lower part of ‘Tainung No. 1-Pink Lady’ were compared. Although explants derived from different positions of the stem had the same proliferation rates of 1.2 bulblets per explant, the upper stem explants had a significant lower contamination rate of 3% than that of 37% from the lower part explants. Comparison of proliferation efficiencies was conducted using half- and quarter-bulb explants of ‘Blossom Peacock’ derived from an *in vitro* bulb with 2.5 cm circumference in size, and no significant difference was found on bulblet formation between both treatments. However, a higher proliferation rate of 5.2 bulblets per original bulb was calculated by using quarter-bulb explants than that of 2.0 bulblets from the half-bulb explants. The highest bulblet proliferation rate with 11.6 bulblets from per 2.5 cm circumference in ‘Red Lion’ *in vitro* bulb was obtained by culturing quarter-bulb explants on the MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ) and 0.2 mg L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) for 8 wk. Results of this study could provide useful information on bulblet proliferation for new varieties of *Amaryllis*.

Key words: *Hippeastrum hybridum*, Disinfection, *In vitro* propagation, Thidiazuron.

Received: June 14, 2016; Accepted: December 28, 2016.

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

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

² Assistant Research Fellow, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

³ Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.