

# 兩階段培養及巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

陳威臣<sup>1</sup> 吳姿穎<sup>2</sup> 曹進義<sup>1</sup> 夏奇鈺<sup>3,\*</sup>

## 摘要

陳威臣、吳姿穎、曹進義、夏奇鈺。2018。兩階段培養及巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響。台灣農業研究 67(1):44–53。

本研究利用孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 「台農 1 號-紅粉佳人」(‘Tainung No.1-Pink Lady’)、「紅獅」(‘Red Lion’) 及「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 組培苗為材料，探討兩階段培養及巴克素對鱗莖生長與發根之影響。「台農 1 號」鱗莖(直徑約 5 mm) 於含有 0.1 mg L<sup>-1</sup> 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> 奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid; NAA) 之液態或固態 MS 培養基中培養 8 wk (第一階段)，再接種至相同組成之固態培養基 8 wk 後 (第二階段)。結果顯示，液-固態兩階段培養具有顯著增加組培苗鮮重、葉數、葉長及根數之效果。利用「紅獅」與「千禧之星」鱗莖(直徑約 10 mm) 進行巴克素 (Paclobutrazol; PBZ) 液態培養試驗，結果顯示，對照組鱗莖培養至 8 wk 時，已有部分組培苗出現嚴重褐化的現象，建議繼代培養間隔時間不宜超過 8 wk。「紅獅」組培鱗莖在 50–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 培養條件下，PBZ 處理之根數顯著較多於對照組，但 PBZ 處理間並無顯著差異。然而，「千禧之星」鱗莖在 25–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理時根系生長受到抑制，且濃度越高時根數就越少，而 75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理則較對照組具有顯著較短與較寬的葉片；將 PBZ 濃度降低至 5 mg L<sup>-1</sup>，則有增大鱗莖與促進發根之效果。

**關鍵詞：**朱頂紅、液-固態培養、生長抑制劑、多效唑。

## 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人們喜愛，並廣泛應用於盆花、切花及花壇 (De Bruyn 1997; Ilczuk *et al.* 2005; Liu 2005; Shen & Yu 2011; Amani *et al.* 2015)。台灣近年來在農業研究機構與業者努力下，已陸續推出許多優良品種，卻也面臨因種苗量產不易，導致新品種難以推廣的困擾。

孤挺花的繁殖可利用分球、種子、雙鱗片或組織培養等方式，其中以雙鱗片繁殖法最常

被採用 (De Bruyn 1997; Liu 2005; Sarathe *et al.* 2013; Amani *et al.* 2015)。組織培養是許多花卉種苗量產的主要技術之一，尤其在新品種育成初期，面臨種苗數量稀少的狀況下，組織培養是種苗快速量產的有效方法 (De Bruyn 1997; Ilczuk *et al.* 2005; Shen & Yu 2011; Sarathe *et al.* 2013; Amani *et al.* 2015)。本研究前期以孤挺花「台農 1 號-紅粉佳人」(‘Tainung No.1-Pink Lady’)、「紅獅」(‘Red Lion’) 及「千禧之星」(‘Blossom Peacock’) 為材料，已建立其組培瓶苗 (Chen *et al.* 2017)。然而，後續卻出現組培鱗莖生長緩慢的問題，需要進一步探討促進組培苗生長與鱗莖增大的方法。

前人研究指出，垂筒花 (*Cyrtanthus clavatus*

投稿日期：2017 年 7 月 3 日；接受日期：2017 年 8 月 9 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組約僱助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

與 *C. spiralis*) 組培苗於液態培養後再轉為固態培養，可增加其鱗莖鮮重 (Morán *et al.* 2003)。Shen & Yu (2011) 指出，液態培養雖有助於孤挺花組培苗生長。De Bruyn (1997) 卻指出液態培養下之孤挺花組培苗之生長較差。孤挺花雜交種 (*Hippeastrum* × *chmii*) (Ilczuk *et al.* 2005) 與夏雪片蓮 (又名鈴蘭水仙) (*Leucojum aestivum*) (Ptak 2014) 的研究結果均顯示，液態培養基之短暫浸漬系統 (temporary immersion system; TIS) 處理可增加組培苗鮮重，且提升後續組培苗之出瓶存活率。

巴克素 (paclobutrazol; PBZ) 為抑制植物頂端分生組織生長的化學物質，作用機制為抑制激勃素 (gibberellic acid; GA) 合成，改變碳水化合物在供源與積儲組織器官間的關係，其傳導路徑係由根部吸收，經木質部往上運移後累積於葉片；具有調節種子發芽、營養生長、開花結果、產量品質及抵抗逆境等功能，且 PBZ 具有抑制細胞或節間伸長之功能，常被用於植株的矮化處理 (Rademacher 2000; Yadav *et al.* 2005)。植物組培系統可在培養基中添加抑制劑，如 PBZ、flurprimidol、chlorocholine chloride (CCC)、ancimidol (A-Rest) 用以抑制葉片生長、縮短節間及增加塊莖、球莖或鱗莖的權重的效果 (Chen *et al.* 2005; Ilczuk *et al.* 2005; Thakur *et al.* 2006; Sultana *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2012; Ptak 2014)。因此，本研究以孤挺花組培苗為材料，利用液態培養後再轉為固態培養之兩階段培養程序 (液-固態培養)，以及於培養基中添加 PBZ 的方式，藉以促進組培苗生長與增大鱗莖，期能提供產業在種球生產與新品種推展時之用。

## 材料與方法

### 植物材料來源、培養基配製及培養條件

本研究利用 Chen *et al.* (2017) 建立之孤挺花重瓣品種「台農 1 號-紅粉佳人」、單瓣品種「紅獅」及重瓣品種「千禧之星」組培苗進行試驗。培植體培養於含有 6% 蔗糖、1 mg L<sup>-1</sup> 苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 配合 0.1 或 0.2 mg L<sup>-1</sup> 奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic

acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 固態或液態培養基，固態培養基於加入 9 g L<sup>-1</sup> 洋菜 (Difco Bacto-agar) 前，先以 0.1–1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調為 5.7 ± 0.1，液態培養基則無添加洋菜，且 pH 值調為 5.2 ± 0.1，再利用 121°C、1.05 kg cm<sup>-2</sup> 滅菌 20 min 後冷卻備用。固態與液態培養均是將培植體接種於內含 20 mL 培養基之 125-mL 三角瓶 (Erlenmeyer flask) 進行試驗；固態培養置於 26°C ± 2°C、光照 14 h、光強度 38  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (FL40D-EX/38, China Electric Co., Taiwan) 的環境培養；液態培養則置於相同溫度環境以 10  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 低光照於水平迴轉式振盪器 (Orbital Shaker, SK-302AB, Sun Kuan Co., Taiwan) 以 100 rpm 速度進行振盪培養。

### 兩階段培養對孤挺花組培苗生長與發根之影響

將孤挺花「台農 1 號」組培苗切除根系與葉片前端 (留下 5 mm 葉片) 之組培鱗莖 (直徑約 5 mm) 作為培植體，先以液態或固態培養基進行第一階段培養 8 wk 後，將所得組培鱗莖分別再利用相同組成之固態培養基進行第二階段培養 8 wk，再調查組培苗之鱗莖直徑、全株鮮重、葉數 (葉長 ≥ 1 cm)、最長葉長、根數 (根長 ≥ 1 cm) 及最長根長。本試驗採用 4 重複，每重複接種 5 個鱗莖，共接種 20 個鱗莖。

### 巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

利用已切除根系與葉片前端 (留下 5 mm 葉片) 之孤挺花「紅獅」與「千禧之星」鱗莖 (直徑約 10 mm) 作為培植體，以含有 6% 蔗糖、1 mg L<sup>-1</sup> BA、0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA 及 MS 基本鹽類作為基礎培養基。PBZ 試驗係於基礎培養基中添加含 23% PBZ 水懸劑市售藥劑 (尚好擋，洽益化學股份有限公司，台灣) 進行試驗。試驗分為 3 個部分，試驗一為含有 0、50、100 及 200 mg L<sup>-1</sup> PBZ 之液態基礎培養基；試驗二是含有 0、25、50 及 75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 之液態基礎培養基，培養 8 wk 與 12 wk 後調查組培苗之鱗莖直徑、葉數 (葉長 ≥ 1 cm)、最長葉長、最大

葉寬及根數 (根長  $\geq 1$  cm)；試驗三含有 0、5、10 及 20 mg L<sup>-1</sup> PBZ 之基礎培養基，並添加 2% 活性碳之固態基礎培養基，培養 8 wk 後調查組培苗之鱗莖直徑、葉數 (葉長  $\geq 1$  cm)、最長葉長、根數及最長根長 (根長  $\geq 1$  cm)。本試驗採用 3 重複，每重複接種 3 個鱗莖，共接種 9 個鱗莖。

### 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 Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., USA) 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) 比較各處理平均值間之差異。

## 結果

### 兩階段培養對孤挺花組培苗生長與發根之影響

本試驗利用「台農 1 號」組培鱗莖 (直徑約 5 mm) 培養於含有 0.1 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之液態或固態 MS 培養基中 8 wk 後，結果顯示液態培養所得組培鱗莖可達 11 mm，而固態培養所得組培鱗莖僅 7 mm (資料未列)。後續將此第一階段培養所得組培鱗莖，分別再進行第二階段之固態培養。組培苗經過 8 wk 培養後之結果顯示，液-固態培養處理之鮮重、葉數、葉長及根數，均顯著高於固-固態培養處理，但鱗莖直徑與根長在兩處理間並無顯著

差異 (表 1)。

### 巴克素對孤挺花組培苗生長與發根之影響

本研究中 PBZ 涵蓋 3 組濃度範圍，試驗一採用 0–200 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之結果顯示，鱗莖培養於大於或等於 100 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件下，組培苗於培養 4 wk 開始出現褐化情形，達 8 wk 時已嚴重褐化而死亡 (資料未列)。調降 PBZ 濃度為 0–75 mg L<sup>-1</sup> 進行試驗二之結果顯示，「紅獅」鱗莖於不含 PBZ 之對照組條件下培養達 4 wk 時，培養基開始出現褐化現象，當培養至 8 wk 時已有部分組培苗或培養基均已出現更嚴重之褐化現象 (圖 1)；「千禧之星」也顯示類似的情形 (資料未列)。比較對照組於 8 wk 與 12 wk 之結果顯示，「紅獅」與「千禧之星」組培苗於 12 wk 時之葉長與根數雖增加，但其鱗莖直徑、葉數及葉寬的表現已出現生長停滯或衰退的情形 (表 2)。

「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於 0–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件培養達 12 wk 時，其組培苗葉數並無顯著差異 (表 2)。就組培苗之葉長與葉寬而言，「紅獅」鱗莖在此條件培養達 12 wk 時，組培苗葉長與葉寬在各處理組與對照組之間並無顯著差異。然而，「千禧之星」鱗莖於 0–50 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件培養達 12 wk 時，葉長在各處理組與對照組之間雖無顯著差異，而 75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之葉片顯著較短；此外，75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之葉寬顯著大於對照組與 25 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理，但與 50 mg L<sup>-1</sup> 處理之間並無顯著差異 (表 2)。「紅獅」鱗莖在 50 與 75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之根數顯著多於對照組，而 25 mg L<sup>-1</sup>

表 1. 兩階段培養對孤挺花「台農 1 號」組培苗生長與發根之影響。

Table 1. Effect of two-stage culture on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Tainung No.1-Pink Lady'<sup>2</sup>.

Culture procedure	Bulb diameter (mm)	Bulblet FW (g)	Leaf number (No.)	Leaf length (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
Solid-solid	8.6 ± 0.5 a <sup>3</sup>	1.3 ± 0.2 b	1.8 ± 0.2 b	9.8 ± 0.4 b	7.4 ± 0.6 b	12.4 ± 0.9 a
Liquid-solid	9.0 ± 0.2 a	2.2 ± 0.1 a	2.5 ± 0.1 a	17.7 ± 1.0 a	9.9 ± 0.4 a	11.4 ± 0.3 a

<sup>2</sup> Explants were cultured in liquid or solid MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA in combination with 6% sucrose for 8 wk of culture, and followed by a solid MS medium with same components for another 8 wk of culture. Each treatment had 4 replications, and 5 explants were used in each replication.

<sup>3</sup> Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

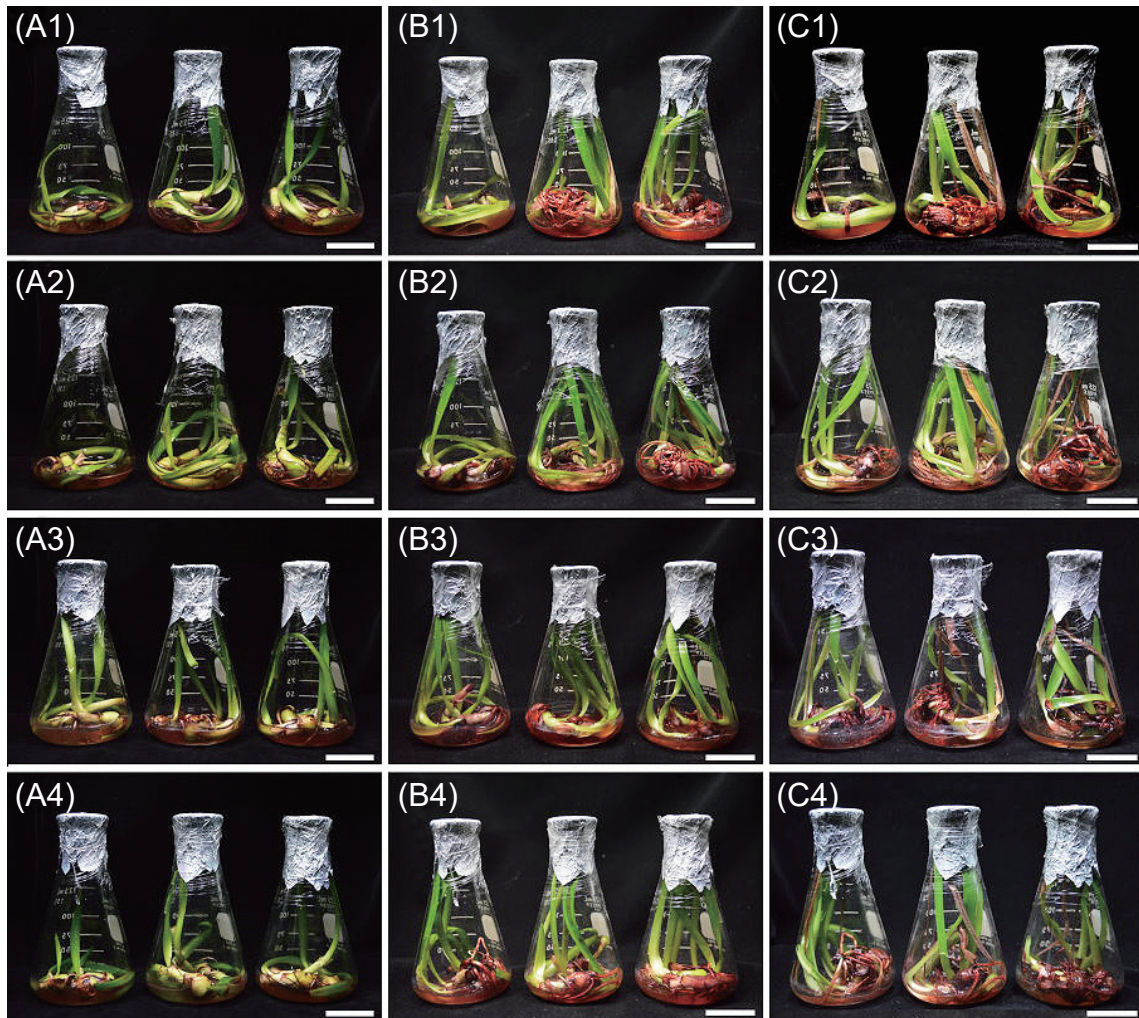


圖 1. 巴克素對孤挺花「紅獅」組培苗生長與發根之影響。(A)、(B) 及 (C) 分別為培養 4 wk、8 wk 及 12 wk 後組培苗生長與發根之情形。(1)、(2)、(3) 及 (4) 為培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA、 $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 及 6% 蔗糖，並分別添加 0、25、50 及  $75 \text{ mg L}^{-1}$  巴克素之 MS 液態培養基。Bars = 5 cm。

**Fig. 1.** *In vitro* bulblets growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion'. Explants were cultured in MS liquid medium containing  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA,  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA and 6% sucrose with additional 0 (1), 25 (2), 50 (3), and  $75 \text{ mg L}^{-1}$  paclobutrazol, respectively, for 4 (A), 8 (B) and 12 (C) wk of culture. Bars = 5 cm.

PBZ 處理則與對照組間並無顯著差異；然而，「千禧之星」組培苗卻顯示根系生長受 PBZ 抑制的結果，對照組根數顯著多於其餘 PBZ 處理，而且 PBZ 濃度越高時之根數就越少 (表 2)。

由於液態培養達 8 wk 之組培苗均出現玻璃質化與褐化現象，因此試驗三採用添加 2% 活性碳之固態培養方式，且調降 PBZ 濃度為  $0\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$  (約  $0\text{--}15.7 \mu\text{M}$ ) 進行試驗，並將

試驗期縮短為 8 wk。結果顯示「紅獅」組培苗之鱗莖直徑在各處理組與對照組之間雖無顯著差異，然而「千禧之星」組培苗顯示鱗莖增大的結果。 $5 \text{ mg L}^{-1}$  (約  $3.9 \mu\text{M}$ ) PBZ 處理鱗莖直徑顯著大於對照組與  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (約  $15.7 \mu\text{M}$ ) PBZ 處理，但與  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (約  $7.8 \mu\text{M}$ ) PBZ 處理並無顯著差異 (表 3)。「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於  $0\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$  PBZ 條件培養達 8 wk 時，

表 2. 巴克素添加於液態培養基對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。

Table 2. Effect of paclobutrazol in liquid medium on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Red Lion' and 'Blossom Peacock'<sup>2</sup>.

PBZ (mg L <sup>-1</sup> )	Bulb diameter (mm)		Leaf number (No.)		Leaf length (cm)		Leaf width (mm)		Root number (No.)	
	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk	8 wk	12 wk
'Red Lion'										
0	1.2±0.1 a <sup>y</sup>	1.0±0 a	2.0±0.0 a	2.2±0.8 a	15.8±0.2 ab	17.4±2.3 a	6.6±1.1 a	6.4±1.0 a	4.6±1.9 b	5.0±2.2 b
25	1.2±0.1 a	1.0±0 a	2.2±0.2 a	2.6±0.4 a	15.4±0.1 b	16.1±0.2 a	7.7±0.3 a	6.8±0.4 a	7.1±2.0 ab	9.2±1.3 ab
50	1.2±0.0 a	1.0±0 a	1.9±0.1 a	2.4±0.3 a	16.0±0.6 ab	17.7±1.0 a	7.7±0.6 a	7.0±0.7 a	7.6±0.7 ab	11.3±0.4 a
75	1.3±0.1 a	1.0±0 a	2.1±0.1 a	2.6±0.2 a	16.2±0.5 a	17.4±0.6 a	7.1±0.2 a	7.1±0.2 a	10.6±0.6 a	11.8±0.3 a
'Blossom Peacock'										
0	1.4±0.0 a	1.4±0.0 a	2.8±0.1 a	2.2±0.1 a	8.1±0.5 a	15.9±1.0 a	8.0±0.0 c	8.0±0.0 c	4.1±1.0 a	6.9±0.6 a
25	1.5±0.1 a	1.5±0.1 a	2.6±0.3 a	2.3±0.5 a	8.0±1.2 a	15.0±0.4 a	9.8±0.4 b	9.6±0.8 b	3.2±1.8 ab	4.0±1.6 b
50	1.5±0.1 a	1.5±0.1 a	2.4±0.3 a	2.4±0.3 a	8.1±1.9 a	14.7±1.3 a	10.3±0.6 ab	10.0±0.0 ab	1.9±1.6 ab	3.6±0.2 b
75	1.5±0.0 a	1.6±0.0 a	2.1±0.3 a	2.1±0.3 a	4.8±2.2 b	7.3±6.0 b	10.7±0.7 a	10.7±0.7 a	1.0±0.7 b	1.0±0.7 c

<sup>2</sup> Explants were cultured in MS liquid medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA and 6% sucrose with various concentrations of PBZ for 8 and 12 wk of culture under 100 rpm rotatory shaking condition. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

<sup>3</sup> Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

組培苗葉數與葉長均無顯著差異 (表 3)。「紅獅」與「千禧之星」鱗莖於 0–20 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件下，其發根率均可達到 100%，而且組培苗與培養基均未有嚴重褐化現象 (圖 2)。「紅獅」組培苗根數與根長在各處理之間並無顯著差異，然而「千禧之星」鱗莖在 5–10 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理下，組培苗之根數顯著多於對照組與 20 mg L<sup>-1</sup>

PBZ 處理；此外，5 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之「千禧之星」組培苗的平均根長顯著大於對照組與 20 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理，而與 10 mg L<sup>-1</sup> PBZ 處理之間並無顯著差異 (表 3)。

## 討論

液態培養可有助於孤挺花組培苗的生長

表 3. 巴克素添加於固態培養基對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。

Table 3. Effect of paclobutrazol in solid medium on *in vitro* bulblet growth and rooting of *H. hybridum* 'Red Lion' and 'Blossom Peacock'<sup>2</sup>.

PBZ (mg L <sup>-1</sup> )	Bulb diameter (mm)	Leaf number (No.)	Leaf length (cm)	Root number (No.)	Root length (cm)
'Red Lion'					
0	9.8±0.4 a <sup>y</sup>	1.3±0.3 a	11.8±1.5 a	14.9±1.8 a	8.5±0.6 a
5	9.7±0.3 a	2.1±0.2 a	12.8±1.7 a	12.0±0.3 a	8.9±0.6 a
10	9.9±0.7 a	2.1±0.8 a	11.9±2.2 a	13.0±1.7 a	8.5±0.8 a
20	10.1±0.9 a	1.9±0.4 a	13.6±2.0 a	12.8±3.0 a	9.0±0.2 a
'Blossom Peacock'					
0	10.3±0.2 b	2.0±0.0 a	12.9±1.0 a	11.3±0.5 b	9.4±0.5 b
5	11.4±0.2 a	2.0±0.0 a	11.0±1.6 a	13.4±0.6 a	12.0±0.4 a
10	10.9±0.1 ab	2.0±0.2 a	13.5±1.0 a	14.6±0.7 a	11.0±0.5 ab
20	10.5±0.3 b	1.8±0.1 a	12.4±0.9 a	11.4±0.7 b	9.8±0.3 b

<sup>2</sup> Explants were cultured in MS solid medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> BA, 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA and 6% sucrose with various concentrations of PBZ for 8 wk of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

<sup>3</sup> Means in the same column followed by different letter(s) are significantly different at the 5% level by LSD test.

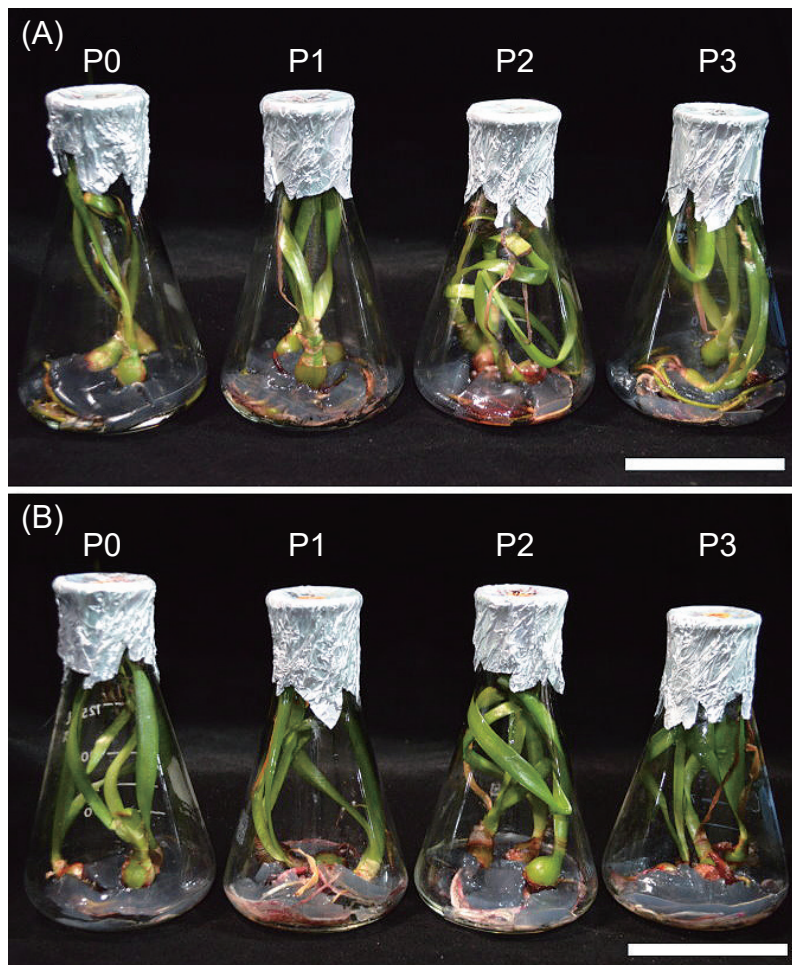


圖2. 巴克素對孤挺花「紅獅」與「千禧之星」組培苗生長與發根之影響。(A) 與 (B) 分別為孤挺花「紅獅」與「千禧之星」。(P0)、(P1)、(P2) 及 (P3) 為培養於含有  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA、 $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA、6% 蔗糖及 2% 活性碳，並分別添加 0、5、10 及  $20 \text{ mg L}^{-1}$  巴克素之 MS 固態培養基。Bars = 5 cm。

**Fig. 2.** *In vitro* bulblets growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion' (A) and 'Blossom Peacock' (B). Explants were cultured in MS solid medium containing  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA,  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  NAA, 6% sucrose and 2% active charcoal with additional 0 (P0), 5 (P1), 10 (P2), and 20 (P3)  $\text{mg L}^{-1}$  paclobutrazol for 8 wk of culture. Bars = 5 cm.

與增加鮮重 (Ilczuk *et al.* 2005; Shen & Yu 2011)，也有報告指出液態培養之孤挺花組培苗生長狀況較差 (De Bruyn 1997)。垂筒花組培苗於液態培養一段時間後再轉為固態培養，可促進其鮮重增加 (Morán *et al.* 2003)。Ptak (2014) 指出 TIS 培養系統可促進夏雪片蓮組培苗之根與葉的生長，不僅增加鮮重且提高其出瓶存活率。本研究結果顯示，第一階段採用液態培養即可達到 100% 發根率，然而組培苗葉片前端易出現褐化枯黃現象 (資料未列)；但

由於每次繼代培養均會切除葉片前端，因此枯黃葉片並不影響後續試驗進行；此外，液-固態培養方式可有助於組培苗生長，其鮮重、葉數、葉長及根數均顯著高於固-固態培養處理 (表 1)；因此，與上述部分之前人研究的結果相類似。然而，「紅獅」組培苗即使在不含 PBZ 之條件下培養達 8 wk 時，部分組培苗或培養基均已出現嚴重褐化現象 (圖 1)；此外，對照組「紅獅」與「千禧之星」組培苗於第 8–12 wk 期間已出現生長停滯或衰退情形 (表 2)。

因此，本研究建議孤挺花組培苗於液態培養條件下之繼代間隔時間不宜超過 8 wk。

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 研究結果顯示，PBZ 處理會抑制組培苗葉片的生長 (Nagaraju *et al.* 2002)。Zheng *et al.* (2012) 於東方型百合 (*Lilium Oriental hybrids 'Sorbonne'*) 栽培試驗結果也顯示，生長抑制劑 (CCC 與 PBZ) 具有減少葉數與葉面積等生長抑制效果。Yadav *et al.* (2005) 之評論報告指出，PBZ 具有減少葉面積與增加葉寬、葉厚及乾重的效果。然而，萱草 (*Hemerocallis spp.*) 的研究結果卻顯示，PBZ 具有促進葉數與葉長的效果 (Chen *et al.* 2005)。Ptak (2014) 的研究結果也指出，PBZ 可提高夏雪片蓮組培苗的葉片形成率。Ilczuk *et al.* (2005) 於孤挺花雜交種的研究結果卻指出，flurprimidol 可增加組培苗之葉數，但同時會抑制其葉長。百合 (*Lilium longiflorum*) 的 PBZ 研究結果顯示，當濃度為 1.7  $\mu\text{M}$  時可促進葉片的生長，但在 3.4–8.5  $\mu\text{M}$  處理下則差異並不顯著，然而當濃度高達 17  $\mu\text{M}$  時則會出現生長抑制的結果 (Thakur *et al.* 2006)。綜合上述前人研究結果顯示，生長抑制劑對葉片生長具有物種差異性，甚至因為濃度有別而有不同的處理效應。本研究結果顯示，「紅獅」鱗莖在 0–75  $\text{mg L}^{-1}$  PBZ 條件培養達 12 wk 時，組培苗之葉長與葉寬在各處理組與對照組之間並無顯著差異；「千禧之星」鱗莖在 0–50  $\text{mg L}^{-1}$  PBZ 條件下培養達 12 wk 時，組培苗之葉長在各處理組與對照組間也無顯著差異，然而在 75  $\text{mg L}^{-1}$  PBZ 條件卻顯示較短的葉片，顯示葉片生長受到 PBZ 抑制 (表 2)；然而，在降低 PBZ 濃度 (5–20  $\text{mg L}^{-1}$ ) 後進行試驗，對於組培苗之葉數與葉長的抑制效果則不再顯著 (表 3)。因此，本研究與上述報導顯示相類似的結果，亦即較高 PBZ 濃度會抑制葉片生長，但較低 PBZ 濃度則不影響葉片生長，然而本研究並未顯示 PBZ 具有促進葉片生長的效果。

百合 (*L. longiflorum*) 組培苗的研究結果顯示，PBZ 可促進其根系生長與乾重增加 (Thakur *et al.* 2006)。PBZ 可提高夏雪片蓮組培苗的發根率與出瓶存活率 (Ptak 2014)。Chen *et al.* (2005) 於萱草的研究結果指出，PBZ 處

理並不會影響組培苗之根數與根長。Yadav *et al.* (2005) 的評論報告指出，PBZ 具有抑制根長、促進根徑與根重，以及提高側根數與發根率的效果。然而，Nagaraju *et al.* (2002) 研究結果卻指出，PBZ 會抑制唐菖蒲組培苗根系的生長而導致根徑縮小的結果。火焰百合 (*Gloriosa rothschildiana*) 的研究結果顯示，PBZ 與 flurprimidol 處理雖不會影響組培苗的根數，但具有促進發根率與增加根重的效果，同時會抑制根長，但若是 flurprimidol 濃度高達 5  $\text{mg L}^{-1}$  時則會抑制組培苗根系生長 (Kozak 2002)。Ilczuk *et al.* (2005) 於孤挺花雜交種的研究結果指出，flurprimidol 於固態或液態培養下對於組培苗根系發育影響並不一致，固態培養下顯示促進根數與抑制根長的結果，但在液態培養時則根數與根長均受到促進。依據上述前人研究結果顯示，生長抑制劑對根系生長的影響，也會因植物種類、品種、藥劑類型或處理濃度的不同，而出現相反的結果。本研究結果顯示，「紅獅」與「千禧之星」組培苗於 25–75  $\text{mg L}^{-1}$  PBZ 處理之發根率雖然都可達到 100% (資料未列)，但是「紅獅」組培苗根數受到 PBZ 促進，然而「千禧之星」卻出現根數受到抑制的結果 (表 2)，顯示「紅獅」相較於「千禧之星」而言，對於 PBZ 具有較佳耐受性，此可能是因為基因型的差異所造成的結果。

Shen & Yu (2011) 於孤挺花組織培養評論報告指出，培養基添加具有吸附抑制物質能力之活性炭，可降低小鱗莖苗的褐化率。由於本研究無論在是否添加 PBZ 之液態培養條件下，組培苗均出現嚴重褐化的現象 (圖 1)，因此，後續試驗採用添加 2% 活性炭之固態培養方式進行試驗，結果亦顯示此種培養方式確實可以降低組培苗之褐化現象 (圖 2)。

就 PBZ 處理對於組培苗儲存器官 (塊莖、球莖、鱗莖) 之生長而言，唐菖蒲 (Nagaraju *et al.* 2002)、火焰百合 (Kozak 2002)、百合 (Thakur *et al.* 2006) 及夏雪片蓮 (Ptak 2014) 研究結果均顯示，PBZ 具有增加儲存器官鮮重的效果。Chen *et al.* (2005) 於萱草研究也有類似結果，組培苗乾重增加主要來自於澱粉的累積。孤挺花雜交種研究結果顯示，含有 flurprimidol 之液態培養基可促進組培鱗莖鮮重

的增加 (Ilczuk *et al.* 2005) ; CCC (500 ppm) 也具有促進孤挺花組培鱗莖鮮重增加的效果 (Sultana *et al.* 2010) 。Zheng *et al.* (2012) 於東方型百合的栽培試驗結果顯示, CCC 對於增加鱗莖鮮重的效果顯著, 但 PBZ 處理則效果不佳。本研究結果顯示, 「紅獅」與「千禧之星」鱗莖培養於 25–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件達 8 或 12 wk 時, 鱗莖直徑在各處理組與對照組之間並無顯著差異, 亦即此條件下之 PBZ 處理並無促進鱗莖增大的效果, 甚至「紅獅」可能因部分組培苗死亡而鱗莖萎縮, 導致鱗莖直徑縮小的結果 (表 2) 。此外, 「紅獅」在 50–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件下雖有助於組培苗根數的增加 (表 2) , 但 5–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ 對鱗莖卻無增大的效果 (表 2、表 3) , 而在 5 mg L<sup>-1</sup> PBZ 條件之「千禧之星」組培苗, 顯示鱗莖增大、根數增加及根長較長的結果 (表 3) , 因此 PBZ 對於「紅獅」與「千禧之星」組培苗之處理效果並不一致, 此結果可能是兩品種對於 PBZ 的耐受性不同所造成的差異。

本研究利用孤挺花「台農 1 號」、「紅獅」及「千禧之星」之無菌組培苗進行試驗, 尋求促進組培苗生長與發根的方法。試驗結果顯示, 利用液態培養轉固態培養之兩階段培養方式, 具有促進「台農 1 號」組培苗生長的效果; 此外, 較高濃度 (50–75 mg L<sup>-1</sup>) (約 39.2–58.7 μM) PBZ 處理可促進「紅獅」組培苗的發根; 而較低濃度 (5 mg L<sup>-1</sup>) (約 3.9 μM) PBZ 處理則顯示「千禧之星」組培苗之鱗莖增大、根數增加及根長變長的結果。本研究後續擬將上述試驗所得組培苗進行馴化試驗, 並探討於馴化期間促進鱗莖增大的方法。

## 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, S. H., H. Zarei, A. Mottallebi Azar, and K. Mashayekhi. 2015. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. *Cumhuriyet Sci. J.* 36:594–605.
- Chen, J., D. E. Hall, and V. De Luca. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Heremercallis* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:58–62.
- 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 of *in vitro* bulblet proliferation of *Amaryllis*. *J. Taiwan Agric. Res.* 66:286–297. (in Chinese with English abstract)
- De Bruyn, M. H. 1997. Micropropagation of *Amaryllis (Hippeastrum hybridum)*. p.3–13. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag, Berlin, Germany. 397 pp.
- 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 Tissue Organ Cult.* 83:339–346.
- Kozak, D. 2002. The effect of growth retardants on induction and development of *Gloriosa rothschildiana* O'Brien tubers *in vitro*. *Acta Hort.* 570:345–349.
- 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)
- Morán, G. P., R. Colque, F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. *Sci. Hort.* 98:49–60.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–497.
- Nagaraju, V., G. Bhowmik, and V. A. Parthasarathy. 2002. Effect of paclobutrazol and sucrose on *in vitro* cormel formation in gladiolus. *Acta Bot. Croat.* 61:27–33.
- Ptak, A. 2014. *Leucojum aestivum* L. *in vitro* bulbs induction and acclimatization. *Cent. Eur. J. Biol.* 9:1011–1021.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:501–531.
- Sarathe, S., M. K. Tripathi, M. Vidhya Sankar, and O. P. Singh. 2013. Studies on *in vitro* morphogenesis from bulb scale and leaf disc explant of *Amaryllis belladonna* L. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 14:22–32.

- 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)
- 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.
- Thakur, R., A. Sood, P. K. Nagar, S. Pandey, R. C. Sobti, and P. S. Ahuja. 2006. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: Growth parameters. Plant Cell Rep. 25:382–391.
- Yadav, R. K., N. Rai, D. S. Yadav, and B. S. Asati. 2005. Use of paclobutrazol in horticultural crops – A review. Agric. Rev. 26:124–132.
- Zheng, R. R., Y. Wu, and Y. P. Xia. 2012. Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* oriental hybrids ‘Sorbonne’. J. Zhejiang Univ. Sci. B 13:136–144.

# Effects of Two-Stage Culture and Paclobutrazol on *In Vitro* Bulblet Growth and Rooting of *Hippeastrum hybridum*

Uei-Chern Chen<sup>1</sup>, Tzu-Ying Wu<sup>2</sup>, Jhin-Yi Tsao<sup>1</sup>, and Chi-Ni Hsia<sup>3,\*</sup>

## Abstract

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(1):44–53.

An improved method for *in vitro* bulblet growth and rooting of *Hippeastrum hybridum* was established in this study. *In vitro* bulblets of *Hippeastrum hybridum* ‘Tainung No. 1’, ‘Red Lion’, and ‘Blossom Peacock’ were used as materials to conduct the liquid-solid or solid-solid two-stage culture, and additional paclobutrazol was added into culture medium to enhance growth and rooting of *in vitro* Amaryllis bulblets. *In vitro* bulbs (5 mm diameter) of ‘Tainung No. 1’ were cultured in liquid or solid MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA for 8 wk of culture before transferring to a solid MS medium with the same components for another 8 wk of culture. The results showed that liquid-solid culture was superior to solid-solid culture on fresh weight of bulblets, leaf number, leaf length, and root number. *In vitro* bulblets of ‘Red Lion’ and ‘Blossom Peacock’ showed severe browning or death after 8 wk of culture on the control medium. Therefore, it is suggested that the subculture interval should not exceed 8 wks. The root number of ‘Red Lion’ bulblets by 50–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ treatment was found significantly higher than that of control. No significant difference among PBZ treatments was found. However, root numbers of ‘Blossom Peacock’ were reduced treated with 25–75 mg L<sup>-1</sup> PBZ concentrations. Leaf with shorter and wider shape was observed in 75 mg L<sup>-1</sup> PBZ treatment. However, a lower concentration of 5 mg L<sup>-1</sup> PBZ was found beneficially to bulb diameter, root number and root length.

**Key words:** Amaryllis, Liquid-solid culture, Plant growth retardant, PP333.

---

Received: July 3, 2017; Accepted: August 9, 2017.

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

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Contract Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.