

國立臺灣大學園藝暨景觀學研究所

博士論文

Department of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bioresources and Agriculture

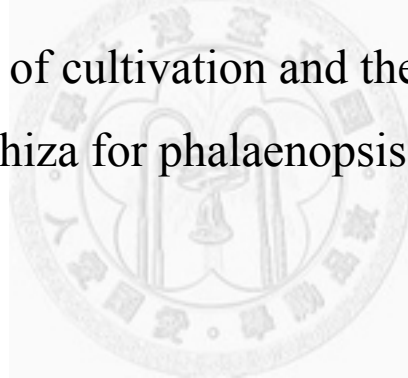
National Taiwan University

Doctoral Dissertation

蝴蝶蘭栽培技術之改良及菌根之應用

Improvement of cultivation and the use of orchid

mycorrhiza for phalaenopsis orchids



吳柏宏

Po-Hung Wu

學號:D93628002

指導教授：張喜寧 教授

Advisor: Doris C. N., Chang, Ph. D.

中華民國 一百年 十二月

December, 2011

誌謝

本論文承蒙指導教授 張喜寧教授在學術研究領域上的悉心指導，始能順利完成。感謝張喜寧老師七年多來如嚴師亦如慈母般的教誨，除了學術研究外，亦教導了我許多待人處世的道理，並給予我充分的自主性，讓我有機會除了學術研究外，在事業上亦能稍有成就。感謝黃定鼎老師在蘭花菌根機制研究中，提供研究經費、儀器設備及在研究上的諸多指導。感謝黃浩仁老師提供儀器設備，及軟腐病抗病能力測試技術。感謝陳虹燁老師及其研究室阿杰、小芸、昭君、家齊、士毓、雅萍等學長姐、學弟妹，提供我儀器設備的使用、技術上的指導及生活上的協助，使我在成大做實驗的期間不致徬徨無助。

感謝陳文輝老師、方煒老師、詹明才老師、葉信宏老師、詹富智老師、廖麗貞老師在我博士班求學期間，蘭花研究上，給予我相當多的指導與建議，更要感謝王寅東老師，在我實驗設計上及國際科學期刊寫作上的指導，使我真正學習到如何才能在国际科學期刊上發表。

七年多的日子裡，感謝實驗室諸多的研究夥伴，淑芬學姐、亦青學姐、明治、秀霏、康康、俊成、孟妘、婉瑜、志平、君豪、小陸、瓊瑩、映齡、文南在實驗上的幫助及生活上的陪伴，尤其是明治及淑芬學姐，如沒有妳們的互相勉勵，或許論文需更多的時間才能完成。感謝系上鄭正勇老師、林宗賢老師、陳右人老師、李金龍老師、葉德銘老師、張育森老師、張耀乾老師在課業上的教導，讓我開始慢慢了解什麼是農業、什麼是園藝、什麼是花卉。

最後要感謝我的家人、許許多多的長輩及好朋友，在我求學期間的支持、鼓勵及體諒，沒有你們的加油、打氣，論文或許不知何時才能順利完成。謝謝大家!!
謝謝!!

中文摘要

蘭花產業是我國農業發展的旗艦作物，在所有種類的蘭花中，蝴蝶蘭是世界上最重要的盆花作物之一。台灣是世界上最主要的蝴蝶蘭生產國家，2011 年台灣的蝴蝶蘭外銷總值已經達到 27 億台幣。本論文針對蘭菌對於蝴蝶蘭的生長促進、誘導抗病、以及外加植物生長調節物質對於開花品質的增進以及開花時間的調節作了一系列詳細的研究，以期在學術上或實際的產業利用上，有所貢獻。利用蘭菌之接種(*Rhizoctonia* spp. (R02 及 R04))可有效促進蘭苗的生長，並且可增強對軟腐病菌(*Erwinia chrysanthemi*)的抗性。經由抑制性扣減雜合技術(Suppression subtractive hybridization, SSH)的方式，已找到數個可能與抗軟腐病相關的基因。在蝴蝶蘭開花控制時，施用三種不同濃度的三種 cytokinins (N-6-benzyladenine(50、100、150 mg·L⁻¹)、kinetin(100、200、300 mg·L⁻¹)及 2-isopentenyladenine(50、100、150 mg·L⁻¹))。結果顯示施用 N-6-benzyladenine 100 及 150 mg·L⁻¹ 對開花的促進效果最佳，可顯著增加花梗數及花朵數。

關鍵詞：蝴蝶蘭、蘭菌、抑制性扣減雜合技術、抗軟腐病、甲殼素、涼溫處理

Abstract

Orchid industry is the flagship of agricultural crop development in Taiwan. Phalaenopsis, in all type of orchids, is the most important potted flower in the world. Taiwan is the main orchid producer countries in the world. In 2011 the export value of Taiwan's Phalaenopsis orchid has reached NT \$ 2.7 billion. This thesis focus on the utility of rhizoctonia to phalanopsis including growth promoting, induce disease resistance, improve the quality of flowering and flowering time regulation. I expect these results can be contributed to the orchid industry and basic research in orchid. Inoculation of *Rhizoctonia* spp. (R02 and R04) can enhances Phalaenopsis orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. By suppression subtractive hybridization (SSH) assay, we found several candidate genes which play a role at against *Erwinia chrysanthemi*. In the other hand, application of three different concentrations of the three cytokinins (N-6-benzyladenine (50、100、150 mg·L⁻¹)、kinetin (100、200、300 mg·L⁻¹) and 2-isopentenyladenine (50、100、150 mg·L⁻¹)) at flowering control. The results showed that application of 100 or 150 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine on flowering for best results, can significantly increase the number and flower stalk number.

Key Words: Phalaenopsis, orchid micorrhizal fungi, suppression subtractive hybridization, anti soft rot disease, chitosan, cool temperature treatment

目錄

中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
前言.....	10
前人研究.....	12
第一章、蝴蝶蘭菌根之效益.....	39
摘要.....	39
第一節、蘭菌接種可促進蝴蝶蘭生長.....	40
前言.....	40
材料與方法.....	42
結果與討論.....	44
結論.....	44
第一節圖表.....	45
第二節、蘭菌接種可增加抗軟腐病能力.....	48
前言.....	48
材料與方法.....	49
結果與討論.....	51
結論.....	52
第二節圖表.....	53
第三節、接種蘭菌之蝴蝶蘭其生長抗病之機制探討.....	59
前言.....	59
材料與方法.....	61
結果與討論.....	66
結論.....	69

第三節圖表.....	70
參考文獻.....	73
第二章、植物生長物質在蝴蝶蘭的生長與開花上之應用.....	89
摘要.....	89
第一節、出瓶前涼溫處理及出瓶後施用甲殼素可促進蝴蝶蘭小苗生長.....	90
前言.....	90
材料與方法.....	91
結果與討論.....	93
結論.....	94
第一節圖表.....	95
第二節、使用 N-6-benzyladenine 及 Gibberelic acid 3 調控蝴蝶蘭開花.....	101
前言.....	101
材料與方法.....	103
結果與討論.....	105
結論.....	107
第二節圖表.....	108
第三節、使用 N-6-benzyladenine、kinetin 及 2-isopentenyladenine 調控蝴蝶蘭開花.....	113
前言.....	113
材料與方法.....	114
結果與討論.....	115
結論.....	116
參考文獻.....	117
第三節圖表.....	119
附錄(已發表之國際科學期刊三篇).....	121

圖目錄

圖 1-1、以蝴蝶蘭菌根植株螢光顯微鏡快速檢測法觀察蝴蝶蘭菌根及非菌根植株.....	45
圖 1-2、接種蘭菌之蝴蝶蘭大白花栽培種 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111)、大紅花栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31' 植株生長情況.....	46
圖 1-3、蝴蝶蘭大白花栽培種 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111)及大紅花栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31' 接種蘭菌 R02 或 R04 4 個月後植株之總鮮重.....	47
圖 1-4、蝴蝶蘭大紅花栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31' 接種軟腐病菌(<i>Erwinia chrysanthemi</i>) 24 小時病徵的發展情況(1×10^{-2} ~ 1×10^{-7})..	53
圖 1-5、 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) 接種軟腐病菌(<i>Erwinia chrysanthemi</i>) 24 小時病徵的發展情況(1×10^{-2} ~ 1×10^{-7})..	54
圖 1-6、 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31' 接種軟腐病菌(<i>Erwinia chrysanthemi</i>) 24 小時病徵的發展情況(1×10^{-1} 及 1×10^{-3}).....	55
圖 1-7、 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) 接種軟腐病菌(<i>Erwinia chrysanthemi</i>) 24 小時，病徵的發展情況(1×10^{-1} 及 1×10^{-3}).....	56
圖 1-8、蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 及大紅花栽培種 V31 接種 R02 菌種之菌根以 Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 實驗後，經電泳分析的結果.....	70
圖 1-9、以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭大紅花栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31'、 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) 根部 cytochrome P450 monooxygenase、GDA2 protein(G2 pea dark accumulated gene)、pectinesterase、PVPR3(Phaseolus vulgaris pathogenesis-related protein)、GRX(glutaredoxin)、LEA5 (Late embryogenesis abundant protein 5) 等 6 個基因之基因表現量.....	71
圖 2-1、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片數.....	95
圖 2-1、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉幅.....	96

圖 2-3、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片鮮重.....	97
圖 2-4、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片乾重.....	98
圖 2-5、不同處理後之蝴蝶蘭植株根莖比.....	99
圖 2-6、於涼溫處理(26/18°C)後第 1 天及第 14 天各噴灑一次 70 mg·L ⁻¹ N-6-benzyladenine 所造成 <i>Phalaenopsis</i> Luchia Pink '244' 之花梗畸形.....	108
圖 2-7、涼溫處理第 1 天噴灑不同濃度之 GA ₃ 後蝴蝶蘭之花型.....	109



表目錄

表 1-1、蝴蝶蘭栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31'、 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111)軟腐病徵的發展.....	57
表 1-2、蝴蝶蘭栽培種 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31'、 <i>Doritaenopsis</i> Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111)軟腐病徵的發展.....	58
表 1-3、蝴蝶蘭接種蘭菌後誘導根部差異性表現基因經 Suppression subtractive hybridization 篩選後，所獲得基因片段經 BLASTx 比對之結果.....	72
表 2-1、蝴蝶蘭商業品種(<i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian 'V3'、 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'V31'及 <i>Phalaenopsis</i> Mount Lip)出瓶前以 18°C 低溫處理一個晚上、出瓶後接種 <i>Rhizoctonia</i> spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04、及每二週葉面噴灑 0.02%之甲殼素等六種處理之出瓶存活率.....	100
表 2-2、於涼溫處理(26 /18 °C)第一天及第十四天各施用 70 mg·L ⁻¹ N-6-benzyladenine (BA)一次對 <i>Phalaenopsis</i> Luchia Pink '244'及 <i>Doritaenopsis</i> Taisico Firebird 'OX' 生殖生長的響.....	110
表 2-3、於涼溫處理(26 /18 °C)第 1 天噴灑不同濃度之 N-6-benzyladenine (BA)對 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'Queen'及 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian 'V3'抽梗率及開花品質之影響.....	111
表 2-4、於涼溫處理(26 /18 °C)第 1 天噴灑不同濃度之 GA ₃ 對 <i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel 'Queen'及 <i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian 'V3'之花梗數及開花品質之影響.....	112
表 2-5、蝴蝶蘭 Sogo Yukidian 'V3' 在不同時間點(涼溫處理後一日及第一花苞達到 0.2cm 時) 施用不同濃的 N-6-benzyladenin (BA)、kinetin (kin)及 2- isopentenyladenine (2-iP)之花梗數及花朵品質.....	119
表 2-6、蝴蝶蘭 Tai Lin Redangel 'V31'在不同時間點(涼溫處理後一日及第一花苞達到 0.2cm 時) 施用不同濃的 N-6-benzyladenin (BA)、kinetin (kin)及 2- isopentenyladenine (2-iP)之花梗數及花朵品質.....	120

前言

蘭花是世界上重要的盆花作物，2004 年全世界使用數量約 1.3 億株，並以每年 30% 之速度快速成長，預計於 2014 年，使用數量將突破 3 億株(Wang, 2004)。其中蝴蝶蘭為其最受歡迎之種類，佔銷售總量約 60%。蝴蝶蘭在歐洲市場排名第一(Vereniging van Bloemenveilingen in Nederland, 2010)，美國市場排名第二，僅次於聖誕紅(United States Department of Agriculture, 2010)，有非常大的產值。

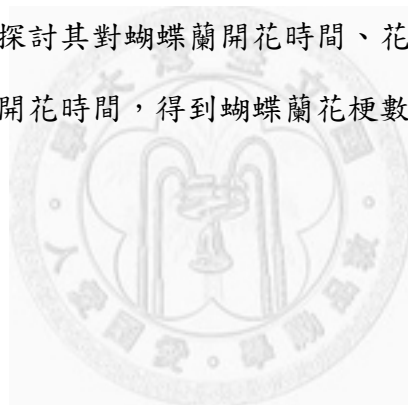
台灣為蝴蝶蘭主要生產國家，素有蝴蝶蘭王國之美譽，2011 年外銷產值超過二十七億台幣(海關進出口資料，2012)，內銷產量約六百萬株，產值約八億，近年來仍繼續穩定成長。而台灣蘭花產業的崛起，可由組培作物的改變看出端倪。根據 2004 及 2008 年省種苗場公佈之組培業者資料，1998 年蘭花類別之種苗生產，已佔國內種苗生產總量之 51%，2004 年更提高至 85%，而蝴蝶蘭所佔比例，亦由 1998 年之 35%，提高至 2004 年的 42%，其中大紅花佔總花色 47.6%，外銷主力產品大白花佔總花色 23.2%，分生苗與實生苗比例則分別為 52.6% 及 47.4%(植物組織培養種苗業者名錄，2004、2008)。

在研究室先期的研究中，發現接種蘭菌的蝴蝶蘭菌根植株，除生長勢較佳外，亦較不易得到軟腐病等蘭花常見病害(王，1999；藍，2001；王，2004；楊，2008)。本論文第一章節中，選取 2 個目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly') 及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31')，探討蘭菌接種對其生長是否有促進效果，並以動接種軟腐病病原菌 *Erwinia chrysanthemi* 的方法，來確認接種蘭菌的蝴蝶蘭菌根植株，其抗軟腐病能力是否確有增加，並探討其可能機制，以評估其直接應用在商業栽培生產上的可能性。

此外，蝴蝶蘭栽培品種雖然具有種類繁多、開花期長之特色，然最後仍須使其開花方能銷售，而開花的時間、花梗數及開花品質對其銷售價格的影響甚鉅。影響蝴蝶蘭開花的因素主要有幼年性、溫度、光線、養份、植物生長物質及蘭菌

等，如何使得不同栽培種的蝴蝶蘭能夠在需求量最大的時候，如歐美二月的情人節、五月的母親節、十二月的耶誕節及中國的春節、中秋節等節日開花及提高開花品質，亦是一個重要的研究題目。

在第二章節的試驗中，選取了多個不同的蝴蝶蘭商業栽培品種，以瓶苗出瓶後接種蘭菌、噴灑 0.02% 甲殼素及栽種前 18°C 涼溫處理等方式，探討其對蝴蝶蘭小苗出瓶存活率提高及生長促進是否有所幫助。並以於涼溫處理第 1 天及第 14 天各全株葉面噴灑 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine(BA) 一次；涼溫處理後第 1 天，全株葉面噴灑 Gibberelic acid 3 (GA₃) 或 BA 一次(各 50、100、150 mg·L⁻¹)；涼溫處理後第 1 天及第一朵花苞達到 0.2 cm 時，葉面噴灑 N-6-benzyladenin (BA)、2-isopentenyladenine (2-ip)(各 50、100、150 mg·L⁻¹) 及 kinetin (100、200、300 mg·L⁻¹) 等不同的植物生長物質，探討其對蝴蝶蘭開花時間、花梗數、花朵數及開花品質之影響，以期能準確控制開花時間，得到蝴蝶蘭花梗數、花朵數增加及開花品質提高的商業使用方法。



前人研究

一、蘭科植物簡介

蘭科植物種類繁多且多樣性高，有多達 30,000 種以上之龐大族群，為被子植物中最大的一科。蘭科植物的分佈極廣，最北達瑞典北部以及美國阿拉斯加北部，最南至南美火地島與麥夸里島，幾乎涵蓋地球上植物所能及的範圍。台灣的蘭科植物的物種數目約有 360 種，佔台灣所有原生種子植物的十分之一（林，1976）。

蘭科植物的分類

蘭科植物依生長特性可區分為兩大類，一是單莖類蘭花（monopodial orchids），單莖類的莖不會分枝，可以持續生長多年，不斷增長，也沒有假球莖。單莖類蘭花大多屬於附生蘭，其具革質或多肉的厚葉及粗大的氣生根。如蝴蝶蘭、萬代蘭等都屬單莖類蘭花。另一類為複莖類蘭花（symodial orchids），此類蘭花每年會有新的側枝長出新莖並延著水平面匍匐生長取代舊的主莖形成多莖成叢，這一類蘭花通常擁有假球莖，如文心蘭、嘉德麗亞蘭、石斛蘭、東亞蘭等（李，1995）。

蘭科植物依其生長環境及生存方式可分類為腐生蘭、地生蘭、半地生蘭及附生地蘭四類。腐生蘭不具有葉綠素，無法行光合作用，是靠根系與周圍微生物形成共生關係，利用土壤中腐爛植體來獲取養分，如無葉蘭、山珊瑚及赤劍等蘭科植物皆屬於腐生蘭。地生蘭生長在森林或灌木叢下，葉片較薄，根較細小，無儲水構造，較不耐旱，靠吸收土壤的養分維生，主要分佈在溫帶地，如台灣金線連、蕙蘭、根節蘭、一葉蘭、拖鞋蘭等蘭科植物。半地生蘭會附生於枯倒木上，吸取枯木的養分，像滿綠隱柱蘭就是半地生蘭的典型代表。附生蘭是最為人們所熟悉的蘭花，有生長在岩石上的石生蘭及攀附生長於樹上的氣生蘭兩類；併稱為「附生蘭」，如蝴蝶蘭、石斛、台灣風蘭、蜘蛛蘭、嘉德麗亞蘭等皆屬此類。

蘭科植物花部形態

蘭科植物的花型變化極大，但基本上是由花萼、花瓣及中間一個蕊柱組合而成的。蘭科植物兩側的花瓣（petals）通常較大且成對，底部的花瓣特化為唇瓣（labellum）其形態多變，具有吸引授粉媒的功能，並為授粉媒進入花朵內腔的踏板，是植物分類重要之依據（林，1976）。蕊柱是蘭科植物特有的結構，為雌蕊、雄蕊合一的構造，和一般花朵中雄蕊環繞著雌蕊的形態明顯不同，這也是判別植物是否為蘭科的重要依據。蘭科植物的根為植物體吸收環境中水份與養分的輸送帶。其中蝴蝶蘭的根，除了可併儲存養分和水分亦可行光合作用（李和李，1991）。

二、蝴蝶蘭簡介

蝴蝶蘭分類與分佈

蝴蝶蘭屬名 *Phalaenopsis* 是由拉丁文的 *phalaena* (似蛾的) *opsis* (形象) 結合而成，其花形十分優美，深受社會大眾喜愛，有蘭花之后之稱。蝴蝶蘭在分類上屬被子植物門 (Angioapermae)、單子葉植物綱 (Monocotyledoneae)、雌雄合蕊植物目 (Gynandreae)、蘭科 (Orchidaceae)、樹蘭亞科 (Epidendroideae)、萬代蘭族 (Tribe Vandeeae)、萬代蘭亞族 (Subtribe Vandeeae)、蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*)。1860 年代萊克茵巴克 (F. Reichenbach) 以唇瓣中裂片有無捲鬚的特徵對蝴蝶蘭簡單的分類，將蝴蝶蘭分為兩群、十一個種。歷經一百多年後，史威特 (H. R. Sweet) 博士，依花瓣及萼瓣特徵進行的分類法較被接受。他雖以整朵花的特色皆列入分類依據，但唇瓣的型態變化仍為分類重點，將蝴蝶蘭屬分為九節 (section)、四十四個種。2001 年 Christenson 將蝴蝶蘭屬分成 5 個亞屬，蝴蝶蘭屬目前已發現約有六十個原生種 (Christenson, 2001) 多生長在海拔 800~1,500 公尺的森林或雨林中，常見的只有二十

多種，台灣也有兩個蝴蝶蘭原生種，分別是白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*) 與姬蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. f.)。白花蝴蝶蘭較為耐寒，主要生長在屏東縣恆春、大武及蘭嶼等地 800 公尺以下的季節雨林樹幹上。白花蝴蝶蘭在眾多的國際花卉展獲獎無數。姬蝴蝶蘭又名桃紅蝴蝶蘭，生長於小蘭嶼，台東縣的蘭嶼也是因為盛產蘭花而命名，姬蝴蝶蘭更是蝴蝶蘭育種上的主要親本(李，1992；李，2002)。

呼吸作用

蝴蝶蘭為單莖類的氣生性附生蘭，可附生生長於森林樹木與岩石上。蝴蝶蘭的莖極短，具有肉質葉、氣生根及無限型總狀花序。蝴蝶蘭的葉片、莖、以及發達之根系皆可用來儲存水份及養分 (Kluge 和 Ting，1978)。蝴蝶蘭為絕對性景天酸循環 CAM(Crassulacean acid metabolism)植物，其葉片背面氣孔在白天時關閉可防止水分散失，到夜間葉片背面氣孔才會開啟，其 CO₂ 吸收速率、氣孔導度及葉片可滴定酸的含量具有日夜週期性的變化(林，2002)。在極端的水分逆境下，蝴蝶蘭可轉為閒置型景天酸代謝(CAM-idling)狀態，使氣孔由白天至晚上均保持開啟。而使得幾乎無 CO₂ 淨吸收，但仍具有機酸的日夜韻律，並保持光合酵素之代謝活性，脫離逆境之後可快速恢復成 CAM 循環(Szarek 等氏，1973)。CAM 和 CAM-idling 的轉換機制能讓蝴蝶蘭在水分不足的環境之下維持正常生長(Herrera 等氏，2000)。蝴蝶蘭花梗具有弱景天酸代謝(weak-CAM)的特徵，花梗內的蘋果酸、檸檬酸含量與 pH 值在白天及黑夜會有些微的改變，可能為蝴蝶蘭花期持久的原因之一(Endo 和 Ikusima，1989)。

蝴蝶蘭的葉與根的形態

蝴蝶蘭具肥厚而多汁的葉，除了可進行光合作用外也可以貯

藏水分(李和李, 1991; Ota 等氏, 1991)。植株上含碳水化合物較多的葉片為位於上位的成熟葉片, 尤其是最上位成熟葉的含量最高, 顯示其有高效率的固碳能力(李和李, 1996)。而居於下位的葉片, 也許養分都提供於開花所以碳水化合物較少(林, 1994; 李和李, 1996)。蝴蝶蘭葉片上的氣孔, 因為具有外側角質突出物, 可將氣孔外室封住, 所以能有效的阻止水分的散失(李和李, 1991)。

蝴蝶蘭的根為氣生根可用來吸收空氣中的水分, 根部結構具有根帽(root cap)、表層組織(epidermis)、皮層(cortex)和中心柱(vascular cylinder 或 vascular stele)等四部份。蝴蝶蘭之外露的氣生根因其皮層細胞含有葉綠體外表為綠色, 可以行光合作用, 其CO₂之固定類型是屬 C3 型而非 CAM, 而生長於盆內的根為白色, 不含葉綠素, 無法行光合作用(李, 1990; 李和李, 1991; 李和李, 1996)。蝴蝶蘭根系儲存了大量的碳水化合物, 亦為許多植物賀爾蒙生成之處, 其中所生成的 cytokinins, 對幫助蝴蝶蘭開花扮演極重要的角色(Bernier 等氏, 1993)。蝴蝶蘭即使葉片完好且具有足夠的光照和養分, 若莖部無法長出新根, 植株便無法抽梗(李和李, 1996)。蝴蝶蘭若栽培管理不善容易引起根尖褐化, 開花期若使根系養分消耗殆盡也會導致根系死亡。

蝴蝶蘭的生長

由於蝴蝶蘭原生於亞熱帶森林中, 其最適合的生長溫度為 20°C ~ 25°C, 此溫度範圍內會使蝴蝶蘭生長最為快速。當溫度高於 32°C 蝴蝶蘭生長會遲緩或完全停頓, 並且會抑制花梗的形成。在夏天時溫度居高不下, 需要進一步進行遮蔭並且保持空氣流通, 使蝴蝶蘭維持良好的生長。若溫度太低低於 10°C, 蘭株就會出現寒害產生枯萎的現象, 同時花朵亦會產生掉落的情況。寒害

就是因為低溫而導致植物發生傷害，但未達結凍的程度。一般而言，當溫度降至 10℃ 以下時，多數植物會發生寒害，所以 10℃ 常被當作是寒害發生的臨界點(邱等氏，2000)。蝴蝶蘭為兼性半日照植物，須避免直接照射陽光，栽培環境需要空氣流通、並且進行遮蔭，以避免造成蝴蝶蘭葉燒。遮光程度依據日光的強度來調整，春、夏季日光較強溫度也偏高，必須要遮光 70% 至 80% 之間；秋、冬季時，日照相對較弱，僅需遮光 60% 即可。因為植物需陽光進行光合作用以累積養份，來供給生長與開花，因此若遮光太多，導致光照不足，反而會使得蘭株生長緩慢，也更容易感染病蟲害。蝴蝶蘭的根為氣生根，可吸收空氣中的水份，過多的水份反而會使得根部腐爛，無法正常執行水份及養分的輸送，而造成蝴蝶蘭生長緩慢。蝴蝶蘭適合在通風良好且潮濕的環境中生長，水份在蝴蝶蘭的栽培中是個很關鍵的因素，澆水適當與否除了會直接影響植株的生長且更會影響植株的開花。蝴蝶蘭若長期缺水，葉片會有皺縮脫水及生長停滯的現象。通風良好有助於葉片散熱，避免病蟲害發生。也可刺激葉片上氣孔打開，提供二氧化碳，有利於植株進行光合作用，有利於蝴蝶蘭生長及開花；通風不良則會提高環境濕度，造成蘭株生長緩慢且容易患病蟲害。蘭株生長環境若空氣不流通，也會使得生長環境內乙烯濃度提高，使花朵提早凋謝及消苞。氮、磷、鉀三要素是維持蝴蝶蘭生長不可或缺的養分。氮肥，利於蘭株營養生長，而磷、鉀肥則有利於開花，因此，調整氮、磷、鉀的濃度可促進蝴蝶蘭生長或開花。因為蝴蝶蘭的生長速度較慢，吸收速率及所需要的濃度自然較低，所以低濃度、少量、多次是蝴蝶蘭施肥的原則。

影響蝴蝶蘭抽梗之內在因子

1. 幼年期(juvenile period)

從種子萌發形成幼苗，植物需經過幼年期後才能進入成年期。植物在幼年期無法誘導開花。蝴蝶蘭的幼年期主要受到品種的影響。其他因素如栽培環境如溫度、光度與肥培管理等。以葉面積及其所蓄存的養分比以株齡來表示定義其幼年性更為準確(Goh 等氏，1992；李和李，1996；李和王，1997)。

2. 碳水化合物

蝴蝶蘭之花芽創始與碳水化合物含量的增加有關(Chen 等氏，1994)。蝴蝶蘭在接受涼溫誘引花芽時，貯存於葉片的葉綠體內的澱粉分解成蔗糖，使葉、莖和根含蔗糖量增加。莖主要碳水化合物成分是蔗糖，說明糖在莖的運移以蔗糖為主，為碳水化合物之主要輸送物質，葡萄糖和澱粉甚少，而澱粉含量在成熟植株含量似略高，因此短縮莖只是一運輸用器官，並非具貯藏養分與水分之功能，至於根主要含蔗糖和葡萄糖，澱粉含量較少(Daie 和 Wyse，1985；李和王，1997)。澱粉及蔗糖均是由光合作用而得，在出瓶後之幼苗及小苗生長期，弱光延遲生育，減少葉片碳水化合物含量。涼溫誘引花芽，葉片的澱粉含量下降，蔗糖增加，花苞可見時，葉含葡萄糖甚少，花梗剛伸長 10~15cm 時富含葡萄糖和蔗糖，待花序的花朵全開時，花梗主含蔗糖，其花朵則以果糖和葡萄糖為主，顯示養分由葉及/或根經花梗送到強蓄池的花朵，其蔗糖已分解成果糖和葡萄糖(Endo 和 Ikusima，1992；李和李，1996)。；在植株由幼年相轉入成熟相時，即出瓶後 15~17 個月，開花率已提昇到 70~100%時，根所含蔗糖及葡萄糖快速降低，而

澱粉呈穩定趨勢，碳水化合物含量由 16~17% 降到 10% 以下，顯示成熟期根之碳水化合物含量有減少之趨勢，這種現象可能是在相的轉變中，光合產物的分配已發生變化，使它有利於花芽的誘引 (Daie, 1985; 李和王, 1997)。

花朵的生成刺激與糖類有關，且低溫能使尖端分生組織所產生的糖類含量增加，並增加受源的強度及使得蔗糖由供源葉片轉換至花序尖端的情形較早發生；高溫下蔗糖的轉換會受到抑制 (Chen 等氏, 1994)。

當高光強度時，葉固定 CO₂ 多，光合產物以澱粉停存於葉綠體內，光強度弱時光合成減少，葉綠體內的澱粉則被水解供代謝生長之用而濃度降低；葉片中之澱粉含量的起伏，乃在光合成產物不足之時分解供應生長所需之故，且其含量受光線影響甚鉅 (Daie, 1985; 李和王, 1997)。當增加蝴蝶蘭植株下位葉陰暗面的光強度時，光合作用、碳水化合物濃度及花苞數皆呈增加之現象 (林, 2002)。

3. 礦物營養

Yoneda 等學者於 2000 年進行不同元素缺乏對蝴蝶蘭植株生長與開花之影響，顯示當氮素缺乏時會造成營養生長不良，但花梗數的抽出數目不會減少；而當植株缺磷時，卻會抑制花梗之抽出；缺鉀對於抽梗未造成影響，但花梗卻傾向於較早發育；而當植株缺鈣在蝴蝶蘭的生長及抽梗方面則未有任何明顯改變；而與對照組比較，植株缺鎂時，其抽梗時間則稍微延遲。對照組、缺氮、缺磷、缺鉀及缺鎂植株之抽梗率則依次為 64.0、70.8、4.0、64.0 及 60.0%。

4. 植物賀爾蒙

瓶內栽植蝴蝶蘭植株，利用高濃度 N-6-benzyladenine (BA)處理栽培 120 天後即可誘導花芽形成，因此，BA 可促進蝴蝶蘭形成花芽；此外，在根中未發現高濃度的 BA，因而推測 BA 會抑制蝴蝶蘭營養生長(Duan 和 Yazawa, 1994)。將蝴蝶蘭植株自 24/22°C 移至 22/17°C 下 3.5 個月即全部開花，而期間並未改變光週期；此一新的溫週性明顯的誘導了 indol acetic acid (IAA)的改變，於低溫處理後之 2~5 天即有明顯的 IAA 含量增加，之後於 7~9 天更有一高峰產生(Fouche 等氏, 1997)。蝴蝶蘭生長於 30/25°C 的高溫下即無法開花，然以 Gibberellins (GA_s)處理便可正常開花，乃由於在高溫下處理 GA_s可使植株內蔗糖、葡萄糖及果糖含量提高。GA_s 會刺激蝴蝶蘭頂端分生組織的受源活性，且會促進蔗糖從供源的葉片運移至花序的頂端而累積；且 GA_s 處理會使蔗糖合成酶的活性增加，而對於轉化酶的活性則未產生影響(Chen 等氏, 1994)。植株體內 GA_s 的量會直接影響開花，且似乎是調節花序及花芽發育的重要因子(Su 等氏, 2001a)。GA_s 及 BA 會促進花芽原體縱徑及橫徑生長(Chen 等氏, 1997)。蝴蝶蘭葉片中游離及結合性 abscisic acid (ABA) 較根中為少；休眠芽中則有相當高之 ABA 含量，然而在 2~3cm 或 7~10cm 之花梗長度中卻未發現明顯之游離及結合性 ABA，因此，休眠階段植株內之游離及結合性 ABA 明顯的較已抽出花梗階段的植株為高。另外，每株外加 0.1 或 1 μg 的 ABA 可有效的抑制花梗之抽出。學者推測，植株根及芽中游離性 ABA 含量會減少而葉片則不會，此與芽體活化而發育成為花梗有關(Wang 等氏, 2002)。有學者發現在蝴蝶蘭植株葉片的生長後期，游離及共軛的多元胺(polyamines)含量會增加，且其會從嫩葉運移至花芽

內而發育形成花序(Fouche 等氏，1997)。

影響蝴蝶蘭抽梗之外在因子

1. 溫度

溫度一向被視為是調控蝴蝶蘭生育的重要環境因子，並已用於商業化之生產(Sakanishi 等氏，1980；Yoneda，1985)。蝴蝶蘭植株自短縮莖抽出花梗的低溫需求量，依品種、株齡及植株生育狀態等而異，亦即說株齡不足較需多量之低溫需求量，株齡成熟者高溫亦會萌發花梗。一般而言，恆溫條件下 25°C 亦具備促進植株抽梗之能力，然 28°C 以上之高溫則不會造成任何反應。因此，無論品種及蘭株成熟狀況如何，較有效之涼溫催花環境，仍以恆溫 20°C 或 25/20°C 日/夜溫為最具效果，且於處理 3~4 週後即可明顯看見花梗抽出(李和李，1996；Goh 等氏，1982；李和王，1997)。而日溫的影響比夜溫的影響要來得顯著(Matthew 和 Runkle，2006)

2. 光照

蝴蝶蘭並非短日性植物，因此無法利用短日來促進植株抽梗(Wang，1998)。然而，Su 等多位學者(2001)曾提及蝴蝶蘭為短日性植物，且需在冷涼的溫度下(25/20°C 日/夜溫)才會開花，且涼溫的影響因子較日長來的重要，而短日(9 小時)則較長日(16 小時)情況下有利於抽梗、開花。然蝴蝶蘭長時期施予不同遮蔭度栽培，低光處理將顯著降低其葉和根之營養生長量，連帶地也會影響後續之生殖生長，造成抽梗率低且不整齊、花朵數銳減等不良現象，嚴重者甚至出現完全不抽梗之情形；顯示光度在蝴蝶蘭開花過程中亦極為重要。因此蝴蝶蘭的生育除深受溫度之調節外，光度亦扮演一重要角色。蝴蝶蘭給予 1250~1400 fc 之光強度才能

誘導植株抽梗開花，且每天至少須維持 6 小時的光照量，並持續 30 天(Gordon，1989)。在 Photosynthetic photon flux (PPF) $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{S}^{-1}$ 光度下催花者，*Phalaenopsis amabilis* 抽梗率均可達 100%，且部份植株有雙梗抽出， $13 \mu\text{molm}^{-2}\text{S}^{-1}$ PPF 下催花者，不論前期營養生長是高光或低光，抽梗率降到 60~70%，且均抽單梗；至於大白花，營養期及催花時均處高光度者，抽梗率才能達 100%，因此，均顯示涼溫催花時之光度，對植株抽梗開花之影響最大，而催花前營養生長期的光度強弱，相形之下影響較小(Kubota 和 Yoneda，1993a)。高光度可促進蝴蝶蘭之葉片生長、增加碳水化合物含量及抽梗(李，1990；Konow 和 Wang，2001)。每日給予 8 小時(高光短日)光照較自然日長(低光長日)環境下提早 5~7 天抽梗，且可促進提早開花，並得較多之花梗及花朵數(Yoneda 等氏，2000)。

日人 Kubota 和 Yoneda(1993b)認為催花前的弱光，會減少還原糖的含量，增加含氮代謝物，使抽梗率降低。催花時的光度比營養生長期的光度更為重要，且若將成熟植株置涼溫之 $8 \mu\text{molm}^{-2}\text{S}^{-1}$ PPF 或黑暗下 6 星期也不會抽梗，移到強光下就抽梗，顯示涼溫誘引花梗抽出，除要有成熟葉片貯藏澱粉粒與糖外，尚需有正在進行光合作用的光合產物參與，此光合產物大概就是糖，尤其是蔗糖(Kubota 和 Yoneda，1993b；李和王，1997)。隨著光強度增加，葉片中的葡萄糖及果糖濃度則維持不變，然而蔗糖及蘋果酸含量則會隨著光度增加而增加(Konow 和 Wang，2001)。將蝴蝶蘭成株置於高光環境下，植株總乾物重、糖類及氮素的吸收則會增加，且隨著光強度增加，葉片數及根乾物重亦會增加；高光下植株體內有較高含量之糖類物質，而導致花芽誘導的敏感性會提高，學者推測認為，因為氮素會加速進行代謝作用(Kubota 和 Yoneda，1993b)。

3. 肥料

利用肥料管理以促進蝴蝶蘭植株抽梗，必需減少或停止氮肥之施用，若無法停止施用肥料時可施高磷肥之肥料種類，如 $2N-10P_2O_5-10K_2O$ (Gordon, 1989)。在蝴蝶蘭抽梗前後若利用高濃度之氮肥施用，持續使用至花芽完成創始階段，有助於花芽原體的形成及較多之花朵數。於瓶內蝴蝶蘭花芽形成前，增加總氮肥之施用則會減少植株花芽形成(Duan 和 Yazawa, 1994)。利用 $20N-20P_2O_5-20K_2O$ 肥料澆灌蝴蝶蘭植株，將液肥濃度由 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 時，即可逐漸的促進營養生長，相對地，當施肥量增加時開花的時間則會提早且可生成更多的花朵數(Wang, 2000)。合理的施肥方法可縮短蝴蝶蘭幼年期，而提早進入生殖生長階段而抽梗開花，以 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之 N 肥能增加葉面積及葉片數目，並能使花朵數、花梗長度等表現較佳。當氮素濃度施用 $50-200 \text{ mg N L}^{-1}$ 可促進蝴蝶蘭的開花及葉片的增生。均衡肥料中含 200 mg N L^{-1} 之抽梗期較 70 mg N L^{-1} 為晚(Wu 等氏, 1994)。當蝴蝶蘭植株花梗抽出前後使用高濃度之磷肥可獲得良好之開花品質；當植株持續使用 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之 $20N-8.7P-16.6K$ 肥料，隨後則改用 $10N-13.1P-16.6K$ 肥，可得更好的花序品質(Wang, 1996)。有學者推荐於蝴蝶蘭營養生長相時應採用高氮肥，隨後再改用高磷肥，可在初秋時使植株進入生殖生長而花芽創始。利用低氮肥及高磷、鉀肥處理蝴蝶蘭植株可促進提早抽梗及開花約 6~7 天，然而卻會使花朵數變少且更會影響葉片生長，因此，氮肥與磷肥、鉀肥相較下，氮肥仍顯得更為重要(Wang, 2000)。使用低濃度($EC = 0.5 \text{ mS/cm}$ 或 1 mS/cm)之全效性肥料處理蝴蝶蘭，可提早 7 天抽梗及較 2S 提早開花 20 天，而 $EC = 1.5 \text{ mS/cm}$

之肥料濃度下，卻可得較好的花朵品質，如有較長之花朵壽命、花徑大小、花朵數及花梗數(Cui 等氏，2004)。

4. 水分

降低水分的供給及濕度可誘導蝴蝶蘭植株抽梗，以灌溉前後 2.0~0 及 2.2~1.5 pF 之水分含量栽培蝴蝶蘭植株，則會促進蝴蝶蘭植株抽梗(Yoneda 等氏，2000)。濕度須降低至 50%甚至以下，並維持一段時間(將近 30 天)之處理即可有效促進蝴蝶蘭抽梗，在栽培時可經由開啟溫室內之除濕機降低空氣中的濕度，幫助蝴蝶蘭抽梗(Gordon，1989)。

三、蘭菌與蘭科植物的關係

蘭菌的定義與簡介

凡是能與蘭科植物建立共生關係之真菌，即謂之為「蘭共生真菌」，簡稱之為「蘭菌」(orchid mycorrhizal fungi; OMF)。蘭菌具促進種子發芽與植株生長的效果(Hadley 和 Smith，1983)。1885 年 Frank 定義高等植物與共生有益真菌形成共生的根部即稱為菌根(mycorrhiza)並仍使用至今(Arditti，1967)。植物與菌類的共生現象普遍存在於自然界中，是植物在長期的演化過程中與菌根真菌共同進化的結果。除沼澤植物、十字花科及仙人掌科植物尚未發現菌根植株外，其他各科均有發現。其中雙子葉約有 83%及單子葉約有 79%的植物有發現菌根，此外幾乎所有的裸子植物均為菌根植物。而依菌根的形態構造，可歸納為外生菌根(ectomycorrhiza)、外內生菌根(ectendomycorrhiza)與內生菌根(endomycorrhiza)等 3 大類(胡，1990)，蘭科植物菌根則屬於內生菌根(蔣等氏，2001)。蘭花的菌根真菌多屬絲核菌屬(*Rhizoctonia* spp.)，(Otero 等氏，2002)。這類真菌普遍存在土壤、植物體內或土壤中的植物殘體以腐

生為主，能與蘭科植物形成共生的絲核菌即稱為蘭菌(orchid mycorrhizal fungi; OMF)。絲核菌屬的蘭科真菌有以下特徵：

1. 菌絲有隔膜。
2. 分枝菌絲基部有縊縮現象。
3. 菌絲分支角度呈九十度或四十五度。
4. 有些具念珠狀細胞 (moniliod cell)。
5. 可產生內外結構均勻的菌核。
6. 無性世代不具任何種類的產孢構造。

蘭菌感染蘭科植物的營養根後，在皮層細胞內形成螺旋狀的菌絲團，或與寄主根細胞形成不規則的菌絲附著物，這些結構稱為胞內菌絲團。胞內菌絲團在形成的幾天之後就會被寄主細胞分解成菌絲殘體，並逐漸被根細胞溶解及吸收。

蘭菌的鑑定與分類

由於絲核菌屬真菌在自然界中不易形成有性世代，所以在鑑定上依據菌核形態、細胞化學測定、菌絲細胞核數、擔子器形態和隔膜孔微細構造等來進行絲核菌屬的鑑定 (Sneh 等氏，1991)。

蘭菌的分類最早由 Burgeff(1959)所提出，他將蘭菌分成絲核菌屬(*Rhizoctonia*)和蘭根共生蕈綱(*Hymenomycetes*)。直到 1972 年 Hadley 提出另一套分類法，將蘭菌分成三大類，即擔子菌類(*Basidiomycetes*)、不完全擔子菌類(imperfect *Basidiomycetes*)和絲核菌屬(*Rhizoctonia*)。兩種不同的分類方式，都認為絲核菌屬真菌為蘭菌最被確認的種類。根據菌絲細胞核數來分類，絲核菌屬可分為三大類群，第一類為多核絲核菌 (multinucleate *Rhizoctonia*)，大部分菌絲細胞具有 3 個細胞核，菌絲直徑為 6-10 μm ，其有性世代為 *Thanatephorus* 屬，無性世代則為 *R. solani*。第二類為雙核絲核菌，大部分的細胞具有 2 個細胞核(極少數的細胞具有 1 個或 3 個細胞核)，菌絲直徑為 4-7 μm ，有性世代為 *Ceratobasidium* 屬，無性世代

為 *Rhizoctonia cerealis*、*R. fumigata* 等。第三類共包含水稻絲核菌(*R. oryzae*)和玉蜀黍絲核菌(*R. zeae*)，菌絲細胞為多核，有性世代為 *Waitea* 屬 (Ogoshi, 1987)。

菌株間之菌絲會進行融合現象(anastomosis)，利用菌絲融合狀況和程度等，歸納成數個菌絲融合群 (anastomosis group; AG)。其菌絲融合方式包含 1. 菌絲尖端對菌絲尖端。2. 菌絲尖端對側生小枝。3. 側生小枝對側生小枝。依菌絲融合程度分為：1. 完全融合(perfect fusion)，指兩群對峙菌絲在相聚 7-15 μm 處，因相互間或其中一方吸引而迅速接和，並快速的完成菌絲接觸、細胞壁融合及細胞質交流等步驟，融合後細胞不會死亡。2. 不完全融合(imperfect fusion)，菌絲細胞進行細胞質融合後，該細胞及其鄰近細胞會迅速死亡。3. 接觸 (contact)，為兩個菌絲只進行到菌絲細胞壁接觸後即停止，無進一步融合行為，菌絲亦停止生長(周，2004)。目前已發現 AG-1 至 AG-11 及 AG-BI 等 12 群，其中有些群內可細分成幾個亞群(藍，2001)。近期有許多研究人員以生化及分生的方式來驗證菌絲融合現象分群之可信度，結果證明生化(如蛋白質電泳、脂肪酸分析、isozymes 等)及分子生物學(如 RFLP 與 RAPD 等)可支持其分群之正確性，更可進一步瞭解其間之差異性與演化上的同源性 (Sneh 等氏，1991; Kohn, 1992; Curtis 等氏，1994)。

蘭菌的感染模式

蘭菌可經由菌球消化(tolypophagy)與胞質逸出(ptyophagy) 這兩種方式來感染蘭科植物 (Hadley, 1972; Burgeff, 1959)。

1. 菌球消化(tolypophagy)指的是蘭菌在蘭科植物根部的皮層細胞內會產生團狀物(clump)的構造，而這些皮層細胞具有吞噬細胞(phagocytes)的特徵，最後蘭菌產生的團狀物(clump)的構造會被寄主消化 (Rasmussen 和 Whigham, 1993; Smith, 1966)，大多絲核菌多屬於此類型菌根。
2. 胞質逸出型(ptyophagy)，最早是由 Gallaud (1905)研究腐生蘭類 *Lecanorchis javantica* 時所提出的，此感染模式和菌球消化不同處在於寄主細胞中並不會產生菌絲團之構造，是藉由分枝的吸器(ramified hastorium)與單獨之菌絲(individual hypha)來侵入根部的吞噬細胞層 (phagocyte layer)。

蘭菌感染蘭科植物根部時，真菌菌絲會先在已受感染之細胞間擴張，再以單一菌絲侵入相臨的細胞，在細胞內擴張後再侵入別的細胞形成多量的分支，分枝

互相癒合後會形成三度空間的網狀結構，稱為菌絲團(peloton)或菌絲捲(coil mass)。受蘭菌感染的根部細胞其細胞核腫大，細胞質內核糖體密佈，粗內質網呈層狀排列，大量粒腺體聚集於菌絲旁，隨著菌絲老化而解體，菌絲內細胞質釋出，菌絲細胞壁之殘骸由寄主細胞之內質網及細胞質包裹著(朱，1987)。蘭菌生活史極為短暫，菌絲侵入寄主細胞後僅需數天即開始被解體及消化(lysis)，而在 11 天內可完全被寄主的吞噬細胞解體及消化(Hadley 和 Williamson，1972；朱，1987)。而大部份內生菌根之菌絲消化型態區可分為菌球消化(tolypophagy)、吐出消化(chylophagy)、集鹽消化(halmophagy)、樹枝狀消化(thamniscophagy)及胞質逸出(ptyophagy)等類型(蔡，1979；藍，2001)。

影響蘭菌與蘭科植物建立共生之因素

蘭菌與蘭科植物共生時，其溫度、培養基中的碳水化合物皆會影響共生狀況。要維持良好的共生狀況，植物與共生菌之間的營養狀況與生長勢，必須達到某種程度的平衡，才能維持共生關係(莊和李，1985)。Hadley 於 1970 年指出，蘭科植物與蘭共生菌接觸時，並非只有親和性感染。可能會有 4 種情況發生：

1. 蘭科植物根部被真菌感染，但真菌在宿主細胞內沒被消化分解，呈寄生狀態。
2. 蘭科植物幼苗根部被感染後，菌絲在細胞內被消化且生長受限，幼苗生長不受影響。
3. 種子被真菌感染，菌絲在寄主細胞內被消化，蘭花種子正常發芽，菌絲對宿主感染持續，原球體發育至某階段時，共生狀態會轉為寄生狀態。
4. 蘭科植物根部被真菌感染，菌絲在宿主細胞內被消化，但萌芽正常感染持續發生，整個生長週期皆維持共生狀態(Burgeff，1959；Hadley，1970；Hadley 和 Williamson，1972；Hadley 和 Smith，1983；Harvais 和 Hadley，1967)。

而影響蘭共生菌與蘭科植物建立共生關係的因子，可由下列各方面加以探討

1. 植物防禦素(Phytoalexin)

植物防禦素是植物所分泌的抗真菌物質，蘭科植物中的兩種防禦素 orchinol 和 hircinol 都屬於 dihydrophenanthrene。蘭菌感染蘭科植物後會破壞植物體內的 orchinol 和 hircinol，與植物體內持續 orchinol 和 hircinol 達到平衡後，植物對於

真菌的感受度會降低，進而不再產生植物防禦素，蘭菌即可與蘭科植物達到共生(Harley 和 Smith, 1983; Gehlert 和 Kind, 1991)。

2. 專一性

蘭科植物和蘭菌是否具有專一性是極具爭論的，目前也尚未定論。Bernard 在 1904 年提出，同種、同屬之蘭花，不同植株間經常含有相同之真菌，且從同種、同屬的蘭科植物分離出的真菌，才有能力促進本種、屬種子的發芽生長，推論出蘭菌與蘭科植物間的共生關係有專一性存在(Smith, 1966)，這些專一性包括了種與種、種與屬、屬與屬之間(Hadley, 1970)。但在 1939 年 Curtis 提出反對證明，他試驗多種自根內分離的蘭菌，無法促進本種的種子發芽生長，有些甚而對植株生長有害(Curtis, 1939)；1967 年 Harvais 和 Hadley 也發現，許多自根內分離出的真菌，無法促進本種原球體的生長發育，而自他種分離者(如番茄、稻米中分離出的兩種寄生性真菌(*Rhizoctonia solani* RSI, *R. solani* RS)，皆可促使蘭花原球體的生長，且呈現良好的共生狀態(Harvais 和 Hadley, 1967)。

單一蘭科植物根部可同時被多種蘭菌感染，從蘭花菌根分離出的多種絲核菌屬，有些種類確實對寄主具有專一性，但有些種類則不具有專一性。其中 *Tulasnella calospora* 則是一種普遍存在於蘭花菌根中的真菌。由於可從一植株中可分離出許多種真菌，因此專一性並非絕對存在。除此專一性之外，在不同的蘭科植物生長時期感染也會有所差異。在種子期與根莖期以同種屬的蘭花菌根分離出來的蘭菌接種同種屬的親和力較大，較易形成共生關係，出瓶期以後的再去感染比較不容易形成共生關係 (王, 1999)。

3. 環境因子

Harvais 和 Hadley, 1967 年以 *Orchis purpurella* 的種子為材料，證實了環境溫度會影響蘭菌與蘭科植物的共生。Harvais 和 Hadley, 1967 年在 *Orchis purpurella* 的種子上分別接種不同品系的蘭共生菌。結果顯示，在沒有接種蘭菌情況下，原球體於 25°C 較 10°C 生長快速；若接種蘭菌，培養於 29°C、23°C、17°C、11°C 不同的溫度下，僅 11°C 處理能維持共生關係，並使得原球體生長加速，其餘的處理皆呈現寄生狀態，使原球體無法生長。由此得知，低溫可維持蘭菌與蘭科植物的共生關係，達到促進原球體生長的效果。此外 *Epipactis palustris* 種子目前還不知道其所需的發芽時間，即使在試管中與蘭菌共同培

養，發芽率仍不理想。溫度也會影響 *Dactylorhiza majalis* 與蘭菌的共生發芽。當溫度高於 23 度時，種子的發芽率就會下降，同時也會影響往後的植株生長 (Rasmussen, 1990)。Rasmussen (1992) 也將 *Epipactis palustris* 種子以 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 在 20°C 下預處理數周後，再於 4~8°C 下濕冷層積處理 8~12 星期，再於 20°C 下與蘭菌培養 4 周，可將發芽率提高 50%。因此，後熟的處理以及春季的低溫或許可幫助蘭科植物種子自然發芽，如能伴隨蘭菌在 20°C 下共生培養能顯著提高發芽率。

除了溫度外養分同樣也會影響蘭菌與蘭科植物共生關係的建立，其中主要的影響在於碳源的來源以及碳氮比，而不同的蘭科植物與蘭菌的組合，也會有其最適合的碳氮比(李, 1999a)。*Dactylorhiza incarnate* (L.) Soo. 培養在 0.36 mM 的氮源培養基中，可與蘭菌形成共生關係。而在 3.6 mM 氮源的培養基中，原球體會被真菌寄生導致原球體死亡，所以提高氮源會使得蘭科植物和蘭菌從原本的共生關係轉變為寄生關係(Beyrle 等氏, 1991)。將 *Orchis morio* 培養在不同碳氮比的培養基，也會對共生產生影響。在低氮碳比的培養基中，植物較易受到軟腐病菌的感染 (Beyrle 等氏, 1995)。而李(1999b)在一葉蘭的試驗結果中亦顯示以纖維素為碳源的組合可以維持共生狀態。在素心蘭根莖期接種蘭菌，在四種不同濃度的燕麥培養基中，在越高濃度的培養基下，蘭菌的生長繁密，將根莖蓋過，終究會使植物死亡，並非建立共生關係；但在較低濃度的燕麥培養基下(2.5 g/l)，則與根莖呈現平衡的共生狀態(王, 1999)。1967 年 Harvais 和 Hadley 以相同的材料將立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)共同培養在不同碳源的培養基下，結果顯示以纖維素為碳源的組合可以維持共生狀態，其他以單醣或雙醣為碳源者，原球體多為死亡。

1993 年 Beyrle 和 Smith 發現日照有助於共生培養下 *Orchis morio* 的葉片發育及葉綠素形成，加入 1% 的澱粉或蔗糖可使培植體發育長根，但會阻礙光引起的葉綠素合成。*Spiranthes odorata* 接種由 *S. odorata* 及 *Platanthera ciliata* 分離的共生菌，在黑暗下可形成葉原體(leaf primordia)，但要進一步分化成葉片(芽)，則需要光線(白光)才可(Zettler 等氏, 1995)。

絲核菌屬蘭菌之營養需求

絲核菌屬真菌之營養需求類似於一般微生物，其基本所需之營養物質為碳源、氮源、礦物元素與維生素。環境條件主要為溫度、pH 值、光線、濕度與氧，以下分述之：

1. 碳源: 絲核菌可利用葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、果糖、半乳糖、多糖之纖維素、麥芽糊精與澱粉與菊糖為碳源(Madhusudan 等氏, 1977), 但無法利用乳糖、乳酸與甘油(Allington, 1936)。
2. 氮源: 絲核菌最適合之氮源為天門冬胺酸(Allington, 1936), 蛋白凍(peptone)、酪蛋白(linulin)及豆素(legumin)也可以被當成氮源。不適合之氮素源則有硝酸鹽與銨鹽。
3. 其他礦物元素: 鈣為絲核菌生長所必需之元素(Young 和 Bennett, 1922), 優良磷源為 $K_2H(PO_4)_3$, 優良硫源為硫酸鎂($MgSO_4$), 另外, 10 mM 之鋅幾乎可完全抑制絲核菌之生長(Babich 和 Stotzky, 1978)。
4. 維生素: 維生素 B1(thiamine)為所有絲核菌屬真菌其共同必需之維生素, 其它維生素即為菌株本身特性需求而有差異, 如葉酸(folic acid)、菸鹼酸(nicotinic acid)、肌醇(inositol)與維生素 B6(pyridoxine) (Ogoshi 和 Ui, 1979)。
5. 酸鹼值: 絲核菌喜生長於酸性環境, 可生長之 pH 約在 2.4 至 9.2 之間。pH 低於 2.0 時會停止生長, pH 高於 10.4 時亦會停止生長。大多絲核菌株於 pH 5.9 時生長最佳(Elarosi, 1957)。但於 pH4.0 時, 絲核菌會出現菌落化(colonization)現象, 會由於老化, 族群數量會減少。因此, 絲核菌適宜於酸性偏中性環境生長(Papavizas 和 Davey, 1961)。
6. 溫度: 絲核菌之生長適溫因菌種不同而有差異。一般最適生長溫度為 25~30 °C, 亦有適溫 30~34 °C 之菌株, 某些菌株更可於 40 °C 下生長(Verhoeff, 1963)。
7. 濕度: 絲核菌於高濕度下生長快速, 相對濕度達 100%時為絲核菌最佳的生

長條件(Schneider, 1953)。但如果一直維持在潮濕的狀態達 45 天，反而會影響絲核菌的接種潛勢(inoculums potential)。

8. 氧: 絲核菌為好氣性真菌。所以絲核菌一般存在於表面土層，通氣不良或二氧化碳濃度達 25%時，會促進菌核之形成使得菌絲生長會受抑制 (Vasudeva, 1936)。

蘭菌對蘭科植物的影響

1. 促進種子發芽

所有的蘭花在自然環境下，其發芽與實生苗的發育需有蘭菌共生 (Arditti 等氏, 1990)。蘭花種子十分細小，至成熟時，種子僅由一群分化未完全的細胞，外被透明的種皮而成 (Arditti, 1966)。其不含胚乳，至成熟時僅達到原球胚階段 (globular embryo stage)，沒有胚乳、胚根與胚芽，外面披著透明的單層細胞種皮。胚內主要貯存物質為脂肪，而澱粉、醣類不存在(李, 1990)。於野生狀態下，若無蘭共生菌感染，則無法繼續發育成原球體 (protocorm) (莊和李, 1985)。反之，若被根共生菌感染，胚會迅速擴大，並於頂端形成生長點，之後分化葉片，根部形成，完成幼苗之發育 (Arditti, 1966)。蘭科植物種子受蘭菌感染後，基部細胞逐漸發育成懸柄，真菌菌絲由懸柄孔口處穿透進入胚內生長(Arditti, 1967)，或經由原球體上的吸收毛進入(Muir, 1987)。菌絲進入胚後，會先在表皮細胞內形成菌絲團，再逐漸形成消化區，消化後所產生的養分運送至細胞分裂區，提供種子往後分化芽體時所需的養份(Uetake 等氏, 1992)。

Dactylorhiza majalis 與 *Rhizoctonia* 屬蘭菌進行共生發芽實驗，發現在最適發芽溫度下，共生發芽率是非共生發芽率的兩倍(Rasmussen 等氏, 1990)。以蘭菌 *Rhizoctonia* sp. 接種於 *Dactylorhiza purpurella*，發現可使原球體的生長曲線直線上升，且當添加纖維素於培養基後，因共生菌可以分解纖維素，緩慢供應碳水化合物使原球體生長加速 (Hadley 和 Williamson, 1971)。此外將蘭菌接種在台灣白 (*Blettila formosana* (Hayata) Schltr.) (蘇, 1996)、石斛蘭 (*Dendrobium*) (林, 2002)、*Nigritella* (Deutsch, 2001)、粉蝶蘭屬(*Platanthera*)之 *Platanthera clavellata* (Zettler 和 Hofer, 1998)、*Platanthera leucophaea* (Zettle 等氏, 2001) 及綬草 (*Spiranthes lacera*) (Zelmer 和 Currah, 1997) 等，皆可促進種子發芽及種苗生長。蘭菌除促進蘭花種子

發芽外，還能增加種子吸水能力，種子發芽後，有蘭菌共生的種子水分含量較高 (Yoder 等氏，2000)。

2. 增加養分的吸收與運轉

最近從叢枝菌根 (Arbuscular mycorrhiza) 的研究，可瞭解氮素從根外菌絲 (extraradical mycelium) 轉移到植物的過程。利用 ^{15}N 標定一週後，發現根外菌絲 (extraradical mycelium; ERM) 區裡的谷胺酸 (glutamate, Glu)、麩胺酸 (glutamine, Gln) 和天門冬胺酸 (asparagine, Asn) 有 85% 被 ^{15}N 標定，而精氨酸 (arginine, Arg) 的標定量為 99%。這些高劑量表現的胺基酸，指出氮的同化作用發生在根外菌絲，且精氨酸為主要的游離胺基酸 (Jin 等氏，2005)。測量根內菌絲 (intraradical mycelium; IRM) 到根外菌絲，氮素代謝中 glutamine synthetase 和 NAD-dependent glutamate dehydrogenase 的基因表現，得到同化作用所需的酵素活性會在根外菌絲被誘導出來，而在根內菌絲被抑制。更支持了經由 GS-GOGAT 的途徑發生在根外菌絲 (Govindarajulu 等氏，2005)。而從菌根組織裡所有蛋白質水解後，胺基酸內的谷胺酸標定量，於菌根內的游離胺基酸池中也很高，證明氮轉移到菌根內，確定了根外菌絲可快速的吸收氮，並將大多的氮生合成精氨酸轉到植株根內 (Govindarajulu 等氏，2005)。

為了追蹤養份輸出的情形，供應 ^{13}C acetate 到根外菌絲區。但由菌根抽出的蛋白質與在自然條件下標定量比較後並無差異，指出氮素是以無機形式轉移到植物細胞 (Govindarajulu 等氏，2005)。也就是說精氨酸進入根內菌絲後，會經由一個分解的過程轉換成小分子，再運到寄主細胞內。而氮素分解的途徑多經由尿素循環，因此比較於根內菌絲加入 NH_4 和 NO_3 後，和正常情況下尿素循環之相關蛋白的含量比例。發現加入氮源後，urease accessory protein, ornithine amino transferase 和 ammonium transporter 的含量具高相似度的基因表現。推測氮素是直接的從根外菌絲到根內菌絲被轉移到植物裡 (Govindarajulu 等氏，2005)。

歸納以上所述，叢枝菌根吸收無機鹽類後，同化作用所需的酵素活性會在 ERM

被誘導，其經由 GS-GOGAT 途徑合成 glutamine, glutamate 和 asparagines 等，而大多合併和貯藏者為 Arginine。Arginine 進入 IRM 後，經過尿素循環分解成銨再進入植物細胞，合成蛋白。此氮素代謝途徑的存在與高流量的氮之轉移，指出 OMF 的共生可有效轉運土壤中的氮到植株體內。而大部分的蘭菌，寄主細胞與真菌間的界面被假設為進行養分的交換的地方 (Peterson 和 Massicotte, 2004)。可知由叢枝菌根根外菌絲吸收養分後，轉運到植物細胞中的運送過程，但是絲核菌與蘭科植物間是否也有一套類似的運送模式，尚待後人研究與探討。

斑葉蘭(*Goodyera repens*) 接種蘭菌進行共生發芽，可顯著增加植株體內磷與氮的含量，顯示蘭菌具有運移磷與氮的功能(Alexander and Hadley, 1984)。在大花蕙蘭(*Cymbidium*) 接種蘭菌可促進幼苗對氮、磷及鉀的吸收，並增加植株的乾重(趙等氏, 1999)。將接種 *Ceratobasidium cornigerum* 的 *Goodyera repens* 植株固定於密封的培養皿上，待分離的培養基上菌絲橋樑形成後，注射液體 $^{14}\text{CO}_2$ 於內。由自動顯影圖可看到 ^{14}C 經由菌絲橋樑，轉移到根部中，證實養分能從真菌轉運到植物體中 (Cameron 等氏, 2006)。

3. 促進植株的生長、開花

蘭花於幼年期時為異營植物，許多種類需要依靠真菌提供碳源才能進入成熟期 (Rasmussen 等氏, 2002)。以斑葉蘭屬 (*Goodyera repens*) 的幼苗與成熟植株作為研究碳水化合物及磷的運移。證明在只有 3-4 片葉的未成熟植株，可經由根外菌絲提供碳源，但在有 5-7 片葉的成熟植株上，則未發現有養分運移的現象，顯示蘭花會隨著葉片的發育，對碳源的依賴會由異營性轉為自營性 (Alexander 和 Hadley, 1984)。朱 (2000) 以文心蘭為材料，接種蘭菌者其植株高度、偽莖長度及子球株高與寬度，另外在葉片數、葉片厚度、鮮重、面積、葉片葉綠素含量及可溶性蛋白質含量都有增加。絲核菌屬蘭菌能與石斛蘭形成共生關係，具有促進石斛蘭小苗生長之作用(曾, 2002)。紫晶石斛(*Dendrobium amethystoglossum*) 瓶苗出瓶並接種蘭菌四個月後，結果顯示接種蘭菌對於新生偽球莖地上部及地下部皆

有促進效果(林, 2002b)。接種蘭菌可提高鐵皮石斛(*Dendrobium candidum*)、銅皮石斛(*Dendrobium moniliforme*)植株的生長勢(康, 2004)。仙履蘭(*Paphiopedilum delenatii*)接種蘭菌可以促進植株的生長, 如鮮重及葉長等(蔡, 2003; 藍, 2001)。也可促進國蘭類小苗及成株的生長(王, 1999)。金線連(*Anoectochilus Formosanus* Hayata)和彩葉蘭(*Haemaria discolor* var. *dowsoniana*) , 接種蘭菌都具顯著促進植株生長上的功用(周, 2004; 蔡, 1997)。蝴蝶蘭接種多種蘭菌, 可顯著增加葉綠素含量, 使花梗增長及加大花朵直徑(張, 2003)。Zelmer 與 Currragh 將綬草(*Spiranthes laxera*)與蘭菌行共生發芽後, 定植於土中六個月後有部分的植株能提早開花(Zelmer 和 Currragh, 1997)。

陳(2005)歸納接種蘭菌對蘭科植物拖鞋蘭生長與發育具有下列功能, 包含 1: 可以促進種子發芽與小苗的生長, 並提供小苗生長所需的菸鹼酸(niacin)。2: 增加養分的吸收及提高礦物元素的轉運。3: 可分解澱粉成為葡萄糖, 調整培養基內的 pH 值及養分的吸收與轉運作用。4: 具有分解酵素的能力, 已知菌絲的解體與酸性磷酸酶有關。5: 具有分解纖維素之功能, 使轉變成為一種可被植物體吸收之碳水化合物。6: 增加植物對逆境的抵抗力。7: 促進植株生長。8: 調節蘭科植物的花期。9: 減少農藥的施用。10: 提高蘭科植物的開花品質。11: 有助於植株進行野地復育。12: 提高植株移植存活率。13: 能增加植株 CuZnSOD 與 MnSOD 兩種超氧歧化酶、過氧化酶及酸性磷酸酶等酵素活性, 還可增加多醣體、多酚化合物、類黃酮化合物、礦物元素及維生素 C 含量。

植物生長物質 (Plant growth substance, PGS)

激勃素 (Gibberellins)

激勃素代謝與型式之轉變

內生與外加激勃素在植物的細胞裡持續的運轉與代謝, 這個過程影響了單位時間與區間裡的激勃素之有效性, 也影響了芽原生體(bud primordia)最後分化的命運(Oden 等氏, 1995)。因此激勃素如何運送以及如何轉變為具有生理活性的型態顯得格外的重要。挪威雲杉(*Picea abies*)的主要激勃素種類為 GA₉、GA₄、GA₁、

GA₃ (Oden 等氏, 1982、1987) 而其代謝由 GA₉ 轉變成 GA₄、GA₅₁ 與 GA₉-conjugate (Moritz 等氏, 1989)。另研究顯示 *Picea sitchensis* 的激勃素代謝由 GA₉ 轉變成 GA₄, 而 GA₄ 轉變成 GA₁ 與 GA₃₄ (Moritz 等氏, 1989)。

Oden 等(1995)研究挪威雲杉(*Picea abies*)激勃素的運轉代謝跟花芽分化之關係, 比較高溫又乾燥適合開花與低溫潮溼不適宜開花的環境, 將 [3H] 與 [2H] 的 GA₄ 與 GA₉ 混合液注射挪威雲杉延展枝(elongating shoots)裡, 結果顯示兩個環境下枝條之 GA₉ 轉變成 GA₅₁、GA₄、GA₃₄、GA₁, 而 GA₄ 轉變成 GA₃₄、GA₁、GA₈; 在低溫潮溼不適宜開花的環境下之枝條, [3H] GA₉ 主要代謝為 GA₅₁, 而在高溫乾燥環境適宜開花的枝條, GA₉ 代謝轉變為 GA₄ 的量遠比低溫潮溼環境下的枝條為多; [3H] GA₄ 主要代謝為 GA₃₁, 也發現有 GA₁ 與 GA₈。

激勃素促進養分轉移到有潛力的花芽

開花是因為養分的轉移, 經過開花誘導的比沒有誘導的植株容易開花, 是因為其莖頂接收的同化物較未開花者為多使然 (Ross 等氏, 1984)。放射松(*Pinus radiata*) 以 GA_{4/7} 處理 8 天之後, 施用 ¹⁴C 予放射松針葉, 結果顯示在花芽分化期間施用 GA_{4/7} 顯著的提高 ¹⁴C 同化物移到潛在的長梢原生體(lateral long-shoot primordia), 這個位置於隔年具有潛力產生花芽或營養芽 (Ross 等氏, 1984)。GA_{4/7} 處理的相同效應是在莖部乾物質的分配, 由於 GA₃ 對於松科開花促進的效果較 GA_{4/7} 劣, 經觀察兩者處理的植株於分化期間同化物轉移到側芽原生體(lateral primordia) 的量, 顯示低極性的 GA_{4/7} 顯著的促進開花, 但同化物的轉移並沒有比較多, 這意味 GA_{4/7} 對於芽體形態改變的效果遠超過同化物的轉移 (Ross 等氏, 1984; Pharis 和 King, 1985)。

激勃素與被子植物之開花

不像針葉樹那樣, 許多的被子植物施用激勃素不僅沒有促進開花, 有時甚至

會有抑制作用(Bernier, 2005; Pharis 和 King, 1985)。有些果樹如蘋果、西洋梨、杏與橘子等，在花芽分化期間或花芽分化早期，具有生物活性的激勃素從發育中的果實進入鄰近的短枝頂梢 (spur apex) (Looney 等氏, 1985; Pharis 和 King, 1985)。也有激勃素可以促進開花，例如施用 GA₄ 可促進蘋果的短枝轉變成花，但相同環境下處理，GA₃ 與 GA₇ 卻對花芽分化形成抑制(Looney 等氏, 1985; Pharis 和 King, 1985)。為什麼具高度生物活性的激勃素 GA₃ 與 GA₇ 會抑制開花，但 GA₄ 卻可以促進開花呢？可能因為 GA₄ 的代謝比 GA₃ 與 GA₇ 快速，而避免淪為抑制的形態，而 GA₄ 的促進效果是由於提高了花芽的分化。GA₄ 促進開花而 GA₃ 與 GA₇ 卻呈現抑制，意味著不同的激勃素結構對於木本的被子植物開花的誘導有不一樣的影響。

激勃素結構之差異對於開花之影響

以毒麥(*Lolium temulentum*)為研究系統，探討激勃素結構之差異對於開花之影響。毒麥為長日照植物，在經過 24 小時的連續光照之後，激勃素的含量呈現出升高的趨勢，而且具有 polyhydroxylated group 的激勃素呈現一致性的升高(Pharis 等氏, 1987)。根據這樣的結果，探討不同的激勃素結構對於毒麥在誘導開花的長日照，與非誘導的情況下之開花能力，結果顯示激勃素經由人為方式添加一個 β -hydroxyl group 到 GA₃ 的 C-15 位置，這個分子促進開花的活性提高了 10-20 倍；而具有 polyhydroxylated group 的 GA₃₂ 其有效施用劑量只有 GA₁ 的 1/1000。毒麥經過 24 小時長日照處理後，莖頂的 polyhydroxylated group 的激勃素產生與花芽的分化有很大的關連性。GA₃₂ 為具 polyhydroxylated group 的激勃素，其結構上第一個碳與第二個碳間具有雙鍵，反觀 GA₁ 對於毒麥的開花促進效果很差，但對於營養生長則很好，而其結構上第一個碳與第二個碳間沒有雙鍵，另 GA₃ 可以增加開花的效果，而其結構上卻有雙鍵存在(Pharis 等氏, 1987)。因此，激勃素不一樣的構造具有特殊的效應，似乎是存在的，莖頂可能只認得一或數種激勃素的結構，

而這些結構多少參與了許多的代謝過程(Pharis 等氏, 1987)。

激勃素與蘭科植物

GA₃被廣泛應用於農、林、園藝上,可提高水稻結實率;促進菠菜、葡萄苗、玉米等作物的營養生長;西瓜、柑橘、香蕉等的保鮮與延緩衰老;以及調節菊花、仙客來、草莓、萵苣等作物花期,達到提早開花效果等(立石產品說明書, 2000)。在植物體內,可由萌發的種子、幼芽、生長的葉、盛開的花、果實以及根部合成,並透過韌皮部移動運輸。其作用機理為促進 DNA 和 RNA 的合成,提高 DNA 模板活性,增加 DNA 與 RNA 聚合酶的活性;誘導澱粉酶、脂肪合成酶等的合成活化;延緩葉綠體分解;提高細胞膜透性與細胞壁的延展性,促進細胞伸長與細胞分裂;加快同化物和儲藏物的流動 (Taiz 和 Zeiger, 1998)。

蝴蝶蘭的開花需有低溫誘導 (Higuchi 和 Sakai, 1978 ; Tran Thanh Van, 1974),當生長溫度超過 28°C 則不會進行花芽萌發 (Sakanishi 等氏, 1980),但在高溫環境 (30/25 °C 日/夜溫) 下,施用 GA₃ 可誘導花朵產生。可知 GA₃ 可增加蔗糖合成酶的活性,促使供源葉(source leaf)將蔗糖轉運(translocation)到花序頂端累積,增加花序上蔗糖、葡萄糖與果糖的含量,使之達到花芽萌發的能力(Chen 等氏, 1994)。但施用高濃度 GA₃ 調節蝴蝶蘭或仙履蘭開花,皆有畸形花的問題發生,且隨著施用濃度的增高,畸形花比例也隨之增加。若有相同劑量的 BA 共同施用,則可避免畸形花產生的比例(Chen 和 Chang, 1997)。

外施GA₃也可促進花原體的形成,在30/25°C日/夜溫環境下,於蝴蝶蘭花梗上注射GA₃ 0.5 µg可得到與用涼溫催花相同的花原體數,可知GA₃供應為影響蝴蝶蘭花序與花芽在高溫環境下繼續發育的重要因子 (Su等氏, 2001)。外施GA₃還可提早開花,處理2.5 mM GA₃ 的 *Miltoniopsis hybrids* 'Eillen' 同一天觀察可見花序的百分比達到56%,處理5 mM GA₃ 為24%,對照組為4%。*Miltoniopsis hybrids* 'Akatsuka' 施用2.5 mM GA₃ 可見花序的百分比為69% , 5 mM GA₃ 為與對照組皆是0%。可知GA₃的供應可使花序提早出現,且不影響最後的總開花率(Matsumoto, 2006)。但濃度過高的GAs極易造成花朵畸形,蔡 (2003) 施用GA₃ 100 mg · L⁻¹和GA₄₊₇ 100 mg · L⁻¹於仙履蘭 *Paphiopedilum Maudiae* type上,可顯著提升其開花率,但因濃

度太高導致畸形花的產生。陳(2005)降低GA₃濃度(70、30、10 mg · L⁻¹)處理於*Paphiopedilum Maudiae* type植株，結果指出GA₃確實可以促進仙履蘭的抽梗率，但濃度必須低於10 mg · L⁻¹才能降低畸形花的發生，可見仙履蘭對GA₃極為敏感。

細胞分裂素 (Cytokinins)

細胞分裂素是調節植物許多生理及發育過程的植物荷爾蒙，其影響效應包括延緩離體植物器官之老化、養分的流動、葉綠體之成熟、子葉之擴展和形態發生的控制等(柯，2002)。

一些研究裡指出，細胞分裂素為花芽轉換過程中的信息號分子。(Bernier 等氏，1993；Kinet 等氏，1993)，如 Aranda Noorah Alsagoff 的根尖是細胞分裂素、生長素與離層酸的主要來源，在已開花植株的氣生根根尖，可探查到較高量的內源性細胞分裂素 (Zhang 和 Ou，1995)；*Euphoria longana* 不同發育階段裡的細胞分裂素，花芽創始時其總含量會增加，尤其是 [9R] iP 跟 [9R] Z (Chen 等氏，1997)；而當 *Dendrobium Second Love* 花芽誘導時，內源性細胞分裂素含量上升的現象，推測可能為一個活化開花相關基因的信號，或是開花途徑中關鍵成分的調節者(Ferrerira 等氏，2006)。細胞分裂素也可促進花芽發育，如 *Polianthes tuberosa* 在早期花芽創始及發育階段時，內生細胞分裂素的含量比營養生長時高 (Chang 等氏，1999)。於瓶內栽培蘭科植物 *Psycmorchis pusilla* 40 天後，細胞分裂素的含量會上升，其作者表示於花原頂端分生組織細胞的再分化會形成花朵發育 (Vaz，2002)。林(1994)以 BA 處理於高溫下之蝴蝶蘭花梗，花梗節位較多，花序較長；以 BA 處理的植株其花期較長，花朵大且質地厚實。噴施 BA 於仙履蘭 *Paphiopedilum Maudiae* type 上，雖無促進抽梗，但可增加花徑大小約 1cm，提高花朵品質(陳，2005)。施用 BA 於 *Miltoniopsis Orchid hybrids* 除了可促進小苗的成長也可以促使植株提早開花(Matsumto，2006)，此外在 *Doritaenopsis* 和

Phalaenopsis 施用 BA 也有促進開花的效果(Matthew 等氏，2008)

但溫度可影響植物內生性細胞分裂素的含量，夜溫較低的溫度周期使得石斛 *Dendrobium Second Love* 芽與葉中內生荷爾蒙含量改變，進而促進花芽創始，由營養芽轉變為花芽(Campos 和 Kerbauy，2004)。光照時數也可影響頂端分生組織內細胞分裂素的含量變化，如 *Sinapis alba* 經過一天長日照會使多的蔗糖與細胞分裂素 (ip) 輸出。蔗糖會往上下兩端移動，到達根部時蔗糖會造成細胞分裂素 (ZP) 與養分的增加，進而誘導開花 (Bernier 和 Perilleux，2005)。商業上也有許多作物利用細胞分裂素的噴施以誘導開花，如噴施 BA 可刺激 *Aranda Deborah*、*Dendrobium Louisae Dark* 和 *Aranthera James Storie* 的開花，最近 BA 的使用更是延伸到單莖蘭花 (monopodial orchids)，如 *Aranda Kooi Choo*、*Holttumara Loke Tuck Yip*、*Mokara Chark Kuan*、*Aranthera Beatrice Eng* 與複莖蘭花(sympodial orchids)，如 *Dendrobium Mary Mak*、*Dendrobium Madam Uraiwan*、*Dendrobium Jaquelin Concert* × *Jester* 與 *Oncidium Gower Ramsey* (Hew 和 Yong，2004)。



第一章、蝴蝶蘭菌根之植株效益

摘要

蝴蝶蘭的花型優美深受社會大眾喜愛。台灣蘭花產業每年外銷產值超過二十七億台幣，且逐年成長當中。我們證實利用 R02 及 R04 這兩種蘭菌接種目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly') 及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31') 可有效促進植株生長，此蝴蝶蘭栽培改進技術，可直接應用在蝴蝶蘭的商業栽培上。此外也發現蘭菌的接種也可以增加蝴蝶蘭抗軟腐病的能力。為了瞭解蘭菌與蘭花共生而促進生長和增加抗性的分子機制，我們利用抑制性扣減雜合技術 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 分離蘭菌接種後會被誘導表現的基因。結果得到 6 個與其他高等植物之 cytochrome P450 monooxygenase、G2 pea dark accumulated gene (GDA2 protein)、pectinesterase、Phaseolus vulgaris pathogenesis-related protein (PVPR3)、glutaredoxin (GRX)、Late embryogenesis abundant protein 5 (LEA5) 等抗病、抗逆境蛋白具極高相似度之核酸序列，經 RT-PCR 之方法確認後，證實蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 之菌根植株，其抗病、抗逆境基因確實有較高之表現量，由此推測，蝴蝶蘭之菌根植株，出瓶存活率提高，可能是由於這些抗病、抗逆境基因的表現量提高所造成。

第一節 蘭菌接種可促進蝴蝶蘭生長

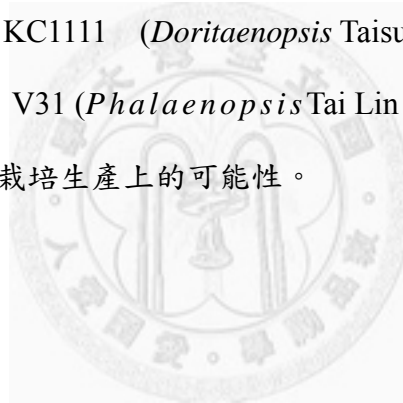
前言

蝴蝶蘭(*Phalaenopsis* spp.)，英文名 Moth Orchid，蘭科，蝴蝶蘭屬，原產於熱帶、亞熱帶。因其花梗長或分枝多、花朵數多、花型原潤平整、花朵排列整齊、弧度優美、氣質高雅、花朵繁茂、色彩明亮鮮豔，再加上長達二至三個月之開花期，或三至四星期的切花瓶插壽命，使蝴蝶蘭頗受國內外愛花人士的喜愛。

蝴蝶蘭為單莖性無限花序之著生蘭，每一葉腋至少有 2 個芽原體，當植株渡過幼年期且環境適合 (25/20 °C 之涼溫)，葉腋內發育呈靜止狀態的腋芽，可被活化而萌發為花梗，花梗由頂葉往下數第三及第四葉腋抽出率最高。(李和李, 1996; 林, 2002)。

在先期的研究中，發現接種蘭菌的蝴蝶蘭菌根植株之生長勢較佳。為了對不同蘭菌與蘭科植物間的關係能有更明確的認知，進行蘭花共生菌種之分離、純化與鑑定，再加以探討彼等對蘭科植物的影響。結果顯示，王(1999)使用 W01、W07、W10、W10B、W11 等蘭共生菌接種蝴蝶蘭白花雜交種，在 143 天後調查生長情形，發現在葉幅和根數上優於對照組。朱(2000)以文心蘭為材料，接種不同菌種之蘭菌，得到蘭菌處理者在生長上均優於對照組。張(2001)使用不同蘭菌接種彩葉蘭，發現無論是個別菌種或混合菌種對彩葉蘭的莖長、鮮重、葉面積等皆有明顯促進效果；另外，使用接種蘭菌與否作肥料濃度試驗，發現接種蘭菌可降低肥料使用的濃度，有助於降低生產成本。藍(2001)使用不同蘭共生菌 R01、R02、R04、R11、F03、F04 等，接種蝴蝶蘭紅花和白花雜交種，在接種一年後處理組各項生長數據皆優於對照組；接種 R02 者，其平均葉面積最大，且開花株數達 40%，對照組則為 0%。王(2004) 分離出 FP01、GP01、GP02、GP03 等菌種，其中 GP01(*Fusarium* sp.)能提高蝴蝶蘭台灣阿嬾(*Phalaenopsis amabilis* var. *formosana*)的抽梗率。康 (2004) 利用數種蘭共生菌接種於鐵皮石斛之上，發現 R01、R02 及

Cy (*Cylindrocarpon* sp.) 皆可促進生長，其中以接種 R02 之植株株高最高，接種 R02 及 Cy 則可增加假球莖長度和寬度。而接種 R02 於銅皮石斛之上可增加假球莖長度及寬度；接種 R02 或 Cy 皆可增加鮮重，與對照組相比約高出一倍或以上。這些前人研究顯示蘭共生菌之存在可有效促進蘭科植物之生長發育。陳 (2005) 利用五種絲核菌屬蘭菌 (R01、R02、R04、R13、R14) 單獨接種在兩個品種的拖鞋蘭小苗上，栽培四個月後調查，證實 R02 能促進葉片長度及增加鮮重，且接種 R02 的小苗存活率達 100%。張(2007) 也證實接種 R01 能顯著提高金草石斛中具有抑制癌細胞活性的 moscatilin 含量，在黃花石斛中則是接種 R04 能顯著促進其 moscatilin 量的增加。楊(2008) 也證實接種蘭菌可降低病毒感染所造成的植株生長遲緩及開花品質不佳等問題。本研究主要探討蘭菌對於促進目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly')及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31')生長的效果並評估其直接應用在商業栽培生產上的可能性。



材料與方法

研究材料

本試驗之植物材料為目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Dtps.* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly')及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phal.* Tai Lin Redangel 'V31')，來源為牛記花卉農場所生產之瓶苗。出瓶時分別接種 *Rhizoctonia* spp. (R02)及(R04)菌種，以高溫消毒過之智利水苔栽培，栽種於 28/23°C 日/夜溫、平均光照 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，自然光照時間的溫室環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)灌溉，並以 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肥液於午後做葉面噴灑。

蘭菌製備

選用馬鈴薯抽出物洋菜培養基(Potato Dextrose Agar; PDA)作為菌種繼代用的固體培養基。將菌種繼代至 PDA 固體培養基後，置於 25°C 黑暗處生長 5-7 天，待已純化之菌絲長滿培養皿，即可作為菌種生產之母源；將此固體培養基切成小塊，放入 2.5%安佳脫脂奶粉培養液中震盪培養，可作為製作固體菌種時的液態菌種來源。另將水苔浸泡於水中三天，每天換水一次，使其脫酸，再將已脫酸之水苔放入洗衣網內，置於脫水機脫水約 2 分鐘取出，待風乾或放入烘箱烘乾後，將乾燥之水苔以粉碎機研磨 1~2 秒，使成粉狀，再將 2.5%安佳脫脂奶粉培養液與水苔粉末以 1:8 之比例混合，分裝至太空包內經高溫高壓滅菌，接種蘭菌靜置生長後，即成固體菌種(李，2001)。

蘭菌接種

植株購入後，在組培苗出瓶，分別進行接種蘭菌之工作，接種後以螢光顯微鏡檢測法檢測，以確認接種菌根之成長。先將植株自原有的容器中取出，清除根部附著的培養基或水苔介質，取 0.2 克 之水苔菌種水苔包埋根部或塞入靠近根部附近，將其介質包附於植株根部周圍後，完成裝盆的動作。本試驗分別接種由張

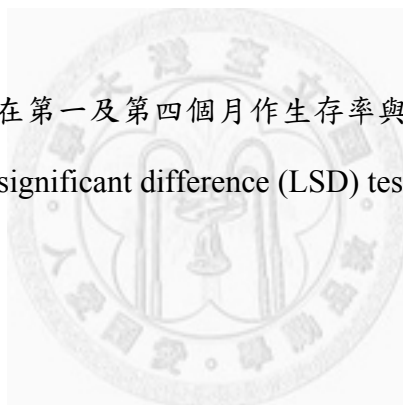
喜寧教授實驗室自行分離並經純化、鑑定、致病性分析等步驟之 R02 及 R04 菌種，此二種菌種皆為絲核菌屬 *Rhizoctonia* spp.，其中 R02 為雙核絲核菌，R04 為多核絲核菌(蔡，1997)，其等已經過該研究室試驗，證實確實有利於蘭株生長，另以無接種蘭菌植株作為對照組。

菌根植株檢測

本試驗所有菌根樣本皆以張喜寧教授研究室所發展出之螢光顯微鏡快速檢驗法(李，私人聯繫)。將蝴蝶蘭根部，徒手切片後，直接放置於波長 260 nm 之螢光顯微鏡下作觀察，檢驗確認確實為菌根植株後方進行採樣。

存活率與葉幅生長差異

實驗組與對照組分別在第一及第四個月作生存率與葉幅長度檢測，每處理 70 株，試驗結果分別以 least significant difference (LSD) test at $P < 0.05$. 作為差異比較之統計方法。



結果與討論

本試驗為確認所有採樣之蝴蝶蘭植株，確為菌根植株，所有採集之菌根植株根部樣本，皆採用本研究室所發展出之菌根植株螢光顯微鏡快速檢測法進行菌根植株確認(圖 1-1)，其中 A 為非菌根植株，B、C 及 D 為受蘭菌感染之菌根植株，圖 1-1 顯示，菌根植株根部切片內有明顯之螢光團塊狀物質，而非菌根植株除中央之髓部外，並無發現其他明顯之螢光團塊狀物質，這些螢光物質，經傳統染色方式與菌根植株螢光顯微鏡快速檢測法檢測之結果進行比對後，已確認確實是菌絲團塊。

蝴蝶蘭大紅花栽培種 V31 及大白花栽培種 KC1111 之非菌根植株及接種蘭菌 R02、R04 之菌根植株，於 28/23°C 日/夜溫之溫室內生長 4 個月後。大白花栽培種 KC1111，接種蘭菌 R02 及 R04 之菌根植株，植株總鮮重量皆較高。大紅花栽培種 V31，接種蘭菌 R02 之菌根植株，植株總鮮重量皆較高(圖 1-2、1-3)。其中大白花栽培種 KC1111，接種蘭菌 R04 之菌根植株的鮮種由對照組的 10g 成長到 14g，有 40% 的大幅成長。大紅花栽培種 V31，接種蘭菌 R02 之菌根植株，植株總鮮重由 8g 成長到 14 g 更達到 75% 的顯著成長(圖 1-2、1-3)。證實接種蘭菌確可有效促進蝴蝶蘭之營養生長。

結論

本研究證實利用 R02 及 R04 這兩種蘭菌接種目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly') 及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31') 可有效促進植株之生長。此蝴蝶蘭栽培改進技術，可直接應用在蝴蝶蘭的商業栽培上。

圖

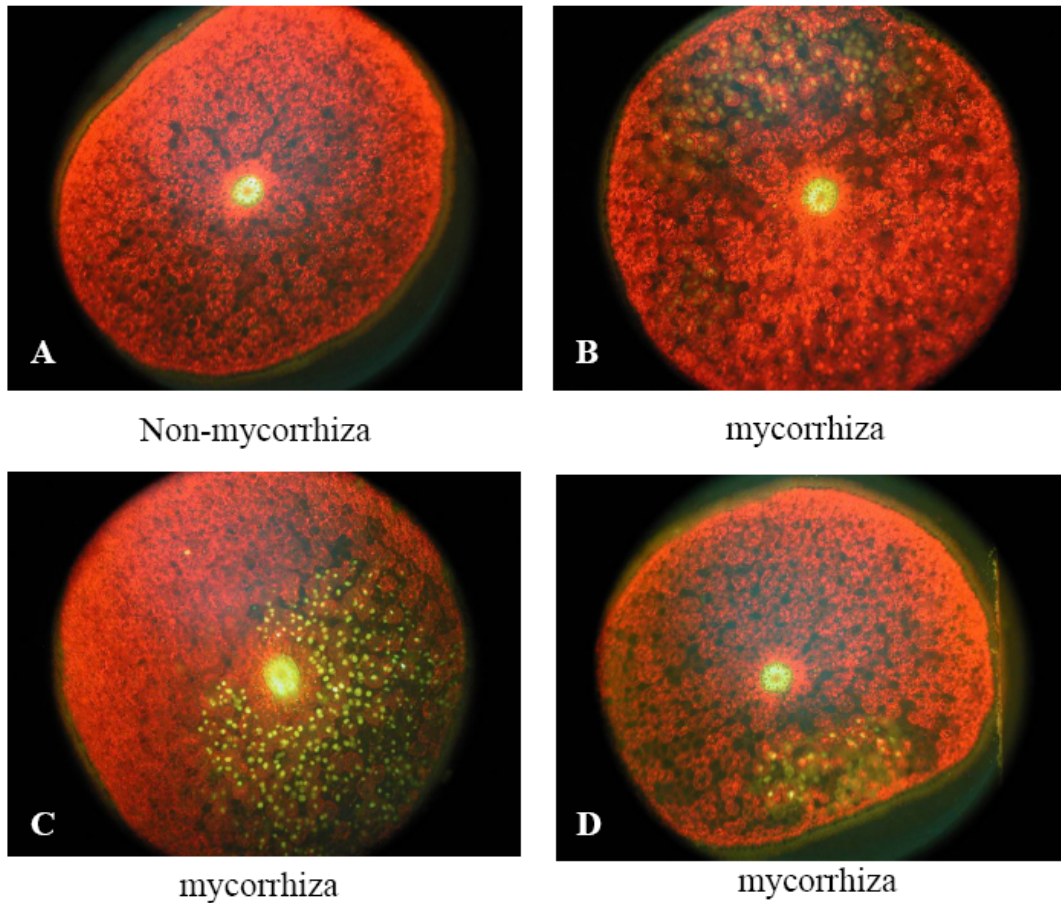


圖 1-1、以蝴蝶蘭菌根植株螢光顯微鏡快速檢測法觀察蝴蝶蘭菌根及非菌根植株。(A)為非菌根植株之根部切片構造，B、C 及 D 為菌根植株之根部切片構造。在菌根植株中，可看到蘭菌菌絲纏繞形成的結構(peloton)所產生明顯之綠色螢光團塊。

Figure 1-1. Observation of growth of orchid mycorrhizal fungi (OMF) in root of *Phalaenopsis* orchid by florescent microscope. (A) Section of non OMF infeted root. (B, C, D) Section of OMF infeted root. OMF infection plant forms a tightly coiled hyphal structure termed a peloton (florescent dot) in the cells.



圖 1-2、接種蘭菌之蝴蝶蘭大白花栽培種 *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111)、大紅花栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' 植株生長情況。(A)和(C) KC111 接種 R02 和 R04、(B)和(D) V31 接種 R02 和 R04。接種蘭菌 4 個月後，植株葉幅以及根部均有顯著的成長。

Figure 1-2. Plant growth of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel' (V31) inoculated with orchid micorrhizal fungi. (A) and (C) KC111 orchid plants inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04, respectively; (B) and (D) V31 orchid plants inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04, respectively. Growth stimulation is characterized by orchid plants having a larger leaf span and better root growth than control after 4 months of inoculation.

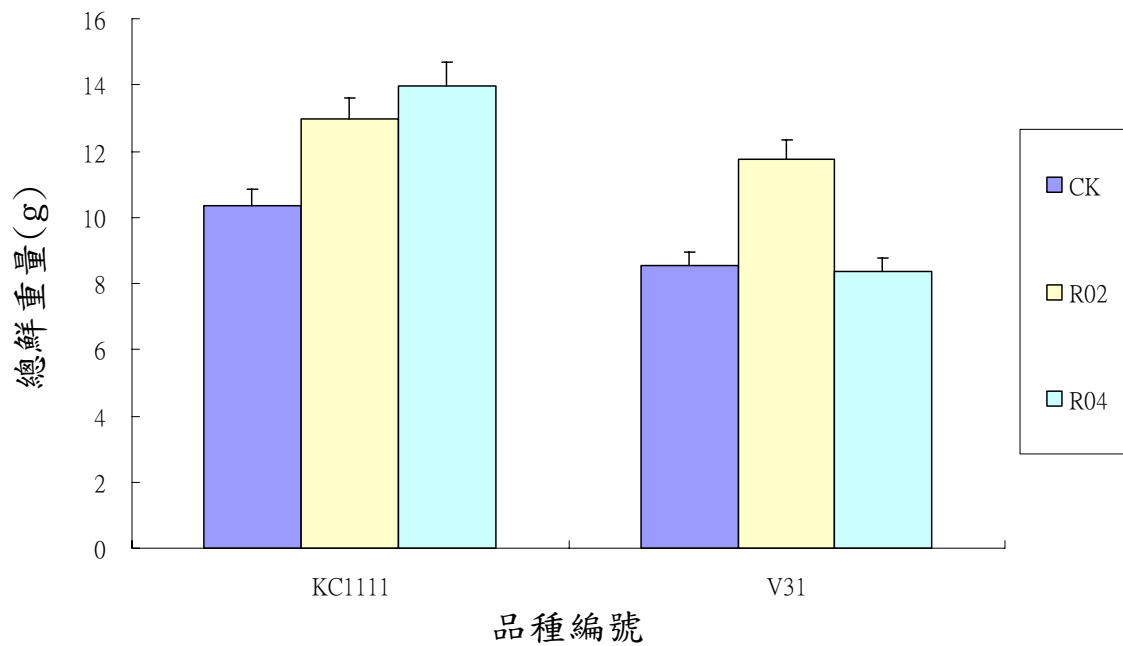


圖 1-3、蝴蝶蘭大白花栽培種 *Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111)及大紅花栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ 接種蘭菌 R02 或 R04 4 個月後植株之總鮮重量。(P<0.05)。

Figure 1-3. Fresh weights of four months old *Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin ‘Redangel ‘V31’ (V31) plants after been inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04 respectively. (P<0.05)

第二節、蘭菌接種可增加抗軟腐病能力

前言

蝴蝶蘭病蟲害種類繁多，其中細菌性軟腐病的發生常常造成蘭園的重大損失。在台灣引起蝴蝶蘭軟腐病的病原為 *Erwinia chrysanthemi* (Fu 和 Huang, 2011; Wu 等氏, 2010)。此病菌主要的傳播方式為藉由傷口侵入組織，此外也可經澆水、施肥、修剪葉片而造成二次感染。*Erwinia chrysanthemi* 感染蝴蝶蘭後會造成植物組織軟腐，使得整個植株喪失經濟價值。所以軟腐病在蘭花產業是急待解決的嚴重病害。

蘭花菌根真菌(Orchid mycorrhizal fungi, OMF)除了可促進磷和氮的吸收，進而增快植物的生長之外，許多的研究報告也證實菌根真菌也可以幫助植物抵抗乾旱(Koske 等氏, 1997)、鹽害(Rosendahl 和 Rosendahl, 1991)、以及可進行生物防治的功效。利用菌根真菌可在許多植物引起系統性的抗性，如番茄(Cordier 等氏, 1998)、蠶豆(Rabie 等氏, 1996)、小麥(Khaosaad 等氏, 2007)以及香蕉(Etsen 等氏, 2008)。而此抗性主要是引起植物的誘導性系統抗性(induced systemic resistance, ISR) (Heil 和 Bostock, 2002)。

此外由於在第一節的研究中，發現接種蘭菌的蝴蝶蘭菌根植株，除生長勢較佳外，亦較不易得到軟腐病等蘭花常見病害。故本研究以主動接種軟腐病病原菌 *Erwinia chrysanthemi* 的方法，來確認接種蘭菌的蝴蝶蘭菌根植株，其抗軟腐病能力是否確有增加，並探討其可能機制。

材料與方法

研究材料

本試驗之植物材料為目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly')及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31')，來源為牛記花卉農場或金車生物科技所生產之瓶苗。出瓶時分別接種 *Rhizoctonia* spp. (R02)及(R04)菌種，以高溫消毒過之智利水苔栽培，栽種於 28/23 °C 日/夜溫、光照強度 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每日 12 小時光週期，相對濕度 70%的植物生長箱環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)灌溉一次。

軟腐病病原菌培養

本試驗使用之軟腐病原菌 *Erwinia chrysanthemi* 由成功大學黃浩仁教授研究室提供，於 25°C 條件下，培養於酵母抽出物培養基(yeast extract peptone, YEP)，隔夜培養並調整至 $\text{OD}_{600} = 1.0$ ，(約 9×10^7 CFU)(Tsai et al., 2007)以之做為人工主動接種之原液。

蘭菌製備

選用馬鈴薯抽出物洋菜培養基(Potato Dextrose Agar; PDA)作為菌種繼代用的固體培養基。將菌種繼代至 PDA 固體培養基後，置於 25°C 黑暗處生長 5-7 天，待已純化之菌絲長滿培養皿，即可作為菌種生產之母源；將此固體培養基切成小塊，放入 2.5%安佳脫脂奶粉培養液中震盪培養，可作為製作固體菌種時的液態菌種來源。另將水苔浸泡於水中三天，每天換水一次，使其脫酸，再將已脫酸之水苔放入洗衣網內，置於脫水機脫水約 2 分鐘取出，待風乾或放入烘箱烘乾後，將乾燥之水苔以粉碎機研磨 1~2 秒，使成粉狀，再將 2.5%安佳脫脂奶粉培養液與水苔粉末以 1:8 之比例混合，分裝至太空包內經高溫高壓滅菌，接種蘭菌靜置生長後，即成固體菌種(李，2001)。

蘭菌接種

植株購入後，在組培苗出瓶，分別進行接種蘭菌之工作，接種後將進行菌根顯微鏡檢測，以確認接種菌根之成長。先將植株自原有的容器中取出，清除根部附著的培養基或水苔介質，將 0.2 克菌種水苔包埋根部或塞入靠近根部附近，將其介質包附於植株根部周圍後，完成裝盆的動作。本試驗分別接種由張喜寧教授實驗室自行分離並經純化、鑑定、致病性分析等步驟之 R02 及 R04 菌種，此二種菌種皆為絲核菌屬 *Rhizoctonia* spp.，其中 R02 為雙核絲核菌，R04 為多核絲核菌(蔡，1997)，其等已經過該研究室試驗，證實確實有利於蘭株生長，另以無接種蘭菌植株作為對照組。

菌根植株檢測

本試驗所有菌根樣本皆以張喜寧教授研究室所發展出之螢光顯微鏡快速檢驗法(李，私人聯繫)。將蝴蝶蘭根部，徒手切片後，直接放置於波長 260 nm 之螢光顯微鏡下作觀察，檢驗確認確實為菌根植株後方進行採樣。

軟腐病病原菌 *Erwinia chrysanthemi* 接種

1、 *Erwinia chrysanthemi* 的最佳接種濃度測定，取 $OD_{600} = 1.0$ 之菌液做為原液(約 9×10^7 CFU)，以無菌水進行連續稀釋 (從 1×10^{-2} ~ 1×10^{-7})，於有蘭菌共生的 *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) 和 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' (V31) 蝴蝶蘭葉片上，以針頭穿刺形成孔洞，每個孔洞間距必須大於 2 cm。取稀釋後之菌液，以 Tip 吸取 10 μ l，分別注射入不同孔洞中，每個接種濃度重複 5 次，並將蘭花植株，以塑膠袋密封，置於 28/23 $^{\circ}$ C 日/夜溫，相對溼度 70%，光度 80 μ mol·m⁻²·s⁻¹ 之生長箱中，培養 24 小時後，比較其所形成之水漬狀組織直徑，並記錄結果。

2、 利用 1×10^{-1} 以及 1×10^{-3} 這兩種濃度進行接種，每個接種濃度皆重複 10 次。

接種後 24 小時觀察其病徵的發展情況，比較其所形成之水漬狀組織直徑。

結果與討論

Erwinia chrysanthemi 菌液經連續稀釋後(從 1×10^{-2} ~ 1×10^{-7})之試驗結果 (圖 1-4, 1-5)。在部分植株上可觀察到接種蘭菌的植株，感染軟腐病菌後所形成的水漬狀組織直徑比對照組來的小，但經統計後皆無顯著差異(表 1-1)，可能是樣本數不夠所造成之誤差。但從此次實驗得知，較高的接種濃度可觀察到較明顯的抗性。所以接著利用 1×10^{-1} 以及 1×10^{-3} 這兩種濃度進行接種，每種濃度皆重複 10 次。接種後 24 小時觀察其病徵的發展情況，以及測量所形成之水漬狀組織直徑(圖 1-6, 1-7)。結果顯示 V31 接種 R02 之後可增加對於軟腐病菌的抗性，接種 R04 則沒有抗性產生(表 1-2)。另一面接種 R04 之 K C1111 菌根植株接種高濃度的軟腐病菌(1×10^{-1})後有明顯的抗性產生，但接種 R02 之 K C1111 菌根植株並沒有抗性產生。顯示出抗性的產生，必須要有特定的蘭菌與其共生蘭花的組合。

由於接種蘭菌後會加速植物的生長，所以菌根植株對於軟腐病菌所產生的抗性，是由於蘭菌的共生使得植株的抗病性狀態提升，所以有比較好的抗性，或是蘭菌感染後植物會產生抗細菌的物質，目前還未有進一步的了解。不過根據 Wulf (2003)的報導，菌根菌感染苜蓿植株後確實會誘導抗生物性以及非生物性逆境的相關基因，而在蘭花上目前還未有任何的報導。

結論

利用二種蘭菌 R02 以及 R04 感染 KC1111 和 V31 蝴蝶蘭，形成蘭菌根植株後再接種不同濃度的軟腐病菌菌液，觀察其水漬狀組織直徑。發現 R02 可增加 V31 對於軟腐病菌的抗性，而 R04 可增加 KC1111 對於軟腐病菌的抗性。且此抗性的產生有蘭菌與其共生蘭花組合的專一性。



第二節圖表

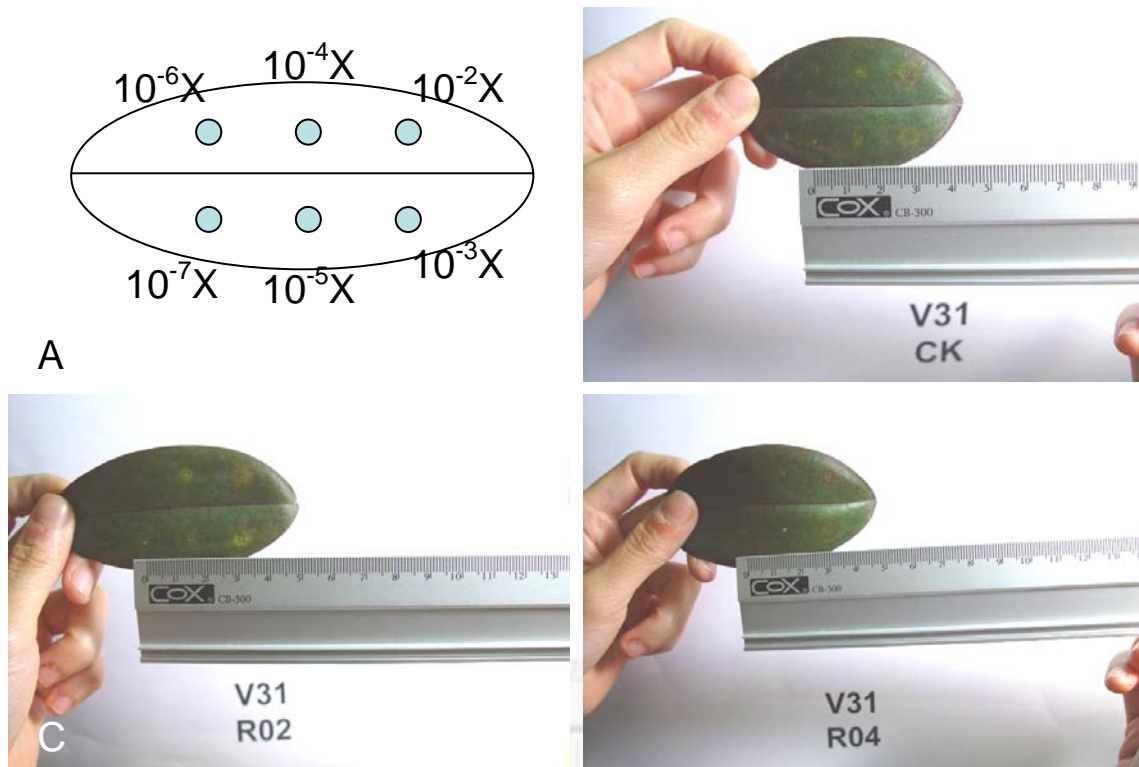


圖 1-4、蝴蝶蘭大紅花栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' 接種軟腐病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 24 小時後病徵的發展情況 ($1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-7}$)。(A) 經序列稀釋後取 10ul 的菌液利用微球管接種在葉片的傷口上、(B) 沒有蘭菌感染的對照組、(C) R02 感染的植株、(D) R04 感染的植株。

Figure 1-4. Soft rot development on leaves of *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel' 'V31' (V31) inoculated with *Erwinia chrysanthemi* after 24 h of inoculation ($1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-7}$). (A) 10 μ l each of series diluted *Erwinia chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-mycorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.

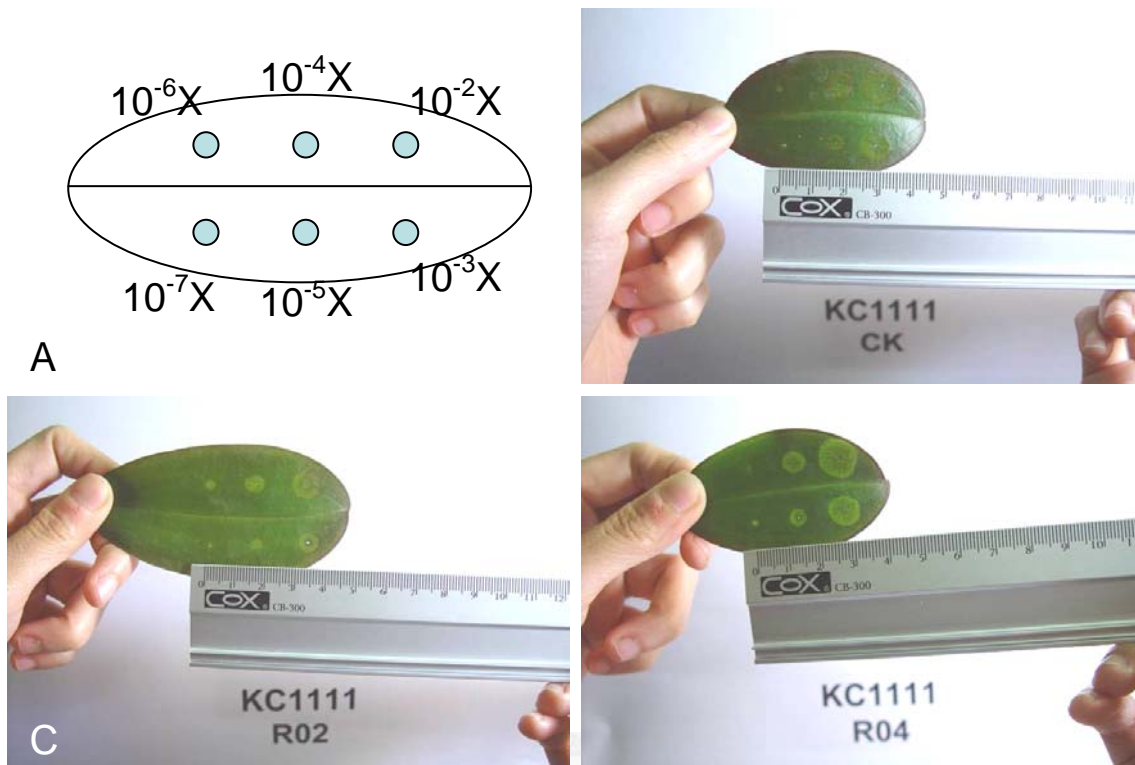


圖 1-5、*Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) 接種軟腐病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 24 小時後病徵的發展情況($1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-7}$)。(A)經序列稀釋後取 10ul 的菌液利用微球管接種在葉片的傷口上、(B)沒有蘭菌感染的對照組、(C)R02 感染的植株、(D) R04 感染的植株。

Figure 1-5. Soft rot development on leaves of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) inoculated with *Erwinia chrysanthemi* after 24 h of inoculation ($1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-7}$). (A) 10 μ l each of series diluted *Erwinia chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-micorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.

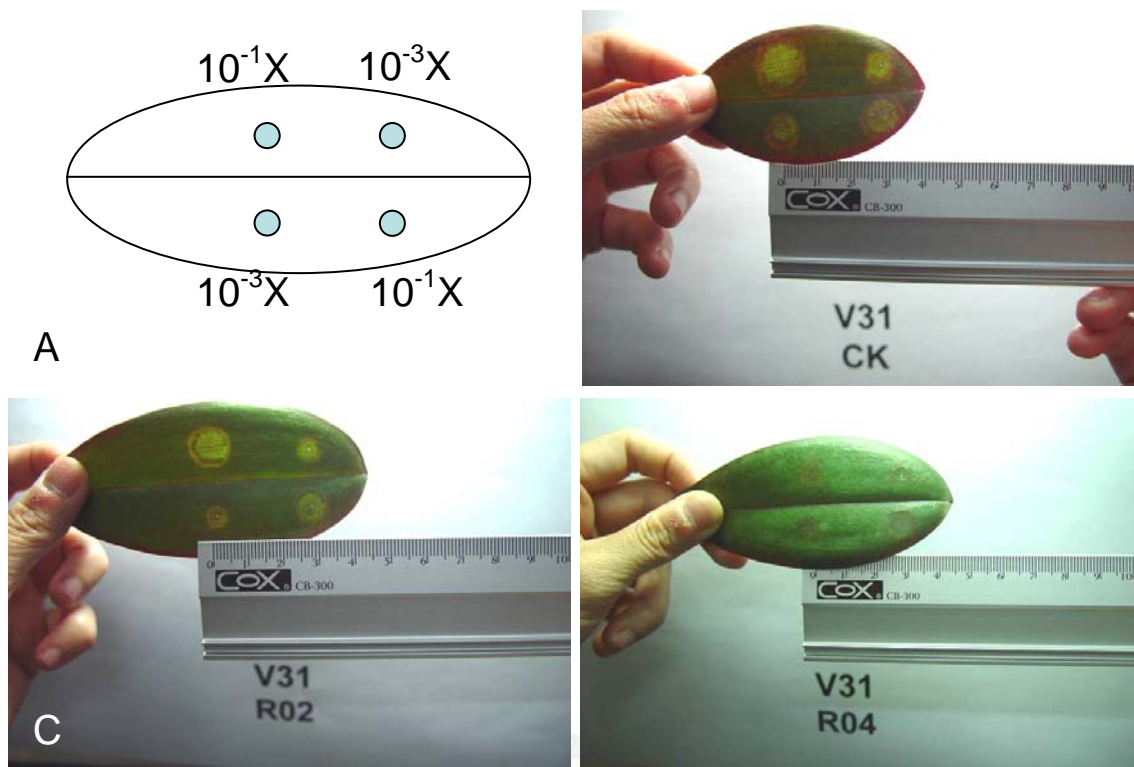
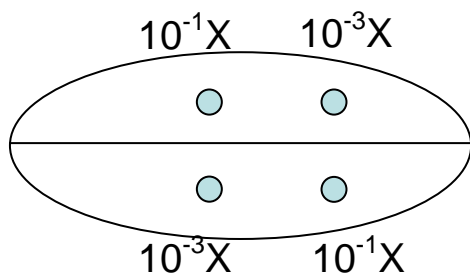
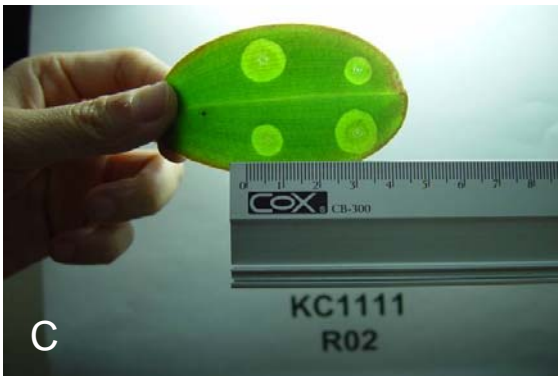
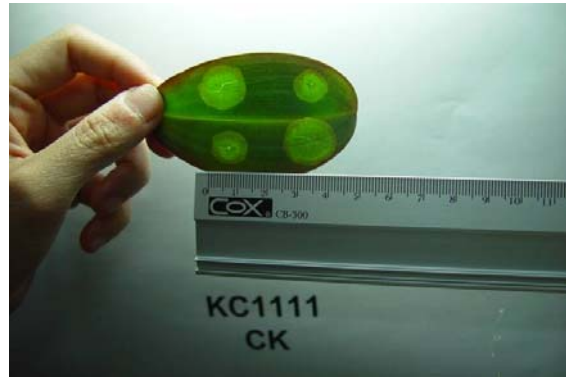


圖 1-6、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' 接種軟腐病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 24 小時後病徵的發展情況 (1×10^{-1} 及 1×10^{-3})。(A) 經序列稀釋後取 10ul 的菌液利用微球管接種在葉片的傷口上、(B) 沒有蘭菌感染的對照組、(C) R02 感染的植株、(D) R04 感染的植株。

Figure 1-6. Soft rot development on leaves of *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel' 'V31' (V31) inoculated with *Erwinia chrysanthemi* after 24 h of inoculation (1×10^{-1} and 1×10^{-3}). (A) 10 μ l each of series diluted *Erwinia chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-micorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.



A



C

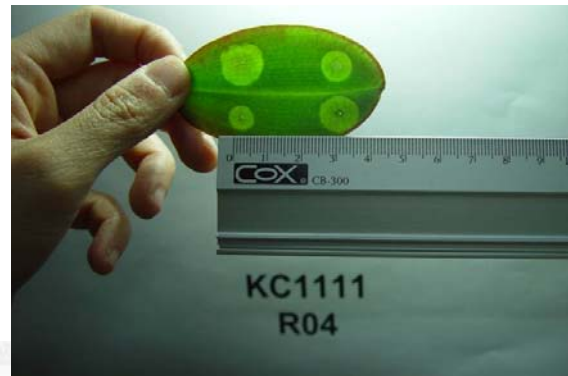


圖 1-7、*Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) 接種軟腐病菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 24 小時後病徵的發展情況(1×10^{-1} 及 1×10^{-3})。(A)經序列稀釋後取 10ul 的菌液利用微球管接種在葉片的傷口上、(B)沒有蘭菌感染的對照組、(C)R02 感染的植株、(D) R04 感染的植株。

Figure 1-7. Soft rot development on leaves of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder ‘King Car Butterfly’ (KC1111) inoculated with *Erwinia chrysanthemi* after 24 h of inoculation (1×10^{-1} and 1×10^{-3}). (A) 10 μ l each of series diluted *Erwinia chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-micorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.

表 1-1、蝴蝶蘭栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'、*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) 軟腐病徵的發展。軟腐病徵的發展為測量其水浸狀組織的直徑。

Table 1-2. Soft rot development in orchid mycorrhizal fungi (OMF) inoculated *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' and *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111). Soft rot development was characterized by forming clear circle zone.

Orchid cultivar	Treatment ^x	<i>Erwinia chrysanthemi</i> conc. (OD ₆₀₀)					
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
		Clear circle zone (mm) ^y					
V31	NM	6.0a	5.4a	3.8a	3.0a	2.0a	0
	R02	5.0a	3.2a	2.6a	2.2a	1.0a	0
	R04	4.6a	4.0a	1.8a	1.0a	0.4a	0
KC1111	NM	8.6a	8.0a	5.6a	3.8a	1.4a	0.7a
	R02	9.0a	7.0a	5.8a	4.6a	2.4a	0.6a
	R04	8.3a	7.3a	5.5a	4.3a	1.5a	1.1a

^zFive replicates were tested for each treatment

^yMeans are signified in each column followed by different letter at 5 % significant level as determined by Duncan's multiple range test.

^xNM:non- mycorrhiza. R02 and R04: inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04.

表 1-2、蝴蝶蘭栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'、*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111)軟腐病徵的發展。軟腐病徵的發展為測量其水浸狀組織的直徑。

Table 1-2. Soft rot development in orchid mycorrhizal fungi (OMF) inoculated *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' and *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111). Soft rot development was characterized by forming clear circle zone.

Orchid cultivar	Treatment ^x	<i>Erwinia chrysanthemi</i> conc. (OD ₆₀₀)	
		10 ⁻¹	10 ⁻³
Clear circle zone (mm) ^y			
V31	NM	7.0a	4.1a
	R02	4.3b	2.2b
	R04	6.0a	3.2a
KC1111	NM	6.9a	3.9a
	R02	6.4ab	4.2a
	R04	5.7b	3.2a

^zTen replicates were tested for each treatment

^yMeans are signified in each column followed by different letter at 5 % significant level as determined by Duncan's multiple range test.

^xNM:non- mycorrhiza. R02 and R04: inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04.

第三節 接種蘭菌之蝴蝶蘭其抗病機制探討

前言

由以上章節可見，蘭菌對蘭科植物之生長確有其影響，但是在機制方面還有很大的空間去探討；為了要讓蘭菌在蝴蝶蘭產業化過程中能發揮功能，其促進蝴蝶蘭生長、抗逆境甚或開花的生理及基因分子層次的相關資料，成為其推廣不可或缺的条件。由於蝴蝶蘭並無完整的基因庫可供應用，若要瞭解接種蘭菌究竟誘發了那些基因，抑制性扣減雜合技術(suppression subtractive hybridization, SSH) (Lukyanov等氏，2007；Diatchenko等氏，1996；von Stein等氏，1997)將是一種好的方法；它將標準化(normalization)及扣減(subtraction)合併於一步驟完成，避免數量少的訊息在過程中遺失，如果再加上抑制性PCR法(suppression polymerase chain reaction)，則可加強微量表現的cDNA，此類序列可被加強1000倍以上(Diatchenko等氏，1996)，能夠減低因不同基因之間RNA量的不同所造成的干擾，並且大幅度提高了偵測差異表現的RNA之靈敏度，因此實為相當有效之利器。SSH之做法為，取實驗組RNA製成Tester cDNA，取對照組RNA製成Driver cDNA後，將Tester cDNA分成兩組，分別接上不同的adaptor，再分別以大量的同一組Driver進行第一次的hybridization。經過此步驟可將不同的RNA的量標準化(normalization)，之後再將兩組接上不同adaptor的Tester cDNA混合後，加入新鮮的Driver cDNA 進行第二次的hybridization。在此步驟中，帶有不同adaptor的同一個基因之ssDNA將會黏合，形成帶有兩種adaptor的dsDNA。最後再利用根據adaptor設計的Primer進行PCR，此時帶有同一種adaptor的cDNA會因為兩端的adaptor互相黏合而無法被PCR放大 (Suppression PCR)，因此能夠被放大的皆是具有差異表現情形且帶有不同adaptor的cDNA，選殖這些cDNA進行定序後，則可得到具有差異表現情形的基因。

不同蘭菌分別接種蝴蝶蘭大白花栽培種 *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111)、大紅花栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'後，

其根系或全株材料與未接種者經 SSH 分離出基因定序並透過 BLAST 比對，先期將目標著重在營養吸收(Paszkowski 等氏，2002; Wang 等氏，2002; Nazoa 等氏，2003)、抵抗逆境(Hause 等氏，2002; Bonfante 等氏，1996; Harrison，1996; Journet 等氏，2001; Wulf 等氏，2003)等相關基因，以做為蘭菌推廣時的依據。SSH 技術被引用後，曾成功地鑑定出人類中與癌症相關的基因(von Stein 等氏，1997; Kuang 等氏，1998)，植物則最先在 ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*)中分離出三個受鹽類誘導之少量 cDNA(Yen 等氏，2000)；目前 SSH 已成為研究相關議題最強而有力的方法，本試驗以抑制型 PCR 法加上 SSH 探討蘭菌在蝴蝶蘭中的分子差異表現，是未來推廣蘭菌、拓展蝴蝶蘭產業過程不可或缺的基礎。



材料與方法

研究材料

本試驗之植物材料為目前業界蝴蝶蘭外銷主力品種，大白花蝴蝶蘭 KC1111 (*Doritaenopsis Taisuco Wonder 'King Car Butterfly'*)及大紅花蝴蝶蘭 V31 (*Phalaenopsis Tai Lin Redangel 'V31'*)，來源為牛記花卉農場或金車生物科技所生產之瓶苗。出瓶時分別接種 *Rhizoctonia* spp. (R02)及(R04)菌種，以高溫消毒過之智利水苔栽培，栽種於 28/23 °C 日/夜溫、光照強度 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，每日 12 小時光週期，相對濕度 70%的植物生長箱環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)灌溉一次。

蘭花根部RNA之萃取

分別選取栽培2個月及4個月之蝴蝶蘭大白花栽培種KC1111及大紅花栽培種V31之菌根及非菌根植株，採集其根部樣本，菌根植株每處理20 g，非菌根植株每處理40 g，儲存於-80 °C 冰箱。進行RNA萃取時，每次拿取4克根部樣本，分置於二研鉢，加入液態氮將其研磨成粉末狀後，每一研鉢加入 12 mL 之 TRIZOL(GIBCOBRL)試劑，混合均勻後，將其平均置入16管1.5 mL之ependorf tube 中後，依據TRIZOL(GIBCOBRL)試劑萃取多醣類含量較高之總RNA建議方式進行蝴蝶蘭根部總RNA萃取，依此方法，每4 g之蝴蝶蘭根部樣本，約可獲得總RNA 100-150 μg 。

mRNA純化

本試驗之mRNA之純化，以Oligotex mRNA Mini Kit(QIAGEN)進行，每400 μg 之總RNA經純化後約可獲得2 μg 之mRNA。

抑制型扣減雜合(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)

本試驗之SSH操作，以PCR-selected cDNA subtraction Kit (Clontech Lab, Inc., Palo Alto, CA, USA) 進行差異表現基因片段放大。所獲得之PCR放大片段，以1% agarose進行電泳後，在紫外光板上，將分子片段大小約0.5-1.5 kb之DNA片段以小刀切割挖出，挖出之含差異表現基因片段之 agarose gel，最後以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit(Geneaid)進行純化。

SSH次基因庫建立

將純化後之SSH產物PCR放大片段，以pGEM-T Easy Vector(Promega)進行植體構築，形成重組質體。接著把重組質體轉殖入高效率之大腸桿菌(*E. Coli*)勝任性細胞JM109($\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g DNA)。加入SOC培養基，於37°C 震盪培養1小時後將菌液均勻塗抹於含ampicillin $0.1 \cdot L^{-1}$ 、X-gal及IPTG之LB平板培養基上，以藍白篩選方式來篩選含有正確重組質體的菌落。由本次試驗選取2個蝴蝶蘭栽培種KC1111及V31，分別接種R02、R04菌種，於生長箱內生長2個月及4個月共8個不同處理組別，共挑選出白色菌落。使用High-Speed Plasmid Mini Kit(Genedid)自大腸桿菌中抽出重組質體後，以*EcoRI*內切酵素，於37°C作用2小時條件下進行重組質體切割，確認inserts是否正確插入重組質體。挑選768個菌落，經確認後確有插入片段之重組質體送至基龍米克斯公司進行核酸定序。

基因比對

所得到之核酸片段序列，利用BLAST network service (National Institutes of Health) 進行BLASTx比對，並由結果中篩選出可能與促進蝴蝶蘭養分吸收及抗病、抗逆境相關之有意義的基因。

RT-PCR之Primer設計

進行RT-PCR所需之Primer，依據表一之結果，以OLIGO 4.0 Primer分析軟體進

行分析設計，表中之紅色部位為Primer序列設計之依據，所有引子依其相似之基因排列如下：

cytochrome P450 monooxygenase

Primer A1

序列 5' AGCCAAACTCCCCACC 3'

長度: 16

Td=59.4°C

Primer A2

序列 5' CATGAACGGATTAACGAGATT 3'

長度: 20

Td=58.2°C

GDA2

Primer B1

序列 5' AGAATCTCGTTTTCTGCT 3'

長度: 20

Td=60.4°C

Primer B2

序列 5' GAGTCGGAATTTGGGACC 3'

長度: 18

Td=61.5°C

Pectinesterase

Primer C1

序列 5' GCTGCCATTACTAACCAAGA 3'



長度: 20

Td=59.8°C

Primer C2

序列 5' TGTTCTGGATGCGGAGGT 3'

長度: 18

Td=63.2°C

PVPR3

Primer D1

序列 5' ATGATTGCAGTTTTGACTACAA 3'

長度: 22

Td=59.6°C

Primer D2

序列 5' ATCTTGACGATCTTGGAAGC 3'

長度: 20

Td=60.9°C



GRX

Primer E1

序列 5' CGAGCACCCACGTCTTAG 3'

長度: 19

Td=60.5°C

Primer E2

序列 5' GGCTTGAGGAGACGGTGA 3'

長度: 18

Td=62.8°C

LEA5

Primer F1

序列 5' CATCTTGCGCAGCTCA 3'

長度: 22

Td=59.2°C

Primer F2

序列 3' CTCGTGCTATCTCGAACGGA 5'

長度: 20

Td=65.4°C

RT-PCR比較菌根及非菌根蝴蝶蘭植株根部基因表現量之差異

使用RT-PCR方法確定基因表現之試驗，以出瓶後栽培2個月之蝴蝶蘭大白花栽培種KC1111、大紅花栽培種V31之菌根及非菌根植株根部抽取所得之總RNA作為模版。以One Step RT-PCR Kit(GeneMark)進行基因表現量分析，RNA模板每個反應(50 µl)加入2 µg總核酸，上游及下游Primer各0.2 µg。第一股cDNA合成條件為50°C 30分鐘後置入94°C 2分鐘中止只酵素反應。第二股DNA合成及PCR放大條件為，每循環94°C 30秒，55°C 30秒，72°C 30秒，共35個循環。PCR之產物以1%之agrose進行電泳分析，以陳虹樺教授研究室所提供之蝴蝶蘭細胞結構蛋白actin9，作為常態性表現之對照，用以比較菌根及非菌根蝴蝶蘭植株根部基因表現之差異。

結果與討論

在蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 及大紅花栽培種 V31，出瓶時接種蘭菌，經二個月及四個月之栽培後，以抑制性扣減雜合技術(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)，將差異性表現基因放大之試驗中，其 SSH 產物經二次 PCR 放大後，以 1% agarose 進行電泳，所得到之蝴蝶蘭菌根及非菌根植株之差異性表現基因長度，呈片狀連續分布(圖 1-8)。選取其中長度約 500-1500 bp 之基因片段進行純化粹取，以之建立 SSH 次基因庫。由此次基因庫，挑選出之 768 個菌落，經送至基龍米克斯公司進行定序。定序後所獲得之基因片段序列，經 BLASTx 比對分析，得到 6 個與其他高等植物 cytochrome P450 monooxygenase、G2 pea dark accumulated gene (GDA2 protein)、pectinesterase、*Phaseolus vulgaris* pathogenesis-related protein (PVPR3)、glutaredoxin (GRX)、Late embryogenesis abundant protein 5 (LEA5) 等抗病、抗逆境相關基因有極高相似度之基因，在菌根及非菌根蝴蝶蘭根部有差異性表現，其相似度見表一。其中 Identities 表示二基因間胺基酸序列相同之比例，而 Positives 表示胺基酸功能相同之比例。在植物體中，部份胺基酸之序列可能不同，但這些胺基酸在蛋白質中之功能應為一致。

Cytochrome P450 monooxygenase 為一與植物抗逆境物質之生成有密切關係之基因，其表現量增加可提高植物在逆境中之存活能力(Wellesen 等氏，2001；Emre 等氏，2007)。

GDA2 是一與 G2 豌豆(*Pisum sativum* L.)短日照條件下不衰老現象緊密相關的基因之一(Li 等氏，1998)。

Pectinesterase，為催化果膠的甲氧酯水解產生果膠酸和甲醇之酵素，可將植物細胞壁之果膠分解成小分子片段，誘導植物之抗病機制啟動(Machinandiarena 等氏，2005)，在馬鈴薯(potato)栽培的過程中，接種雙核絲核菌(Binucleate *Rhizoctonia*)，可使馬鈴薯產生許多小分子多醣，誘使其防禦機制啟動，有效抑制其受到病原微生物 *Rhizoctonia solani* 感染。

PVPR3 是在菜豆中被發現的一種抗病蛋白，它在病原菌入侵或植株受傷時會大量表現，誘導酚類化物生成途徑中二個酵素大量表現。(Sharma 等氏，1992; Walter 等氏，1990)。

GRX 可增加植物細胞內蛋白質之穩定度，使其可對抗氧化逆境(Cheng 等氏，2006)。

LEA5 是一個可以增加植物對低溫、高鹽等逆境耐受能力之蛋白(Shimamura 等氏，2006; Shih 等氏，2004)。

此外，本次研究尚得到二個可能為轉錄因子及一些應為蘭菌本身所產生之基因之片段序列，然這些序列經分析比對，多為功能不明之基因或非植物產生之基因，在此暫不探討。

針對這 6 個可能之差異性表現基因，設計引子，以 RT-PCR 方式進行更進一步之確認。結果證實，cytochrome P450 monooxygenase、GDA2 protein、pectinesterase、PVPR3、GRX 及 LEA5 等 6 個基因，雖然在大白花蝴蝶蘭栽培種 KC1111 及大紅花蝴蝶蘭栽培種 V31 上，表現量皆有所差異，且接種不同種蘭菌時，其表現量亦有所不同(圖 1-9)。其中，這 6 個基因在蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 上，表現量增加幅度較大，而接種 R02 之菌根植株，與 PVPR3、glutaredoxin 相似的二個基因之表現量亦高於接種 R04 之菌根植株(圖 1-9)。而在蝴蝶蘭大紅花栽培種 V31 上，這 6 個基因之表現雖有所增加，但增加量不如大白花栽培種 KC1111 顯著(圖 1-9)。

以 SSH 方法，進行差異性表現量基因比較，所獲得之結果，經核酸定序及 BLAST 比對，獲得到多個與其他種類植物 cytochrome P450 monooxygenase、GDA2、pectinesterase、PVPR3、GRX 及 LEA5 等六個抗病、抗逆境相關之基因有極高相似度之差異性表現基因(表 1-3)。以 RT-PCR 的方式驗證，証實此六個基因確實為差異性表現基因(圖 1-9，這些基因的表現增加量，在蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 上有較顯著之增加；在大紅花 V31 栽培種上，這些基因的表現增加量較不顯著。依所接種之蘭菌不同，這六個基因之表現增加量亦略有差異；接種 R02 菌

種之組別，略高於接種 R04 菌種之組別，但就大體而言，所有菌根植株，這些基因之表現量，皆有顯著之增加；這或許與接種蘭菌，可增加蝴蝶蘭小苗出瓶之存活率有關(陳，2004)。雖然此推測在目前所有與蝴蝶蘭抗逆境相關之文獻中，尚未有任何證據能夠加以佐證，然在其他高等植物中，接種其他種類微生物，如叢枝菌根菌(AM)所形成之菌根植株，許多抗逆境相關之基因表現量皆大幅增加相似(Hause 等氏，2002; Journet 等氏，2002; Wulf 等氏，2003)，其中 pectinesterase 在 2005 年，更被證實與馬鈴薯接種無致病性雙核絲核菌抑制病原微生物 *Rhizoctonia solani* 之感染相關(Wolsai 等氏，2005; Machinandiarena 等氏，2005)。

在 2004 年陳及 2004 年王的研究中，亦發現接種蘭菌可促進部份品系蝴蝶蘭之生長，然在本次試驗中，我們並沒有得到任何可能與高等植物營養吸收相關之基因片段，此結果與其它非蘭科菌根植物在菌根形成後，許多與氮、磷、鉀吸收相關基因表現量增加有所差異(Paszkowski 等氏，2002; Wang 等氏，2002; Nazon 等氏，2003)，此現象可能是由於本研究所使用之蘭菌其作用可能具品種之專一性，在不同蝴蝶蘭栽培種上之表現不同所造成；或因蝴蝶之根為氣生根，養份吸收並非其唯一主要功能，尚有儲存養分及進行光合作用等功能，故這一類之基因表現量可能不高。

此外，接種蘭菌，亦可促使多個不同品系蝴蝶蘭之葉片葉綠素濃度提高(陳，2004)，由此推測，接種蘭菌所造成之小苗生長促進，也可能是由於其葉片光合作用能力提高所造成。然本研究之重點，著重在於探討其根部基因表現差異，故未獲得任何可能與生長促進有關之基因。其確切機制，尚待未來更進一步研究方能加以探討。

結論

本研究於蝴蝶蘭瓶苗出瓶時接種蘭菌，經二個月及四個月之栽培後，以抑制性扣減雜合技術(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)，比較菌根與非菌根蝴蝶蘭根部基因表現之差異。結果得到6個與其他高等植物之cytochrome P450 monooxygenase、GDA2 protein、pectinesterase、PVPR3、GRX、LEA5等抗病、抗逆境蛋白具極高相似度之核酸序列，經RT-PCR之方法確認後，證實蝴蝶蘭大白花栽培種KC1111之菌根植株，其抗病、抗逆境基因確實有較高之表現量。由此推測，蝴蝶蘭之菌根植株，出瓶存活率提高，可能是由於這些抗病、抗逆境基因的表現量提高所造成。



第三節圖表

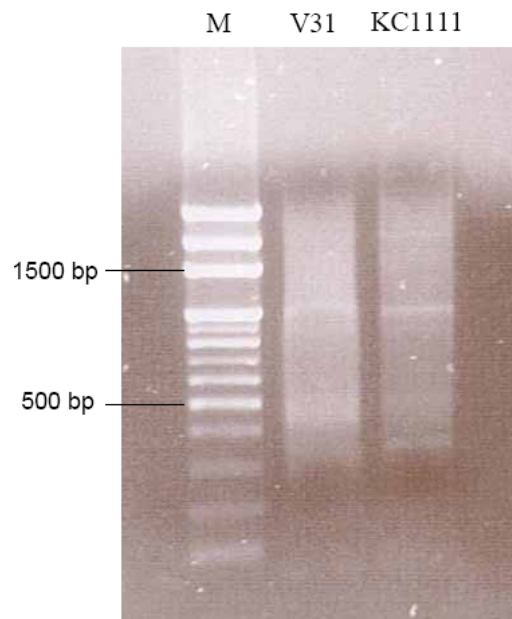


圖 1-8、蝴蝶蘭大白花栽培種 KC1111 及大紅花栽培種 V31 接種 R02 菌種之菌根，以 Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 實驗後，經電泳分析的結果。

Figure 1-8. Electrophoresis analysis of Suppression Subtractive Hybridization (SSH) products that used R02 inoculated root of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' and *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) as template.

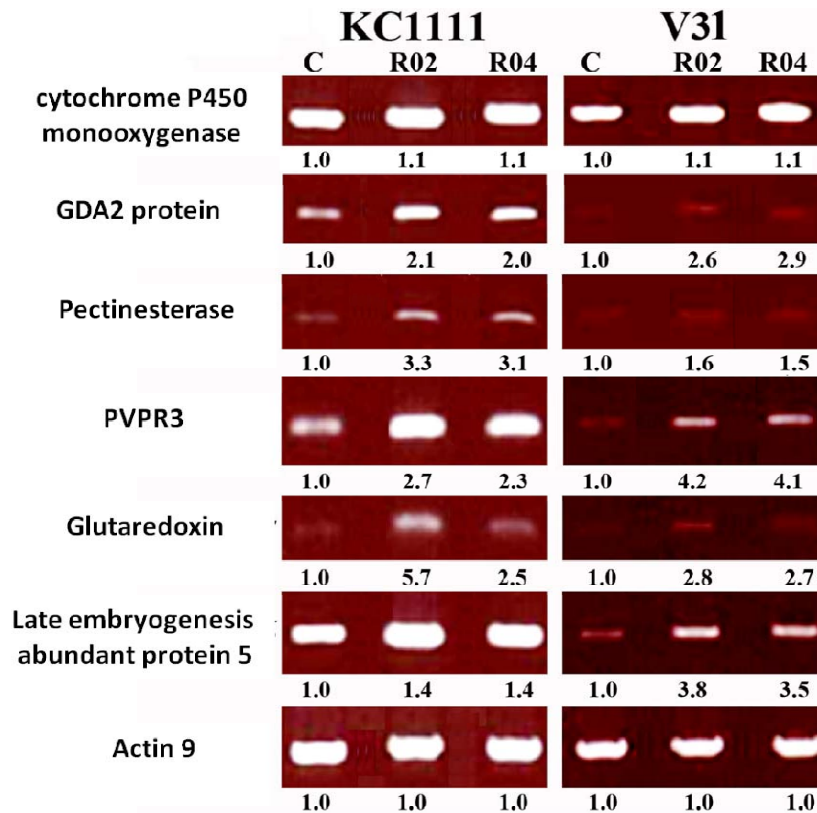


圖 1-9、以 RT-PCR 分析蝴蝶蘭大紅花栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'、*Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) 根部 cytochrome P450 monooxygenase、GDA2 protein(G2 pea dark accumulated gene)、pectinesterase、PVPR3(Phaseolus vulgaris pathogenesis-related protein)、GRX(glutaredoxin)、LEA5 (Late embryogenesis abundant protein 5) 等 6 個基因之基因表現量。C 表示未接種蘭菌之非菌根植株；R02 及 R04 分表代表接種 R02 及 R04 蘭菌所形成之菌根植株。分別偵測 Actin9 作為 RNA 濃度校正之對照。以未接種蘭菌之非菌根植株為 1.0，相對基因的表現量標示在下方。

Figure 1-9. Analysis expression level of cytochrome P450 monooxygenase、GDA2 protein(G2 pea dark accumulated gene)、pectinesterase、PVPR3(Phaseolus vulgaris pathogenesis-related protein)、GRX(glutaredoxin)、LEA5 (Late embryogenesis abundant protein 5) in root of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' and *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) by RT-PCR. C indicated non orchid mycorrhizal fungi (OMF) *Phalaenopsis*. R02 and R04 indicated different OMF *Phalaenopsis*. Actin9 used as internal control. Gene expression level of non OMF *Phalaenopsis* as a 1.0 and relative level as indicated below.

表 1-3、蝴蝶蘭接種蘭菌後誘導根部差異性表現基因經 Suppression subtractive hybridization 篩選後所獲得基因片段經 BLASTx 比對之結果。

Table 1-3. OMF induced genes isolated in infected Phalaenopsis root tissues by Suppression subtractive hybridization. Gens BLASTx results was show.

Gene	Species	Identities	Positives	E Value	no.
25S rRNA					153
GDA2 protein (G2 pea dark accumulated gene)	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	32/37 (86%)	36/37 (97%)	3.00E ⁻¹¹	2
Pectinesterase	<i>Medicago truncatula</i>	187/299 (62%)	222/299 (74%)	1.00E ⁻⁸⁴	1
cytochrome P450 monooxygenase	Maize	49/55 (89%)	49/55 (89%)	2.00E ⁻²⁴	2
PVPR3	<i>Phaseolus vulgaris</i> (菜豆)	26/35 (74%)	32/35 (91%)	8.00E ⁻⁰⁹	1
glutaredoxin family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24/29 (82%)	26/29 (89%)	2.00E ⁻⁰⁶	1
LEA5 family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	22/40 (55%)	27/40 (67%)	1.00E ⁻⁰⁵	2
putative elongation factor 1-gamma-like	<i>Solanum tuberosum</i> (馬鈴薯)	32/37 (86%)	36/37 (97%)	3.00E ⁻¹¹	2
antifreeze protein	<i>Saussurea involucrata</i> (雪蓮)	58/131 (44%)	63/131 (48%)	2.00E ⁻¹²	3
nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	35/48 (72%)	40/48 (83%)	2.00E ⁻¹²	7
retrotransposon-like protein	<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)	36/38 (94%),	36/38 (94%),	2.00E ⁻¹⁴	1
unknown protein	Bacteria				123
TonB-dependent receptor	<i>Caulobacter sp.</i> K31	57/67 (85%)	62/67 (92%),	2.00E ⁻⁴⁶	57
Squalene/phytoene synthase	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	131/169 (77%)	145/169 (85%)	1.00E ⁻⁹⁷	16
oxidoreductase, molybdopterin binding	<i>Acidovorax sp.</i> JS42	141/174 (81%)	162/174 (93%)	1.00E ⁻⁸¹	9
DNA gyrase, A subunit	<i>Brevundimonas diminuta</i>	101/106 (95%)	102/106 (96%)	9.00E ⁻⁵²	5
ATP-dependent protease La	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	123/134 (91%)	131/134 (97%),	1.00E ⁻⁶³	2
cell wall-associated hydrolase	<i>Vibrio cholerae</i> AM-19226	21/34 (61%),	23/34 (67%),	0.045	5

參考文獻

- 王美琇. 1999. 蘭共生菌與數種蘭科植物生長與發育之影響與應用. 台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 王元甫. 2004. 蘭菌與植物生長素對蝴蝶蘭生長與開花之影響. 台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 朱欽昌. 1987. 蘭科植物的內生菌根菌與蘭菌共生. 洋蘭月刊 **17**:59-62.
- 朱俊南. 2000. 蘭花菌根菌之分離與接種對文心蘭幼苗生長之影響. 屏東科技大學熱帶農業研究所碩士論文.
- 李自強. 1999. 蘭共生菌對一葉蘭與（彩葉蘭×金線連）雜交種生長與發育之影響. 台大園藝學研究所碩士論文.
- 李明治. 2001. 蘭菌(絲核菌)之生理、菌種生產及其對台灣金線連生長之影響. 台大園藝學研究所碩士論文.
- 李岍. 1990. 蘭之胚培養. 中國園藝 **36**:223-244.
- 李岍、李嘉惠. 1991. 台灣蝴蝶蘭根和葉的形態與解剖的特性. 中國園藝. **37**: 237-248.
- 李岍. 1992. 台灣原生蘭在園藝上之研究. 台灣生物資源調查及資訊管理研習會論文集. 303-317.
- 李岍. 1995. 蘭科植物. 農家要覽農作篇（二）. 665-684.
- 李岍、李嘉慧. 1996. 蝴蝶蘭花芽誘引和花序發育時之碳水化合物變化. 中國園藝 **42(3)**:262-275.
- 李岍、王明吉. 1997. 白花蝴蝶蘭由幼年到成熟相之礦物成分和碳水化合物之變化. 中國園藝. **43(4)**:295-305.
- 李華榮. 1999. 絲核菌的菌絲融合群及其遺傳多樣性研究的新進展. 菌物系統 **18(1)**:100-109.
- 邱麗慧、王玉麒、詹明才. 2000. 植物與溫度逆境的交感作用I、植物低溫逆境的傷害. 科學農業 **48**: 254-258.

- 林育如. 1994. 光、溫度與生長調節劑對蝴蝶蘭生長與開花之影響。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。
- 林育如. 2002a. 蝴蝶蘭腋芽發育與開花調控關係之研究。國立臺灣大學園藝學研究所博士論文。
- 林秋芬. 2002b. 蘭菌對石斛蘭種子發芽與幼苗生長之影響。國立中興大學園藝研究所碩士論文。
- 林讚標. 1976. 台灣蘭科植物第一卷. 南天出版社。
- 陳俊成. 2005. 蘭菌配合植物生長物質對拖鞋蘭生育之影響。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。
- 柯勇. 2002. 植物生理學. 藝軒圖書出版社. 台北。
- 周玲勤. 2004. 台灣金線蓮、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與栽培. 國立台灣大學園藝學研究所博士論文。
- 胡弘道. 1990. 林木菌根. 千華出版公司. 台北。
- 陳俊成. 2005. 蘭菌配合植物生長物質對拖鞋蘭生育之影響。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。
- 莊錦華、李晔. 1985. 蘭苗共生下之生長生理. 中國園藝 **31**: 189-200.
- 康繼文. 2004. 蘭菌與植物生長素對藥用石斛蘭生長發育之影響. 台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 張喜寧、林秀霏、周玲勤、藍亦青. 2004. 蘭菌的量產與應用. 93 年國科會計劃報告
- 張喜寧. 2003. 蘭菌的量產與應用. 國科會專題研究計劃成果報告。
- 張博勛. 2007. 蘭菌、植物生長物質與石斛蘭的生長及有效成分 moscatilin 含量的相關性. 台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 曾千容. 2002. 石斛蘭蘭菌之分離、鑑定與培養及其對石斛蘭生長之影響. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 楊映齡. 2008. 蘭花菌根及藥劑處理與蝴蝶蘭及朵麗蝶蘭抗蕙蘭嵌紋病毒之相關

- 性. 台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 蔡麗君. 2003. 蘭菌與植物生長素對拖鞋蘭生長發育之影響. 台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 蔡靜怡. 1997. 蘭菌及溫度對台灣金線連生長之影響. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 蔡瑜卿. 2004. 植物組織培養種苗業者名錄
- 蔡瑜卿. 2008. 植物組織培養種苗業者名錄
- 蔣家淡、林延生、詹正宜、鮑曉紅、劉亨平. 2001. 菌根生物技術應用現狀與研究進展. 江西農業大學學報. **23**: 216-219.
- 趙楊景、郭順星、高薇薇、杜淑燕. 1999. 三種內生真菌與大花蕙蘭共生對礦質營養吸收的影響. 園藝學報 **26**(2):110-115.
- 藍亦青. 2001. 蘭菌對蝴蝶蘭與拖鞋蘭生長與發育之影響. 台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 蘇明志. 1996. 台灣白及共生現象之初步研究. 台灣大學森林研究所碩士論文.
- Alexander, C. and G. Hadley. 1984. The effect of mycorrhizal infection of *goodyera repens* and its control by fungicide. *New Phytol.* **97**:391-400.
- Allington, W. B. 1936. Sclerotial formation in *Rhizoctonia solani* as affected by nutritional and other factors. *Phytopathology* **26**:831-844.
- Arditti, J. 1966. The effects of niacin, adenine, ribose, and niacinamide coenzymes on germinating orchid seeds and young seedlings. *Ochids. Sci. Amer.* **214**: 70-78.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* **33**:1-97.
- Arditti, J. R. Ernst, T. W. Yam, and C. Glabe. 1990. The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: A speculative review. *Lindleyana* **5**:249-255.
- Babich, H. and G. Stotzky. 1978. Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and colihages: influence of chloride ions, *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:906-914.

- Bernard, N. 1904. Recherches experimentales sur les Orchidees. Rev. gen. Bot. **16**: 405-451.
- Bernier, G., A. Havelange., C. Houssa., A. Petitjean. and P. Lejeune. 1993. Physiological signals that induce flowering. Plant Cell. **5**: 1147-1155.
- Bernier, G. and C. Perilleux 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. Plant Biot. J, **3**:3-16.
- Beyrle, H. F. 1991. The Role of Nitrogen Concentration in Determining the Outcome of the Interaction between *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo and *Rhizoctonia* sp. Penningsfeld and B. Hock. 665-672.
- Beyrle, H.F. and S.E. Smith. 1993. Excessive carbon prevents greening of leaves in mycorrhizal seedlings of terrestrial orchid *Orchis morio*. Lindleyana. **8**:97-99.
- Beyrle, H.F., Smith, S.E., Franco, C.M.M. and R.L. Peterson. 1995. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. Canadian Journal of Bot. **73**:1128-1140.
- Bonfante, P., R. Bergero, X. Uribe, C. Romera, J. Rigau and P. Puigdomenech. 1996. Transcriptional activation of a maize –tubulin gene in mycorrhizal and transgenic tobacco plant. Plant J. **9**:737-743.
- Burgeff, H. 1959. Mycorrhiza of orchids, C. Withner, Editor, *The orchids: A Scientific Survey*, The Roland Press, New York . 361–395.
- Cameron, D. D., J. R. Leake and D. J. Read. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. New Phytol. **171**: 405-416.
- Campos, K. O., G. B. Kerbauy. 2004. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). J. Plant Physiol. **161**: 1385-1387.

- Chang, S.T., W.S. Chen., C.Y. Hsu., H.C. Yu., B.S. Du and K.L. Huang. 1999. Changes in cytokinin activities before, during and after floral initiation in *Polianthes tuberosa*. Plant Physiol. Biochem. **37**:679-684.
- Cheng N. H., J. Z. Liu , A. Brock, R. S. Nelson and D. H. Kendal. 2006. AtGRXcp, an Arabidopsis Chloroplastic Glutaredoxin, Is Critical for Protection against Protein Oxidative Damage. J. Biol. Chem. **281(36)**: 26280-26288
- Chen W. S., H. Y. Liu, Z. H. Liu, L. Yang, and W. H. Chen. 1994. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. Physiol. Plant. **90**:391-395.
- Chen W. S. and H. W. Chang. 1997. Gibberellic acid and cytokinin affect *Phalaenopsis* flower morphology at high temperature. HortScience **32(6)**:1069-1073.
- Chen, W.S., Huang, K.L. and Yu, H.C. 1997. Cytokinins from terminal buds of *Euphoria longana* during different growth stages. Physiologia Plantarum **99**:185-189.
- Christenson, E. A. 2001. Phalaenopsis: A Monograph. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Cordier, C., M. J. Pozo, J. M. Barea, S. Gianinazzi, and V. G. Pearson. 1998. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Molecular Plant-Microbe Interactions **11**:1017-1028.
- Curtis, J.T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Am. J. Bot. **26**:390.
- Curtis, M. D., J. Gore, and R. P. Oliver. 1994. The phylogeny of the tomato leaf mould fungus *Cladosporium fulvum* sym. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. Curr. Genet. **25**: 318-322.

- Cui, Y. Y., M. W. Jeon, E. J. Hahn and K. Y. Paek. 2004. Concentration of nutrient solution and growing media affect growth and flowering of *Doritaenopsis* 'Tinny Tender'. *Acta Hort.* **644**:77-83.
- Daie, J. and R. R. Wyse. 1985. Evidence on the mechanism of enhanced sucrose uptake at low cellular turgor in leaf discs of *Phaseolus coccineus*. *Physiol. Plant.* **64**: 547-552.
- Deutsch, G. 2001. In vitro-propagation of *Nigritella* (Orchidaceae-Ochideae) from seeds with the help of mycorrhizal fungi. *Phyton* **41**: 111-128.
- Diatchenko, L., Y.-F.C. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyannov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization : A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:6025-6030.
- Duan, J. X. and S. Yazawa. 1994. In vitro floral development in *Doriella* Tiny (*Doritis pulcherrima*! *Kingiella philippinensis*). *Sci. Hort.* **59** :253–264
- Elarosi, H. 1957. Fungal association. II. Culture studies on *Rhizoctonia solani* KÜhn, *Fusarium solani* Snyder and Hansen, and other fungi, and their interaction. *Ann. Bot. N. S.* **21**:569-585.
- Emre, M., F. Isin and P. Guengerich. 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* **1770**: 314-329.
- Endo, M. and I. Ikusima. 1992. Changes in concentration of sugars and organic acids in long-lasting flower clusters of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Physiol.* **33**:7–12.
- Endo, M. and I. Ikusima. 1989. Diurnal rhythm and characteristics of photosynthesis and respiration in the leaf and root of a *Phalaenopsis* plant. *Plant Cell Physiol.* 30:43-47.
- Etsen, A., R. Gervacio, R. Swemmem and D. D. Waele. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza*.

18:251-256.

- Frank, A. B. 1885. Ü ber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernä hrung gewisser Bä ume durch unterirrsische Pilze. Ber. Deut. Bot. Gesell. **3:128-145**
- Ferreira, W. D. M., G. B. Kerbauy, J. E. Kraus, R. Pescador and R. M. Suzuki. 2006. Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoot of *Dendrobium*. J. Plant Physiol. **163: 1126-1134.**
- Fouche, J.G., L. Jouve, J. F. Hausman, C. Kevers and T. Gaspar. 1997. Are temperature-induced early changes in auxin and polyamine levels related to flowering in Phalaenopsis ? J. Plant Physiol. **150:232-234.**
- Fu, S.F. and H. J. Huang. 2011. Molecular Characterization of the Early Response of Orchid Phalaenopsis Amabilis to Erwinia Chrysanthemi Infection. Orchid biotechnology II. 283-308.
- Gallaud, I. 1905. Etudes sur les mycorrhizes endotrophes. Rev. Gen. Bot. **17:5-48.**
- Goh, C. J. 1992. Studies on flowering in orchids- A review and future direction. Proc. Nagoya Inter, Orchid Congress. **92:141-144.**
- Gordon, B. 1989. Phalaenopsis flower induction (or, how to make them bloom). Am. Orchid Soci. Bull. **58: 908-910.**
- Govindarajulu, M., P. E. Pfeffer, H. Jim, J. Abubaker, D. D. Douds, J. W. Allen, H. Bucking, P. J. Lammers and Y. Shachar-Hill. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature **435: 819-823.**
- Harvais, G. and G. Hadley. 1967. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytol. **65:488.**
- Hadley, J. L. and S. E. Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. Britain.
- Hadley, J. B. 1970. The Ocoee Series and its possible correlatives in Fisher, G. W.,

- Pettijohn, F. J., Reed, J. C., Jr., and Weaver, K. N., eds., Studies of Appalachian geology central and southern: Interscience, New York, 247-259.
- Harrison, M. J. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: Altered expression pattern in roots during vesicular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J.* **9**:491-503.
- Hadley, G. and B. Williamson. 1972. Features of mycorrhizal infection in some Malayan orchids. *New Phytol.* **71**:1111-1118.
- Hadley, G. and B. Williamson. 1971. Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* **70**:445-456.
- Hause, B., W. Maier, O. Miersch, R. Kramella and D. Strack. 2002. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* **130**:1213-1220.
- Heil, M., and R. M. Bostock. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Ann. Bot.* **89**: 503-512.
- Hew, C. S. and J. W. H. Yong. 2004. The physiology of tropical orchids in relation to the industry. World Scientific, Second Edition.
- Higuchi, H. and K. Sakai. 1978. Advancing flowering in *Phalaenopsis* by transferring the plants to a higher altitude during the summer. *Res. Bull. Aichi-Ken Agric. Res. Cent B* **10**:40-45.
- Jin, H., P. E. Pfeffer, D. D. Douds, E. Piotrowski, P. J. Lammers and Y. Shachar-Hill. 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **168**:687-696.
- Journet, E. P., N. El-Gachtouli, V. Vernoud, F. de Billy, M. Pichon, A. Dedieu, C. Arnould, D. Morandi, D. G. Barker and V. Gianinazzi-Pearson. 2002. *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*

14:737-748.

- Kinet, J. M., P. Lejeune and G. Bernier. 1993. Shoot-root interactions during floral transition: a possible role for cytokinins. *Environ Exp. Bot.* **33**: 459-469.
- Kluge, M. and I. P. Ting. 1978. Crassulacean Acid Metabolism-Analysis of an ecological adaptation. *Ecological Studies*, vol. 30 Berlin, Heidelberg, New-York. Springer.
- Khaosaad, T., J. M. Garcia-Garrido, S. Steinkellner, and H. Vierheilig. 2007. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol. And Bioche.* **39**:727-734.
- Koske, R. E. and J. N. Gemma. 1997. Mycorrhizae and succession in plantings of beachgrass insand dunes. *Am J Bot* **84**:118–130.
- Kohn, L. M. 1992. Developing new characters for fungal systematic: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* **84**: 139-153.
- Konow, E. A. and Y. T. Wang. 2001. Irradiance levels affect in vitro and greenhouse growth, flowering and photosynthetic behavior of a hybrid *Phalaenopsis* orchid. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **126**: 531-536.
- Kuang, W.W., D. A. Thompson, R. V. Hoch and R. J. Weigel. 1998. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1116-1123.
- Kubota, S, and K. Yoneda. 1993a. Effect of light intensity preceding day/night temperatures on the sensitivity of *Phalaenopsis* to flower. **62**: 595-600.
- Kubota, S, and K. Yoneda. 1993b. Effects of light intensity on development and nutritional status of *Phalaenopsis*. *Journal of the Japan. Soci. For horti. Scien.* **62**: 173-179.

- Li, H. Y., Z. E. Guo and Y. X. Zhu. 1998. Molecular cloning and analysis of a pea cDNA that is expressed in darkness and very rapidly induced by gibberellic acid. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 393-397.
- Looney, N. E., R. P. Pharis and M. Noma. 1985. Promotion of flowering in apple trees with gibberellin A4 and c-3 epi-gibberellin A4. *Planta.* **165**:292-294.
- Lukyanov, S., D. Rebrikov and A. Buzdin. 2007. suppression subtractive hybridization. *Nucleic acid. Hybrid. Modern Appli.* 53-84.
- Madhusudan, T. K., S. Amin, and D. Gopalaraju. 1977. Influence of carbon and nitrogen source on growth and sclerotia formation of the rice sheath blight pathogen. *Mysore J. Agr. Sci.* **11**:544-547.
- Machinandiarena M. F., E. A. Wolski, V. Barrera, G. R. Daleo and A. B. Andreu. 2005. Characterization and in vitro expression patterns of extracellular degradative enzymes from non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* AG-G. *Mycopathologia.* **159**:441-448.
- Matsumoto, T.K. 2006. Gibberellic acid and benzyladenine promote early flowering and vegetative growth of *Miltoniopsis* orchid hybrids. **41**:131-135.
- Matthew, G.B. and E. S. Runkle. 2006. Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. *J. Exp. Bot.* **57**: 4043-4049.
- Matthew, G. B. and E. S. Runkle. 2008. Benzyladenine promotes flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids. *J. Plant Growth Regul.* **27**:141-150.
- Moritz, T., J. J. Philipson and P. C. Oden. 1989. Detection and identification of gibberellins in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) of different ages and coning ability by bioassay, radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Physiol. Plant.* **75**: 325-332.
- Muir, H. 1987. Symbiotic micropropagation of orchid seed. *Orchid Rev.* **91**:44-48.

- Nazoa P., J. J. Vidmar, T. J., K. Mouline, I. Damiani, P. Tillard, D. Zhuo, A. D. Glass and B. Touraine. 2003. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol. Biol.* **52(3)**: 689-703.
- Oden, P. C , B. Andersson and R.Gref. 1982. Identification of gibberellins A9 in extracts of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) by combined gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **247**: 133-140.
- Oden, P. C., L. Schwenen and J. E.Graebe. 1987. Identification of gibberellins in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* **84**: 516-519.
- Oden, P. C., Q. Wang , K. A. Hogberg and M. Werner. 1995. Transport and metabolism of gibberellins in relation to flower bud differentiation in Norway spruce (*Picea abies*). *Tree Physiol.* **15**:415-456.
- Ogoshi, A. and T. Ui. 1979. Specificity in vitamin requirement among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **45**:47-53.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**:125-143.
- Ota, K., K. Morioka and Y. Yamamoto. 1991. Effects of leaf age, inflorescence, temperature, light intensity and moisture conditions on CAM photosynthesis in *Phalaenopsis*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **60**:125–132.
- Otero, J. T., and D. James. 2002. Ackerman and Paul Bayman. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchid. *Amer. J. Bot.* **89**:1852-1858.
- Papavizas, G. C. and C. B. Davey. 1961. Saprophytic behaviour of *Rhizoctonia* in soil. *Phytopathology* **51**:693-699.

- Paszkowski, U., S. Krokrn, C. Roux and S. P. Briggs. 2002. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 13324-13329.
- Peterson, R. L. and H. B. Massicotte. 2004. Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interface. *Can. J. Bot.* **82**:1074-1088.
- Pharis, R. P. and R. W. King. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 517-68.
- Pharis, R. P. and S. D. Ross. 1987. Hormonal promotion of flowering in Pinacea family conifers. - *In Handbook of Flowering* (A. Halevy, ed.). **5**: 269-286.
- Rabie, M. H., A. Y. Negm, M. E. Wleiwa and M. F. Abdel Sabour. 1996. Influence of twosewage sludge sources on plant growth and nutrient uptake. *Egyptian. J. Agri. Res.* **74**: 113-119.
- Rasmussen, H. N. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiol. Plantar.* **86**: 161-167.
- Rasmussen, H., T. F. Andersen and B. Johansen. 1990. Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell and Enviro.***13**: 171-177.
- Rasmussen, H. N., and D. F. Whigham. 1993. Seed ecology of dust seeds *in situ* : a, new study technique and its application in terrestrial orchids. *Amer. J. Bot.* **80**: 1374-1378.
- Rasmussen, H. T. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil.* **244**: 149-163.
- Rosendahl, C. N. and S. Rosendahl. 1991. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. *Environ. Exp Bot.* **31**:313-318.

- Ross, S. D. and R. P. Pharis. 1984. Promotion of flowering in tree crops: Different mechanisms and techniques with special reference to conifer. - *In* Attributes of Trees as Crop Plants (M. G. R. Cannelli and J. E. Jackson, eds). 383-397.
- Sakanishi, Y., H. Imanishi and G. Ishida. 1980. Effect of Temperature on Growth and Flowering of *Phalaenopsis amabilis*. **32**: 1-9.
- Schneider, R. 1953. Studies on the humidity requirements of parasitic fungi. *Phytopathology* **21**:63-78.
- Sharma Y. K., C. M. Hinojos and M. C. Mehdy. 1992. cDNA cloning, structure and expression of a novel pathogenesis-related protein in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**: 89-95
- Shih M. D., S. C. Lin, J. S. Hsieh, C. H. Tsou, T. Y. Chow, T. P. Lin and Y. I. Hsing. 2005. Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Mol. Biol.* **56(5)**:689-703
- Shimamura C., R. Ohno, C. Nakamura and S. Takumi. 2006. Improvement of freezing tolerance in tobacco plants expressing a cold-responsive and chloroplast-targeting protein WCOR15 of wheat. *J. Plant Physiol.* **163(2)**:213-219
- Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* **45**: 488-499.
- Sneh, B., L. Burpee and A. Ogoshli. 1991. Identification of Rhizactonia species. APS Press. St. Paul. Minnesota, USA.
- Su, W. R., W. S. Chen., K. Masaji, L. N. Mander, L. S. Hung., W. H. Chen, Y. M. Fu and K. L. Huang. 2001. Changes in gibberellin levels in the flowering shoot of *Phlaenopsis hybrida* under high temperature conditions when flower development is blocked. *Plant Physiol. Biochem.* **39**:45-50.
- Szarek, S.R., B. J. Johnson and I. P. Ting. 1973. Drought adaptation in *Opuntia basilaris*. *Plant Physiol.* **52**: 539-541.

- Taiz L. and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Tran Thanh Van, M. 1974. Methods of acceleration of growth and flowering in a few species of orchids. Am. Orchid Soc. Bull. **43**:699-707.
- Ting, I. P. 1985. Crassulacean acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. **36**:596-622.
- Uetake, Y., K. Kobayashi and A. Ogoshi. 1992. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C. Mycol. Res. **96**: 199-209.
- US Department of Agriculture. 2010. Floriculture crops 2009 summary. Agricultural Statistics Board, Washington, DC
- Vasudeva, Y. S. 1936. Studies on the root diseases of cotton in the Punjab. Some studies in the physiology of the casual fungi. Ind. J. Agr. Sci. **6**:904-916.
- Vaz, A. P. A. 2002. Crescimento vegetativo e floral em plantas de *Psychomorphis pusilla* (Orchidaceae). Ph.D dissertation, University of Sao Paulo, Brazil.
- Verhoeff, K. 1963. Tomato root rot cause by *Corticium solani*. Neth. J. Plant. Path. **69**:265-278.
- Vereniging van Bloemenveilingen in Nederland. 2010. Annual report 2009. Association of Dutch Flower Auctions, Leiden, The Netherlands
- Von Stein O. D., W. G. Thies and M. Hofmann. 1997. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. Nucleic Acids Res. **25**: 2598-2602.
- Walter M. H., J. W. Liu, C. Grand, C. J. Lamb and D. Hess. 1990. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. Mol. Gen. Genet. **222(2-3)**:353-60.

- Wang, Y. T. 1996. Effects of six fertilizers on vegetative growth and flowering of phalaenopsis orchids. **65**:191-197.
- Wang, Y. T. 1998. Deferring flowering of greenhouse-grown Phalaenopsis orchids by alternating dark and light. *J. Amer. Soc. HortScience*. 123(1):56-60.
- Wang, Y. T. 2000. Impact of a high phosphorus fertilizer and timing of termination of fertilization on flowering of a hybrid moth orchid. **56**:434-436.
- Wang, W. Y., W. S. Chen, W. H. Chen, L. S. Hung, and P. S. Chang. 2002. Influence of abscisic acid on flowering in Phalaenopsis hybrida. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002)97-100.
- Wang, Y. T. 2004. Flourishing market for potted orchids. *Flower TECH* **7(5)**:2-5.
- Wang, Y. H., D. F. Garvin and L. V. Kochian. 2002. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. *Plant Physiol.* **130(3)**:1361-1370.
- Wellesen K., F. Durst, F. Pinot, I. Benveniste, K. Nettesheim, E. Wisman, S. Steiner-Lange, H. Saedler and A. Yephremov. 2001. Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid omega -hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci.* **98(17)**:9694-9.
- Wolsai E. A., C. Lima, R. Aquisti, G. R. Daleo, A. B. Andreu and R. M. De Lederkremer. 2005. An alpha-glucan elicitor from the cell wall of a biocontrol binucleate Rhizoctonia isolate. *Carbonhydr Res.* **340(4)**:619-627
- Wu, Z.Y., Y. Fang, X. Chen, H. L. Zhang , M. Z.Zhang and B.Li. 2010. Pathogen identification of bacterial soft rot in moth orchid in Zhejiang Province. *J. Zhe. For. Coll.* **46**: 58-69.
- Wulf, A., K. Manthey, J. Doll, A. M. Perlick, B. Linke., T. Bekel, F. Meyer, P. Franken, H. Kuster and F. Krajinski. 2003. Transcriptional changes in response to

- arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:306-314.
- Yen, H. E., S. M. Wu, Y. H. Hung and S. K. Yen. 2000. Isolation of 3 salt-induced low-abundance cDNA from light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum* by suppression subtractive hybridization. *Physiologia Plantarum.* **110**: 402-409.
- Yeonda, K. 1985. Effects of plant age and time of transfer to highland during summer on *Phalaenopsis* flowering. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **54**: 101-108.
- Yonededa, K., Kubota Staoshi, F. Yonemoto and T. Matsumoto. 2000, Effects of Various Irrigation Methods on Growth and Inflorescence Emergence in *Phalaenopsis* and *Doriteanopsis*. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* **46**: 297-304.
- Young, H. C. and C. W. Bennett. 1922. Growth of some parasitic fungi in synthetic culture media. *Amer. J. Bot.* **9**:459-469.
- Zettler, L. W., F. V. Barrington, and Jr. T. M. McInnis. 1995. Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture. *Lindleyana* **10**:211-216.
- Zelmer, C. D. and R. S. Currah. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. *Lindleyana* **12**:142-148.
- Zetter, L.W. and C. J. Hofer. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Enviro. And Exp. Bot.* **39**:189-195.
- Zhang, Z. S. and X. J. Ou. 1995. Tissue culture of *Cymbidium sinense*. *Acta Horticulturae Sinica*, **22**:303-304

第二章、植物生長物質在蝴蝶蘭生長與開花品質增進上之應用

摘要

植物的生長與發育受到不同種類的生長激素所調控。在蝴蝶蘭上施用不同種類的植物生長物質，並觀察其對於蝴蝶蘭的生長以及開花的影響。根據實驗的結果，得到以下三個結論：

1. 出瓶前 18°C 涼溫處理及出瓶後施用 0.02% 甲殼素可促進蝴蝶蘭小苗生長。
2. 施用 N-6-benzyladenine 促進抽梗率及花梗數、增加花朵數，且使花期提早。而施用 GA₃ 會使抽梗率降低，花梗數減少，花朵畸形、萎凋，且下位葉黃化。
3. 使用 N-6-benzyladenine、kinetin 或 2-isopentenyladenine 三種不同植物分裂素 (cytokinins) 調節蝴蝶蘭花期試驗，以 N-6-benzyladenine 最佳，kinetin 次之，且須使用較高濃度。



第一節、出瓶前 18°C 涼溫處理及出瓶後施用 0.02% 甲殼素可促進蝴蝶蘭小苗生長

前言

甲殼素是地球上儲量僅次於纖維素的可再生資源，殼聚醣是其脫乙酰基衍生物，由 2-氨基-2-脫氧-β-D-葡萄糖通過 β-1.4-糖苷鍵連接形成的聚合物。甲殼素不僅來源豐富，而且有許多生理活性，如可以降低膽固醇和血脂，增加免疫能力、抗菌、調節植物生長。可以被生物降解，有良好的生物兼容性。

由於甲殼素在農業上具有(1)增強植物生長的功用：透過活化植物細胞，進而有效促進植物生長。以甲殼素施用於植物上，可取代其他植物生長物質調節植物生長作用，例如促進生根而增加植物對土壤中肥料的吸收與利用，並擴大葉面積及使葉片增厚，而增強植物光合作用，並增加作物的抗逆性。(2)提高病害的抗性：甲殼素可誘導植物產生抗病分子，可有效的防治各種病害。(3)可成為植物養分：甲殼素含有豐富的氮源，被微生物分解後可被植物利用(Boller, 1995)。

因此本試驗選了五個不同的蝴蝶蘭商業栽培品種，進行每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次，於四個月後觀察植物的生長狀況。並且與 18°C 涼溫處理，以及接種不同的蘭菌進行比較。更進一步探討甲殼素在蝴蝶蘭開花處理上應用之可行性，希望能提高蝴蝶蘭的出瓶存活率以及促進蘭苗的生長。

材料與方法

研究材料

選取 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124)及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104)等五個商業品種，以水苔種植於 4.5cm 之透明軟盆內，栽種於 28 °C/23 °C 日/夜溫、平均光照 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，置於自然光照長度的溫室環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)灌溉，並以 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料，下午三時葉片噴灑每週兩次。

蘭菌製備

選用馬鈴薯抽出物洋菜培養基(Potato Dextrose Agar; PDA)作為菌種繼代用的固體培養基。將菌種繼代至 PDA 固體培養基後，置於 25°C 黑暗處生長 5-7 天，待已純化之菌絲長滿培養皿，即可作為菌種生產之母源；將此固體培養基切成小塊，放入 2.5%安佳脫脂奶粉培養液中震盪培養，可作為製作固體菌種時的液態菌種來源。另將 0.2 克水苔浸泡於水中三天，每天換水一次，使其脫酸，再將已脫酸之水苔放入洗衣網內，置於脫水機脫水約 2 分鐘取出，待風乾或放入烘箱烘乾後，將乾燥之水苔以粉碎機研磨 1~2 秒，使成粉狀，再將 2.5%安佳脫脂奶粉培養液與水苔粉末以 1:8 之比例混合，分裝至太空包內經高溫高壓滅菌，接種蘭菌靜置生長後，即成固體菌種(李，2001)。

蘭菌接種

植株在組培苗出瓶，分別進行接種蘭菌之工作，接種後將進行菌根顯微鏡檢測，以確認接種菌根之成長。先將植株自原有的容器中取出，清除根部附著的培養基或水苔介質，將 0.2 克菌種水苔包埋根部或塞入靠近根部附近，將其介質包附於植株根部周圍後，完成裝盆的動作(李，2001)。本試驗分別接種由張喜寧教授

實驗室自行分離並經純化、鑑定、致病性分析等步驟之 *Rhizoctonia* sp. (R01) (周，2004)、*Rhizoctonia* spp.(R02)及(R04)菌種(蔡，1997)，另以無接種蘭菌植株作為對照組。

菌根植株檢測

本試驗所有菌根樣本皆以張喜寧教授研究室所發展出之螢光顯微鏡快速檢驗法(李，私人聯繫)。將蝴蝶蘭根部，徒手切片後，直接放置於波長 260 nm 之螢光顯微鏡下作觀察，檢驗確認確實為菌根植株後方進行採樣。

研究方法

五種品系出瓶時分別接種 R01、R02、R04 及(R01+R02+R04)三種混合蘭菌、栽培後以稀釋 500 倍之 10% 甲殼素(0.02%)(牛記)每二週噴灑葉面一次及栽培前置於 18°C 以下之低溫一晚等六種方法進行處理，以不做任何處理之該品系植株為對照組，於栽培後一個月及三個月統計存活率，並於四個月後調查其生長情形。每處理 8 重複，每重覆 8 株。

結果與討論

實驗結果如表 2-1 所示，五個蝴蝶蘭商業品種，出瓶前分別以 18°C 低溫處理一個晚上、出瓶後分別接種 R01、R02、R04 或混合菌種、及每二週葉面噴灑 0.02% 之甲殼素等六種處理後，第一及第三個月調查存活率。結果顯示除 OX1197 栽培種接種 R01 之組別，栽培三個月後，存活率 88.6%，低於 90% 外，其餘組別存活率皆高於 90%，無顯著差異。

各處理對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉片數之影響，結果顯示，當 OX1197 栽培種接種混合菌種、OX1199 栽培種接種 R02、OX1104 接種 R04、混合菌種及低溫處理、OX1124 栽培種接種混合菌種或施用甲殼素，皆有助於其葉片數之增加 (圖 2-1)。

各項處理對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉幅之影響顯示，當 OX1197 栽培種接種混合菌種或施用甲殼素；OX1199 栽培種接種 R01、R02、R04、混合菌種、施用甲殼素及涼溫處理；OX1102 栽培種接種 R01、施用甲殼素及涼溫處理；OX1104 栽培種接種 R01、R02、R04、施用甲殼素及涼溫處理；OX1124 栽培種接種混合菌種及涼溫處理，皆有助於其葉幅之增加(圖 2-1)。

在 OX1197 栽培種接種混合菌種、施用甲殼素或涼溫處理之植株其鮮重量有明顯的增加(圖 2-3)。同樣的情形可在 OX1199 栽培種接種 R01、R02、R04、施用甲殼素及涼溫處理；OX1102 栽培種接種 R01、R02、R04、施用甲殼素或低溫處理；OX1104 栽培種接種 R02、R04 或混合菌種、施用甲殼素或涼溫處理；OX1124 栽培種接種 R01、R02、R04 或混合菌種、施用甲殼素及涼溫處理下測得，皆有助於其植株鮮重之增加。對於植株乾重量之影響，與鮮重量相同：OX1197 栽培種涼溫處理，OX1199 栽培種接種 R01、R02、R04、施用甲殼素及涼溫處理，OX1102 接種 R01、R02、R04、施用甲殼素及低溫處理，OX1104 栽培種接種 R02、R04、施用甲殼素及涼溫處理，OX1124 栽培種接種 R02、R04、混合菌種及涼溫處理，皆有助於其植株乾重量之增加(圖 2-4)。

而在各處理下，蝴蝶蘭植株根莖比之影響實驗中。除了不易發根之 OX1124

接栽培種種 R01 後，其菌根生長有顯著之效果外，其餘組別皆無幫助發根之現象(如圖 2-5)。

結論

選取 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) 及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104) 等五個商業品種，出瓶時分別接種 R01、R02、R04 及三種菌種之混合菌種、栽培前以稀釋 500 倍之 10% 甲殼素浸潤、栽培前置於 18°C 以下之低溫一晚等六種方法進行處理，以不做任何處理之該品系植株為對照組，觀察植物的生長情況。結果顯示涼溫處理對所有品種鮮重量跟葉幅都顯著促進，施用甲殼素可增加所有品種鮮重量，但只能促進 OX1197、OX1199、OX1102 和 OX1104 葉幅。而接種蘭菌對蝴蝶蘭的生長有顯著的促進效果，但在不同的品種間必須要接種不同的蘭菌，如 OX1197 必須接種 R01+02+04 混合菌種，OX1199 以及 OX1102 單獨接種 R01、R02 或 R04 都可以有效促進蝴蝶蘭的生長。

第一節圖表

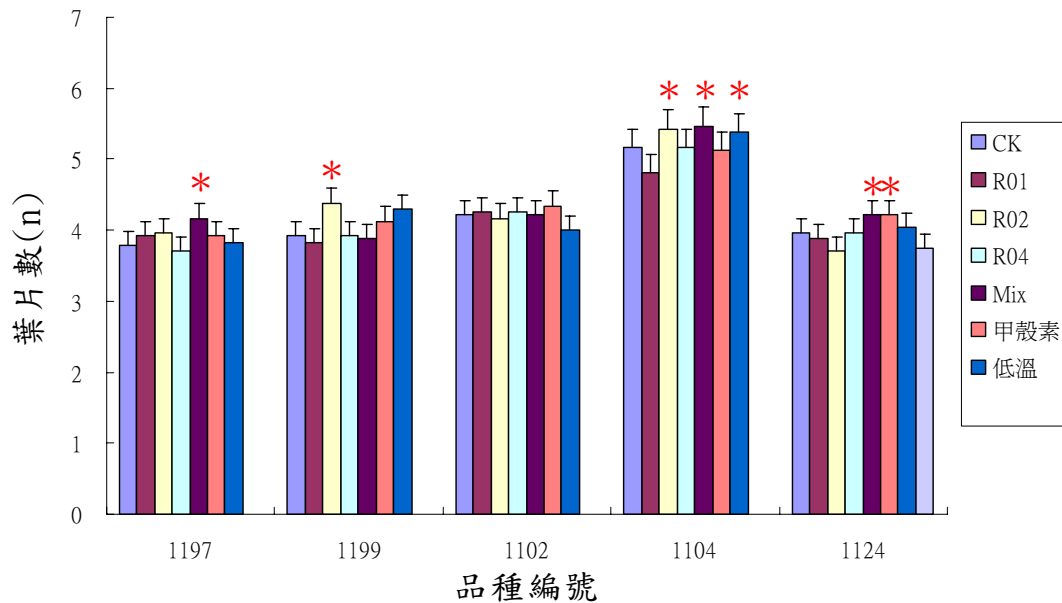


圖 2-1、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片數。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124)及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104)。I、出瓶前 18°C 涼溫處理。II、以 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04(Mix)) 菌接種及 III、每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉片數之影響(*:P≤0.05)。

Figure 2-1. Number of leaves of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) and *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104) between those I、treated with 18°C for one night before planted. II、inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04(Mix)), or III、sprayed with 0.02% chitonsan twice a week and the controls after 4 month. (*:P≤0.05)

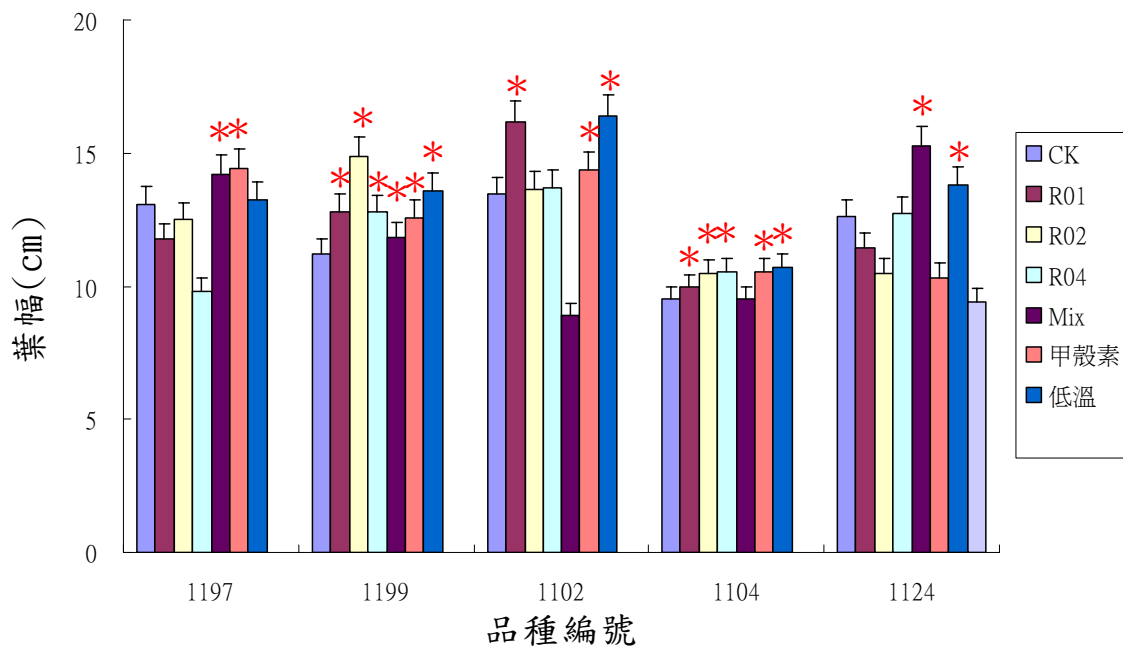


圖 2-2、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉幅。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) 及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104)。I、出瓶前 18°C 涼溫處理。II、以 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04(Mix)) 菌接種及 III、每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉幅之影響 (*: $P \leq 0.05$)。

Figure 2-2. Number of the leaf size of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) and *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104) between those I、treated with 18°C for one night before planted. II、inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04(Mix)), or III、sprayed with 0.02% chitonsan twice a week and the controls after 4 month. (*: $P \leq 0.05$)

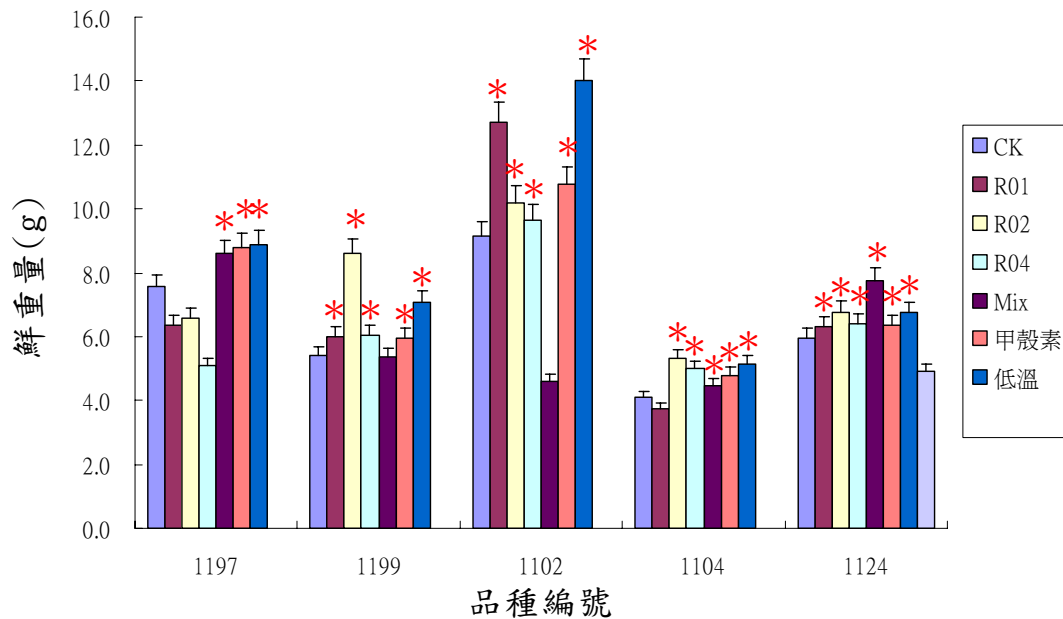


圖 2-3、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片鮮重。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis Tai Lin Redangel* ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis Mount Lip* (OX1102)、*Phalaenopsis Taida Salu* (OX1124) 及 *Doritaenopsis SoGo Moto* (OX1104)。I、出瓶前 18°C 涼溫處理。II、以 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04(Mix)) 菌接種及 III、每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉片鮮重之影響 (* : $P \leq 0.05$)。

Figure 2-3. Number of the weight of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis Tai Lin Redangel* ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis Mount Lip* (OX1102)、*Phalaenopsis Taida Salu* (OX1124) and *Doritaenopsis SoGo Moto* (OX1104) between those I、treated with 18°C for one night before planted, II、inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04(Mix)), or III、sprayed with 0.02% chitonsan twice a week and the controls after 4 month. (* : $P \leq 0.05$)

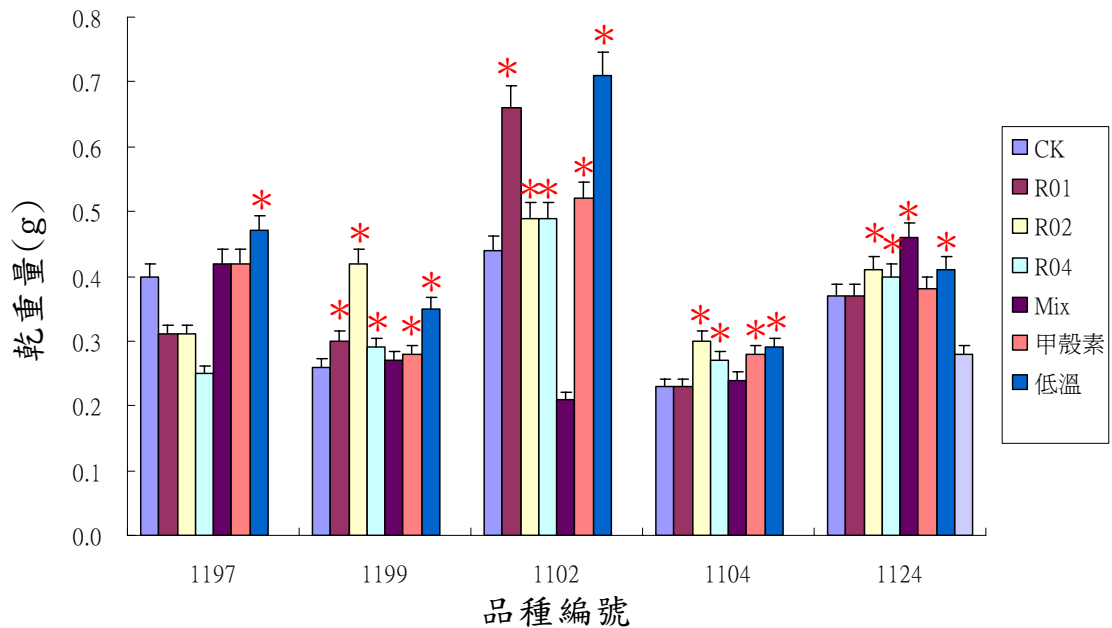


圖 2-4、不同處理後之蝴蝶蘭植株葉片乾重。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) 及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104)。I、出瓶前 18°C 涼溫處理。II、以 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04(Mix)) 菌接種及 III、每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉片乾重 (*: $P \leq 0.05$)。

Figure 2-4. Number of the dry weight of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) and *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104) between those I、treated with 18°C for one night before planted, II、inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04(Mix)), or III、sprayed with 0.02% chitonsan twice a week and the controls after 4 month. (*: $P \leq 0.05$)

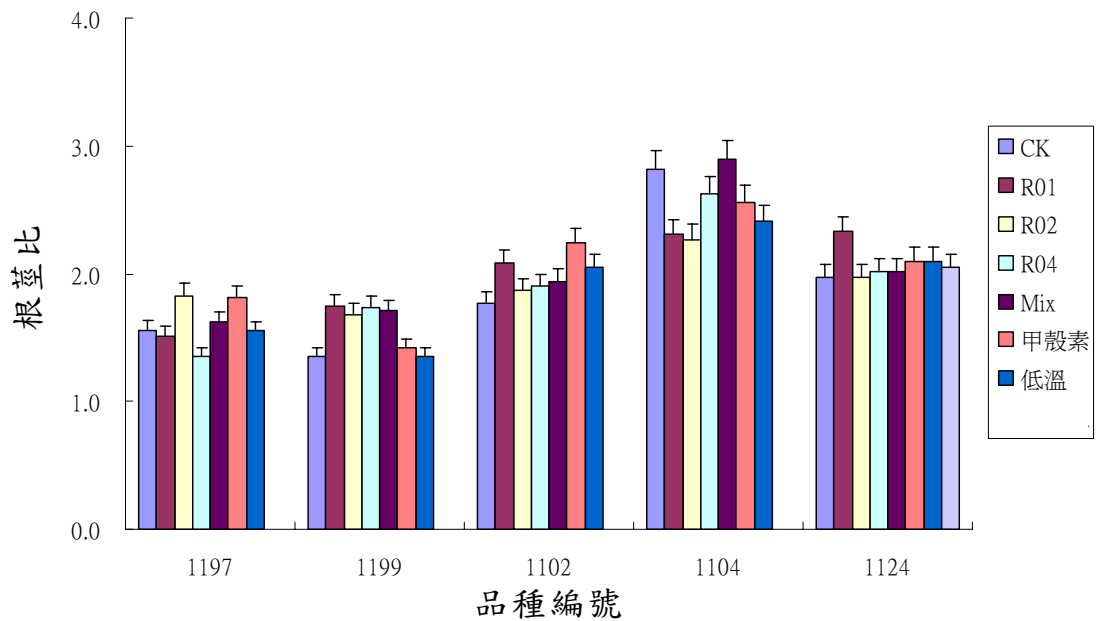


圖 2-5、不同處理後之蝴蝶蘭植株根莖比。蝴蝶蘭 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124)及 *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104)。I、出瓶前 18°C 涼溫處理。II、以 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04(Mix)) 菌接種及 III、每二週葉面噴灑 0.02% 甲殼素一次對出瓶四個月之蝴蝶蘭植株葉片數之影響。比值越小表示根所佔之比例越高。

Figure 2-5. Number of the roots/stalks ratio of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ (OX1197)、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ (OX1199)、*Phalaenopsis* Mount Lip (OX1102)、*Phalaenopsis* Taida Salu (OX1124) and *Doritaenopsis* SoGo Moto (OX1104) between those I、treated with 18°C for one night before planted, II、inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04(Mix)), or III、sprayed with 0.02% chitonsan twice a week and the controls after 4 month. The lower ration indicated highly root growth.

表 2-1、蝴蝶蘭商業品種(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’及 *Phalaenopsis* Mount Lip)出瓶前以 18°C 低溫處理一個晚上、出瓶後接種 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04)、及每二週葉面噴灑 0.02%之甲殼素等六種處理之出瓶存活率。

Table 2-1. Survival rates of the orchids (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ and *Phalaenopsis* Mount Lip) that treated with 18°C for one night before planted, and inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04) mixed inocula, or sprayed with 0.02% chitonsan twice a week.

Cultivar	Treatment	Survival (%)	
		1 st month	3 rd month
<i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’	CK	100.0	100.0
	R01	94.3	88.6
	R02	95.7	95.7
	R04	97.1	97.1
	R01+R02+R04	100.0	100.0
	0.02% chitonsan	100.0	100.0
	18°C	100.0	100.0
<i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel ‘V31’	CK	97.1	91.4
	R01	97.1	94.3
	R02	98.6	97.1
	R04	92.9	90.0
	R01+R02+R04	91.4	90.0
	0.02% chitonsan	95.7	95.7
	18°C	100.0	98.6
<i>Doritaenopsis</i> Mount Lip	CK	97.1	95.7
	R01	100.0	98.6
	R02	94.3	90.0
	R04	98.6	95.7
	R01+R02+R04	98.6	95.7
	0.02% chitonsan	97.1	95.7
	18°C	100.0	92.9

表 2-1(續)、蝴蝶蘭商業品種(*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’及 *Phalaenopsis* Mount Lip)出瓶前以 18°C 低溫處理一個晚上、出瓶後接種 *Rhizoctonia* spp. (R01、R02、R04 或 R01+R02+R04)、及每二週葉面噴灑 0.02%之甲殼素等六種處理之出瓶存活率。

Table 2-1(continue). Survival rates of the orchids (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’、*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘V31’ and *Phalaenopsis* Mount Lip) that treated with 18°C for one night before planted, and inoculated with *Rhizoctonia* spp. (R01, R02, R04 or R01+R02+R04 mixed inocula), or sprayed with 0.02% chitonsan twice a week.

Cultivar	Treatment	Survival (%)	
		1 st month	3 rd month
<i>Doritaenopsis</i> SoGo Moto	CK	98.6	98.6
	R01	97.1	97.1
	R02	100.0	100.0
	R04	98.6	98.6
	R01+R02+R04	100.0	97.1
	0.02% chitonsan	100.0	100.0
	18°C	100.0	98.6
<i>Phalaenopsis</i> Taida Salu	CK	98.6	98.6
	R01	98.6	97.1
	R02	100.0	100.0
	R04	100.0	100.0
	R01+R02+R04	100.0	100.0
	0.02% chitonsan	100.0	97.1
	18°C	100.0	100.0

第二節 使用 N-6-benzyladenine 及 Gibberelic acid 3 調控蝴蝶蘭開花

前言

蝴蝶蘭屬於單莖性無限花序之著生蘭，每一葉腋至少有 2 個芽原體，當植株渡過幼年期且在適當溫度（15-20 °C 之涼溫）及光線環境下，可抽梗開花(李及李，1996; Wang 和 Hsu，1994)，葉腋內上部較大呈靜止狀態的腋芽，可被活化而萌發為花梗，花梗由頂葉往下數第三及第四葉腋抽出率最高。(李和李，1996)。

蝴蝶蘭需開花方能銷售，其是否能夠接受環境刺激，抽梗開花，與其葉面積成高度正相關，且栽培種間差異甚大(李，1991)。如何使得不同栽培種的蝴蝶蘭能夠在需求量最大的時候，如歐美二月的情人節、五月的母親節、十二月的耶誕節及中國的春節、中秋節等節日開花，是一個重要的研究主題。

在涼溫條件下，蝴蝶蘭抽梗至開花的時間大致相同 (Wang 和 Hsu，1994; 林和李，1998)。如何有效控制蝴蝶蘭開花時間，抽梗時間的控制應是其重點。植物生長物質的應用，或許是解決此問題的一個可能方式(Wang，1995)。

蝴蝶蘭在高溫下無法抽梗、開花(李及李，1996; Wang 等氏，2006)。已抽梗之蝴蝶蘭植株，如在花絮序未開始分化前，將其移到高溫環境(30°C)，亦無法繼續開花，此現象可能與蝴蝶蘭花序中 GA₅ 及 Cytokinin 濃度的下降有關(Chen 等氏，1994; Chou 等氏，2000)。在高溫條件下，單獨使用 GA₃ 及 BA 等植物生長物質並不能使得蝴蝶蘭抽梗、開花 (Satoshi 等氏，1997; Chen 等氏，1994)，但如在蝴蝶蘭抽梗 3-5cm 後，注射 Gibberelic acid 3 (GA₃)，可使得其花朵在高溫情況下仍可繼續發育。此結果可能與施用 GA₃ 可抑制其花梗內碳水化合物濃度之降低相關(Chen 等氏，1994、1997)。

如在涼溫條件(25/20°C 日/夜溫)下，施用 GA₃，可得到花梗長度較長，花朵數較多之結果，但花瓣質地較薄，且易有畸型花產生(林，1994)。涼溫條件下噴施 BA，可得到較多之花朵數及花梗數，而以在第一朵花苞可見時施用 BA，則花朵數較多，且花徑較大、花瓣質地較厚，但花苞夭折比例亦最高(林，1994; Ho 和

Yang, 1990)。更進一步探討 BA 及 GA₃ 在蝴蝶蘭開花處理上應用之可行性，希望能提高蝴蝶蘭抽梗率並使得花梗數、花朵數增加及開花品質提高。

材料與方法

一、BA 對蝴蝶蘭抽梗及花朵數目之影響

實驗一、

選取分生苗白花紅心品種 WR (*Phalaenopsis* Luchia Pink '244') 及紅花品種 F (*Doritaenopsis* Taisico Firebird 'OX') 等二個商業栽培品種，種植於 10.5cm 盆以水苔為栽培介質之成熟植株，栽種於 28/23 °C 日/夜溫、平均光照 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，每日自然光照時間的溫室環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K) 水溶性肥料 (Scotts, Marysville, Ohio) 灌溉。並以 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Peters (20N-8.6P-16.6K)，下午三時之後葉片噴灑每週兩次。所有植株移入涼溫冷房後，栽培平均光度 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，平均日長 12 小時，平均 26/18 °C 日/夜溫，每週以 Peters 0.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10N-12.9P-16.6K 水溶性肥料澆灌一次，並以 Peters 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10N-12.9P-16.6K 水溶性肥料，下午三時之後葉片噴灑每週兩次之施肥方式。植株移入冷房後，分別於第 1 天及第 14 天各以添加 0.05% Tween 20 的 70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 全株噴灑一次，每株約 10 mL。每栽培種 8 重複，每重複 8 株，於處理後第四週及第十四週統計花梗數及開花品質。

實驗二、

選取分生苗紅花品種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' 及大白花品種 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' 等二個商業栽培品種，種植於 10.5cm 盆以水苔為栽培介質之成熟植株，栽種於 28/23 °C 日/夜溫、平均光照 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，每日自然光照時間的溫室環境。植株每週以 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters

(20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)灌溉。並以 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Peters (20N-8.6P-16.6K)，下午三時之後葉片噴灑每週兩次。所有植株移入涼溫冷房後，栽培平均光度 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，自然光照時間，平均 $26/18 \text{ }^\circ\text{C}$ 日/夜溫，每週以 Peters $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10N-12.9P-16.6K 水溶性肥料澆灌一次，並以 Peters $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 10N-12.9P-16.6K 水溶性肥料，下午三時之後葉片噴灑每週兩次之施肥方式。植株移入冷房後，於第 1 天，以添加 0.05% Tween 20 的 50 、 100 、 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 全株噴灑一次，每株約 10 mL。每栽培種 8 重複，每重複 4 株，統計開花時間、花梗數、花梗長度、花朵數、花徑及花朵壽命。

二、GA₃ 對蝴蝶蘭抽梗率及開花品質之影響

選取蝴蝶蘭 *Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song' 及 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' 2 個不同栽培種，植株栽種於 $28/23 \text{ }^\circ\text{C}$ 日/夜溫、平均光照 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，每日光照時間 12 小時的溫室環境。每週以 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K) 水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio) 交替灌溉。在移入 $26/18 \text{ }^\circ\text{C}$ (日/夜溫) 之涼溫處理溫室後，同時分別以 0 、 50 、 100 、 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 GA₃ 與 BA，全株葉面噴灑，所有溶液添加 0.05% Tween 20，每株平均噴灑 10 mL，每處理 12 重複，每重複 4 株，六週後調查抽梗率，第 14 週調查開花品質。

結果與討論

第一部分試驗中，在涼溫處理第 1 天及第 14 天各全株噴灑 $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 一次，*Phalaenopsis Luchia Pink '244'* 在第四週之抽梗率由 58% 提高至 98%，即抽梗率增加了 40% (表 2-1)，此結果有利於控制蝴蝶蘭在特定節日開花。*Phalaenopsis Luchia Pink '244'* 在第十四週時，花梗數由每株 1.0 梗增加為每株 1.2 梗；*Doritaenopsis Taisico Firebird 'OX'* 在第十四週花朵盛開時，花梗數由每株 1.6 梗增加至每株 2.0 梗 (表 2-2)。此結果與林(1994) 在涼溫處理第二週噴灑 $50\text{-}150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 之結果相近，然在其研究中，此結果亦伴隨著花苞夭折數增加之現象，但在本研究中，所有花朵之壽命皆超過 80 天，並無此現象發生，此差異可能是由於我們所使用之栽培種、栽培方式及 BA 使用方式、濃度不同所造成。

在林(2002)的研究當中，在涼溫處理第二週及第一朵花苞可見時，全株噴灑 $50\text{-}150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA，皆可增加蝴蝶蘭之花朵數，然而，在我們的研究中，以在涼溫處理第一天及第十四天，各全株噴灑 $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 一次之方式進行處理，對於花朵數的增加，並無促進效果。在 *Doritaenopsis Taisico Firebird 'OX'* 栽培種，部份具有三枝花梗的植株，每一花梗上僅有 1-2 朵花，每株之花朵數反而少於單梗之植株。此外，以此方式使用 BA，在 *Phalaenopsis Luchia Pink '244'* 上，造成嚴重的手指狀畸形花梗產生 (圖 2-6)，此結果顯示，適當的使用 BA 可以增加蝴蝶蘭抽梗的整齊度及花梗數，但花梗數增加，並不一定能使花朵數增加，且使用 BA 也可能會造成畸型花梗產生。

在第二部份的試驗中，以蝴蝶蘭大紅花 *Phalaenopsis Tai Lin Redangel* 及大白花 *Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'* 等二栽培種作為研究材料，探討在涼溫處理第一天，葉面噴灑 50 、 100 、 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三個不同濃度 BA 對開花時間及開花品質的影響。

試驗結果，得到涼溫處理第一天，噴灑 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA，*Phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen'* 花朵數由 10.4 朵增加至 14 朵。*Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'*

開花時間由涼溫處理後 108.3 天提早至 98 天，花梗數亦由 1.3 增加至 2(表 2-3)。

在噴灑數個不同濃度 GA_3 對 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' 及 *Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song' 抽梗率及開花品質之影響之試驗中(表 2-4)，噴灑 GA_3 使得 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' 開花時花梗數減少，花梗長度增加。*Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song' 花梗長度增加、花朵數增加，但花徑變小。此結果與林(1994)之研究相似。在此二蝴蝶蘭栽培種上， GA_3 之使用，亦有下列葉黃化掉落的現象產生，除此之外，施用 GA_3 亦對其花型造成重大影響，濃度越高，影響越大(圖 2-7)。此結果與 Chen 等人(1994)以注射 GA_3 之方式所得之結果相同，雖然 Chen 等人(1997)之更進一步研究，報導由注射 GA_3 所造成之花朵之畸型，可由後期注射 BA 之方式加以回復，但此方法在於實際應用上將有很大的困難，且尚有開花品質不佳之問題存在。我們亦曾嘗試探討，以全株葉面噴灑 GA_3 之方式，來取代蝴蝶蘭抽梗後之涼溫需求之可行性。我們選取十個不同蝴蝶蘭品系，花梗長度 5 cm 以下之植株各 10 株，以全株噴灑 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 ，每株約 10 mL 之方式進行處理，處理後立即將植株移至高溫環境(30/25°C, 日/夜溫)，但所有花朵皆無法正常發育(data no show)，我們推測，或許 GA_3 只有以注射之方式，方能有取代蝴蝶蘭抽梗後涼溫需求之效果。

結論

由實驗的結果證實，在涼溫處理第一天及第十四天各全株噴灑 $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA。*Phalaenopsis* Luchia Pink '244' 之抽梗率，由 58% 提高至 98%。*Phalaenopsis* Luchia Pink '244' 花梗數由每株 1.0 梗增加為每株 1.2 梗，*Doritaenopsis* Taisico Firebird 'OX' 花梗數由每株 1.6 梗增加至每株 2.0 梗，花朵數由每株 11.3 朵減少至每株 8.6 朵(表 2-2)。但如使用不當，亦會使得 *Phalalenopsis* Luchia Pink '244' 產生畸形花梗(圖 2-6)。

而在涼溫處理第一天，全株噴灑 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA，*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' 花朵數由 10.4 朵增加至 14 朵。*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' 開花時間由涼溫處理後 108.3 天提早至 98 天，花梗數亦由 1.3 增加至 2(表 2-3)。

使用 BA，對不同蝴蝶蘭品系之抽梗率及開花品質，造成不同的影響，使用之濃度、時期及植株照顧方式不同，也會有很大之差異，建議使用前務必先行少量測試。

而 GA_3 之使用，雖然可增加 *Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song' (表 2-4) 之花朵數，但因本實驗以全株噴灑之方式使用，二蝴蝶蘭栽培種均有下位葉黃化掉落數目增加、花朵畸形及花期縮短等結果產生，故不建議使用。

第二節圖表



圖 2-6、於涼溫處理(26/18°C)後第 1 天及第 14 天各噴灑一次 $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ N-6-benzyladenine 所造成 *Phalaenopsis* Luchia Pink '244' 之花梗畸形。 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}=1 \text{ ppm}$, $1 \text{ cm} = 0.3937 \text{ inch}$.

Figure2-6. Deformed flower spike of *Phalaenopsis* Luchia Pink '244' orchid that was caused by spraying with $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ N-6-benzyladenine on the 1st and 14th d after low temperature treatment (26/18°C). $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}=1 \text{ ppm}$, $1 \text{ cm} = 0.3937 \text{ inch}$.



圖 2-7、涼溫處理第 1 天，噴灑不同濃度之 GA_3 後蝴蝶蘭之花型。A-D 為 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen'，分別為施用 0、50、100 或 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 GA_3 ，E-H 為 *Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song'，分別為施用 0、50、100 或 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 之花型。

Figure 2-7. Flowers morphology of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen' (A-D) and *Doritaenopsis* Ho's Happy Auckland 'Song' (E-H) that were treated with 0 (A, E), 50 (B, F), 100 (C, G) or $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 after low temperature treatment started.

表 2-2、於涼溫處理(26 /18 °C)第一天及第十四天各施用 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine(BA)一次對 *Phalaenopsis* Luchia Pink ‘244’ 及 *Doritaenopsis* Taisico Firebird ‘OX’ 生殖生長的影响。

Table 2-2. Reproductive growth of *Phalaenopsis* Luchia Pink ‘244’, and *Doritaenopsis* Taisico Firebird ‘OX’ that were sprayed with 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine (BA) on both day 1 and day 14 after low temperature treatment (26 /18 °C).^z

Cultivar	BA treatment (70 mg·L ⁻¹) ^y	Spiking percentage after cooling [mean ± SE (%)]		Flower spikes (no. /plant)		Spike deformity [mean ± SE (%)]	Flowers (no./plant)
		week 4	week 14	week 4	week 14	week 14	week 14
		<i>Phalaenopsis</i> Luchia Pink ‘244’	No	58 ±12	100±0	0.6b	1b
	Yes	98 ±4	100±0	1.2a	1.2a	43 ±19	8.5a
<i>Doritaenopsis</i> Taisico Firebird ‘OX’	No	100±0	100±0	1.5b	1.6b	0±0	11.3a
	Yes	100±0	100±0	2a	2a	3 ±6	8.6b

^zEight replications for each treatment, with eight plants per replication. Mean separation within columns by least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm

表 2-3、於涼溫處理(26 /18 °C)第 1 天噴灑不同濃度之 N-6-benzyladenine (BA)對 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘Queen’及 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’抽梗率及開花品質之影響。

Table 2-3. Flower spike number and flower quality of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘Queen’ and *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’, as affected by the spraying of various concentrations of N-6-benzyladenine (BA) on the day 1 of low temperature treatment (26 /18 °C).^z

Cultivar	BA concn (mg·L ⁻¹) ^y	Time to anthesis (d)	Flower spikes (no./plant)	Flower spike length (cm) ^x	Flowers (no./plant)	Flower dia. (cm)	Flower longevity (d)
<i>Phalaenopsis</i> Tai Lin Redangel ‘Queen’	0 50 100 150	139.4a 138.1a 135.8a 135.9a	1.1a 1.3a 1.1a 1.5a	80.9a 80a 81a 84.4a	10.4b 11.1ab 11.1ab 14a	10.3a 9.8a 10a 9.7a	101.3a 105a 103a 101.3a
<i>Phalaenopsis</i> Sogo Yukidian ‘V3’	0 50 100 150	108.3a 106.6a 105.9a 98b	1.3b 1.6ab 1.6ab 2a	65.3a 63.9a 63.5a 57.1a	10.1a 11.5a 11.1a 12.1a	11.2a 11.1a 10.6a 10.4a	125.9a 130.4a 126.9a 126.8a

^zEight replications for each treatment, with four plants per replication. Mean separation within columns by least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm

^x 1 cm = 0.3937 inch.

表 2-4、於涼溫處理(26/18 °C)第 1 天噴灑不同濃度之 GA₃ 對 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘Queen’ 及 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’ 之花梗數及開花品質之影響。

Table 2-4. Flower spike number and flower quality of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel ‘Queen’ and *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’, as affected by the spraying of various concentrations of N-6-benzyladenine (BA) on the day 1 of low temperature treatment (26/18 °C).^z

Cultivar	GA ₃ concn (mg·L ⁻¹) ^y	Spiking rate in the 6 th week (%)	Flower spikes (no./plant)	Flower spike length (cm)	Flowers (no./plant)	Flower dia. (cm)	Flower bud abortion ratio ^x (%)
<i>Phalaenopsis</i>	0	92	1.5a	74.5c	12.7a	9.2a	1.6
Tai Lin	50	92	1.2ab	83.9b	11.2ab	9.0a	0
Redangel	100	92	1.1b	89.6b	11.2ab	9.1a	1.6
‘Queen’	150	92	1.0b	101.6a	10.0b	8.9a	3.3
<i>Doritaenopsis</i>	0	100	1.9a	41.7c	5.8b	9.2a	2.9
<i>Ho’s Happy</i>	50	100	1.6b	53.2b	6.6a	9.3a	5.1
Auckland	100	100	1.9ab	56.5b	6.7a	8.7b	8.1
‘Song’	150	100	1.8ab	72.8a	6.9a	8.5b	5.3

^zFour replicates were tested for each treatment and every replicate has 4 plants. Mean separation within columns by least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm ; 1 cm = 0.3937 inch.

^xAverage of 12 replicates

第三節 使用 N-6-benzyladenine、kinetin 及 2-isopentenyladenine 調控

前言

由第二節的試驗結果，我們得知，全株噴灑 N-6-benzyladenine(BA)，對不同蝴蝶蘭品系之抽梗率及開花品質造成不同的影響，使用之濃度、時期及植株照顧方式不同，也會有很大之差異。*Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'Queen'栽培種，在涼溫處理第一天全株噴灑 BA，其每株花朵數在 0-150 mg·L⁻¹ 範圍內，隨 BA 濃度增加而增加。

在 *Phalalenopsis* Sogo Yukidian 'V3'栽培種上，全株噴灑 150 mg·L⁻¹BA，可使得其開花時間由 108 天提早至 98 天，其第十四週時之花梗數由每株 1.3 梗增加至 2.0 梗，總花朵數亦由每株 10.1 朵增加至每株 12.1 朵。但如使用不當，亦會使得 *Phalaenopsis* Luchia Pink '244'產生畸形花梗。

在本節試驗中，我們選取了 N-6-benzyladenine(BA)、kinetin(kin) 及 2-isopentenyladenine(2-iP)等三種不同種類的 cytokinin，各三個不同濃度，探討其分別在涼溫處理第一天及第一朵花苞大於 0.2 cm 時，全株葉面噴灑對不同種類蝴蝶蘭開花品質之影響。

材料與方法

選取的蝴蝶蘭大白花商業栽培種 *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' 及大紅花商業栽培種 *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'。種植於 10.5 cm 盆以水苔為栽培介質之 6 片葉大(約出瓶 16 個月，葉片展開 25-30cm)植株。試驗植株栽種於 28 /23 °C 日/夜溫、平均光照 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (正午約 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)，每日光照時間 12 小時的溫室環境。植株每週以 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之 Peters (20N-8.6P-16.6K)水溶性肥料(Scotts, Marysville, Ohio)交替灌溉。植株於 2006 年 9 月 22 日移入涼溫處理溫室(26/18 °C 日/夜溫、平均光照 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 每日光照時間約 12 小時)，分別於第 1 天及第一朵花苞達到 0.2 cm 時，各以添加 0.05% Tween 20(Sigma Chemical Co., St. Louis)，數個不同濃度之 N-6-benzyladenin (BA)、2- isopentenyladenine (2-ip)(各 50、100、150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)及 kinetin (100、200、300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Sigma Chemical Co., St. Louis)，於下午 4 時全株噴灑一次，每株約 10 mL，直至葉面完全濕潤。於第十四週紀錄開花日期、花梗及花朵數、花朵大小及花期時間。花期長短以第一朵花苞長成到花開凋謝期間為紀錄。紀錄後以 randomized complete block design (RCBD) 和 least significant difference (LSD)統計分析法比較各生長素對花梗數及開花品質的影響。每處理 8 重複，每重覆 8 株。

結果與討論

V3 在經過低溫處理後第一天，全株噴灑 $50\text{-}150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 可增加花梗數由 1 變成 2，也增加花朵數每株由 8.4 朵變成 12.1 朵。此結果與之前的研究相似(Wu 和 Chang, 2009)。同樣條件下，噴灑 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kin 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-iP 也能增加花梗數每株從 1 變成 1.5($200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kin); 花朵數由 8.4 朵增到 10.5 朵 ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-iP)(表 2-5)。在噴灑 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kin 的情況下，花朵數在統計上雖未到達顯著性差異，但在商業產品考量下，花朵數由 8.4 朵增到 10.5 朵在觀賞及售價上有很明顯的差別。

在第一朵花苞長至 0.2 cm 時對植株噴灑 $100\text{-}150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA，發現 V3 品系蝴蝶蘭花朵數由 8.4 增到 10.5，且花期由 125.9 天增長至 134.4 天。以此為基準比較，其他生長素處理對植株皆未達顯著性差異。結果發現到 BA 是對蝴蝶蘭 V3 品系影響最大的生長素(表 2-5)。而在低溫處理後第一天對植株噴灑 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kin 也能增加花梗數，但若想達到與 BA 相同效果，則可能要再提高濃度。

對蝴蝶蘭 V31 品系，只有在花苞達到 0.2 cm 時對植株噴灑 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 能增加花朵數由 8.3 變成 9.6。而在冷處理後第一天噴灑 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA、100 或 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-iP 或是在花苞達到 0.2 cm 時噴灑 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 時，其花期皆比對照組長。但若是在花苞達到 0.2 cm 時噴灑 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 則會降低花期(表 2-6)。

雖然涼溫處理後第一天噴灑 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 對 V31 花梗及花朵數沒有顯著性改變，但在商業上，花梗數由 1 變成 1.4 與花朵數由 8.3 朵成 9.5 朵已有顯著性視覺觀賞上的差異(表 2-5、2-6)。

結論

本研究中，涼溫處理後第一天，除了 BA 之外，對 V3 植株葉面施肥與 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kin 也能增加其花梗數由 1 變成 1.5，然而花朵數未達統計差異。但在商業上，每植株花朵數由 8.4 增至 10.4 則有了 1 元美金的價差。生長素 kin 可能適用於商業栽種，但欲達到與 BA 同樣功效，則可能需增加其施用濃度到 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。

對 V31 品系而言，花梗及花朵數在各處理下未達顯著性差異。花期長度在第一朵花苞大於 0.2 cm 時噴灑 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 處理下，比對照組更短。這可能顯示在第一朵花苞大於 0.2 cm 時噴灑 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或更高濃度 BA 的處理，並非對所有蝴蝶蘭品系是無害的。而比較花梗及花朵數，在涼溫處理後第一天及花苞達 0.2 cm 時各噴灑 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA，與只在涼溫處理後一日噴灑一次，並沒有統計上的差異。

由試驗之結果，我們大致可了解，不同種類、不同濃度的 cytokinins，在不同的時期施用，對於不同的蝴蝶蘭栽培種開花結果之促進略有差異。在本試驗設計的濃度及施用時期條件下，無論是以 BA、kin 或是 2-iP 進行處理，大多可獲得開花時間提早，花梗數、花朵數增加及花朵壽命增加之結果，且對於花朵品質無任何不良之負面影響，將來應有實際應用於產業界之可能。

參考文獻

- 李晔. 1991. 蝴蝶蘭的幼年性. 園藝作物產期調節研討會專刊 II. 77-86.
- 李晔、李嘉慧. 1996. 蝴蝶蘭花芽引誘和花序發育之碳水化合物變化. 中國園藝 **42**: 262-275.
- 李明治. 2001. 蘭菌(絲核菌)之生理、菌種生產及其對台灣金線連生長之影響. 台大園藝學研究所碩士論文.
- 林育如. 1994. 光、溫度與生長調節劑對蝴蝶蘭生長開花之影響. 台大園藝學研究所碩士論文.
- 林育如、李晔. 1998. 蝴蝶蘭涼溫催花前後之光需求. 中國園藝 **44**: 463-478.
- 林育如. 2002. 蝴蝶蘭腋芽發育與開花調控關係之研究. 國立臺灣大學園藝學研究所博士論文.
- 周玲勤. 2004. 台灣金線連、彩葉蘭和其 F1 雜交種之菌根生理與栽培. 國立台灣大學園藝學研究所博士論文.
- 蔡靜怡. 1997. 蘭菌及溫度對台灣金線連生長之影響. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
- Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 189-214.
- Chen, W. S., H. W. Chang, W. H. Chen and Y. S. Liu. 1997. Gibberellic acid and cytokinin affect *Phalaenopsis* flower morphology at high temperature. *HortScience* **32**:1069-1073.
- Chen, W. S., H. Y. Liu, Z. H. Liu, L. Yang and W. H. Chen. 1994. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. *Physiol. Plant.* **90**:391-395.
- Chou, C. C., W. S. Chen, K. L. Huang, H. C. Yu and L. J. Liao. 2000. Changes in cytokinin levels of *Phalaenopsis* Leaves at high temperature. *Plant Physiol. Biochem.* **38**:309-314.

- Ho, F. W. and L. Yang. 1990. Effects of plant growth regulators on the growth and flowering of *Phalaenopsis*. Annu. Rep. –Taiwan Sugar Res. 1989-1990:17-18.
- Satochi, K., H. Hamotsu, I. Kazuo, and K. Masaju. 1997. Effect of light condition and GA₃ application on development of axillary buds during cooling treatment in *Phalaenopsis*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **66**:581-585.
- Wang, Y. T. and T. Y. Hsu. 1994. Flowering and growth of *Phalaenopsis* orchids following growth retardant applications. HortScience **29**:285-28
- Wang, Y. T. 1995. Gibberellic acid on *Phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bul. 745.
- Wang, Y.T., W. T. Tsai, and T.E. Dai. 2006. Heavy shading – an effective, low-cost alternative to high temperatures for inhibiting spiking in *Phalaenopsis*. Proc. Taiwan Intl. Orchid Symp. 164-173.
- Wu, P. H. And D. C. N. Chang. 2009. The use of N-6-benzyladenine to regulate flowering of *Phalaenopsis* orchids. HortTechnology. **19**: 200-203.

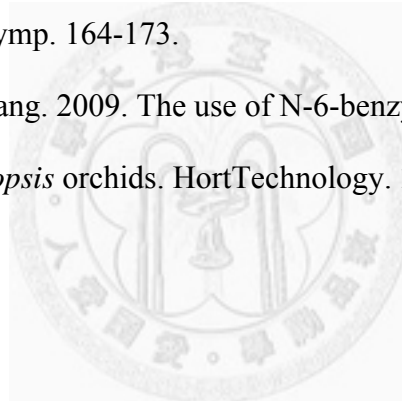


表 2-5、蝴蝶蘭 Sogo Yukidian 'V3' 在不同時間點(涼溫處理後一日及第一花苞達到 0.2cm 時) 施用不同濃的 N-6-benzyladenin (BA)、kinetin (kin)及 2-isopentenyladenine (2-iP)之花梗數及花朵品質。

Table 2-5. Flower spike count and flower quality of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3', as affected by the spraying of various concentrations of N-6-benzyladenin (BA), kinetin (kin) or 2- isopentenyladenine (2-iP) on the day 1 of low temperature treatment or the first flower bud reached 0.2 cm^z.

Treatment ^y	Concn (mg·L ⁻¹) ^x	Time to anthesis (d)	Flower spikes (no./plant)	Length of spikes (cm) ^x	Flowers (no./plant)	Flower dia. (cm) ^x	Flower longevity (d)
Control	0	107.3ab	1.0d	71.1ab	8.4b	11.2bcd	125.9a
BA (1)	50	105.6b	1.6ab	63.9abc	11.5a	11.1cde	130.4a
	100	104.9b	1.6ab	63.5bc	11.1a	10.6de	126.9a
	150	105.5b	2.0a	57.1c	12.1a	10.4e	126.8a
kin(1)	100	108.3ab	1.1cd	67.9ab	8.9b	11.9ab	125.9a
	200	104.3bc	1.5bc	63.3bc	10.4ab	11.6abc	127.8a
	300	109.8a	1.3bcd	71.9ab	10.0ab	12.0a	129.8a
2-iP(1)	50	105.3b	1.3bcd	73.1a	10.5ab	11.7abc	129.4a
	100	106.3ab	1.1cd	67.0ab	8.5b	11.6abc	130.1a
	150	100.4c	1.0d	71.6ab	8.5b	12.1a	132.5a
Control	0	107.3de	1.0a	71.1bc	8.4bc	11.2b	125.9b
BA (2)	50	113.4ab	1.0a	76.5a	9.3b	11.9a	127.0ab
	100	115.4a	1.3b	72.5ab	10.5a	11.8ab	133.4a
	150	113.4ab	1.1ab	76.3a	10.5a	11.9a	127.8ab
kin(2)	100	110.0cd	1.0a	72.5ab	8.8bc	12.1a	126.8ab
	200	107.6de	1.0a	75.5ab	8.6bc	12.3a	129.8ab
	300	106.9e	1.0a	67.0c	8.0c	12.1a	131.0ab
2-iP(2)	50	109.1cde	1.1ab	71.1bc	9.0bc	12.2a	131.8ab
	100	111.3bc	1.1ab	71.8abc	9.3b	12.0a	129.8ab
	150	108.8cde	1.0a	74.9ab	8.3bc	12.3a	130.3ab

^z 8 replicates were tested for each treatment and every replicate has 1 plants.(Arrange at random from 64 plants), Mean separation within columns by least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

^y(1) was sprayed at the day 1 after cool treatment. (2) was the first flower bud >0.2cm

^x1 mg·L⁻¹ = 1 ppm ; 1 cm = 0.3937 inch

表 2-6、蝴蝶蘭 Tai Lin Redangel ‘V31’在不同時間點(涼溫處理後一日及第一花苞達到 0.2cm 時) 施用不同濃的 N-6-benzyladenin (BA)、kinetin (kin)及 2-isopentenyladenine (2-iP)之花梗數及花朵品質。

Table 2-6. Flower spike count and flower quality of phalaenopsis Tai Lin Redangel ‘V31’, as affected by the spraying of various concentrations of N-6-benzyladenin (BA), kinetin (kin) or 2- isopentenyladenine (2-iP) on the day 1 of low temperature treatment or the first flower bud reached 0.2 cm^z.

Treatment ^y	Concn (mg·L ⁻¹) ^x	Time to anthesis (d)	Flower spikes (no./plant)	Length of spikes (cm) ^x	Flowers (no./plant)	Flower dia. (cm) ^x	Flower longevity (d)
Control	0	108.9ab	1.0b	61.4a	8.3b	9.8ab	99.8b
BA (1)	50	109.8a	1.0b	60.5a	8.1b	9.6ab	111.3ab
	100	107.8ab	1.3a	62.8a	9.3ab	9.6ab	116.1a
	150	106.3b	1.4a	61.4a	9.5a	9.4b	110.8ab
kin(1)	100	106.5b	1.0b	62.6a	8.4ab	9.8ab	110.4ab
	200	108.5ab	1.0b	62.9a	8.1b	9.8ab	112.3ab
	300	108.6ab	1.0b	65.0a	8.6ab	9.9a	106.1ab
2-iP(1)	50	107.5ab	1.0b	61.9a	8.4ab	9.9a	111.4ab
	100	106.0b	1.0b	61.9a	8.4ab	9.8ab	116.5a
	150	107.0ab	1.0b	66.3a	8.8ab	9.9a	115.9a
Control	0	108.9c	1.0b	61.4bc	8.3bcd	9.8bc	99.8abc
BA (2)	50	111.4ab	1.0b	61.4bc	8.4bcd	9.6bc	114.1a
	100	112.3a	1.1a	62.9bc	8.9ab	9.5c	99.0abc
	150	109.9bc	1.0b	68.9a	9.6a	9.9abc	84.1c
kin(2)	100	111.3ab	1.0b	60.9bc	7.6d	9.9abc	110.4ab
	200	110.3abc	1.0b	60.6bc	7.9cd	10.0ab	98.1bc
	300	109.8bc	1.0b	59.1c	8.0bcd	9.8bc	96.5bc
2-iP(2)	50	109.9bc	1.0b	63.5b	8.6bc	9.8bc	100.8ab
	100	109.6bc	1.0b	60.5bc	7.9cd	10.0ab	114.0a
	150	108.1c	1.0b	59.4bc	8.3bcd	10.2a	101.6ab

^z 8 replicates were tested for each treatment and every replicate has 1 plants.(Arrange at random from 64 plants), Mean separation within columns by least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

^y(1) was sprayed at the day 1 after cool treatment. (2) was the first flower bud >0.2cm

^x1 mmg·L⁻¹ = 1 ppm ; 1 cm = 0.3937 inch

The Use of N-6-benzyladenine to Regulate Flowering of Phalaenopsis Orchids

Po-Hung Wu and Doris C.N. Chang¹

ADDITIONAL INDEX WORDS. spiking percentage, flower quality, growth regulation, N-6-benzyladenine (BA), doritaenopsis

SUMMARY. Phalaenopsis orchid (*Phalaenopsis* hybrids) is an important potted flower around the world. Programming phalaenopsis to bloom as needed and improving flower quality are important to increasing profitability. Whole plants were sprayed with 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine (BA) at dusk on days 1 and 14 after subjecting them to a 26/18 °C treatment. The spiking percentage at week 4 after the start of the 26/18 °C treatment of phalaenopsis Luchia Pink '244' control plants was 58% ± 12% (mean ± SE), while 98% ± 4% of the BA-treated plants developed floral spikes. The number of flower spikes in phalaenopsis Luchia Pink '244' and doritaenopsis orchid (*Doritaenopsis* hybrids) Taisico Firebird 'OX' increased from 1 to 1.2 flower spikes per plant and from 1.6 to 2 flower spikes per plant at the end of week 14, respectively. When whole plants were sprayed with 150 mg·L⁻¹ BA at dusk on day 1 of cooling, the number of flower spikes in phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3' increased from 1.3 to 2 flower spikes per plant, and the flower count in phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen' increased from 10.4 to 14 flowers at the end of week 20. However, the flower longevity of phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3' and phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen' was not affected. However, phalaenopsis Luchia Pink '244' sprayed with 70 mg·L⁻¹ BA on days 1 and 14 resulted in deformed flower spikes. It is recommended that 14 to 16 weeks before specific festivals, the phalaenopsis orchids should be put into 26/18 °C and BA treatments (100–150 mg·L⁻¹) at day 1 for commercial phalaenopsis orchids production. However, perhaps BA is not effective for all cultivars.

Phalaenopsis is the most important potted orchid around the world, with a fast-growing market (Wang, 2004). It is a monopodial epiphytic orchid, having indeterminate inflorescences. Phalaenopsis spike (bolt) and bloom under conditions of proper temperature and light after the plants have matured (Lee and Lin, 1984; Wang, 1995). The potential flower spikes usually emerge at the axils of the third and/or fourth basipetal mature leaf (Lee and Lee, 1996).

Phalaenopsis can only be sold on the retail market when in bloom. The ability of phalaenopsis to spike and bloom under inductive environmental conditions is highly correlated with its leaf size, but there is a significant difference among various hybrids (Lee, 1991). It is important to program phalaenopsis to bloom when the market demand is the greatest, such as at Chinese New Year,

Valentine's Day, Mother's Day, Christmas, etc.

The period from spiking to first open bloom is unaffected by factors such as lighting, photoperiodism, and fertilizer when the temperature is held constant (Lin and Lee, 1998; Wang and Hsu, 1994). Because spiking precedes flowering in phalaenopsis, controlling spiking becomes the focus for the effective control of the flowering time of this orchid. The application of plant growth substance may be one solution to controlling spiking (Wang, 1995). Phalaenopsis is unable to spike and bloom at high temperatures (Lee and Lin, 1984; Wang et al., 2006). If a spiked phalaenopsis plant is moved to a high-temperature environment (30 °C) before its inflorescence differentiation, it will not

produce flowers. This situation may be related to the decline of gibberellic acids (GAs) and cytokinin concentration in the developing flower stem (Chen et al., 1994; Chou et al., 2000). Using plant growth substances such as GA₃ or N-6-benzyladenine (BA) separately at high temperatures failed to induce phalaenopsis to spike or bloom (Chen et al., 1994, 1997; Kubota et al., 1997). However, Chen et al. (1994) injection of GA₃ into phalaenopsis plants that had already developed 3- to 5-cm-long floral spikes initiated at a cooler temperature resulted in flowering at high temperature (30 °C).

At lower temperatures (25/20 °C), treating phalaenopsis with GA₃ resulted in long flower spikes and higher flower count. However, the petals are relatively thin, and lopsided flowers are easily generated (Lin, 1994). Spraying phalaenopsis with BA at a low temperature resulted in more flowers and flower spikes (Ho and Yang, 1990; Lin, 1994). Spraying BA on phalaenopsis when the first visible flower bud occurs led to more flowers with larger flower diameters and relatively thicker petals. However, the percentage of flower bud abortion increased (Lin, 1994).

The objective of this study was to investigate the feasibility of using BA in the regulation of phalaenopsis flowering to increase the spiking percentage, the spike, and flower count of phalaenopsis.

Materials and methods

EXPT. 1: EFFECT OF BA ON SPIKING PERCENTAGE AND FLOWER COUNT. Plants of two commercial phalaenopsis cultivars were selected, including phalaenopsis Luchia Pink '244' and doritaenopsis Taisico Firebird 'OX'. Mature plants (six leaves and the leaf spread was 25–30 cm) used in this experiment were grown in 10.5-cm-diameter pots (volume of 650 mL) that were filled with Chilean

We thank OX ORCHIDS for providing plant materials and greenhouses during the experiment.

Department of Horticulture, National Taiwan University, No 1, Sec. 4, Roosevelt Road, 106, Taipei, Taiwan

¹Corresponding author. E-mail: hyha@ntu.edu.tw.

Units

To convert U.S. to SI, multiply by	U.S. unit	SI unit	To convert SI to U.S., multiply by
29.5735	fl oz	mL	0.0338
2.54	inch(es)	cm	0.3937
7.4892	oz/gal	g·L ⁻¹	0.1335
1	ppm	mg·L ⁻¹	1
(°F - 32) ÷ 1.8	°F	°C	(1.8 × °C) + 32

Table 1. Reproductive growth of phalaenopsis Luchia Pink ‘244’ and doritaenopsis Taisico Firebird ‘OX’ orchids that were sprayed with 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine (BA) on days 1 and 14 after low temperature treatment (26/18 °C).^z

Cultivar	BA treatment (70 mg·L ⁻¹) ^y	Spiking percentage after cooling [mean ± SE (%)]		Flower spikes (no./plant)		Spike deformity [mean ± SE (%)]	Flowers (no./plant)
		Week 4	Week 14	Week 4	Week 14	Week 14	Week 14
Phalaenopsis Luchia Pink ‘244’	No	58 ± 12	100 ± 0	0.6 b	1 b	0 ± 0	8.3 a
	Yes	98 ± 4	100 ± 0	1.2 a	1.2 a	43 ± 19	8.5 a
Doritaenopsis Taisico Firebird ‘OX’	No	100 ± 0	100 ± 0	1.5 b	1.6 b	0 ± 0	11.3 a
	Yes	100 ± 0	100 ± 0	2 a	2 a	3 ± 6	8.6 b

^zEight replications for each treatment, with eight plants per replication. Mean separation within columns by least significant difference test at $P \leq 0.05$.

^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm.

sphagnum moss as the sole growing substrate. They were grown from 4 Mar. 2003 to 1 Sept. 2004 in a greenhouse with an average daytime temperature of 28 °C, an average night temperature of 23 °C, an average photosynthetic photon flux (*PPF*) at 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (maximum 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon), and a 12-h photoperiod. Plants were fertigated once weekly, alternating 0.2 and 0.5 g·L⁻¹ of 20N–8.6P–16.6K water-soluble fertilizer (Peters; Scotts, Marysville, OH).

On 1 Sept. 2004, plants were moved into a greenhouse regulated to 26 °C day and 18 °C night, with an average *PPF* at 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (maximum 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at noon) and a 12-h photoperiod. Plants were fertigated weekly with 0.3 g·L⁻¹ 10N–12.9P–16.6K water-soluble fertilizer (Peters), and they were sprayed biweekly with 1 g·L⁻¹ 10N–12.9P–16.6K water-soluble fertilizer at ≈ 1500 HR. On days 1 and 14 after they were moved into the cool room, they were sprayed to drip with about 10 mL of a solution containing 70 mg·L⁻¹ BA (Sigma, St. Louis) and 0.05% Tween 20 (Sigma) at dusk. The powder of BA was dissolved in 1 N NaOH and was diluted for spraying. There were eight replications per treatment, each having eight plants. Most phalaenopsis hybrids could spike within 4 weeks of 26/18 °C treatment and have the first open bloom before week 14. Therefore, we collected data on spiking percentage, spike number in weeks 4 and 14 after the treatment, flower count, and spike deformity on week 14. The least significant difference (LSD) test was used for comparing treatment effects.

EXPT. 2: EFFECT OF BA ON SPIKING AND FLOWER QUALITY. Two

cultivars, phalaenopsis Tai Lin Redangel ‘Queen’ and phalaenopsis Sogo Yukidian ‘V3’, were cultured similar to those in the above experiment. Plants were moved to a greenhouse on 6 Sept. 2005 for the low-temperature treatment (26/18 °C, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ *PPF*, and a 12-h photoperiod). The leaves were sprayed with 0, 50, 100, or 150 mg·L⁻¹ BA at dusk. All solutions had 0.05% Tween-20. The spray solutions were used at an average of 10 mL per plant. There were eight replications, each having four plants. We recorded the date of anthesis, flower spike number, flower count, flower diameter on week 14, and flower longevity after the first flower started to wilt. LSD test was used for comparing treatment effects.

Results and discussion

In Expt. 1, spraying 70 mg·L⁻¹ BA on whole plants on days 1 and 14 after the low-temperature treatment increased the spiking percentage of phalaenopsis Luchia Pink ‘244’ from 58% ± 12% (mean ± SE) to 98% ± 4% by the end of the 4th week (Table 1). These results indicated that BA could accelerate the spiking of phalaenopsis and be scheduled for specific festivals. All plants bloomed after 14 weeks. The flower spike numbers of phalaenopsis Luchia Pink ‘244’ and doritaenopsis Taisuco Firebird ‘OX’ plants treated with BA increased from 1 to 1.2 flower spikes per plant and from 1.6 to 2 flower spikes per plant, respectively, in week 14 (Table 1). This result was similar to that of spraying 50 to 150



Fig. 1. Deformed flower spike of phalaenopsis Luchia Pink ‘244’ orchid that was caused by spraying 70 mg·L⁻¹ N-6-benzyladenine on days 1 and 14 after low temperature treatment [26/18 °C (78.8/64.4 °F)]; 1 mg·L⁻¹ = 1 ppm, 1 cm = 0.3937 inch.

Table 2. Flower spike number and flower quality of phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen' and phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3' orchids as affected by the spraying of various concentrations of N-6-benzyladenine (BA) on the 1 of low temperature treatment (26/18 °C).^z

Cultivar	BA concn (mg·L ⁻¹) ^y	Time to anthesis (d)	Flower spikes (no./plant)	Flower spike length (cm) ^x	Flowers (no./plant)	Flower diam (cm)	Flower longevity (d)
Phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen'	0	139.4 a	1.1 a	80.9 a	10.4 b	10.3 a	101.3 a
	50	138.1 a	1.3 a	80 a	11.1 ab	9.8 a	105 a
	100	135.8 a	1.1 a	81 a	11.1 ab	10 a	103 a
	150	135.9 a	1.5 a	84.4 a	14 a	9.7 a	101.3 a
Doritaenopsis Sogo Yukidian 'V3'	0	108.3 a	1.3 b	65.3 a	10.1 a	11.2 a	125.9 a
	50	106.6 a	1.6 ab	63.9 a	11.5 a	11.1 a	130.4 a
	100	105.9 a	1.6 ab	63.5 a	11.1 a	10.6 a	126.9 a
	150	98 b	2 a	57.1 a	12.1 a	10.4 a	126.8 a

^zEight replications for each treatment, with four plants per replication. Mean separation within columns by least significant difference test at $P \leq 0.05$.

^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm, 1 cm = 0.3937 inch.

mg·L⁻¹ BA in week 2 after the low-temperature treatment began (Lin, 1994). However, the increased bud abortion observed by Lin (1994) was not found in this experiment. This may be caused by the different cultivar, culture technique, and the timing of BA treatment and its concentrations.

It was reported that spraying 50 to 150 mg·L⁻¹ BA on whole plants in week 2 after the low-temperature treatment had begun and also when the first floret bud was visible increased the flower count of *Phalaenopsis amabilis* and phalaenopsis Taisuco Bright (Lin, 1994). However, in the present experiment, spraying 70 mg·L⁻¹ BA on whole plants on days 1 and 14 after the low-temperature treatment did not increase the flower count of doritaenopsis Taisico Firebird 'OX', although some plants bore three flower spikes but had only one to two flowers on each spike. The total flower count of this cultivar was less than that of the plants with a single spike [11.3 and 8.2 flowers per plant, respectively (Table 1)]. In addition, the use of BA upon phalaenopsis Luchia Pink '244' caused seriously forked spikes (Fig. 1). This abnormality appeared to be the result of a reduced apical dominance in spike. These results suggested that while the proper use of BA may increase the timeliness of spiking and the increase of flower spikes, more spikes may not result in a higher flower count, and the use of BA may cause spike deformity.

The results of Expt. 2 indicated that foliar application of 150 mg·L⁻¹ BA on phalaenopsis Tai Lin Redangel

'Queen' increased the flower count (from 10.4 to 14 flowers per plant), but not flower spike number and length or flower diameter (Table 2). However, foliar application of 150 mg·L⁻¹ BA on phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3' increased the flower spike number from 1.3 to 2 flower spikes per plant and accelerated anthesis. None of the treatments resulted in bud abortion. The results showed that application of BA may increase the spike number or flower count in some phalaenopsis cultivars, but not the others. There was no flower spike deformity in Expt. 2, which may be due to different phalaenopsis cultivars and different treatment periods of BA.

Conclusions

Foliar application of 70 mg·L⁻¹ BA on whole plants on days 1 and 14 after the low-temperature treatment accelerated spiking by the end of the 4th week. The number of flower spikes in phalaenopsis Luchia Pink '244' and doritaenopsis Taisico Firebird 'OX' were also increased by BA treatment. Spraying 150 mg·L⁻¹ BA on whole plants on day 1 of the low-temperature treatment increased the number of flower spikes in phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3' and the flower count in phalaenopsis Tai Lin Redangel 'Queen' without affecting flower longevity. However, BA may cause flower spike deformity in some phalaenopsis cultivars. It is recommended that 14 to 16 weeks before specific festivals, the phalaenopsis orchids should be put into 26/18 °C and BA treatments (100–150 mg·L⁻¹) at day 1 for commercial phalaenopsis

orchids production. However, BA may not be not effective for all cultivars.

Literature cited

- Chen, W.S., H.W. Chang, W.H. Chen, and Y.S. Liu. 1997. Gibberellic acid and cytokinin affect *Phalaenopsis* flower morphology at high temperature. Hort-Science 32:1069–1073.
- Chen, W.S., H.Y. Liu, Z.H. Liu, L. Yang, and W.H. Chen. 1994. Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. Physiol. Plant. 90:391–395.
- Chou, C.C., W.S. Chen, K.L. Huang, H.C. Yu, and L.J. Liao. 2000. Changes in cytokinin level of *Phalaenopsis* leaves at high temperature. Plant Physiol. Biochem. 38:309–314.
- Ho, F.W. and L. Yang. 1990. Effects of plant growth regulators on the growth and flowering of *Phalaenopsis*. Annu. Rept. Taiwan Sugar Res. Inst. 1989–90: 17–18.
- Kubota, S., H. Hamotsu, I. Kazuo, and K. Masaju. 1997. Effect of light condition and GA₃ application on development of axillary buds during low temperature treatment in *Phalaenopsis*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 66:581–585.
- Lee, N. 1991. Juvenility in *Phalaenopsis*. Proc. 2nd Symp. on Regulating the Production Period of Horticultural Crops. Taichung District Agr. Expt. Sta. Special Issue 23. p. 77–86.
- Lee, N. and G.M. Lin. 1984. Effect of temperature on growth and flowering of *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 30:223–231.
- Lee, N. and J.H. Lee. 1996. Changes in carbohydrates in *Phalaenopsis* flower induction and inflorescence development. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 42:262–275.

- Lin, Y.R. 1994. Effect of light, temperature and plant growth regulators on flowering of *Phalaenopsis* spp. Graduate Institute of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Master's thesis.
- Lin, Y.R. and N. Lee. 1998. Light requirement of *Phalaenopsis* prior to and after cool-temperature forcing. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 44:463–478.
- Wang, Y.T. 1995. Gibberellic acid on *Phalaenopsis*. Amer. Orchid Soc. Bul. July:744–745.
- Wang, Y.T. 2004. Flourishing market for potted orchids. Flower Tech. 7:2–5.
- Wang, Y.T. and T.Y. Hsu. 1994. Flowering and growth of *Phalaenopsis* orchids following growth retardant applications. HortScience 29:285–288.
- Wang, Y.T., W.T. Tsai, and T.E. Dai. 2006. Heavy shading: An effective, low-cost alternative to high temperatures for inhibiting spiking in *Phalaenopsis*. Proc. Taiwan Intl. Orchid Symp. p.164–173.

Full Length Research Paper

Mycorrhizal symbiosis enhances *Phalaenopsis* orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*

Po-Hung Wu¹, Ding-Ding Huang² and Doris C. N. Chang^{1*}

¹Department of Horticulture, National Taiwan University, No 1, Sec. 4, Roosevelt Rd., 10617, Taipei, Taiwan.

²Department of Biotechnology, Asia University, 500, Lioufeng Rd., Wufeng, Taichung 41354, Taiwan.

Accepted 13 July, 2011

Phalaenopsis is the most important potted orchid genus in the world. However, the low seedling survival rate, long vegetative growth period and disease outbreak are problems in production. Orchid micorrhizal fungi (OMF) are their obligate partners in orchid physiology. Orchids use their symbionts to gain access to organic and mineral nutrients by increasing nutrient absorption and translocation to plants under natural conditions. The benefit of orchid mycorrhizal symbiosis using *Phalaenopsis* as model plants was conducted. We inoculated *in vitro* grown plantlets of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly KC1111' and *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' with two OMF isolates, *Ceratobasidium* sp. AG-A (R02) and *Rizoctonia solani* AG-6 (R04). The effects of OMFs on orchid plant growth and *Erwinia* soft rot progression were examined after two months of *ex vitro* growth. The results showed that the presence of OMFs in *Phalaenopsis* roots significantly increased the growth and soft rot resistance of plants. Selectivity of cultivar type to different OMF was also observed. The relevance of this findings and future work are discussed.

Key words: *Phalaenopsis*, orchid micorrhizal fungi, orchid, cultivar type.

INTRODUCTION

Orchids is the most important potting plant in the world with 30% annual market growing rate (Wang, 2004). *Phalaenopsis* is the most popular orchid species and is only sold in the retail market when in blossom (U. S. Dept. Agr. 2007; Vereniging van Bloemveilingen, 2007). Taiwan is one of the largest orchid plant exporters. The total export value for 2007 was nearly US\$50 million (Kras, 2008). Over the years, traditional breeding has generated a large pool of new hybrids and genetic variation. Great advances in tissue culture techniques also allow mass production of disease free orchid plantlets from seeds or vegetative tissues. *Phalaenopsis* is a monopodial epiphytic orchid having indeterminate inflorescence. The ability of *Phalaenopsis* to spike (bolt) and flower under inductive environmental conditions, such as low temperature and dim light, is highly correlated with leaf size as plants mature (Wang, 1995)

but with a significant difference among various hybrids (Lee, 1991). The potential flower spikes usually emerge at the axils of the 3rd or/and the 4th basipetal mature leaf (Lin, 2002).

One of the major problems in orchid production is that seedlings require at least two years of vegetative growth before flowering. Orchid seedlings grown in flasks are first transferred to a community pot, then thumb pots, and then to a larger typical commercial pot. The duration of each transfer is about three to six months. *Phalaenopsis* spike and blossom can be controlled under proper temperature and light, and application of synthetic chemical and plant growth regulator, after plants have matured (Wang, 1995). Nevertheless, precocious flowering will affect flower size and number of flowers per spike. Poor seed germination and high mortality rates in young plantlets also affect orchid production in the nursery.

Another problem is disease outbreak during orchid cultivation. Diseases caused by bacteria, fungus or viruses can affect the quality of plants by leaving brown spots and scars if the disease is not controlled or eradicated, causing economic losses in orchid production.

*Corresponding author. E-mail: cymmvlscc@hotmail.com. Tel: +886-2-33664869. Fax: +886-2-23625542.

Soft rot diseases caused by *Erwinia* spp. is the most devastating diseases in orchid production (Liau et al., 2003). Good husbandry by controlling water availability and quality, lighting, airflow, optimal temperature and preventing nutrient deficiency during cultivation is crucial in disease prevention. Development of transgenic orchids is an alternative method of disease control (Belarmino and Mii, 2000). Transfer of a sweet pepper ferredoxin-like protein and defensin into phalaenopsis was successful in the reduction of soft rot infection caused by *Erwinia* spp. (Liau et al., 2003; Chan et al., 2005).

Orchids are obligate that are dependent on orchid micorrhizal fungi (OMF) and use the symbionts to access organic and mineral nutrients by increasing absorption and translocation to plants (Smith and Read, 1997). Orchid seeds (OMF) inoculation of micropropagated plantlets or seedlings with mycorrhiza has improved the germination rate (Chang and Chou, 2001; Takahashi et al., 2001). It is also suggested that OMF seedlings increases *ex vitro* survival rates, enhances vegetative and reproductive growth, induces early flowering improves flower quality, and reduces disease infection (Chang, 2008). Burgeff (1959) observed that orchid seed germination was impossible in the absence of OMF under natural conditions. OMF inoculation was also reported to improve seed germination rates and protocorm development in various species (Chang and Chou, 2001; Takahashi et al., 2001; Johnson et al., 2007). In this study, the effects of OMF inoculation on plant growth and development of soft rot disease (*Erwinia chrysanthemi*) are described in *Phalaenopsis* orchids.

MATERIALS AND METHODS

Phalaenopsis Dtps. Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' (V31) were used in this study. *In vitro* established orchid plants were used as initial plant materials. Orchids were kept in a growth chamber under a 12 h light/12 h dark photoperiod with average day/night temperatures of 28/23°C. Relative humidity was 70% with lighting of 3000 Lux. Plants were fertilized once weekly, alternating between 0.2 and 0.5 g·L⁻¹ of a Peters water soluble fertilizer (20N-8.6P-16.6K; Scotts, Marysville, Ohio) at EC value of 0.6 TO 0.8 ds/m. Chilean sphagnum moss *Sphagnum Magellanicum* was used as the potting medium.

Orchid micorrhizal fungi culture and plant inoculation

Two OMF isolates R02 and R04 were used. R02 is *Ceratobasidium* sp. AG-A whereas R04 is *Rizoctonia solani* AG-6 (Chang, unpublished data). R02 and R04 inoculums were prepared as described previously (Chang and Chou, 2007). About 0.1 g of inoculum was applied around the roots of KC1111 and V31 cultivars while transplanting *in vitro* plants to pots. OMF growth in root was verified using florescent light microscopy based on a method developed by Chang's laboratory. Briefly, OMFs were found intracellularly in the cells of the cortex and they were confined to the roots. OMF infection forms a tightly coiled hyphal structure termed a peloton in the cells. Each florescent dot indicates a peloton in the cell by immunofluorescence assay (Smith and Read, 1997; Chang

and Chou, 2007). OMF inoculated plants, mycorrhizal KC1111 (inoculated with R02 or R04) and mycorrhizal V31 (inoculated with R02 or R04), were used for growth assessment and *E. chrysanthemi* inoculation after two months.

E. chrysanthemi culture and plant inoculation

E. chrysanthemi was obtained from Dr. Hao-ren Huang at the National Cheng-Kung University, Tainan, Taiwan. A single colony of *E. chrysanthemi* was grown overnight in 5 ml of YEP medium. The bacterial culture was then adjusted to OD₆₀₀ = 1.0 and used for inoculation with a series of dilutions (1 × 10⁻¹ to 10⁻⁷).

Fully grown leaves (2nd leaf from the top) from OMF infected orchid plants were used for inoculation. Leaf inoculation was carried out using a syringe needle 2 cm apart. 10 µl each of series diluted bacterial inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette. Inoculated orchid plants were placed in sealed plastic bags and kept in the growth chamber. The area of soft rot infection was characterized by forming a water clear zone after 24 h of inoculation. The radius of the infection zone was measured and calculated using least significant difference (LSD). Mean of 10 replicates for each treatment was presented.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of OMF inoculation on growth of orchid plants

Growth of two KC1111 and V31 plants were evaluated after two months of OMF inoculation. OMF isolates R02 and R04 were used for inoculation of mycorrhizal plants. Mycorrhizal KC1111 (R02 and R04) had larger leaf size than the control (Figure 1A and B). Similar results were also found in mycorrhizal V31 plants inoculated with R02 but not with R04 (Figure 1C and D). Mycorrhizal V31 (R04) showed no enhanced growth which may be due to no or low level of R04 colonization in the roots because of host selectivity. Growth stimulation was confirmed by weighing the plants. The fresh weights of orchid plants were increased significantly as indicated by their appearances as shown in Figure 2. The relationship between orchids with OMF is ubiquitous in the plant kingdom. Orchids use their symbionts to gain access to organic and mineral nutrients by increasing absorption and translocation to plants (Smith and Read, 1997). The fungi form hyphae and penetrate the soil around the infected organ which help to break down complex organic materials and tap unusual substrates for nutrients. OMFs can also transfer carbon from neighboring trees to orchids and increase the nutrient absorption surface of host plant root systems (Dearnaley, 2007). Alexander and Hadley (1984) found that plant growth and the uptake of phosphorus and nitrogen were enhanced in mycorrhizal *Goodyera repens* plants. The rate of 32^P uptake was up to 100 times greater than that of non-mycorrhizal plants. They also found a reduction in root/shoot ratio in mycorrhizal plants and plantlets. Decrease in root/shoot ratio is often associated with increased nutrient availability. It is not clear whether nutrients was translocated across a living interface between plants and

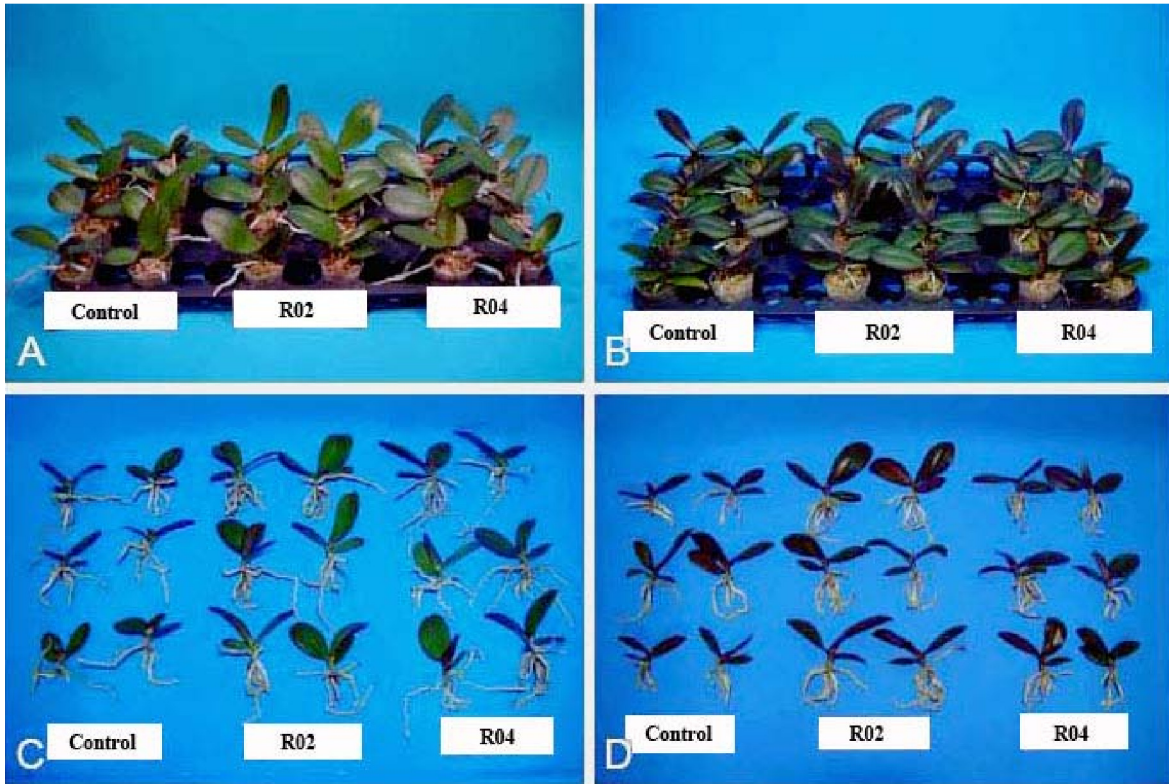


Figure 1. Plant growth of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel 'V31' (V31) inoculated with orchid micorrhizal fungi. (A) and (C) KC1111 orchid plants inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04, respectively; (B) and (D) V31 orchid plants inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04, respectively. Growth stimulation is characterized by orchid plants having a larger leaf span and better root growth than control after 4 months of inoculation.

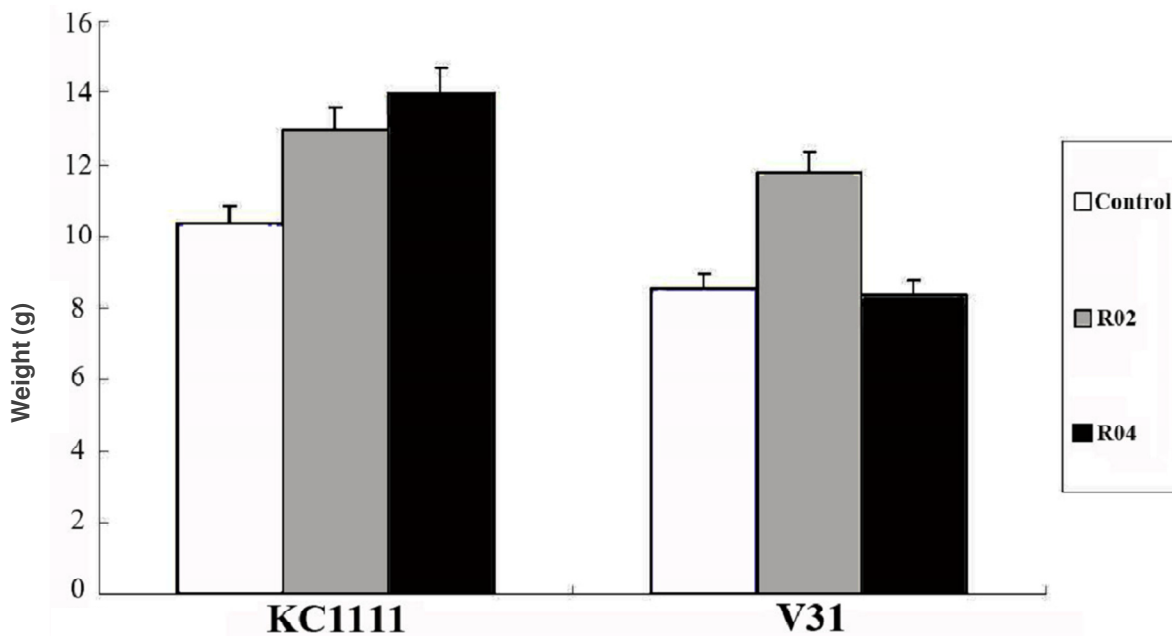


Figure 2. Fresh weights of four months old *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel 'V31' (V31) plants after been inoculated with *Rizoctonia* isolates R02 and R04 respectively. Mean total with a common letter was not different ($P \leq 0.05$) by least significant difference and are expressed in grams.

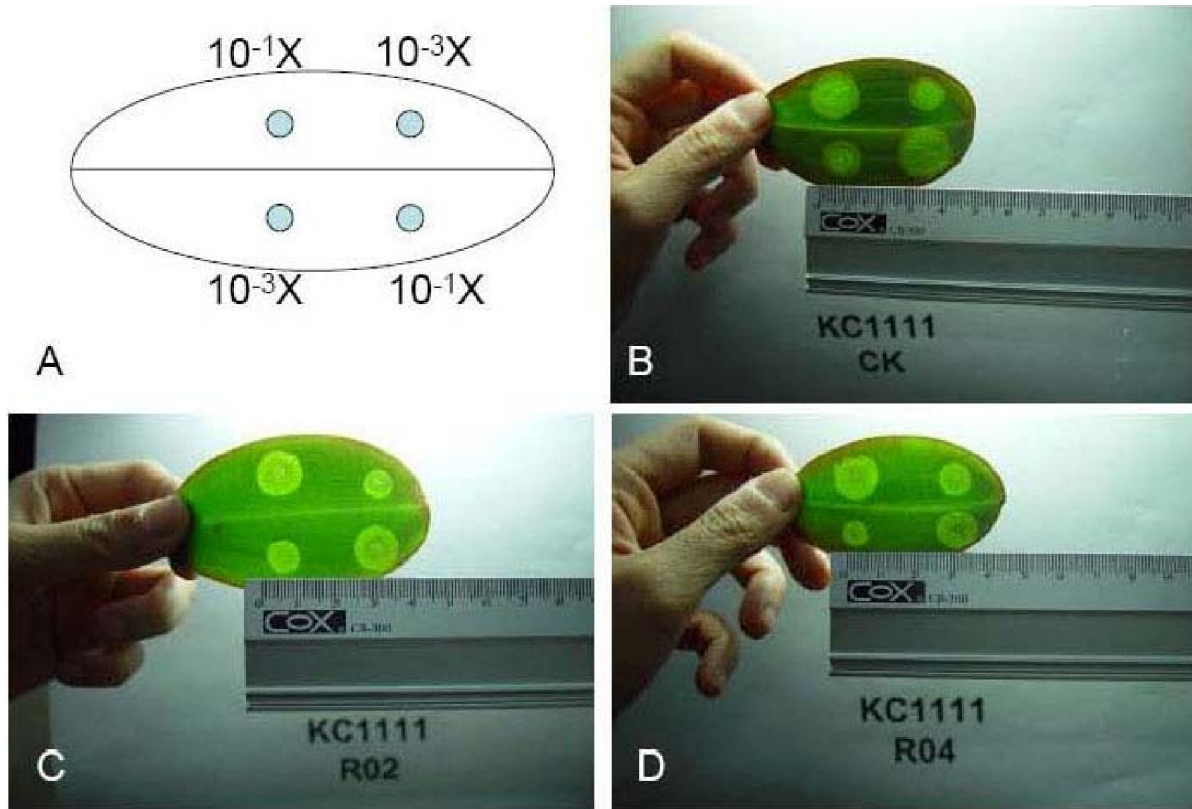


Figure 3. Soft rot development on leaves of *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) inoculated with *E. chrysanthemi* after 24 h of inoculation. (A) 10 μ l each of series diluted *E. chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-mycorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.

mycorrhiza or released upon digestion of the fungus. It has been suggested that nutrients are possibly derived from the digestion of the fungi. However, it is still not known if the enzymes involved in the digestion are produced by plant or OMF. OMFs inoculation was also reported to improve growth and development of other orchid plants in *Haemaria discolor* (Chang and Chou, 2001) and *Anoectochilus formosanus* Hayata (Chang and Chou, 2007).

Erwinia soft rot progression on leaves of OMF symbiotic orchid

The second leaves from the top, were used for *E. chrysanthemi* inoculation. A series dilution between 1×10^{-1} and 10^{-7} was tested for effectiveness of inoculation (data not shown). Soft rot development was characterized by forming a clear circle zone on the leaves (Figures 3 and 4). The disease progressing on the leaves of mycorrhizal KC1111 (inoculated with R02 or R04) and mycorrhizal V31 (inoculated with R02 or R04) were compared using two bacterial dilutions (1×10^{-1} and 10^{-3}). The mean of 10 replicates for each treatment is

presented in Table 1. The development of soft rot on mycorrhizal KC1111 (inoculated with R04 at highest inoculum) leaves was significantly reduced. Nevertheless, the reduction was more evident on mycorrhizal KC1111 (inoculated with R04) leaves. Mycorrhizal V31 inoculated with R02 significantly reduced soft rot development but not with R04. Disease symptom reduction is correlated to the better plant growth.

It is not known if the reduction in soft rot development is due to the fact that plants grow better, making plants have higher resistance, or that plants are capable of producing antibacterial reagents from mycorrhizal symbiosis. It was found that the activities of acid and alkaline phosphatases in roots and superoxide dismutase in leaves, contents of polysaccharides, polyphenols, flavonoids, ascorbic acid and phosphate were significantly higher in the OMF infected *Anoectochilus formosanus* tissues than in the non-mycorrhizal control (Chang and Chou, 2007). Watkinson et al. (2005) also found that the level of trehalose increased when the orchid *Cypripedium parviflorum* was inoculated with *Thanatephorus pennatus*. It is suggested that trehalose plays a protective role against abiotic stress (Penna, 2003). Genes induced in orchids during mycorrhizal

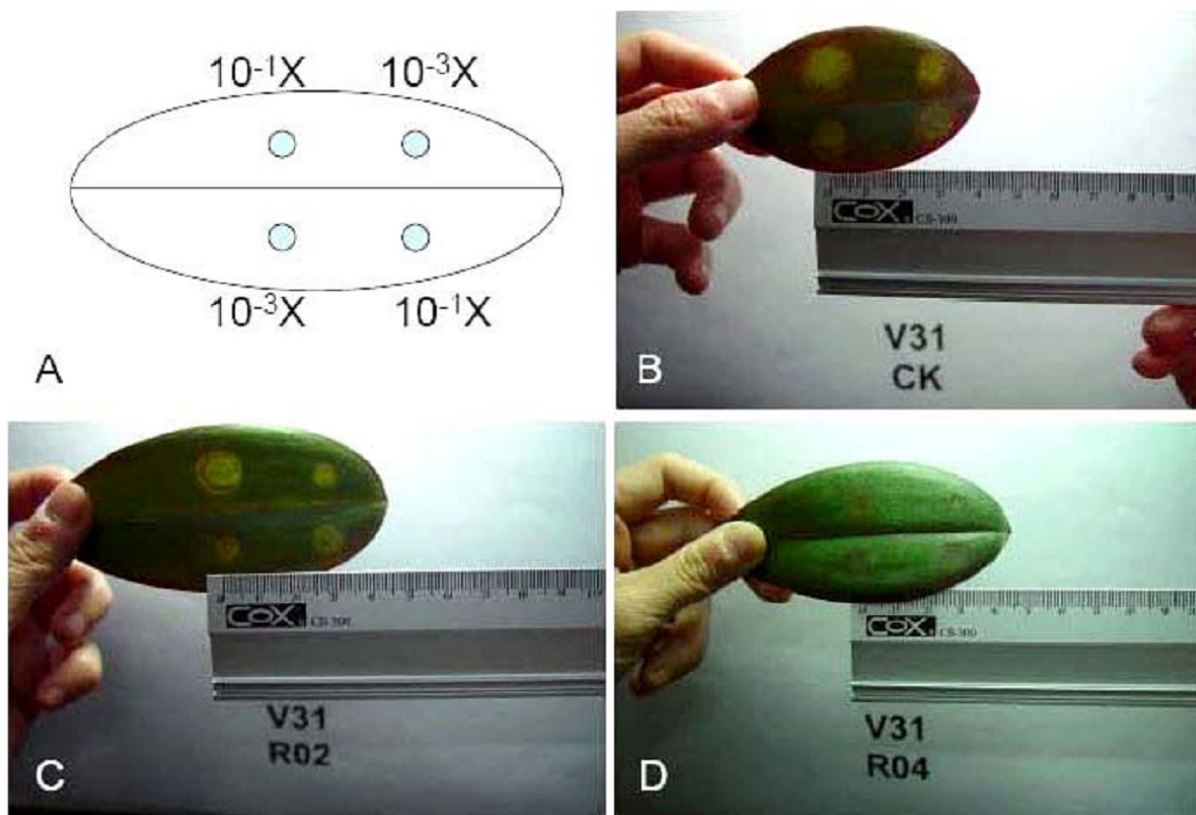


Figure 4. Soft rot development on leaves of *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel' (V31) inoculated with *E. chrysanthemi* after 24 h of inoculation. (A) 10 μ l each of series diluted *E. chrysanthemi* inoculum was applied directly onto the wounding site with a micropipette; (B) non-micorrhizal fungi infected control; (C) *Rizoctonia* isolates R02 infected; (D) *Rizoctonia* isolates R04 infected.

Table 1. Radius of the soft rot development in orchid micorrhizal fungi (*Rizoctonia* isolates R02 and R04) inoculated *Doritaenopsis* Taisuco Wonder 'King Car Butterfly' (KC1111) and *Phalaenopsis* Tai Lin 'Redangel' (V31) (V31), respectively. Soft rot development was characterized by the formation of a clear circle zone.

Orchid cultivar	Treatment	Radius of soft rot tissue (mm)	
		1 \times 10 ⁻¹ dilution	1 \times 10 ⁻³ dilution
KC1111	Control	6.9 ^a	3.9 ^a
	R02	6.4 ^{ab}	4.2 ^a
	R04	5.7 ^b	3.2 ^a
V31	Control	7.0 ^a	4.1 ^a
	R02	4.3 ^b	2.2 ^b
	R04	6.0 ^a	3.2 ^a

Means in each column followed by different letter at 5% significant level are significant as determined by least significant difference (LSD) test.

symbiosis are associated with the initiation of OMF infection and spread, nutrient translocation, digestion of OMF fungi and promoting plant growth. Induction of biotic and abiotic stress related genes were also reported during arbuscular mycorrhiza development in *Medicago truncatula* (Wulf et al., 2003). It is suggested that

flavonoids and phenolic compounds may be the signal for molecules produced in plants to induce spore germination and direct mycelium growth to a suitable host in legumes during symbiosis (Hirsch and Kapulnik, 1998; Martin et al., 1999).

The interaction between plant and fungus is suggested

to be highly specific and regulated by the plant to prevent parasitism by the fungus (Hirsch and Kapulnik, 1998; Martin et al., 1999). The fungus recolonises the plant each year and continues to benefit the host. It is therefore assumed that the plant exudes a powerful attractant (Smith and Read, 1997). Orchinol is a phytoalexin produced by the orchid plants and may play such a function to control the development of the mycorrhiza, both in space and time (Beyrle et al., 1995). Thus, the mechanism of increasing soft rot disease resistance by mycorrhiza needs further investigation.

REFERENCES

- Alexander C, Alexander IJ, Hadley G (1984). Phosphate-uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 97: 401–411.
- Belarmino MM, Mii M (2000). Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep.* 19:435–442.
- Beyrle HF, Smith SE, Peterson RL, Franco CMM (1995). Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses, *Can. J. Bot.* 73: 1128–1140.
- Burgeff H (1959). Mycorrhiza of Orchids. in Withner CR, ed. *The Orchids, A Scientific Survey*. The Ronald Press Company, New York, Pp. 361-395.
- Chan YL, Lin KH, Sanjaya Liao LJ, Chen WH, Chan MT (2005). Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. *Transgenic Res.* 14: 279-288.
- Chang DCN (2008). Research and Application of orchid mycorrhiza in Taiwan. *Acta Hort.* 766: 299-305.
- Chang DCN, Chou LC (2007). Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by *Rhizoctonia* Orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Bot.* 48:446-451.
- Chang DCN, Chou LC (2001). Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. *Symbiosis*, 30: 29-40.
- Chang WC (2007) In vitro morphogenesis and micro-propagation of orchids. In: Chen WH and Chen HH (eds), *Orchid Biotechnology*. World Scientific, Singapore, pp. 45-64.
- Dearnaley JD (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17: 475-86.
- Hirsch A M, Kapulnik Y (1998). Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Fungal Genet. Biol.* 23: 205-212.
- Johnson TR, Stewart SL, Dytra D, Kane ME, and Richardson L (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90:313-323.
- Kras JN (2008). Orchid beauty a profession. *FloraCulture International*, June 2008.
- Liau CH, Lu JC, Prasad V, Hsiao HH, You SJ, Lee JT, Yang NS, Huang HE, Feng TY, Chen WH, Chan MT (2003). The sweet pepper ferredoxin-like protein (*pf1p*) conferred resistance against soft rot disease in *Oncidium* orchid. *Transgenic Res.* 12: 329-336.
- Lin CF (2002). Effects of orchid mycorrhizal fungi on seed germination and the seedling growth of *Denrobium*. Master's thesis. Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Martin M, Mengs G, Allende JL, Fernandez J, Alonso R, Ferrer E (1999). Characterization of two novel propachlor degradation pathways in two species of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 802-806.
- Penna S (2003). Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8:355-357.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, pp. 349-375.
- Takahashi K, Ogiwara I, Hakoda N (2001). Inoculation of *Habenaria* (*Pecteilis*) radiata with two isolates of orchid mycorrhizal fungi: Germination and growth response to separate, simultaneous, and consecutive inoculation. *Lindleyana*, 16: 102-108.
- U.S. Department of Agriculture (2007). *Floriculture crops 2006 summary*. Agricultural Statistics Board, U.S. Dept. Agr., Washington, DC.
- Vereniging van Bloemeneveilingen (2007). Annual report 2006. Association of Dutch Flower Auctions. Vereniging van Bloemeneveilingen, Netherlands.
- Wang Y (1995). *Phalaenopsis* orchid light requirements during the induction of spiking. *Hort. Sci.*, 30: 59-61.
- Wang YT (2004). Flourishing market for potted orchids. *Flower TECH*, 7(5): 2-5.
- Watkinson J, Beers EP, Welbaum GE (2005). Differential display analysis of the orchid fungus mycorrhizal association. *Annu. Meeting Am. Soc. Plant Biologists*. Poster 841.
- Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Kuster H, Krajinski F (2003). Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 306-314.

Full Length Research Paper

Cytokinin treatment and flower quality in *Phalaenopsis* orchids: Comparing N-6-benzyladenine, kinetin and 2-isopentenyl adenine

Po-Hung Wu and Doris C. N. Chang*

Department of Horticulture, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Rd., 10617, Taipei, Taiwan.

Accepted 27 October, 2011

We previously documented an N-6-benzyladenine (BA) protocol to increase spike and flower number in *Phalaenopsis* orchids. To increase options for growers, we tested two additional cytokinins, kinetin (Kin) and 2-iso-pentenyl adenine (2-iP), comparing them with BA. Two key commercial cultivars were used (*Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' and *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'). We counted spike number and length, flower number and diameter, time to anthesis and flower longevity. Whole plants were sprayed once with BA (50, 100 or 150 mg·L⁻¹), Kin (100, 200 or 300 mg·L⁻¹) or 2-iP (50, 100 or 150 mg·L⁻¹) either on day 1 of 26 /18°C treatment (Time 1) or when the first flower bud reached 0.2 cm in diameter (Time 2). Surprisingly, all three cytokinins increased flower diameter. With *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' sprayed at Time 1, Kin (200 mg·L⁻¹) increased the number of spikes (1 to 1.5) and flowers (8.4 to 10.4 per plant). BA increased both spike and flower number. Also, at Time 2, BA (100 mg·L⁻¹) increased spike numbers. In the second cultivar, *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31,' spike and flower number increased only with BA. Kin showed no effect in measured parameters, while 2-iP increased flower diameter and longevity. Although, BA was shown to be the most effective in increasing flower and spike number, this research suggests that non-BA cytokinins are useful for increasing flower quality in *Phalaenopsis* orchids.

Key words: 2-Iso-pentenyl adenine (2-iP), kinetin (Kin), spike number, flower count.

INTRODUCTION

Within the last decade, the global orchid market has grown rapidly with public awareness of orchids. Orchids have become one of the top-selling potted plants in Europe (US Department of Agriculture, 2010). *Phalaenopsis* orchids account for 80% of all orchids sold, and can only be sold on the retail market when in flower. Growers who produce the *Phalaenopsis* need to deliver high quality flowering plants to market during key sales periods, such as Thanksgiving, Christmas and Chinese New Year. The attributes considered valuable vary with

the target market. Some markets favor a double-spike plant, while others prefer a single spike on a plant. Preference also varies for spike height. However, in all cases, the orchids plant must be flowering intensively, have many flowers and achieve high prices. Therefore, the main factors that could increase profitability of orchids cultivation is the improvement of flowering characteristics such as spike number, spike length, and number of flower, (Wang, 2004).

Timing of flowering is controlled through timing of spiking. Growers can modulate flowering time in each *Phalaenopsis* cultivars, based on reliably controlling the time of spiking when a potentially flowering stem emerges from a leaf axis. *Phalaenopsis* orchid grow at various light intensity, photoperiod or fertilizer condition, with only slight changes in spiking induction (Wang and Hsu, 1994; Lin and Lee, 1998). However, spike induction followed by temperature control is a reliable way to induce and control

*Corresponding author. E-mail: cymmvlsco@hotmail.com. Tel: +886-2-33664869. Fax: +886-2-23625542.

Abbreviations: Kin, Kinetin; 2-iP, 2-iso-pentenyl adenine; BA, N-6-benzyladenine.

flowering time. For spike induction, vegetative plants are moved from a day temperature 30°C/night temperature 25°C to a lower temperature (day 26°C/night 18°C) and left under such conditions for 4 to 6 weeks (Lee and Lin, 1984; Blanchard and Runkle, 2006).

In addition, the application of cytokinins has been reported to promote flowering (Bernier et al., 1993). Previous study on orchids has explored how cytokinins can enhance flower quality by spike induction. An earlier work was concerned with describing the effect of plant growth regulators, such as BA and GA on growth and flowering of *Phalaenopsis* (Ho and Yang, 1990; Lin, 1994). Later, researches focused on gibberellic acid (GA) (Chen et al., 1994, 1997; Wang, 1995) and N-6-benzyladenine (BA), as the one of the cheapest cytokinins (Kubota et al., 1997). Moreover, with the huge growth in global demand for orchids, researchers have looked at how to create cytokinin protocols to further regulate flowering in orchids (Blanchard and Runkle, 2008; Wu and Chang, 2009). Blanchard and Runkle (2008) treated *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* orchids with either BA or a BA+GA₃ mixture one week after transferring plants into a low air temperature (from a 29 to 23°C). Their main finding was that after BA treatment, the number of flower spikes increased. They also reported that earlier spiking caused early flowering.

Our previous work showed that combining low temperatures and the BA application can be used to control flowering (Wu and Chang, 2009). Thus, two *Phalaenopsis* cultivars showed increased in numbers of flower spikes and flower when plants were treated with a foliar application of BA (100 or 150 mg·L⁻¹) at the day after transfer to lower air temperatures. Plants were ready for market 14 to 16 weeks following transfer to a low air temperature. Wu and Chang (2009) stated that *Phalaenopsis* cultivars respond differently to treatment with BA, either favorably (increased the spike and flower number) or negatively (deformation of spikes). However, there is lack of research on the effect of cytokinins other than BA, used during flowering of commercial *Phalaenopsis* cultivars. Therefore, the objective of this study was to compare the effects of BA and other cytokinins on flowering of potted *Phalaenopsis*.

MATERIALS AND METHODS

Plants of the two important commercial *Phalaenopsis* cultivars exported from Taiwan, *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' and *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31', were used in this study. Mature plants (six leaves with a leaf spread of 25 to 30 cm, approximately 14 to 16 months after deflasking) used in this experiment were initially grown (from 10th March to 25th September, 2006) in 10.5 cm diameter pots (650 ml in volume) that were filled with Chilean sphagnum moss as the sole growing substrate. The greenhouse had average day/night air temperatures of 28/23°C, maximum photosynthetic photon flux (PPF) at 400 μmol·m⁻²·s⁻¹ at noon and natural photoperiod (latitude 23° N). They were fertilized weekly, alternating between 0.2 and 0.5 g·L⁻¹ of a Peters water soluble fertilizer (20N-8.6P-16.6K; Scotts, Marysville, OH).

To initiate spiking, on the 25th of September 2006, mature plants were moved into a low air temperature (day 26°C/ night 18°C, 800 μmol·m⁻²·s⁻¹ PPF, maximum and natural photoperiod). Plants were sprayed weekly with 0.3 g·L⁻¹ 10N-12.9P-16.6K water-soluble fertilizer (Peters), and sprayed biweekly with 1 g·L⁻¹ 10N-12.9P-16.6K water-soluble fertilizer at 1500 HR. Furthermore, plants were treated with one of three cytokinins, at one of three concentrations, and at one of two times. Treatments were either applied after they were moved into the cool room (Time 1), or at the time when the first flower bud reached 0.2 cm in diameter (Time 2, approximately 2 to 3 months after Time 1). These times were chosen based on our previous unpublished trials, which indicated that these application times were the most effective on spike and flower numbers and least likely to lead to deformity of spikes. The following cytokinins used were BA, kinetin (Kin), or 2-Isopentenyl adenine (2-iP) (all from Sigma, St. Louis). Leaves were sprayed to drip with about 10 ml of a solution containing either BA (50, 100 or 150 mg·L⁻¹), Kin (100, 200 or 300 mg·L⁻¹), or 2-iP (50, 100 or 150 mg·L⁻¹) and 0.05% Tween 20 (by vol. Sigma) at dusk. The powders of BA, Kin, and 2-iP were each dissolved in 1 N NaOH and diluted for spraying.

The duration to anthesis, spike and flower number, spike length (from the base to the top of spike), flower diameter, and flower longevity (days from first flower opening to wilting) were recorded at 14th week. These measurements were continued until the first flower wilted. We used a randomized complete block design (RCBD) and least significant difference (LSD) test for comparing treatment effects. Each treatment was used on eight blocks of plants, each with eight plants. Eight plants, each block one plant, was randomly selected, giving eight replicates per treatment. There were three concentrations per cytokinin, three cytokinins and a control, or 1216 plants of each cultivar.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of BA on flowering of the *Phalaenopsis* orchids

Flower spikes were increased in many treatments at Time 1. Spraying 50 to 150 mg·L⁻¹ BA on whole plants on the first day of low temperature treatment increased the number of flower spikes per plant, as well as total number of flower (Table 1). However, the highest concentrations also significantly decreased flower diameter as compared to the control (from 11.2 to 10.4). This was probably due to competition in nutrient access for flower development after increasing in number of flowers. The effects of BA treatments were similar to that in our previous report (Wu and Chang, 2009). In *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3', the 100 mg·L⁻¹ of BA at Time 2 (when the diameter of first buds were approximately 2 mm), significantly increased the total number of flower from 8.4 to 10.5 per plant (Table 1), and flower longevity from 126 to 133. However, the flower diameter was not significantly increased at the middle concentration. On the other hand, BA sprayed at Time 1 on *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' was only effective at high concentration, 150 mg·L⁻¹, to increase number of spike and flower longevity (Table 2).

Effects of 2-iP and Kin on flowering of the *Phalaenopsis* orchids

In the case of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3', Kin was

Table 1. Flower characteristics of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' after applying cytokinins N-6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN), or 2- isopentenyl adenine (2-iP). Cytokinins were applied either on the first day of low temperature treatment (Time 1) or when the first flower bud reached 0.2 cm in diameter (Time 2)².

Cytokinin		Spike				Flower				Timing			
Treatment	Concentration (mg·L ⁻¹) ^y	Number (no./plant)		length (cm) ^y		Number (no./plant)		Diameter (cm) ^y		Flower longevity (days)		anthesis (days)	
Time		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	0	1.0 ^d	1.0 ^a	71.1 ^{ab}	71.1 ^{bc}	8.4 ^b	8.4 ^{bc}	11.2 ^{bcd}	11.2 ^b	126 ^a	126 ^b	107 ^{ab}	107 ^{de}
BA	50	1.6 ^{ab}	1.0 ^a	63.9 ^{abc}	76.5 ^a	11.5 ^a	9.3 ^b	11.1 ^{cde}	11.9 ^a	130 ^a	127 ^{ab}	106 ^b	113 ^{ab}
	100	1.6 ^{ab}	1.3 ^b	63.5 ^{bc}	72.5 ^{ab}	11.1 ^a	10.5 ^a	10.6 ^{de}	11.8 ^{ab}	127 ^a	133 ^a	105 ^b	115 ^a
	150	2.0 ^a	1.1 ^{ab}	57.1 ^c	76.3 ^a	12.1 ^a	10.5 ^a	10.4 ^e	11.9 ^a	127 ^a	128 ^{ab}	106 ^b	113 ^{ab}
Kin	100	1.1 ^{cd}	1.0 ^a	67.9 ^{ab}	72.5 ^{ab}	8.9 ^b	8.8 ^{bc}	11.9 ^{ab}	12.1 ^a	126 ^a	127 ^{ab}	108 ^{ab}	110 ^{cd}
	200	1.5 ^{bc}	1.0 ^a	63.3 ^{bc}	75.5 ^{ab}	10.4 ^{ab}	8.6 ^{bc}	11.6 ^{abc}	12.3 ^a	128 ^a	130 ^{ab}	104 ^{bc}	108 ^{de}
	300	1.3 ^{bcd}	1.0 ^a	71.9 ^{ab}	67.0 ^c	10.0 ^{ab}	8.0 ^c	12.0 ^a	12.1 ^a	130 ^a	131 ^{ab}	110 ^a	107 ^e
2-iP	50	1.3 ^{bcd}	1.1 ^{ab}	73.1 ^a	71.1 ^{bc}	10.5 ^{ab}	9.0 ^{bc}	11.7 ^{abc}	12.2 ^a	129 ^a	132 ^{ab}	105 ^b	109 ^{cde}
	100	1.1 ^{cd}	1.1 ^{ab}	67.0 ^{ab}	71.8 ^{abc}	8.5 ^b	9.3 ^b	11.6 ^{abc}	12.0 ^a	130 ^a	130 ^{ab}	106 ^{ab}	111 ^{bc}
	150	1.0 ^d	1.0 ^a	71.6 ^{ab}	74.9 ^{ab}	8.5 ^b	8.3 ^{bc}	12.1 ^a	12.3 ^a	133 ^a	130 ^{ab}	100 ^c	109 ^{cde}

²Randomized complete block design (RCBD) with eight replicates, eight plants each, and mean separation within columns at $P \leq 0.05$. ^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm. 1 cm = 0.3937 inch

only effective in increasing of the number of spike and number of flower at Time 1 with 200 mg·L⁻¹. No significant effect was found with 2-iP. We see a potential in developing Kin protocols in *Phalaenopsis* orchids culture, but because of the high price of 2-iP, it is unlikely to be commercially viable. Flower number showed economically important differences that in this analysis, did not show statistical differences (Table 1). The control group has an average flower number of 8.4, while the Kin treatment group (Time 1) has an average flower number of 10.5. Commercially, the values of these two groups of plants are considerably different.

The same phenomenon is seen in spike number. The control group had an average spike number of 1.0, while the Kin treatment group (Time 1) has an average spike number of 1.1, 1.3

and 1.5. Treating whole plants with 200 mg·L⁻¹ Kin also increased the flower spikes per plant. Similar effects were found in spraying with 50 mg·L⁻¹ 2-iP. While 200 mg·L⁻¹ Kin applications increased the flower count from an average of 8.4 on control plants to 10.4, the result was not statistically significantly. Flower diameter was enlarged by treatment with 300 mg·L⁻¹ Kin or 150 mg·L⁻¹ 2-iP. Moreover, 2-iP is significantly more expensive to use. No results here justify additional research using 2-iP. We expect, however, that Kin will be useful in commercial protocols if experimented with at higher concentrations (>200 mg·L⁻¹). Furthermore, other examined parameters showed no change in flower diameter at Time 2, or in flower longevity at Time 1. Only two favorable effects were found with 2-iP, both at the highest concentration and at Time 1. At Time 2, the

greatest increase in flower diameter was around 1 cm, both with Kin and 2-iP. All three BA concentrations and the 100 mg·L⁻¹ 2-iP delayed flowering. In *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31', Kin and 2-iP treatments had no effect on increasing the number of flowers or spikes (Table 2) when applied at Time 1, but flower diameter increased with the highest concentration of 2-iP applied at Time 2. The results were overall less striking with this cultivar.

Conclusion

This research documents the effects of three various cytokinins concentrations and application times on two commercial cultivars. Results indicate that *Phalaenopsis* Sogo Yukidian 'V3' was

Table 2. Flower characteristics of *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31' after applying cytokinins N-6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN) or 2- isopentenyl adenine (2-iP). Cytokinins were applied either on the first day of low temperature treatment (Time 1) or when the first flower bud reached 0.2 cm in diameter (Time 2)².

Plant growth regulators		Spike				Flower				Timing			
Treatment	Concentration (mg·L ⁻¹) ^y	Number (no./plant)		length (cm) ^y		Number (no./plant)		Diameter (cm) ^y		Flower longevity (days)		Anthesis (days)	
Time		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	0	1.0 ^b	1.0 ^b	61.4 ^a	61.4 ^{bc}	8.3 ^b	8.3 ^{bcd}	9.8 ^{ab}	9.8 ^{bc}	100 ^b	100 ^{abc}	109 ^{ab}	109 ^c
BA	50	1.0 ^b	1.0 ^b	60.5 ^a	61.4 ^{bc}	8.1 ^b	8.4 ^{bcd}	9.6 ^{ab}	9.6 ^{bc}	111 ^{ab}	114 ^a	110 ^a	111 ^{ab}
	100	1.3 ^a	1.1 ^a	62.8 ^a	62.9 ^{bc}	9.3 ^{ab}	8.9 ^{ab}	9.6 ^{ab}	9.5 ^c	116 ^a	99 ^{abc}	108 ^{ab}	112 ^a
	150	1.4 ^a	1.0 ^b	61.4 ^a	68.9 ^a	9.5 ^a	9.6 ^a	9.4 ^b	9.9 ^{abc}	111 ^{ab}	84 ^c	106 ^b	110 ^{bc}
Kin	100	1.0 ^b	1.0 ^b	62.6 ^a	60.9 ^{bc}	8.4 ^{ab}	7.6 ^d	9.8 ^{ab}	9.9 ^{abc}	110 ^{ab}	110 ^{ab}	107 ^b	111 ^{ab}
	200	1.0 ^b	1.0 ^b	62.9 ^a	60.6 ^{bc}	8.1 ^b	7.9 ^{cd}	9.8 ^{ab}	10.0 ^{ab}	112 ^{ab}	98 ^{bc}	109 ^{ab}	110 ^{abc}
	300	1.0 ^b	1.0 ^b	65.0 ^a	59.1 ^c	8.6 ^{ab}	8.0 ^{bcd}	9.9 ^a	9.8 ^{bc}	106 ^{ab}	97 ^{bc}	109 ^{ab}	110 ^{bc}
2-iP	50	1.0 ^b	1.0 ^b	61.9 ^a	63.5 ^b	8.4 ^{ab}	8.6 ^{bc}	9.9 ^a	9.8 ^{bc}	111 ^{ab}	101 ^{ab}	108 ^{ab}	110 ^{bc}
	100	1.0 ^b	1.0 ^b	61.9 ^a	60.5 ^{bc}	8.4 ^{ab}	7.9 ^{cd}	9.8 ^{ab}	10.0 ^{ab}	117 ^a	114 ^a	106 ^b	110 ^{bc}
	150	1.0 ^b	1.0 ^b	66.3 ^a	59.4 ^{bc}	8.8 ^{ab}	8.3 ^{bcd}	9.9 ^a	10.2 ^a	116 ^a	102 ^{ab}	107 ^{ab}	108 ^c

²Randomized complete block design (RCBD) with eight replicates, eight plants each and mean separation within columns at $P \leq 0.05$. ^y1 mg·L⁻¹ = 1 ppm. 1 cm = 0.3937 inch.

far more responsive to the treatments than *Phalaenopsis* Tai Lin Redangel 'V31'. Cytokinin treatment on the first day of cold treatment (Time 1) appeared most advantageous, although, increased flower count was found when treated at Time 2. BA had the greatest potential for increase flower count on *Phalaenopsis* orchids. This study also reveals that the application of different cytokinin on *Phalaenopsis* plants may varied with be tested before large scale applications.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Ox Orchids for providing the raw trial data upon which this research was based, as well as the plant material and greenhouse space for

this study.

REFERENCES

- Bernier GA, Havelange C, Houssa A, Petitjean, Lejeune P (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*. 5: 1147-1155.
- Blanchard MG, Runkle ES (2006). Temperature during the day, but not during the night, controls flowering of *Phalaenopsis* orchids. *J. Exp. Bot.* 57: 4043-4049.
- Blanchard MG, Runkle ES (2008). Benzyladenine promotes flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids. *J. Plant Growth Regul.* 27: 141-150.
- Chen WS, Chang HW, Chen WH, Liu YS (1997) Gibberellic acid and cytokinin affect *Phalaenopsis* flower morphology at high temperature. *HortScience*, 32: 1069-1073.
- Chen WS, Liu HY, Liu ZH, Yang L, Chen WH (1994). Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. *Physiol. Plant.* 90:391-395.
- Ho FW, Yang L (1990). Effects of plant growth regulators on

- the growth and flowering of *Phalaenopsis*. *Ann. Rept. Taiwan Sugar Res. Inst.* 1989-1990: 17-18.
- Kubota S, Hamotsu H, Kazuo I, Masaju K (1997). Effect of light condition and GA₃ application on development of axillary buds during low temperature treatment in *Phalaenopsis*. *Jpn. Jan. Soc. Hort. Sci.* 66: 581-585.
- Lee N, Lin GM (1984). Effect of temperature on growth and flowering of *Phalaenopsis* white hybrid. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 30: 223-231.
- Lin YR (1994). Effect of light, temperature and plant growth regulators on flowering of *Phalaenopsis* spp. Graduate Institute of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. Master's thesis.
- Lin YR, Lee N (1998). Light requirement of *Phalaenopsis* prior to and after cool-temperature forcing. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 44: 463-478.
- US Department of Agriculture (2010). Floriculture crops summary. Agricultural Statistics Board, Washington, DC.
- Wang YT (1995) Gibberellic acid on *Phalaenopsis*. *Am. Orchid Soc. Bul.* 8: 745.
- Wang YT (2004) Flourishing market for potted orchids. *Flower Tech.* 7:

2-5.

Wang YT, Hsu TY (1994). Flowering and growth of *Phalaenopsis* orchids following growth retardant applications. HortScience, 29: 285-288.

Wu PH, Chang DCN (2009). The use of N-6-benzyladenine to regulate flowering of *Phalaenopsis* orchids. HortTechnology, 19: 200-203.