

# 培植體大小、蔗糖及活性炭對孤挺花組培苗增殖與生長之影響

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

## 摘要

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈺。2019。培植體大小、蔗糖及活性炭對孤挺花組培苗增殖與生長之影響。台灣農業研究 68(2):137–147。

本研究以孤挺花「台農 1 號」(*Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1') 組培苗為材料，探討培植體大小、蔗糖及活性炭濃度對組培苗生長之影響。以鱗莖直徑約 3、6、9 mm 之 4 分縱切鱗莖作為培植體進行培養，結果顯示不同大小培植體之組培苗增殖率並無顯著差異。每個 1/4 鱗莖於培養 8 wk 後，約可形成 1.1–1.3 株組培苗。此外，9 mm 處理之培植體，在 8 wk 培養後可獲得具有較大鱗莖之組培苗；然而，在延長培養時間至 12 wk 後，9 mm 與 6 mm 處理間已無顯著差異。利用鱗莖直徑約 3–5 mm 之組培苗作為培植體，進行 1.5–9.0% 蔗糖與 0–2 g L<sup>-1</sup> 活性炭濃度組合之複因子試驗，結果顯示 6.0% 蔗糖配合 1.0–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理，對於增加組培苗鱗莖直徑與鮮重較為有利，分別達到 8 mm 與 1.73–1.75 g；但是當蔗糖濃度達到 9% 時，則會抑制組培苗之生長。就組培苗根數而言，在含有 6% 蔗糖搭配 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭條件下，可形成 8.8–9.6 條根，均較高於其他處理。就組培苗葉數而言，於 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭濃度下，蔗糖濃度在 1.5–6.0% 之間並無顯著差異。綜合而言，蔗糖濃度自 1.5% 提高至 6.0%，可增加組培苗之鱗莖直徑、鮮重及根數，若同時添加適量活性炭，則具有協同增效蔗糖之效果。

**關鍵詞：**石蒜花、四分切鱗莖、大量繁殖、發根、增效作用。

## 前言

孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.) 原產熱帶中南美洲，主要分布於巴西、祕魯及墨西哥，為石蒜科 (Amaryllidaceae) 多年生鱗皮鱗莖花卉，別名石蒜花、百枝蓮及喇叭花；栽培品種之花朵碩大且色彩豔麗，更具有多樣之花型與花色，在歐、美、日等國深受消費者喜愛，廣泛應用於盆花、切花及花壇植物，台灣則多應用於庭園栽植與盆花觀賞 (De Bruyn 1997; Chen & Wang 2000; Liu 2005; Sultana *et al.* 2010; Amani *et al.* 2015)。孤挺花可利用種子、分球、雙鱗片或組織培養等方法繁殖

種苗，其中雙鱗片法為目前商業生產種苗之主要方式，其缺點是病原易藉由染病種苗擴散而導致品種弱化 (Chang & Wang 1999; Shao & Shi 2008)。台灣近年來在孤挺花育種已有相當進展，陸續推出許多優良品種，但推廣初期常面臨優質種苗不敷供應，導致成效不彰的困境；植物組培技術具有繁殖倍率高、生產週期短、全年可生產等優點，對於種苗數量短缺的孤挺花新品種而言，是快速量產種苗的有效方法 (Chen *et al.* 2017, 2018)。Chen *et al.* (2017, 2018) 利用孤挺花「台農 1 號」(*H. hybridum* Hort. 'Tainung No. 1') 鱗莖為材料，成功建立微體培養繁殖方式；並藉由液態培養與添加生長

投稿日期：2018 年 10 月 18 日；接受日期：2018 年 12 月 6 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計畫助理。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。

抑制劑-多效唑 (paclobutrazol; PBZ) 增進組培苗之鱗莖生長，然而在其養成效率上仍有改善空間。以往之孤挺花組培研究顯示，提高培養基中蔗糖濃度，可有效促進組培苗生長，而在培養基中添加活性炭 (activated charcoal) 則有助於組培苗發根 (Chang & Wang 1999; Shao & Shi 2008; Sultana *et al.* 2010)。本研究測試培養基中，蔗糖與活性炭之濃度對於孤挺花組培苗生長之影響，期能藉以提高組培苗品質，提供產業於種球量化生產之用。

## 材料與方法

### 材料來源、培養基配製及培養條件

本研究以 Chen *et al.* (2017) 建立之孤挺花「台農 1 號」(*H. hybridum* Hort. 'Tainung No. 1') 組培苗為材料進行試驗。培養基配製與培養條件均同前述報告。

### 培植體來源之鱗莖大小對孤挺花組培苗增殖與生長之影響

選取鱗莖直徑約 3、6、9 mm  $\pm$  1 mm 之組培苗為材料，切除葉片與根部後，將鱗莖十字縱切成 1/4 鱗莖作為培植體，培養於含有 3.0% 蔗糖、0.2 mg L<sup>-1</sup> 賽苯隆 (thidiazuron; TDZ) 與 0.2 mg L<sup>-1</sup> 奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid; NAA) 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基中；培養 8 wk 與 12 wk 後，調查組培苗數、鱗莖直徑及葉長大於或等於 1 cm 之葉數。本試驗採用 4 重複，每重複接種 4 個 1/4 鱗莖培植體。

### 蔗糖濃度與活性炭添加對孤挺花組培苗生長之影響

選取鱗莖直徑約 2–4 mm 之組培苗為材料，切除部分葉與根 (均保留約 3 mm) 後作為培植體，培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> 6-苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine, BA, Sigma)、0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA，並分別添加蔗糖 (1.5、3.0、6.0 及 9.0%, w/v) 與活性炭 (0、2 g L<sup>-1</sup>) 組合之 MS 培養基；培養 8 wk 後，調查組培苗之鱗莖直徑、根數及葉長大於或等於 1 cm 之葉數。本試驗採用

5 重複，每重複接種 3 個鱗莖培植體。

### 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花組培苗生長之影響

選取鱗莖直徑約 3–5 mm 之組培苗為材料，切除部分葉與根 (均保留約 3 mm) 後作為培植體，培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> BA、0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA，並分別添加蔗糖 (1.5、3.0、6.0 及 9.0%, w/v) 與活性炭 (0、0.5、1.0、2.0 g L<sup>-1</sup>) 組合之 MS 培養基；培養 10 wk 後，調查組培苗之鱗莖直徑、鮮重、根數及葉長大於或等於 1 cm 之葉數。本試驗採用 4 重複，每重複接種 3 個鱗莖培植體。

### 試驗設計和統計分析

本研究之試驗均採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗資料以 SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 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

### 培植體來源之鱗莖大小對孤挺花組培苗增殖與生長之影響

源自不同大小鱗莖之 1/4 鱗莖培植體，培養 8 wk 與 12 wk 後之結果顯示，平均每培植體分別可形成 1.1–1.3 苗與 1.3–1.4 苗，在各處理間並無顯著差異。就誘導所得組培苗之鱗莖直徑而言，在培養 8 wk 後，9 mm 處理所得鱗莖直徑可達 6 mm 為最大，顯著大於其他兩處理；然而在培養 12 wk 後，9 mm 處理雖達約 6.9 mm，與 6 mm 處理間已無顯著差異，但仍顯著大於 3 mm 處理。在誘導所得組培苗葉數方面，當培養至 8 wk 時，各處理間並無顯著差異，每苗約可形成 1.8–2.0 葉，而在培養 12 wk 後，9 mm 處理達到 3.1 葉/苗，顯著多於 3 mm 處理，但與 6 mm 處理間之差異並不顯著 (表 1)。

## 蔗糖濃度與活性炭添加對孤挺花組培苗生長之影響

利用鱗莖直徑約 2–4 mm 之組培苗進行蔗糖濃度與活性炭添加試驗，結果顯示對於組培苗之鱗莖直徑、根數及葉數而言，在蔗糖濃度、活性炭濃度及兩者交感效應均呈現顯著或極顯著之影響 (表 2)。當培養基不含活性炭時，組培苗之鱗莖直徑以 1.5% 與 3% 蔗糖處理較大，分別達 5.5 mm 與 5.6 mm，根數以 3% 蔗糖處理之 6.2 條，顯著多於其他處理，葉數以 1.5% 與 3.0% 蔗糖處理之 2.0 葉較多 (表 2)。當培養基含有 2 g L<sup>-1</sup> 活性炭時，組培苗之鱗莖直徑與根數方面，以 3–9% 蔗糖處理之鱗莖直徑達 6.3–7.1 mm，顯著大於 1.5% 處理，根數以 3.0% 與 6.0% 蔗糖處理之 6.8 條與 7.1 條，顯著大於 1.5% 與 9.0% 處理；而葉數以 1.5% 與 3.0% 蔗糖處理之 2.4 葉與 2.1 葉較高，但隨著蔗糖濃度增加而逐漸減少 (表 2)。此外，在培養基含有 2 g L<sup>-1</sup> 活性炭條件下，1.5、3.0、6.0 及 9.0% 蔗糖處理所得組培苗鮮重，依序為 0.71 g ± 0.07 g、0.98 g ± 0.19 g、0.97 g ± 0.20 g 及 0.65 g ± 0.19 g，顯示 3.0% 與 6.0% 處理較高於 1.5% 與 9.0% 處理。

## 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花組培苗生長之影響

利用鱗莖直徑約 3–5 mm 之組培苗進行蔗糖與活性炭濃度組合之複因子試驗，結果顯示此兩因子及其交感效應對組培苗之鱗莖直徑、鮮重、根數及葉數均有顯著之影響。就鱗莖直徑而言，當培養基未添加活性炭時，隨著蔗糖濃度自 1.5% 增至 6.0% 時可達最大直徑，雖可顯著大於 1.5% 處理，但與 3.0% 與 9.0% 處理間並無顯著差異；當培養基含有 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭時，隨著蔗糖濃度自 1.5% 增至 6.0% 時亦可達最大鱗莖，但濃度提高至 9.0% 時之鱗莖則變小 (表 3)。就活性炭濃度影響而言，在 1.5% 蔗糖濃度條件下，以 1.0 g L<sup>-1</sup> 處理顯著大於 0 與 0.5 g L<sup>-1</sup> 處理，但與 2.0 g L<sup>-1</sup> 處理間並無顯著差異，當蔗糖濃度提高至 3.0% 時，以 2.0 g L<sup>-1</sup> 處理顯著大於 0–1.0 g L<sup>-1</sup> 處理，但是當蔗糖濃度提高至 6.0% 與 9.0% 時，則搭配 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理可得具有最大鱗莖之組培苗，且均顯著大於未添加活性炭處理。其中，以 6.0% 蔗糖配合 1.0 或 2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理，培養 10 wk 後可得具有較大鱗莖直徑之組培苗 (表 3)。

對於組培苗鮮重而言，結果顯示無論培養基是否含有活性炭，鮮重皆隨著蔗糖濃度提高至 6.0% 可達最大鮮重，但當濃度達到 9.0% 時，則鮮重顯著降低 (表 4)。此外，在參試蔗糖濃度條件下，添加活性炭皆可增加組培苗鮮

表 1. 培植體來源之鱗莖大小對孤挺花「台農 1 號」組培苗增殖與生長之影響。

Table 1. Effect of size of bulb used as the sources of explant on *in vitro* plantlet proliferation and growth in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>2</sup>.

Size diameter of bulb used as the source of explant (mm)	Culture duration	No. of plantlets/explant	Bulb diameter of plantlet (mm)	No. of leaves/plantlet
3	8	1.1 ± 0.3 a <sup>y</sup>	5.3 ± 0.8 b	2.0 ± 0.2 a
6	8	1.3 ± 0.2 a	5.3 ± 0.6 b	1.8 ± 0.1 a
9	8	1.2 ± 0.2 a	6.0 ± 0.4 a	2.0 ± 0.2 a
3	12	1.3 ± 0.4 a	5.6 ± 0.8 b	2.4 ± 0.7 b
6	12	1.4 ± 0.2 a	6.1 ± 0.7 ab	2.7 ± 0.5 ab
9	12	1.3 ± 0.3 a	6.9 ± 1.1 a	3.1 ± 0.7 a

<sup>2</sup> Explants (one-quarter bulb) derived from *in vitro* plantlets with various diameter of bulbs (about 3, 6, and 9 mm) were cultured on MS medium containing 3.0% sucrose, 0.2 mg L<sup>-1</sup> thidiazuron (TDZ) and 0.2 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) for 8 and 12 wk of culture. Each treatment had four replicates, and four explants were used in each replicate. Leaf length shorter than 1 cm was not recorded.

<sup>y</sup> Means (standard error of the means) in the same column within same data collection date followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

表 2. 蔗糖濃度與活性炭添加對孤挺花「台農 1 號」組培苗生長之影響。

**Table 2.** Effect of sucrose concentrations of medium with or without activated charcoal on *in vitro* plantlet growth in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>z</sup>.

Sucrose (%)	Activated charcoal (g L <sup>-1</sup> )	Bulb diameter of plantlet (mm)	No. of roots/plantlet	No. of leaves/plantlet
1.5	0	5.5 ± 0.2 c <sup>y</sup>	3.3 ± 0.3 c	2.0 ± 0.1 b
3.0		5.6 ± 0.1 c	6.2 ± 0.4 ab	2.0 ± 0.1 b
6.0		4.8 ± 0.1 de	2.5 ± 0.2 cd	1.6 ± 0.1 c
9.0		4.3 ± 0.1 e	2.2 ± 0.2 d	0.5 ± 0.1 d
1.5	2	5.2 ± 0.3 cd	5.2 ± 1.3 b	2.4 ± 0.2 a
3.0		6.3 ± 0.5 b	6.8 ± 1.1 a	2.1 ± 0.2 ab
6.0		7.1 ± 0.9 a	7.1 ± 0.2 a	1.8 ± 0.2 bc
9.0		6.5 ± 0.9 ab	5.8 ± 1.0 b	1.5 ± 0.4 c
Source		<i>F</i> -test <sup>x</sup>		
Sucrose		*	***	***
Activated charcoal		***	***	***
Sucrose × Activated charcoal		***	***	***

<sup>z</sup> *In vitro* bulb explants (about 2–4 mm in diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) with various sucrose concentrations and combined with or without activated charcoal for 8 wk of culture. Each treatment had five replicates, and 3 explants were used in each replicate. Leaf length shorter than 1 cm was not recorded.

<sup>y</sup> Means (standard error of the means) in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup> *F*-test of ANOVA. \*, \*\* and \*\*\*, are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

表 3. 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花「台農 1 號」組培苗鱗莖生長之影響。

**Table 3.** Effect of sucrose and activated charcoal on bulb growth of *in vitro* plantlet in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>z</sup>.

Sucrose (%)	Bulb diameter of plantlet (mm)			
	Activated charcoal (g L <sup>-1</sup> )			
	0	0.5	1	2
1.5	4.2 ± 0.1 b B <sup>y</sup>	4.2 ± 0.1 c B	4.7 ± 0.5 d A	4.6 ± 0.3 c AB
3.0	4.7 ± 0.3 a C	5.6 ± 0.5 b B	5.8 ± 0.3 c B	6.8 ± 0.8 b A
6.0	4.8 ± 0.4 a B	7.4 ± 0.9 a A	8.0 ± 0.4 a A	8.0 ± 0.2 a A
9.0	4.5 ± 0.1 ab B	6.5 ± 0.6 ab A	6.6 ± 0.4 b A	6.8 ± 0.4 b A
Source		<i>F</i> -test <sup>x</sup>		
Sucrose		***		
Activated charcoal		***		
Sucrose × Activated charcoal		***		

<sup>z</sup> *In vitro* explants (about 3–5 mm in bulb diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) in combination with various concentrations of sucrose and activated charcoal (AC) for 10 wk of culture. Each treatment had four replicates, and three explants were used in each replicate.

<sup>y</sup> Means (standard error of the mean) within the same column (in small letter) and within the same row (in capital letter) followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup> *F*-test of ANOVA. ns, non-significant; \*, \*\* and \*\*\*, are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

重。其中，以 6.0% 蔗糖搭配 1.0 或 2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理，培養 10 wk 後之組培苗鮮重可達 1.75 g 與 1.73 g 為最高 (表 4)。

對組培苗根數而言，當培養基未添加活性炭時，蔗糖濃度為 3.0–6.0% 時顯著多於 1.5% 與 9.0% 處理，而在 0.5 g L<sup>-1</sup> 活性炭條件下，

表 4. 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花「台農 1 號」組培苗鮮重之影響。

**Table 4.** Effect of sucrose and activated charcoal on fresh weight of *in vitro* plantlet in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>z</sup>.

Sucrose (%)	Fresh weight of plantlet (g)			
	Activated charcoal (g L <sup>-1</sup> )			
	0	0.5	1	2
1.5	0.32 ± 0.05 a C <sup>y</sup>	0.62 ± 0.08 b B	0.74 ± 0.05 c AB	0.75 ± 0.13 b A
3.0	0.35 ± 0.02 a B	1.27 ± 0.21 a A	1.29 ± 0.29 b A	1.54 ± 0.20 a A
6.0	0.36 ± 0.09 a C	1.34 ± 0.23 a B	1.75 ± 0.16 a A	1.73 ± 0.15 a A
9.0	0.22 ± 0.04 b C	0.70 ± 0.06 b B	0.88 ± 0.17 c A	0.75 ± 0.05 b A
Source	<i>F</i> -test <sup>x</sup>			
Sucrose	***			
Activated charcoal	***			
Sucrose × Activated charcoal	***			

<sup>z</sup> *In vitro* explants (about 3–5 mm in bulb diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) in combination with various concentrations of sucrose and activated charcoal (AC) for 10 wk of culture. Each treatment had four replicates, and three explants were used in each replicate.

<sup>y</sup> Means (standard error of the mean) within the same column (in small letter) and within the same row (in capital letter) followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup> *F*-test of ANOVA. ns, non-significant; \*, \*\* and \*\*\*, are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

3.0% 或 6.0% 蔗糖處理達 9.0 與 9.6 條根為最多，亦顯著多於其餘處理，而在 1.0–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理時，則均以 6% 處理顯著多於其餘處理。當 3% 蔗糖處理時，以搭配 0.5 g L<sup>-1</sup> 活性炭可達 9.0 條根為最多，而 6% 蔗糖處理條件下，則是以搭配 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭之處理具有最多根數，每苗可形成約 8.8–9.6 條根。此外，在所有蔗糖濃度下，當活性炭濃度高於 0.5 g L<sup>-1</sup> 之後，根數隨著濃度增加而減少 (表 5)。

對組培苗葉數而言，當培養基未添加活性炭時，1.5% 蔗糖處理顯著多於 6.0% 與 9.0% 處理，但與 3.0% 處理間並無顯著差異；而在 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭處理下，1.5–6.0% 蔗糖濃度處理間差異並不顯著，但當濃度提高至 9.0% 時則顯著降低。在 1.5% 蔗糖處理條件下，培養基添加活性炭並無法增加葉數，但在 3.0–9.0% 蔗糖處理時，添加 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭之影響雖不明顯，各處理具有相近葉數，但是均顯著高於未加活性炭處理 (表 6)。圖 1 為不同蔗糖與活性炭濃度組合條件下，組培苗於培養 10 wk 後之生長與發根情形，圖中顯示添加活性炭可明顯促進組培苗生長與發根，其中以 3.0% 與 6.0% 蔗糖處理具有較大促進效

果。此外，葉長與根長調查結果均顯示，添加 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭可明顯促進組培苗之葉長與根長，但在活性炭處理間則無顯著差異。

## 討論

Chen *et al.* (2017) 於孤挺花研究結果顯示，組培苗增殖效率受到鱗莖切法的影響。若以單一鱗莖為計算基準，則 4 分縱切較 2 分縱切可得較多組培苗，但組培苗之鱗莖大小則以 2 分縱切處理者較大。Dal Vesco *et al.* (2001) 於鳳梨 (*Ananas comosus*) 組培研究結果指出，3–4 mm 培植體相較於 1–2 mm 與 2–3 mm 培植體，對於組培苗之生長較為有利。上述研究結果均顯示，使用較大之培植體對組培苗後續之生長與增重較為有利。然而，萱草 (*Hemerocallis* spp.) (Chen *et al.* 2005)、海棗 (*Phoenix dactylifera*) (Mazri 2013) 及朝鮮薊 (*Cynara cardunculus*) (El Boullani *et al.* 2017) 之研究則指出各個組培階段皆有其適當大小之培植體，過大或太小之培植體均不利於組培苗生長。本研究結果顯示，培植體來源之鱗莖大小對孤挺花「台農 1 號」('Tainung No. 1') 組培苗增殖並無顯著影響，但會顯著影響組培鱗莖

表 5. 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花「台農 1 號」組培苗根數之影響。

**Table 5.** Effect of sucrose and activated charcoal on root number of *in vitro* plantlet in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>z</sup>.

Sucrose (%)	No. of roots/plantlet			
	Activated charcoal (g L <sup>-1</sup> )			
	0	0.5	1	2
1.5	1.8 ± 0.5 b C <sup>y</sup>	5.3 ± 1.6 b A	4.1 ± 0.3 c AB	3.1 ± 1.0 d BC
3.0	3.1 ± 1.3 a C	9.0 ± 1.1 a A	6.8 ± 1.3 b B	7.1 ± 0.8 b B
6.0	3.8 ± 0.4 a B	9.6 ± 1.7 a A	9.4 ± 0.6 a A	8.8 ± 0.4 a A
9.0	1.3 ± 0.5 b C	6.3 ± 0.6 b A	6.1 ± 0.7 b AB	5.0 ± 1.0 c B
Source	<i>F</i> -test <sup>x</sup>			
Sucrose	***			
Activated charcoal	***			
Sucrose × Activated charcoal	**			

<sup>z</sup> *In vitro* explants (about 3–5 mm in bulb diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) in combination with various concentrations of sucrose and activated charcoal (AC) for 10 wk of culture. Each treatment had four replicates, and three explants were used in each replicate.

<sup>y</sup> Means (standard error of the mean) within the same column (in small letter) and within the same row (in capital letter) followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup> *F*-test of ANOVA. ns, non-significant; \*, \*\* and \*\*\*, are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

表 6. 蔗糖與活性炭濃度組合對孤挺花「台農 1 號」組培苗葉數之影響。

**Table 6.** Effect of sucrose and activated charcoal on leaf number of *in vitro* plantlet in *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1'<sup>z</sup>.

Sucrose (%)	No. of leaves/plantlet <sup>y</sup>			
	Activated charcoal (g L <sup>-1</sup> )			
	0	0.5	1	2
1.5	2.3 ± 0.2 a A <sup>x</sup>	2.3 ± 0.3 a A	2.3 ± 0.3 ab A	2.5 ± 0.4 a A
3.0	2.0 ± 0.0 ab B	2.6 ± 0.5 a A	2.4 ± 0.5 a AB	2.3 ± 0.2 ab AB
6.0	1.8 ± 0.2 b B	2.4 ± 0.5 a A	2.5 ± 0.1 a A	2.5 ± 0.4 a A
9.0	0.7 ± 0.3 c B	1.6 ± 0.4 b A	1.8 ± 0.3 b A	1.9 ± 0.2 b A
Source	<i>F</i> -test <sup>w</sup>			
Sucrose	***			
Activated charcoal	***			
Sucrose × Activated charcoal	*			

<sup>z</sup> *In vitro* explants (about 3–5 mm in bulb diameter) were cultured on MS medium containing 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthalene acetic acid (NAA) in combination with various concentrations of sucrose and activated charcoal (AC) for 10 wk of culture. Each treatment had four replicates, and three explants were used in each replicate.

<sup>y</sup> Leaf length shorter than 1 cm was not recorded.

<sup>x</sup> Means (standard error of the mean) within the same column (in small letter) and within the same row (in capital letter) followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>w</sup> *F*-test of ANOVA. ns, non-significant; \*, \*\* and \*\*\*, are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

之生長。同樣以 1/4 鱗莖作為培植體，若培植體來自 9 mm 之較大鱗莖，則培養 8 wk 後可達到最大鱗莖，但此優勢在時間延長至 12 wk 後則消失；此外，組培苗葉數雖然在培養 8

wk 後並無顯著差異，但在延長至 12 wk 後，則源自 6 與 9 mm 培植體之組培苗具有較多葉片 (表 1)。根據本研究結果推論，若時間非為限制因子時，可利用較小培植體進行培養，但

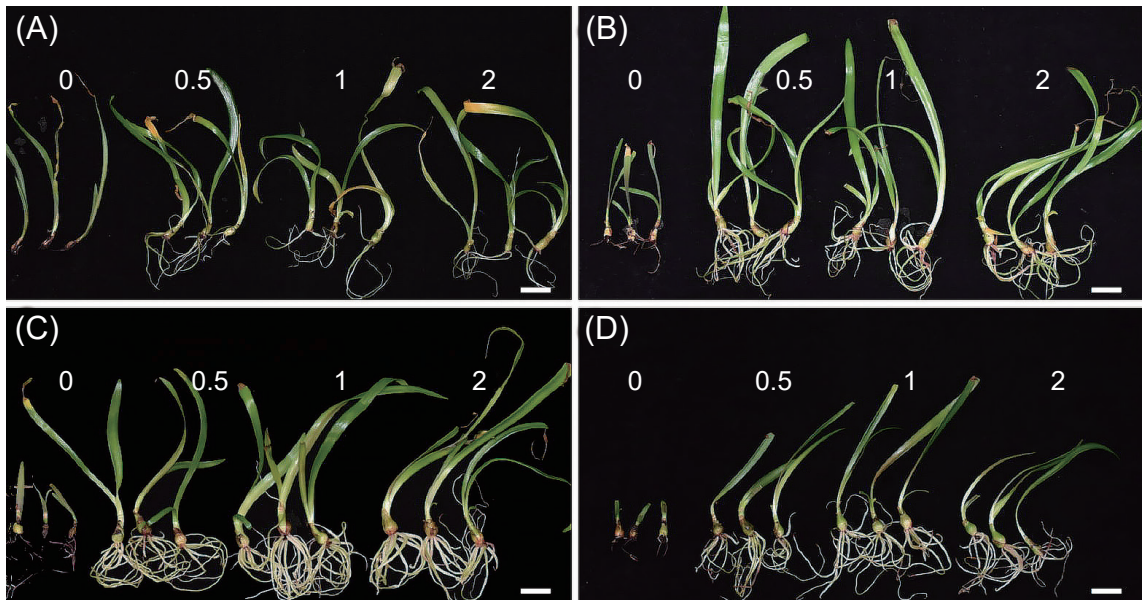


圖 1. 孤挺花「台農 1 號」組培苗培養於含有不同蔗糖與活性炭濃度組合培養基 10 wk 後之生長情形。以鱗莖直徑約 3–5 mm 之組培苗培養於含有  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  苯甲基腺嘌呤 (6-benzyl-aminopurine; BA)、 $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  萘乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid; NAA)，並分別添加 1.5、3.0、6.0、9.0% 蔗糖濃度 (A、B、C、D) 與 0、0.5、1.0、2.0  $\text{g L}^{-1}$  活性炭濃度 (標示於圖中) 組合之 MS 培養基中，培養達 10 wk 時組培苗之生長與發根情形。Bar = 2 cm。

**Fig. 1.** The growth situation of *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Tainung No. 1' plantlets while in vitro plantlets cultured on the medium containing various concentrations of sucrose and activated carbon for 10 wk of culture. In vitro plantlets with 3–5 mm bulb diameter were cultured on MS medium containing  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6-benzylaminopurine (BA) and  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$   $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) with additional various concentrations of 1.5, 3.0, 6.0, 9.0  $\text{g L}^{-1}$  sucrose (A, B, C, D) and 0, 0.5, 1.0, 2.0  $\text{g L}^{-1}$  activated charcoal (marked in picture) for 10 wk of culture. Bars = 2 cm.

時間如果是限制因子時，則建議使用較大培植體，預期能夠在較短時間內獲得較大鱗莖之組培苗。

在培養基沒有添加活性炭之條件下，孤挺花「紅獅」研究結果顯示，3.0% 與 5.0% 蔗糖處理相較於無糖或 1.0% 蔗糖處理，可顯著促進組培苗之生長 (Chang & Wang 1999)。孤挺花「橙色君主」('Orange Sovereign') 研究結果顯示，蔗糖濃度提高至 4.5% 與 6.0%，較 3.0% 處理可顯著增加鱗莖鮮重 (Shao & Shi 2008)。垂筒花 (*Cyrtanthus loddigesianus* 與 *C. speciosus*) (Angulo *et al.* 2003) 與垂筒花雜交種 (*C. 'Orange Gem' × C. eucallus*) (Hong & Lee 2012) 也有相類似結果，亦即提高蔗糖濃度可增加鱗莖之鮮重與直徑。Chen & Wang (2000) 於孤挺花「紅獅」之研究指出，3.0–4.0% 蔗糖處理相較於 1.0–2.0% 或 6.0–8.0% 處理，

對鱗莖生長具有較佳之促進效果。Sultana *et al.* (2010) 於孤挺花研究指出，在 3.0–11.0% 蔗糖濃度處理條件下，以 9.0% 處理可獲得最高鱗莖鮮重，顯著大於較低或更高濃度之蔗糖處理。垂筒花 (*C. clavatus* 與 *C. spiralis*) (Morán *et al.* 2003)、長柄石蒜 (*Lycoris longitube*) (Wang *et al.* 2005)、石蒜 (*Lycoris Herb.*) (Lin & Chang 2015) 及水仙 (*Narcissus 'St. Keverne'* 與 *N. 'Hawera'*) (Staikidou *et al.* 2005) 等研究也有類似結果，亦即適度提高蔗糖濃度可促使組培苗增重，但濃度過高時則不利於鮮重增加。Nagaraju *et al.* (2002) 利用唐菖蒲 (*Gladiolus*) 組培苗為材料，探討 3.0–12.0% 蔗糖處理對組培苗生長之影響，結果顯示 9% 蔗糖對組培球莖 (cormel) 鮮重之促進效果最佳，6.0–12.0% 蔗糖較有利於組培球莖鮮重，3.0–9.0% 蔗糖有助於葉長增加，而 12.0% 蔗糖對根部伸長效果

最好，顯示組培苗各器官生長皆有其最適當之蔗糖濃度。Ptak (2014) 於鈴蘭水仙 (*Leucojum aestivum*) 研究也顯示，雖然 9.0% 蔗糖處理之鱗莖鮮重顯著大於 3.0% 與 6.0% 處理，但葉數卻顯著較少。本研究利用鱗莖直徑約 2–4 mm 組培苗進行試驗，結果顯示當培養基不含活性炭時，組培苗之鱗莖直徑、根數及葉數，皆以 1.5% 與 3.0% 蔗糖處理優於 6.0% 與 9.0% 處理 (表 2)，此部分與上述研究結果並不完全一致；但是當培養基中添加 2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭時，則提高蔗糖濃度對其生長具有顯著之增效作用 (synergistic effect)，其中以對鱗莖直徑與根數之促進效果最明顯，但是當蔗糖濃度提高至 9.0% 時，則對組培苗生長產生不利影響 (表 2)，此一結果則與上述研究結果顯示相同趨勢。

水仙屬植物 (*Narcissus*) (Staikidou *et al.* 2005) 與穿龍薯蕷 (*Dioscorea nipponica*) (Chen *et al.* 2007) 研究指出，培養基含有適量蔗糖不僅可提供培植體之碳源需求，更可維持適當之培養基滲透勢 (osmotic potential)，藉以促進培植體的良好生長。然而當蔗糖濃度過高時，則可能因培養基滲透勢過低而抑制培植體生長。台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus*) 研究結果顯示，組培苗各發育階段皆有其適當蔗糖濃度，濃度過高將抑制組培苗生長，此結果可能是培養基水勢 (water potential) 過低所造成 (Ket *et al.* 2004)。Yassen *et al.* (2013) 於碳源功效評論報告指出，培養基含高蔗糖濃度會降低其滲透勢，導致培植體生長受缺水限制。Varshney *et al.* (2000) 於亞洲百合雜種系 (Asiatic hybrids) 研究結果顯示，6.0% 蔗糖處理具有最佳鱗莖直徑與鮮乾重累積，但是當蔗糖濃度提高至 9.0–15.0% 時，則會抑制組培苗生長。然而，較大培植體對高蔗糖濃度之承受力較佳，因此可有較佳之增重效果。本研究分別在兩個不同試驗中，利用不同鱗莖大小之組培苗進行蔗糖濃度試驗，結果顯示鱗莖直徑約 3–5 mm 組培苗在培養基不含活性炭條件下，6.0% 蔗糖並不會抑制組培苗生長 (表 3、表 4)；但以鱗莖直徑約 2–4 mm 組培苗進行試驗結果卻顯示，在不含活性炭條件下，6.0% 蔗糖濃

度並不有利於組培苗鱗莖增大 (表 2)；兩試驗中組培苗對於蔗糖濃度反應差異之原因，推測可能是 3–5 mm 鱗莖相對於 2–4 mm 鱗莖對於高蔗糖濃度之耐受力較佳，較能承受培養基之水分逆境。因此，在較高 6% 蔗糖條件下，可獲得具有較大鱗莖直徑且較重之組培苗。此外，兩試驗中未含活性炭對照組之組培苗根數差異較大，2–4 mm 鱗莖試驗所得組培苗根數達 2.2–6.2 條根，而 3–5 mm 鱗莖試驗所得組培苗根數僅 1.3–3.8 條根 (表 2、表 5)；雖然於不同試驗之相同處理，在根數上具有差異，但 2–4 mm 鱗莖試驗係以 3% 處理所得組培苗具有較多根數 (表 2)。而 3–5 mm 鱗莖試驗，則是以 3% 與 6% 處理之組培苗根數較多 (表 5)。兩試驗間仍具有相同之趨勢，且同樣有較大鱗莖具有較佳高蔗糖耐受力之情形，此差異不排除係不同試驗在批次材料間之生物性誤差所導致。

Chang & Wang (1999) 於孤挺花「紅獅」研究結果指出，雙鱗片培植體培養於含有 3% 蔗糖之 1/2 MS 培養基時，添加 3 g L<sup>-1</sup> 活性炭可促進組培苗鮮重、鱗莖直徑、葉數及根數的增加。Thomas (2008) 評論報告指出，藉由在培養基中添加活性炭吸附生長抑制物質，具有顯著促進組培苗生長之效果。鋸棕櫚 (*Serenoa repens*) (Gallo-Meagher & Green 2002)、台灣金線連 (Ket *et al.* 2004) 及萱草 (Chen *et al.* 2005) 等研究均有相類似結果，亦即培養基中添加活性炭可促進組培苗之生長與發根。Staikidou *et al.* (2006) 於雪花蓮 (*Galanthus nivalis*、*G. nivalis* 'Flore Pleno' 及 *G. elwesii*) 研究結果顯示，培養基中若同時添加蔗糖與活性炭，對鱗莖生長具有協同促進效果。本研究於蔗糖與活性炭之複因子試驗結果顯示，在 1.5–9.0% 蔗糖濃度條件下，添加 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭對於蔗糖具有增效作用，可有效提升組培苗之鱗莖直徑、鮮重及根數。然而，培養基中添加活性炭可改善高蔗糖濃度抑制生長之原因，是否為活性炭吸附培養基內之生長抑制物質，抑或是改變植物生長調節劑平衡所造成，必須藉由進一步研究加以釐清。

本研究利用孤挺花「台農 1 號」鱗莖直徑

約 3、6、9 mm 之組培苗進行試驗，結果顯示培植體來源之鱗莖大小不會影響增殖效率，但培植體若是來自 9 mm 之較大鱗莖，則於 8 wk 之較短培養時間內，可獲得具有較大鱗莖之組培苗。但在培養時間延長至 12 wk 後，則源自 6 與 9 mm 鱗莖之培植體表現差異即不顯著；培養基中添加 1.0 與 2.0 g L<sup>-1</sup> 活性炭，可提升蔗糖對組培苗生長之促進效果，其中當蔗糖濃度為 6.0% 時，可獲得具有較大鱗莖直徑、鮮重及根數之組培苗。

## 誌謝

本文稿承行政院農業委員會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 Univ. Faculty Sci. Sci. J. 36:594–605.
- Angulo, M. E., R. Colque, F. Viladomat, J. Bastida, and C. Codina. 2003. *In vitro* production of bulblets of *Cyrtanthus loddigesianus* and *Cyrtanthus speciosus*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 78:441–446.
- 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)
- Chen, T. C. and T. Y. Wang. 2000. Effect of salt strength and sucrose concentration on bulblet growth of *Hippeastrum hybridum* Hort. *in vitro*. Hort. NCHU 25:83–93. (in Chinese with English abstract)
- Chen, J. X., D. E. Hall, and V. De Luca. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:58–62.
- Chen, F. Q., Y. Fu, D. L. Wang, X. Gao, and L. Wang. 2007. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. J. Plant Growth Regul. 26:38–45.
- Chen, U. C., I. Din, T. Y. Wu, J. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2017. Effect of surface disinfection, explant type, and plant growth regulators on establishment of *in vitro* bulblet proliferation of *Amaryllis*. J. Taiwan Agric. Res. 66:286–297. (in Chinese with English 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. 67:44–53. (in Chinese with English abstract)
- Dal Vesco, L. L., A. de Almeida Pinto, G. R. Zaffari, R. O. Nodari, M. S. dos Reis, and M. P. Guerra. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. Fruits 56:143–154.
- 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. New York. 397 pp.
- El Boullani, R., K. Lagram, A. El Mousadik, and M. A. Serghini. 2017. Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus L.). J. Mater. Environ. Sci. 7:2469–2473.
- Gallo-Meagher, M. and J. Green. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. Plant Cell Tissue Organ Cult. 68:253–256.
- Hong, J. and A. K. Lee. 2012. Micropropagation of *Cyrtanthus* ‘Orange Gem’ × *C. eucallus* hybrid. Sci. Hortic. 142:174–179.
- Ket, N. V., E. J. Hahn, S. Y. Park, D. Chakrabarty, and K. Y. Paek. 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biol. Plant. 48:339–344.
- Lin, Y. W. and C. Chang. 2015. A review of propagation literature in *Lycoris*. Seed Nur. 17:33–46. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Mazri, M. A. 2013. Effect of basal medium, explants size and density on the *in vitro* proliferation and growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar ‘16-bis’. Not. Sci. Biol. 5:332–337.
- 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. Hortic. 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.
- Shao, S. J. and Y. M. Shi. 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)
- Staikidou, I., S. Watson, B. M. R. Harvey, and C. Selby. 2005. *Narcissus* bulblet formation *in vitro*: Effects of carbohydrate type and osmolality of the culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 80:313–320.
- Staikidou, I., C. Selby, and G. Hanks. 2006. Stimulation of *in vitro* bulblet growth in *Galanthus* species with sucrose and activated charcoal. *Acta Hortic.* 725:421–426.
- 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.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26:618–631.
- Varshney, A., V. Dhawan, and P. S. Srivastava. 2000. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:383–391.
- Wang, G. P., Y. Chen, J. Zhou, L. Zhang, and M. R. Huang. 2005. Bulb induction and plant regeneration of *Lycoris longituba*. *Plant Physiol. Commun.* 41:457–460. (in Chinese with English abstract)
- Yassen, M., T. Ahmad., G. Sablok. A. Standardi, and I. A. Hafiz. 2013. Review: Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Mol. Biol. Rep.* 40:2837–2849.

# Effect of Explant Size, Sucrose and Activated Charcoal on *In Vitro* Plantlet Proliferation and Growth in *Amaryllis*

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

## Abstract

Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2019. Effect of explant size, sucrose and activated charcoal on *in vitro* plantlet proliferation and growth in *amaryllis*. *J. Taiwan Agric. Res.* 68(2):137–147.

Factors of explant size, concentration of sucrose and activated charcoal in the culture medium were investigated on *in vitro* growth of *Hippeastrum hybridum* Hort. ‘Tainung No. 1’ plantlet in this study. One-quarter vertical cut bulb explants derived from 3, 6 and 9 mm diameters of bulb were evaluated after 8 wk and 12 wk of culture. Proliferation rate of 1.1–1.3 plantlets per one-quarter bulb explant was obtained after 8 wk of culture, and no significant difference was found among all treatments. Furthermore, plantlets with larger bulb were obtained from explants derived from explants of 9 mm treatment. However, no significant difference on bulb diameter of 6 mm and 9 mm treatments was found after extending culture time to 12 wk of culture. A factorial experiment using 1.5–9.0% sucrose in combination with 0–2.0 g L<sup>-1</sup> activated charcoal was conducted using explants derived from plantlets with 3–5 mm diameter of bulb. The better results were obtained from 6% sucrose in combination with 1.0–2.0 g L<sup>-1</sup> activated charcoal on increase of bulb diameter and fresh weight which were 8.0 mm bulb diameter and 1.73–1.75 g fresh weight per plantlet, respectively. It was also found that growth of plantlets was inhibited in the medium containing 9.0% sucrose. In terms of the root number of plantlet, the best results of 8.8–9.6 roots per plantlet were obtained from 6.0% sucrose in combination with 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> activated charcoal, and higher than the other treatments. For the leaf number of plantlet, no significant difference was found by using 1.5–6.0% sucrose in combination with 0.5–2.0 g L<sup>-1</sup> activated charcoal. In summary, raising sucrose concentration from 1.5% to 6.0% would increase bulb diameter, fresh weight and root number of plantlet, and adding proper concentration of activated charcoal would have a synergistic effect with sucrose.

**Key words:** *Hippeastrum hybridum* Hort., One-quarter bulb, Masspropagation, Rooting, Synergistic effect.

---

Received: October 18, 2018; Accepted: December 6, 2018.

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

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

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

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