

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Horticulture

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master thesis

彩葉屬(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)及擎天屬  
(*Guzmania* cv. Hercules)觀賞鳳梨花器培養再生之研究  
The regeneration in floral organs culture of bromeliad  
*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor and *Guzmania* cv.  
Hercules.

許圓珠

Yuan-Chu Hsu

指導教授：許圳塗 博士

Advisor: Dr. Chou Tou Shii

中華民國九十八年七月

July, 2009

## 誌謝

本論文成蒙恩師 許圳塗教授在碩士班期間的悉心指導及鼓勵，充實了專業的知識。稿成後復蒙黃怡菁博士及張耀乾博士詳加批閱斧正，並於百忙之中抽空指導，提供寶貴建議，使本文更加完善，於此謹致最深的謝意與感激。

在學期間，感謝學長姐崇欽、士華、簾涵對我的愛護與照顧，以及同窗長頸鹿、文馨、哲瀚一路上的相互扶持與照顧，還有可愛的學妹們美琴、瑞妤、茜庭、雅雯的陪伴，也感謝實驗室所有的大家，所共同帶給我美好的兩年回憶。

還有身邊所有好朋友、學長姐、學弟妹的鼓勵與愛護，有妳們在，即使心煩意亂、心情低落都有妳們為我加油與打氣，與我分享生命中最寶貴的點點滴滴。

也感謝父母與兄長，一路上的鼓勵與陪伴，讓我變得更加勇敢與堅定，勇敢去追求自己的夢想與未來，也與妳們分享我的成長與喜悅。謹以此論文與兩年寶貴的生活點滴獻給所有疼愛我的大家，也祝福大家都能永遠笑口常開、健康平安、幸福快樂。



圓珠 2009.7 於組培室

### 縮寫字 (Abbreviation)

|                  |                                        |
|------------------|----------------------------------------|
| 2,4-D            | 2,4-dichlorophenoyacetic acid          |
| 2ip              | N <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adenine |
| BA               | N <sup>6</sup> -benzyladenine          |
| GA               | Gibberellic acid                       |
| IAA              | Indole-3-acetic acid                   |
| MS medium        | Murashige and Shoog (1962)             |
| NAA              | 1-naphthalene acetic acid              |
| TDZ(thidiazuron) | N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea  |



## 摘要 (Summary)

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)子房培植體接種於 1/2MS 添加 2,4-D 0.5-2.0 mg/L 組合 NAA 0.5、1.0 mg/L 處理中，以 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 處理可誘導產生黃色顆粒狀癒合組織，產生頻率為 22.2%。此癒合組織繼代於原培養基可持續增生。將癒合組織移至含 TDZ 1.0 mg/L 及 NAA 1.0 mg/L 培養基培養兩個月後可誘導形成不定芽，每 0.5 公分癒合組織團塊約可產生 3-6 個芽體。進一步將叢生芽分切為 0.5 公分之芽塊繼代培養於如上之培養基，在半固態基質其增殖效果較液體培養為佳，每芽塊培植體經兩個月培養後可增生 1-5 個新芽體，平均增殖倍率為 3.2 倍。叢生芽體分切為 0.5 公分之芽塊移至 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 培養基，一個月後芽體抽長，可有利於芽體微扦插。以上述叢生芽分切為單芽微扦插於 1/2 MS 補充 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L 之培養基，兩個月後小植株高度約抽長為 1-3 公分並生長良好，葉片顏色鮮綠，並有黃綠色及白色的細根逐漸形成，其中以 NAA 0.5 mg/L 之培養基培養後生長情形較佳，發根數也較多。

國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)子房培植體接種於 1/2MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 培養兩個月後可誘導產生淡黃色顆粒狀癒合組織，產生頻率為 25%，該淡黃色顆粒狀癒合組織以原培養基繼代後可持續增生。

彩葉鳳梨(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)花瓣培植體接種於 1/2 MS 補充 2,4-D 1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L 及 1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L 四處理組合中，產生頻率分別為 91.6%、83.3%、66.6%及 58.3%，皆可誘導產生白色顆粒狀癒合組織，其中以 2,4-D 1.0 mg/L 之處理較佳。其他不同部位花器包括萼片、雄蕊、子房及花柱接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 之配方，其癒合組織誘導頻率分別為 25%、91.6%、75%、75%。而且所誘導之癒合組織數量亦較其他生長調節劑處理組合來的多。然而該白色癒合組織持續繼代於原培養基，其易於褐化與硬化之問題，其尚待解決。另外於 2,4-D 1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 之處理組合，可以誘導同一花器部位培植體分別產生表面光滑之白色顆粒狀癒合組織，或表面粗糙之半透明鬆散癒合組織，或同時具有兩種形態之癒合組織。

### Summary

The ovary explants of *Guzmania* cv. Hercules were inoculated on 1/2 MS medium supplemented with 2,4-D 0.5-2.0 mg/L combined NAA 0.5、1.0 mg/L, the combination of 2,4-D 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L was capable to induce yellow granular calli, the frequency was 22.2%. The calli were massively proliferated by serial subcultures. The callus mass were transferred on 1/2 MS medium supplemented with TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L, for induction of adventitious buds, about 3-6 buds were formed from each 0.5 cm callus by 2 months after subculture. In further, the ovary-derived adventitious buds were subdivided into 0.5 cm bud blocks, then transferred to proliferation medium as above, each bud block was proliferated 1-5 shoots, the average multiplication rate was 3.2. The multiple buds were separated and transferred to cytokinin free medium for shoot elongation. The singular bud was isolated and rooted rosette plantlets were achieved on medium containing NAA 0.5 mg/L by 2 months after microculture.

The ovary explants of *Guzmania* cv. Carine were inoculated on 1/2 MS medium supplemented with 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L, yellow calli were induced, the frequency was 25%, and those calli were propagated massively by subculture.

The petal explants of *Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor were inoculated on 1/2MS medium added with NAA 0.5 mg/L combined with 2,4-D 1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L, the callusing frequency were 91.6%、83.3%、66.6%、58.3%, white calli were induced, and the treatment of 2,4-D 1.0 mg/L was better. The other floral organs included sepal、stamen、ovary and stigma explants were inoculated on 1/2 MS + 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, obtained callusing frequency were 25%、91.6%、75% and 75% respectively. But the problem of browning still needs to be resolved. Besides, when supplemented with 2,4-D 1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the translucent friable callus and white granular callus could be formation at the same time from the floral organ.

## 目 錄

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 口試委員會審定書.....           | i   |
| 誌謝.....                 | ii  |
| 縮寫字.....                | iii |
| 中文摘要.....               | iv  |
| 英文摘要.....               | v   |
| 壹、前言 .....              | 1   |
| 貳、前人研究 .....            | 2   |
| 觀賞鳳梨之微體繁殖.....          | 2   |
| (一) 培植體種類.....          | 2   |
| (二) 再生途徑.....           | 4   |
| (三) 品種差異與生長調節劑效應.....   | 5   |
| 參、材料方法 .....            | 6   |
| 一、參試材料.....             | 6   |
| 二、取材與消毒.....            | 6   |
| 三、花器衍生癒合組織誘導試驗.....     | 6   |
| 四、間接不定芽誘導試驗.....        | 7   |
| 五、芽體增殖試驗.....           | 7   |
| (一)單芽液體培養.....          | 7   |
| (二)單芽固體培養.....          | 7   |
| 六、芽體健化與發根試驗.....        | 8   |
| 肆、結果 .....              | 9   |
| 一、花器衍生癒合組織誘導試驗.....     | 9   |
| (一)污染控制試驗.....          | 9   |
| (二)花器發育程度誘導癒合組織之情形..... | 9   |
| (三)花器衍生癒合組織誘導試驗.....    | 9   |
| 二、間接不定芽誘導.....          | 11  |
| 三、次生培植體芽體增殖.....        | 11  |
| (一)單芽體液體培養.....         | 11  |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| (二)單芽體固體培養.....               | 11 |
| 四、芽體健化與發根.....                | 12 |
| 伍、討論.....                     | 40 |
| 一、花器培養污染控制試驗與培植體褐化.....       | 40 |
| 二、花器培養誘導逆分化、再分化之探討.....       | 41 |
| 三、次生培植體芽體增殖之探討.....           | 44 |
| 四、芽體健化與植株建立.....              | 45 |
| 陸、結語.....                     | 47 |
| 參考文獻.....                     | 48 |
| 附錄一、擎天屬、彩葉屬觀賞鳳梨花器培養再生之流程..... | 56 |
| 附錄二、擎天屬蠟燭鳳梨花器培養再生流程圖.....     | 58 |



## 表目錄

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 表 1. 次氯酸鈉濃度對蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Hercules</i> )、彩葉鳳梨( <i>Neoregelia</i> cv. <i>Perfecta Tricolor</i> )與國王擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Carine</i> )幼小花各培植體消毒之效果.....          | 13 |
| 表 2. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Hercules</i> )幼小花花器發育程度對癒合組織發生之影響.....                                                                                                             | 13 |
| 表 3. 2,4-D 及 NAA 組合對蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Hercules</i> )幼小花不同花器部位癒合組織發生之頻率.....                                                                                               | 14 |
| 表 4. 2,4-D 及 NAA 組合對國王擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Carine</i> )幼小花不同花器部位癒合組織發生之頻率.....                                                                                               | 15 |
| 表 5. auxin 與 cytokinins 組合對彩葉鳳梨( <i>Neoregelia</i> cv. <i>Perfecta Tricolor</i> )幼小花不同花器部位癒合組織發生之影響.....                                                                             | 16 |
| 表 6. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Hercules</i> )、國王擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. <i>Carine</i> )、彩葉鳳梨( <i>Neoregelia</i> cv. <i>Perfecta Tricolor</i> )小花不同部位培植體誘導癒合組織發生頻率、數量、形態之比較..... | 17 |
| 表 7. 蠟燭鳳梨芽塊固體培養於 TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基 10 週後芽體增殖之情形.....                                                                                                                     | 18 |
| 表 8. 蠟燭鳳梨芽體液體培養、固體培養於 TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基 10 週後芽體增殖效益.....                                                                                                                 | 18 |

## 圖目錄

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 圖 1. 觀賞鳳梨組織培養參試品系.....                                                                                         | 19 |
| 圖 2. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Hercules)幼小花花器培植體起始接種培養之情形...                                                    | 20 |
| 圖 3. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Hercules)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合<br>2,4-D 2.0 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 誘導癒合組織之情形..... | 21 |
| 圖 4. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Hercules)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合<br>2,4-D 1.0 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 誘導癒合組織之情形..... | 22 |
| 圖 5. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Hercules)子房培養衍生癒合組織及繼代增生之情形.....                                                | 23 |
| 圖 6. 國王擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Carine)幼小花花器培植體誘導癒合組織之情形.....                                                 | 24 |
| 圖 7. 國王擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Carine)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合<br>2,4-D 1.0 mg/L 及 NAA 1.0 mg/L 誘導癒合組織之情形..... | 26 |
| 圖 8. 彩葉鳳梨( <i>Neoregelia</i> cv.Perfecta Tricolor)花瓣培植體接種於不同 auxin 與<br>cytokinins 組合誘導癒合組織之情形.....            | 27 |
| 圖 9. 彩葉鳳梨( <i>Neoregelia</i> cv. Perfecta Tricolor)小花花瓣與雄蕊培植體誘導癒合組織<br>形成之情形.....                              | 29 |
| 圖 10. 紫擎天鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Amaranth)幼小花花器培植體誘導癒合組織之情形.....                                                | 30 |
| 圖 11. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Hercules)幼小花子房培植體誘導癒合組織再生不定<br>芽之情形.....                                        | 32 |
| 圖 12. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Hercules)次生培植體芽塊液體培養於 1/2MS +<br>TDZ1.0 mg/L + NAA1.0 mg/L 增殖培養基芽體增殖之情形.....    | 34 |
| 圖 13. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Hercules)次生培植體芽塊固體培養於 1/2MS+TDZ1.0<br>mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基芽體增殖之情形.....        | 35 |
| 圖 14. 蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv.Hercules)次生培植體芽塊固體培養於 NAA1.0 mg/L<br>發根培養基芽體抽長之情形.....                          | 37 |
| 圖 15. NAA 對蠟燭鳳梨( <i>Guzmania</i> cv. Hercules)誘導瓶內發根之情形.....                                                   | 38 |

## 前言 (Introduction)

鳳梨科的觀賞鳳梨原產於中南美洲一帶，種源歧異性大，目前約有 50 屬兩千五百多種以上。其苞片色彩豔麗繽紛，有紅、黃、紫、粉紅及橘等色系，不但苞片色彩可維持 3~6 月之久，且部分觀賞鳳梨品種之葉片也有參雜條紋或斑點等特色，其植株耐陰、耐濕、病蟲害少，可久置室內，也可作為插花用材，因此為極具潛力之室內觀賞植物。觀賞鳳梨於 1925 年引進台灣栽培，目前主要栽培種類為 *Guzmania*、*Vriesea*、*Neoregelia*、*Aechmea*、*Cryptanthus* 與 *Tillandsia* 屬，由於觀賞鳳梨苞片色彩鮮明豔麗，大多為亮紅色系，具有閩南語諧音“旺來”，所以在台灣廣泛被視為吉利、興旺的盆花，意味「財源旺來」、「時運旺來」等好彩頭，為國內年節應景之重要盆花。主要產地在屏東縣，約佔 85%，其次為高雄縣，約佔 10%，其他地區(包含台南縣及南投縣)佔 5%，栽培總數 150 萬盆，每年成品約 80 萬盆(阮，2003)。

由於觀賞鳳梨必須經過 1-3 年之生長方具有開花能力，當花謝後才由母株基部長出吸芽(sucker)，待吸芽長到約母株 1/3 大小後可從母株基部取下種植，為吸芽繁殖法。觀賞鳳梨傳統上採用吸芽繁殖與種子繁殖兩種方式，但因吸芽數目有限，往往每次只有 1~3 個吸芽產生，並視品種不同而有差異，一般而言越是具有園藝優良性狀之品種，其抽出之吸芽數量往往越少，難以充分供應市場上的大量需求。而種子繁殖則因有種子取得不易、發芽率低、具變異性、實生苗幼年期長等特性，所以難以滿足商業需求。目前業者多以進口荷蘭、比利時之組培苗或成株進行栽培與販售，雖然售價較高，依受國人青睞。因此若我們可自行生產均質化、高品質並且發育健全之種苗，將可大幅降低生產成本，並促進觀賞鳳梨成為本土化之產業(陳，2005)。

由於觀賞鳳梨以短縮莖、葉片、花器各部位作為培植體進行微體繁殖之再生效益於品種間具有很大差異性，因此本試驗嘗試以不同屬種(擎天屬 *Guzmania*、彩葉屬 *Neoregelia*)觀賞鳳梨之新興品系的幼花序做為培植體，進行組織培養。藉由以幼花序培養具有可用培植體數量多、消毒容易、不犧牲母株、屬生殖組織，所以再生能力較強等優點，誘導幼花序產生癒合組織，並再生不定芽、繼而建立增殖系統與小植株之建立，藉此建立不同品系之觀賞鳳梨組織培養再生體系，甚至提供某部分難再生新興觀賞鳳梨品系建立再生系統的參考。

## 前人研究 (Literature Review)

觀賞鳳梨之再生繁殖方法一般分為吸芽繁殖、種子繁殖以及微體繁殖三大類。傳統上以吸芽繁殖與種子繁殖為主，吸芽繁殖為每年摘取吸芽(suckers)重新繁殖，吸芽數量因品種與生長環境而異，但數目有限，通常約 1~3 個，而種子取得不易、發芽率低、實生苗幼年期長以及具有變異性，難以滿足商業需求，故目前多採用組織培養技術來加速增殖與商業上的應用。而一般組織培養的培植體依來源、生理及遺傳特性，主要可分為以下五大類：胚體組織(embryonic tissue)、體(營養)組織(somatic tissue)、生殖組織(reproductive tissue)、次生培植體(secondary explant)及變體組織(modified ploidy tissue)。而鳳梨科作物中，組織培養之文獻以食用鳳梨(*Ananas comosus*; pineapple)較多，而觀賞鳳梨之相關研究報告較少。而觀賞鳳梨主要之文獻以營養組織之短縮莖與葉片為培植體藉由器官發生途徑誘導不定芽體產生，並進一步大量增殖；或是搜集種子，以種子無菌播種進行瓶內復育，以進行稀有品種之種緣保存；而以生殖組織之花器為培植體誘導器官發生與體胚發生之研究則較少，以下將就不同培植體之特性、再生途徑以及品種差異與生長調節劑效應分別探討。

### (一)培植體種類

#### 1. 胚體組織(embryonic tissue)：

為具有胚性之種子或實生苗，屬於有性繁殖，會有重組變異之問題，其再生能力強，但具有幼年期性。鳳梨亞科(Tillandsioideae)之擎天屬(*Guzmania*)、空氣屬(*Tillandsia*)與鶯歌屬(*Vriesea*)之種子，無菌播種得到之實生苗，增殖可得到大量側芽產生(Mekers, 1977)。主要之繁殖方式可分為：發芽、增殖與發根三階段。而發芽培養基以 1/2 至 1/4 MS 固體培養基較液體為佳，添加 NAA 可促進發芽；增殖階段以 1/4 MS 液體培養或 1/2 至 1/3 MS 固體培養較佳，單獨添加 auxin，可促進頂芽生長，加入 cytokinin 則促進側芽增生，但高濃度 cytokinin (10 mg/L)則會產生毒害。發根階段以 1/2 MS 固體培養較佳。細胞分裂素對此三屬具有細胞分裂效應(cytokinin-effects)，可以延長叢生芽增生之效果。添加 Auxin 則抑制叢生現象，促進芽體抽長，有助得到單一植株後可出瓶馴化。

由無菌播種所得實生苗取幼葉基部培養，可不用犧牲母株、不需消毒 (Pickens et al, 2006)。以幼嫩組織為培植體培養，體細胞變異率也較低(Carneiro et al, 1999)。並可以種子無菌播種進行瓶內復育與增殖而達到稀有品種之種緣保存與復育 (Pickens et al, 2006)。

## 2. 體(營養)組織(somatic tissue)：

以短縮莖、成年期葉片等部位做為培植體，成年期體組織為營養組織，屬於無性繁殖，可供應商業需求，但缺點為消毒不易、汙染率高且成年期之營養組織再生能力下降(Arrabal et al, 2002)。短縮莖之培養可分為：前處理、消毒、初代培養、增殖與發根等階段。由於葉杯深陷，葉片層層套疊容易受灌溉水以及環境汙染，消毒十分不易，組織培養之汙染率高，故取培植體前須進行前處理，包含農藥與殺菌劑之施用，以及維持葉面乾燥不積水兩個月以上，並於取培植體前一週輪流施用稀釋1000倍之免賴得(benlate)與鋅錳乃浦(mancozeb) 以降低組織培養之汙染率(陳, 2005)。而摘取吸芽須經4~7天陰乾處理，再以殺菌劑、抗氧化劑等進行浸泡、旋轉、超音波震盪等消毒處理，幼嫩芽體容易因過度消毒而亡，且培養後約一週，其汙染率仍高達75% (楊, 1999)，故短縮莖材料不易消毒實為一大限制因子。觀賞鳳梨品種 *Guzmania* cv. Cherry 莖頂培植體培養於1/2 MS組合NAA 1.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L平均可誘導39.2個芽體，*Vriesea* cv. Margo 莖頂培植體於1/2 MS組合NAA 1.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L平均可誘導31.3個芽體(楊, 1999)。玉扇空氣鳳梨 (*Tillandsia cyanea*) 葉片液體培養於1/2 MS培養基添加NAA 0.1 mg/L+BA 0.1 mg/L，三週後由葉片基部產生芽體，每一小植株8~10片葉片可誘導出3.2個芽體(陳, 2005)。

## 3. 生殖組織(reproductive tissue)：

以幼花序之花器官為培植體，屬於無性繁殖，具有很強再生能力，生殖組織可作為培植體材料之數量豐富、消毒容易、不犧牲母株等特性，很適合加速繁殖之應用，但缺點為材料受限於花期(陳, 2005)，但可以人工方式外加益收促進開花。觀賞鳳梨品種 *Neoregelia* cv. Peony、*Tillandsia cyanea*、*Vriesea carinata* cv. Mariae 等之花器以 2,4-D 0.5-2 mg/L 單獨或組合 NAA 0.5mg/L 可誘導產生大量癒合組織，其中玉扇鳳梨花瓣培植體添加 2,4-D 0.5 mg/L 可誘導產生癒合組織之頻率為 61.1%，大鶯歌鳳梨藥培植體添加 2,4-D 0.5 mg/L 可誘導產生癒合組織之頻率為

55.6%。使用幼小花序為培植體誘導癒傷組織之形態與數量會因為植物生長調節劑種類與濃度、品種而有所差異。而 *Tillandsia cyanea* 以 2,4-D 1.5~2.0 mg/L 可誘導產生較具胚性之粒狀癒合組織(張, 2003)。

所誘導之癒傷組織可經由器官發生途徑誘導間接不定芽體產生或做為細胞懸浮培養之起始材料誘導體胚發生，以達到大量增殖之目的。

#### 4. 次生培植體(secondary explant)：

以組培苗作為培植體，可免消毒且組織幼嫩具有較強再生能力，可藉體外復幼作用取當二次培植體，解決難再生作用問題。亦可長期於試管內保存，若遺傳穩定性高，理論上可無限增殖(馬及許, 1988)。而以次生培植體進行芽體增殖時，常利用液體或固體培養，Hosoki 和 Asahira (1980) 認為液體培養之生長速度較固體培養快，因為鳳梨科植物除了可從根部吸收養分，葉片亦可吸收養分，所以使用液體培養可以加速養分之吸收，但持續浸泡可能對培植體有害。而亦有學者認為固體培養較液體培養好(Mekers *et al*, 1983)，有些學者則視不同培養階段以液體培養、固體培養交替進行(馬, 1977)。

### (二) 再生途徑

而觀賞鳳梨之組織培養再生途徑又可分為器官發生與體胚發生：

#### 1. 器官發生(organogenesis)：

藉由外加植物生長調節劑誘導培植體產生不定芽、不定根，再生成小植株。可分為直接與間接器官發生。繁殖特性為多細胞起始、形態單極性、原維管束呈開放型。器官發生再生速度較快，但形態發育過程非同步化且具有變異性，可能產生鑲嵌體。

#### 2. 體胚發生(somatic embryogenesis)：

指特定條件下，體細胞未經受精作用，而產生類似結合子胚發生的過程。可分為直接與間接體胚發生。繁殖特性為單一細胞或少數細胞起始、原維管束呈半開放型、體胚具有根端與莖端之形態雙極性，並且兩者間有微管束相連繫。而體胚發生之再生速度較慢，但具有均質性，可藉由細胞形態轉型生產人工種子、人工

胚。直接體胚發生為培植體不經過癒合組織之階段，直接發育成體胚，通常來源多為具強胚性潛力之組織與器官，如培植體的表皮、次表皮或是幼胚。而間接體胚發生則是培植體先逆分化產生癒合組織，由內部或外圍的細胞再分化為體胚。

### (三) 品種差異與生長調節劑效應

而不同濃度組合之植物生長調節劑中，較高的 BA / NAA ratio 誘導芽體產生頻率較高。但品種間具有差異性(Pickens et al, 2006)。小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合中，擎天屬(*Guzmania*)龍鳳擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Cherry)以花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 0.5-2.0 mg/L 40 天後後可形成較多癒合組織，但於形態上有差異，當 2,4-D 濃度較低時所誘導之癒合組織形態趨於鬆散，顏色呈淡黃色，繼代培養後較易於分化不定芽，而 2,4-D 濃度越高時所誘導之癒合組織形態越趨於濃密，顏色較黃，再分化之能力減弱，誘導不定芽需要較長時間。而同時添加少量的細胞分裂素並無協助癒合組織增生的情形，可能原因為培植體本身已經含有足夠的內生細胞分裂素，只需適量的生長素即能誘導逆分化癒合組織。在龍鳳擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Cherry)之子房以及鶯歌屬(*Vriesea*)金馬鶯歌鳳梨(*Vriesea* cv. Margo) 之花瓣與花藥亦是相同的情形 (楊, 1999)。而空氣屬(*Tillandsia*)玉扇鳳梨(*Tillandsia cyanea*)花瓣與花藥培植體以 1/2 MS 組合 2,4-D 0.5-2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 皆可明顯誘導大量黃色癒合組織產生，而對照組與只添加 2,4-D 0.5 mg/L 之處理皆無癒合組織形成(張, 2003)，故推論適量之 2,4-D 濃度 (0.5-2.0 mg/L) 單獨或組合 NAA 0.5 mg/L 可誘導培植體逆分化產生癒合組織。且花瓣培植體於 2,4-D 0.5、1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 形成鬆散型癒合組織，而提高 2,4-D 濃度時則有利粒狀型癒合組織產生，進一步以鬆散型癒合組織進行細胞懸浮培養，其游離細胞大且空胞化，而粒狀型癒合組織進行細胞懸浮培養釋放之細胞小，成等徑或圓形且細胞質濃稠(張, 2003)。故可推論不同濃度之生長調節劑組合或可誘導不同癒合組織之形態發生，而不同形態之癒合組織朝向器官發生與體胚發生之潛力亦具有部分差異。

## 材料與方法(Materials and Methods)

### 一、參試材料

參試材料為以下各屬之花器各部位，如圖一。以觀賞鳳梨品種彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)、蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)、國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)、紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Amaranth)幼小花進行花器培養再生試驗：癒傷組織誘導、間接不定芽誘導、芽體增殖、芽體健化與發根。

### 二、取材與消毒

分別切取上述各屬之飽滿未開小花(小花花器官發育程度和構造與其花器大小相關，但因品種不同而有所差異)，以酒精棉片擦拭表面，若小花表面具有透明黏液則先以酒精棉片拭去再以無菌水沖洗(國王擎天鳳梨與達摩鳳梨之小花表面皆會產生透明膠狀黏液)。

以 1-2%次氯酸鈉添加 1 滴 Tween20 消毒 15 分鐘，再以無菌水清洗三次。最後分別切取小花之萼片、花瓣、雄蕊、子房與花絲做為培植體(數目分別為 3,3,6,1,1)(圖 2B)，部分品種之萼片由於暴露於環境中十分髒汙，則去除萼片以降低組織培養汙染率。

另參試頭狀花序之彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)，此品系花序埋藏於葉杯當中，僅有正當開放時之小花會突出於花序外，因此於花序形成、小花尚未開放之時，加強消毒處理。每週施用兩次稀釋 1000 倍之”免賴得”澆灌於葉杯與介質，而其餘時間則使用二次水並只澆灌介質。於小花即將開放時則盡量維持葉杯不積水與髒汙，並去除花序周圍苞片維持乾燥與清潔。

### 三、花器衍生癒合組織誘導試驗

以不同濃度 2,4-D、NAA 與 BA 等生長調節劑組合對四個觀賞鳳梨品種之花器官進行誘導癒合組織發生之試驗。

基本培養基為 1/2 MS，補充有機物包括 Citric acid 200mg/L、Arginine 50 mg/L、D-pantothen acid 0.5 mg/L、Asparagine 50 mg/L、Glutamine 25 mg/L、Sucrose 30 g/L、Agar 7 g/L。參試生長調節劑為生長素 2,4-D (0、0.5、1、1.5、2 mg/L)與 2,4-D 1.5 mg/L+ BA 0.5 mg/L 分別組合 NAA 0.5、1.0 mg/L。

將消毒過後之幼嫩小花分切為花萼、花瓣、雄蕊、子房與花柱（數目分別為3,3,6,1,1）做為培植體，接種於同培養皿為一重複，每處理組合共五~八重複。

以上不同部位之花器培植體與生長調節劑處理組合皆放置於  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  培養室，黑暗環境下生長。接種後 60~90 天觀察逆分化癒合組織發生之頻率與數量以及逆分化癒合組織之外表形態特性，並照相記錄之。

#### 四、間接不定芽誘導試驗

將上述參試品系花器衍生之癒合組織接種於間接不定芽誘導之培養基，培養基配方為 1/2 MS 添加 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、agar 7 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。生長調節劑組合為 NAA 1.0 mg/L 組合 TDZ 1.0 mg/L。處理組合皆放置於  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  培養室，光照環境下生長。每培養皿接種 5 小團各約 0.5 公分大小之癒合組織為一重複，每處理 3 重複。接種後觀察癒合組織之外表形態變化，並於 60~90 天觀察芽體產生之頻率、數量、大小與外觀形態特性，並照相記錄之。

#### 五、芽體增殖試驗

##### (一)芽塊液體培養

以上述所得之叢生芽體，分切後進行液體培養，以促進芽體由基部增生。培養基配方為 1/2 MS 添加 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.3。生長調節劑組合為 NAA 1.0 mg/L 組合 TDZ 1.0 mg/L。

液體培養於水平式旋轉振盪器上進行，轉速 80 rpm，光照 16 小時，光強度 1600 lux，溫度維持在  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。每處理 10 重複，每重複為一芽塊，觀察植株發育與芽體增生情形。並於 60 天後觀察芽體產生之頻率、數量、大小與外觀形態特性，並照相記錄之。

##### (二)單芽體之固體培養

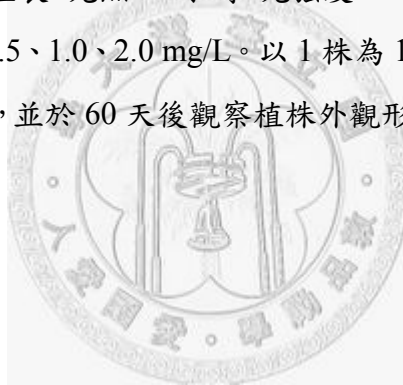
以上述所得之叢生芽體，分切後置於增生培養基進行固體培養，誘導芽體由基部增生。培養基配方為 1/2 MS 添加 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、

glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。生長調節劑組合為 NAA 1.0 mg/L 組合 TDZ 1.0 mg/L。

處理組合皆放置於  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  培養室，光照環境下生長，光照 16 小時，光強度 1600 lux，溫度維持在  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。每培養皿接種各約 0.5 公分大小之 5 單一芽塊為一重複，每處理 3 重複。接種後觀察觀察植株發育與芽體增生情形，並於 60 天後觀察芽體產生之頻率、數量、大小與外觀形態特性，並照相記錄之。

#### 六、芽體健化與發根試驗

取約 0.5 公分大小之芽體，自芽團上分切，置於 1/2MS 固體培養基，並添加有機物 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。處理組合皆放置於  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  培養室，光照環境下生長，光照 16 小時，光強度 1600 lux，溫度維持在  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。參試生長調節劑為 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L。以 1 株為 1 重複，每處理各 10 重複。接種後觀察植株發育情形，並於 60 天後觀察植株外觀形態特性與發根頻率、數量，並照相記錄之。



## 結果(Results)

### 一、 花器衍生癒合組織誘導試驗

#### (一)污染控制試驗

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)幼小花以不同濃度次氯酸鈉消毒之處理中，以 1%次氯酸鈉消毒 15 分鐘之處理，組織培養污染率為 80%，由培植體切口產生內生菌污染之情形嚴重(圖 2C-E)；而以 2%次氯酸鈉消毒 15 分鐘之效果較佳，組織培養污染率可降低為 25%。

彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*)以 2%次氯酸鈉消毒 15 分鐘之組織培養污染率為 35%。其花序埋藏於葉杯當中，僅有正當開放時之小花會突出於花序外，故花序容易受環境污染累積髒汙或受灌溉水污染，導致組織培養之污染率較高於其他品系之參試材料。

國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Carine*)以 2%次氯酸鈉消毒 15 分鐘之組織培養污染率為 0%。其花序之小花會分泌透明膠狀物質於其萼片與花瓣之間，使萼片與花瓣完全閉合而不易受環境污染，因此於本試驗中組織培養之污染率為 0%。三品系組織培養之污染率綜合比較參見表 1。

#### (二)花器發育程度誘導癒合組織之情形

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)幼小花花器發育程度誘導癒合組織之情形如表 2 所示，以肉眼觀察小花外表形態特性，小於 1.9 公分發育不全之小花接種於逆分化培養基約兩週後皆褐化，無癒合組織產生；而 1.9-2.5 公分發育完整之飽滿未開放小花接種於逆分化培養基兩個月後可產生黃色顆粒狀癒合組織；小花大於 2.5 公分，花瓣突出萼片 0.5 公分以上之過於成熟小花接種於逆分化培養基約兩週後皆褐化，無癒合組織產生。

#### (三) 花器衍生癒合組織誘導試驗

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合(表 3)中，花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 兩個月後可產生極為少量的灰褐色癒合組織(圖 3A)，產生頻率為 3.7%。子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 兩個月後可產生少量

黃色顆粒狀癒合組織(圖 4A)，產生頻率為 22.2%，該黃色顆粒狀癒合組織持續繼代於原培養基一至兩個月後可大量增生(圖 5)。而表 3 中其餘處理組合皆無癒合組織產生，小花各部位培植體接種於培養基 7-14 天後皆逐漸褐化死亡，可能與品種特性及花器構造有關，或是消毒時所造成的藥害。

國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine) 小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合(表 4)中，萼片培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後可產生大量的灰褐色顆粒狀癒合組織(圖 6A)，產生頻率為 8.3%；子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 兩個月後可產生淡黃色顆粒狀癒合組織(圖 7A)，產生頻率為 25%，該淡黃色顆粒狀癒合組織持續繼代於原培養基可持續增生；子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後可產生極少量癒合組織且易於褐化，產生頻率為 12.5%。而表 4 中其餘處理組合皆無癒合組織產生，小花各部位培植體接種於培養基兩週內皆逐漸褐化死亡，可能與品種特性及花器構造有關，或為消毒時所造成的藥害。

彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor) 小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合(表 5)中，花瓣培植體以 2,4-D 0.5-2 mg/L 組合 NAA 0.5 mg/L 皆可誘導產生大量白色顆粒狀癒合組織(圖 8)，於 2,4-D 1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L 四處理組合中其花瓣培植體癒合組織產生頻率分別為 91.6%、83.3%、66.6%、58.3%(表 7)，而且由花瓣培植體誘導之癒合組織數量也較其他花器培植體為多(表 6)。而子房、花柱、雄蕊等部位之培植體亦可產生癒合組織(表 6、表 7)。以 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 之處理組合可得到較高之癒合組織誘導頻率，其萼片、雄蕊、花瓣、子房、花柱之癒合組織誘導頻率分別為 25%、91.6%、91.6%、75%、75%，而且所誘導之癒合組織數量亦較其他生長調節劑處理組合來的多(表 6、表 7)。然而該白色癒合組織持續繼代於原培養基易於褐化與硬化之問題尚待解決。另外於 2,4-D 1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 之處理組合，同一花器部位培植體可能分別產生表面光滑之白色顆粒狀癒合組織或表面粗糙之半透明鬆散癒合組織兩種形態，或同時具有兩種形態之癒合組織(圖 9)。

紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Amaranth)幼小花花器培植體接種於不同生長調

節劑組合中，花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.5、2.0 mg/L 可產生黃色顆粒狀癒合組織。該黃色顆粒狀癒合組織持續繼代增生，觀察有疑似體胚以及疑似叢生狀之畸形體胚之形成(圖 10)。

## 二、 間接不定芽誘導試驗

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後子房培植體產生之黃色顆粒狀癒合組織，持續繼代增生後，該癒合組織以 0.5 公分大小之團塊接種於 1/2 MS 組合 TDZ 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 一週後癒合組織逐漸轉綠，兩個月後逐漸形成不定芽(圖 11)，每團塊約可產生 3-6 個芽體。

紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Amaranth*)幼小花花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後所得黃色顆粒狀癒合組織接種於 TDZ 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個月後產生畸形芽體，並於數週後逐漸褐化。

## 三、 次生培植體芽體增殖

### (一) 芽塊液體培養

以蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊為起始培植體，液體培養於 1/2 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基接種兩週後芽體逐漸褐化(圖 12)，接種三週後芽體則完全褐化。

### (二) 芽塊固體培養

以蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊為起始培植體，固體培養於 1/2 MS+TDZ 1.0

mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基兩個月後，多數培植體葉片顏色深綠色並且生長良好，由於細胞分裂效應而呈現葉片短縮、芽體叢生之情形(圖 13)，每芽塊培植體可產生 1-5 個芽體，其中 5 培植體生長兩個月後大小介於 0.6-1.0 公分之間，兩個月後芽體總數為 11 個，增殖倍率為 2.2 倍；5 培植體生長兩個月後大小介於 1.1-1.5 公分之間，兩個月後芽體總數為 17 個，增殖倍率為 3.4 倍；5 培植體生長兩個月後大小介於 1.6-1.8 公分之間，兩個月後芽體總數為 20 個，增殖倍率為 4.0 倍(表 7)。芽塊培植體接種兩個月後芽體總數為 48 個芽體，總增殖倍率為 3.2 倍(表 8)。而其中培植體生長情況越佳、芽體越大，產生之側芽數量也越多，最大培植體長度為 1.8 公分，可產生 4 個芽體；而最小培植體長度為 0.6 公分，可產生兩個芽體。

#### 四、芽體健化與發根

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊固體培養於 NAA 1.0 mg/L 發根培養基一個月後芽體抽長(圖 14)，小植株高度約抽長為 1-2 公分並生長良好，葉片顏色鮮綠，雖然可觀察到芽體抽長之情形，但部分芽體仍具有細胞分裂效應而呈現叢生狀。

以上述之叢生芽團分切為單一芽體後以 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L 之發根培養基持續繼代生長，皆可得到單一植株，以 NAA 0.5 mg/L 之地上部抽長情形較佳(圖 15)。以 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L 皆可促進發根，可產生白色與黃綠色之細根或褐色之粗根(圖 15)。

表 1. 次氯酸鈉濃度對蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)、彩葉鳳梨 (*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)與國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)幼小花各培植體消毒之效果。

Table 1. The effect of NaClO concentration on sterilization of *Guzmania* cv. Hercules、*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor and *Guzmania* cv. Carine.

| NaClO(%)                                    | Contamination(%)                        |                                                    |                                         |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                             | 蠟燭鳳梨<br>( <i>Guzmania</i> cv. Hercules) | 彩葉鳳梨<br>( <i>Neoregelia</i> cv. Perfecta Tricolor) | 國王擎天鳳梨<br>( <i>Guzmania</i> cv. Carine) |
| 1                                           | 80%                                     | --                                                 | --                                      |
| 2                                           | 25%                                     | 35%                                                | 0%                                      |
| Sterile time : 15mins      -- : not counted |                                         |                                                    |                                         |

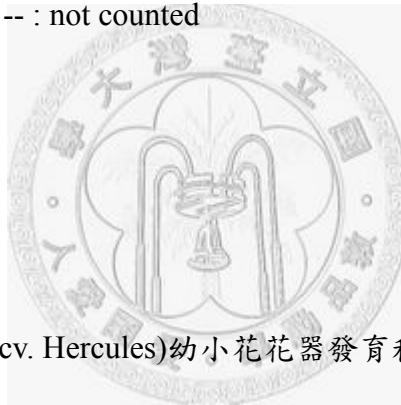


表 2. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)幼小花花器發育程度對癒合組織發生之影響。

Table.2.The effect of different floret development stage on the callogenesis of *Guzmania* cv. Hercules.

| The stage of young floret                                     | Young floret length | performance            |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
| not well developed                                            | <1.9cm              | no callus formation    |
| well developed                                                | 1.9 - 2.5cm         | yellow granular callus |
| well developed<br>(petals are over sepals<br>more than 0.5cm) | >2.5cm              | no callus formation    |
| basic medium: 1/2MS      culture days: 60-90 days             |                     |                        |

表 3. 2,4-D 及 NAA 組合對蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)幼小花不同花器部位癒合組織發生之頻率。

Table.3. Effects of auxin and cytokinins combinations on callogenesis in young floret culture of *Guzmania* cv. Hercules.

| Regulators(mg/L) |     | Callusing(%) / callus amount/callus feature |        |                                         |                        |       |
|------------------|-----|---------------------------------------------|--------|-----------------------------------------|------------------------|-------|
| 2,4-D            | NAA | Sepal                                       | stamen | Petal                                   | ovary                  | style |
| 0                | 0   | -                                           | -      | -                                       | -                      | -     |
|                  |     |                                             |        |                                         | 22.2%                  |       |
|                  |     |                                             |        |                                         | ++                     |       |
| 1.0              | 0.5 | -                                           | -      | -                                       | yellow granular callus | -     |
| 1.0              | 1.0 | -                                           | -      | -                                       | -                      | -     |
| 2.0              | 0.5 | -                                           | -      | -                                       | -                      | -     |
|                  |     |                                             |        | 3.7%<br>+<br>a few gray granular callus |                        |       |
| '--' browning    |     | basic medium: 1/2MS                         |        | culture days: 60-90 days                |                        |       |
| +: few           |     | ++ : many                                   |        | +++ : mass                              |                        |       |

表 4. 2,4-D 及 NAA 組合對國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)幼小花不同花器部位癒合組織發生之頻率。

Table.4. Effects of auxin and cytokinins combinations on callogenesis in young floret of *Guzmania* cv. Carine.

| Regulators(mg/L) |     | Callusing(%) / callus amount/ callus feature |        |       |                        |       |
|------------------|-----|----------------------------------------------|--------|-------|------------------------|-------|
| 2,4-D            | NAA | Sepal                                        | stamen | Petal | ovary                  | style |
| 0                | 0   | -                                            | -      | -     | -                      | -     |
|                  |     | 8.3%                                         |        |       |                        |       |
|                  |     | ++                                           |        |       |                        |       |
| 1.0              | 0.5 | gray granular callus                         | --     | -     | -                      | -     |
|                  |     |                                              |        |       | 25%                    |       |
|                  |     |                                              |        |       | ++                     |       |
| 1.0              | 1.0 | -                                            | -      | -     | yellow granular callus | -     |
|                  |     |                                              |        |       | 12.5%                  |       |
|                  |     |                                              |        |       | +                      |       |
| 2.0              | 0.5 | -                                            | -      | -     | gray callus            | -     |

‘--’ browning      basic medium: 1/2MS      culture days: 60-90 days

+: few    ++ : many    +++ : mass

表 5. auxin 與 cytokinins 組合對彩葉鳳梨(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)幼小花不同花器部位癒合組織發生之影響。

Table.5. Effects of auxin and cytokinins combinations on callogenesis in young floret of *Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor.

| Regulators(mg/L) |     |     | Callusing(%) / callus amount/ callus feature |                 |                 |                 |                 |
|------------------|-----|-----|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2,4-D            | NAA | BA  | sepal                                        | stamen          | Petal           | ovary           | style           |
| 0                | 0   |     | --                                           | --              | --              | --              | --              |
| 1.0              | 0.5 |     | 25%                                          | 91.6%           | 91.6%           | 75%             | 75%             |
|                  |     |     | ++                                           | ++              | +++             | ++              | ++              |
|                  |     |     | white                                        | white           | white           | white           | white           |
|                  |     |     | callus                                       | granular callus | granular callus | granular callus | granular callus |
| 1.5              | 0.5 |     | 45.8%                                        | 83.3%           | 75%             | 75%             |                 |
|                  |     |     | ++                                           | +++             | +               | +++             |                 |
|                  |     |     | --                                           | white           | white           | white           | white           |
|                  |     |     | granular callus                              | callus          | callus          | granular callus |                 |
| 2.0              | 0.5 |     | 66.6%                                        | 25%             | --              |                 |                 |
|                  |     |     | +++                                          | ++              |                 |                 |                 |
|                  |     |     | --                                           | --              | white           | white           | --              |
|                  |     |     |                                              |                 | callus          | granular callus |                 |
| 1.5              | 0.5 | 0.5 | 29.1%                                        | 58.3%           | 25%             | 75%             |                 |
|                  |     |     | ++                                           | +++             | ++              | ++              |                 |
|                  |     |     | --                                           | white           | white           | white           | white           |
|                  |     |     |                                              | callus          | callus          | callus          | callus          |

‘--’ browning

basic medium: 1/2MS

culture days: 60-90 days

+: few ++ : many +++ : mass

表 6. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)、國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)、彩葉鳳梨(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)小花不同部位培植體誘導癒合組織發生頻率、數量、形態之比較。

Table.6 . Callusing percentage 、callus amount and callus feature of floral organs of *Guzmania* cv. Hercules 、 *Guzmania* cv. Carine and *Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor.

| Explants | Callusing(%) / callus amount/callus feature |                                                 |                                                    |
|----------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|          | 蠟燭鳳梨<br>( <i>Guzmania</i> cv. Hercules)     | 國王擎天鳳梨<br>( <i>Guzmania</i> cv. Carine)         | 彩葉鳳梨<br>( <i>Neoregelia</i> cv. Perfecta Tricolor) |
| Sepal    | -                                           | 8.3 / ++<br>gray granular callus                | 25 / ++<br>white callus                            |
| Stamen   | -                                           | -                                               | 91.6 / ++<br>white granular callus                 |
| Petal    | -                                           | -                                               | 91.6 / +++<br>massive white granular callus        |
| Ovary    | 22 / ++<br>yellow granular callus           | 25 / ++<br>yellow granular callus (NAA1.0 mg/L) | 75 / ++<br>white granular callus                   |
| Style    | -                                           | -                                               | 75 / ++<br>white granular callus                   |

Media are 1/2 MS containing 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and culture for 60 days.

-: browning    +: few    ++ : many    +++ : mass

表 7. 蠟燭鳳梨芽塊固體培養於 TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基 10 週後芽體增殖之情形。

Tab 7. The bud proliferation of separated bud blocks on 1/2 MS medium containing TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L in solid medium culture of *Guzmania* cv. Hercules.

| Bud blocks | Bud length (cm) |          | Bud No.<br>(10 weeks) | Bud No. / block |
|------------|-----------------|----------|-----------------------|-----------------|
|            | 0 week          | 10 weeks |                       |                 |
| 5          | 0.5             | 0.6-1.0  | 11                    | 2.2             |
| 5          | 0.5             | 1.1-1.5  | 17                    | 3.4             |
| 5          | 0.5             | 1.6-1.8  | 20                    | 4.0             |

basic medium: 1/2MS      culture days: 10 weeks

表 8. 蠟燭鳳梨芽體液體培養、固體培養於 TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基 10 週後芽體增殖效益。

Tab 8. The bud proliferation of microshoot explants on 1/2MS medium containing TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L in solid medium culture and liquid culture of *Guzmania* cv. Hercules.

| Culture type         | Shoot No |          | Multiplication rate |
|----------------------|----------|----------|---------------------|
|                      | 0 week   | 10 weeks |                     |
| Liquid Culture       | 15       | --       | --                  |
| Solid medium culture | 15       | 48       | 3.2                 |

‘--’ browning      basic medium: 1/2MS      culture days: 10 weeks

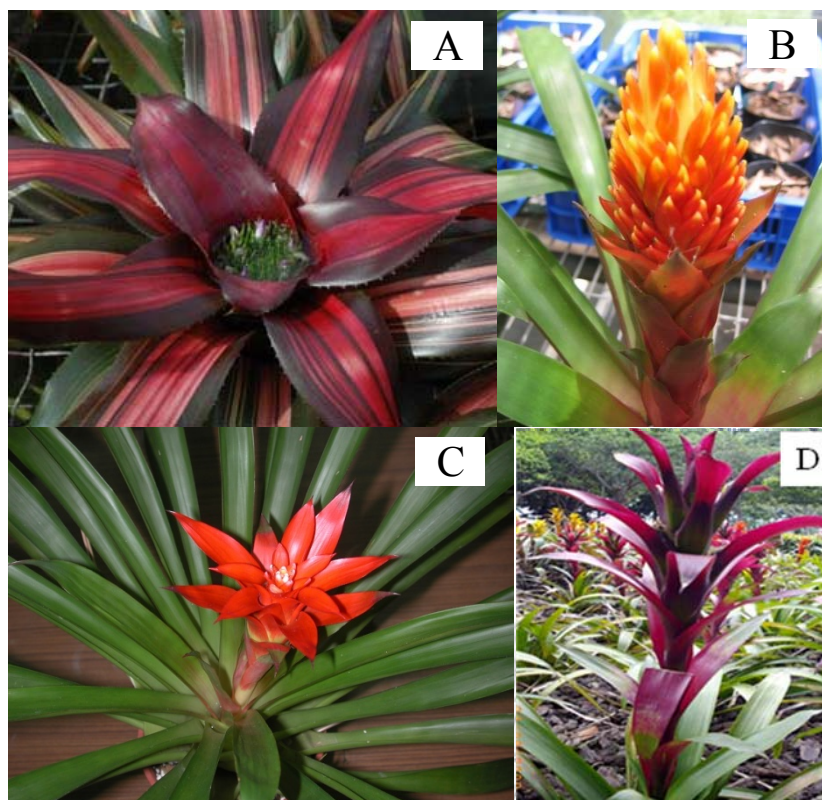


圖 1.觀賞鳳梨組織培養參試品系。

Fig. 1. The ornamental bromeliad cultivars for tissue culture.

A. 彩葉鳳梨 (*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)

B. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)

C. 國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)

D. 紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Amaranth)

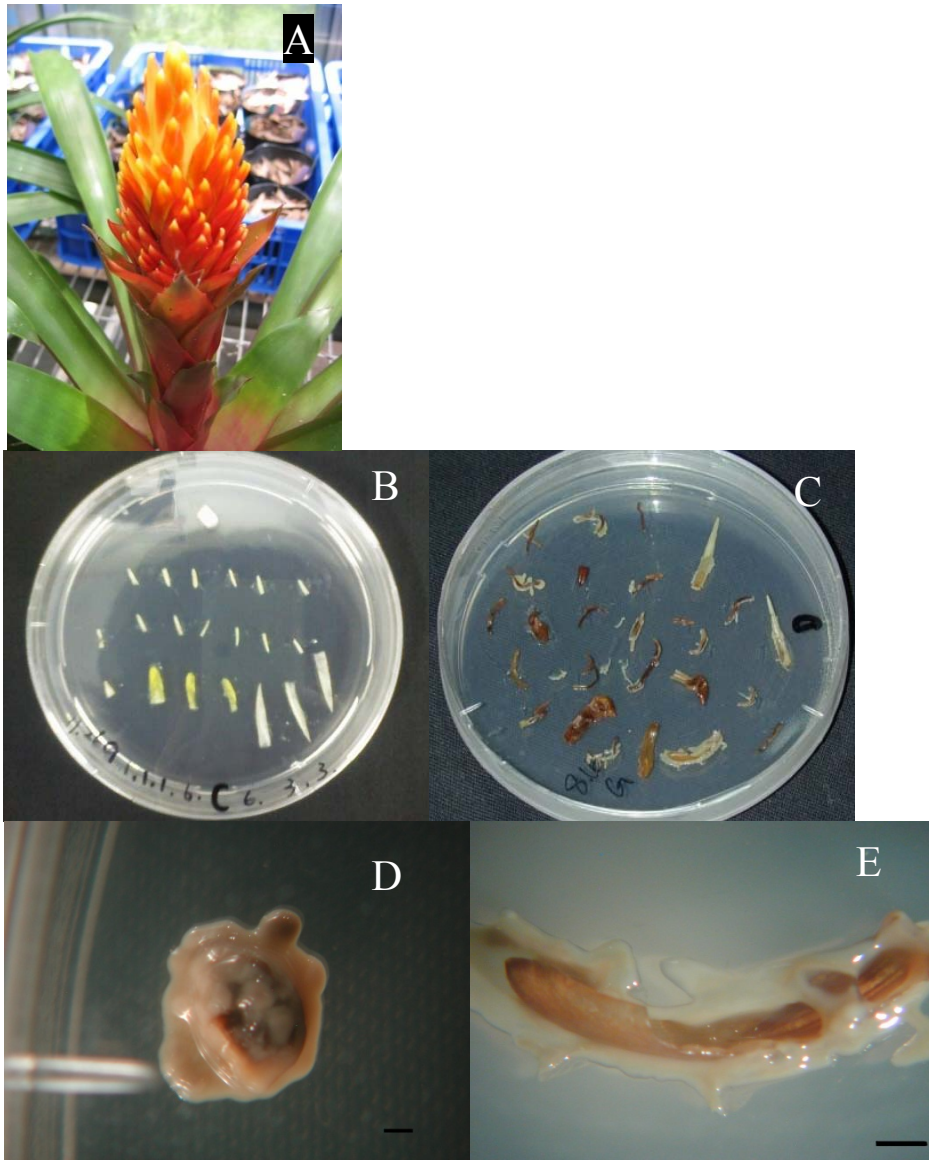


圖 2 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)幼小花花器培植體起始接種培養之情形。  
 Fig. 2. The initial culture in the various young floret organs of *Guzmania* cv. Hercules.  
 (Bar = 1mm)

- A. 蠟燭鳳梨之花器構造。
- B. 小花分切為萼片、花瓣、雄蕊、花柱、子房後接種於培養基，  
 數量分別為 3、3、6、1、1。
- C. 小花各部位培植體接種後污染之情形。
- D. 子房培植體接種後污染之情形。
- E. 花瓣培植體接種後污染之情形。



圖 3.蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 誘導癒合組織之情形。

Fig. 3. The inducible callogenesis in the young florel organ culture on 1/2 MS supplemented with 2,4-D 2.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L of *Guzmania* cv. Hercules. (Bar = 1mm)

(A)花瓣、(B)萼片、(C)雄蕊、(D)花柱、(E)子房培植體接種兩個月後癒合組織發生之情形。



圖 4.蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L 及 NAA 0.5 mg/L 誘導癒合組織之情形。

Fig. 4. The inducible callogenesis in the young florel organ culture on 1/2 MS supplemented with 2,4-D 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L of *Guzmania* cv. Hercules. (Bar = 1mm)

(A)子房、(B)萼片、(C)花瓣、(D)雄蕊、(E)花柱培植體接種兩個月後癒合組織發生之情形。

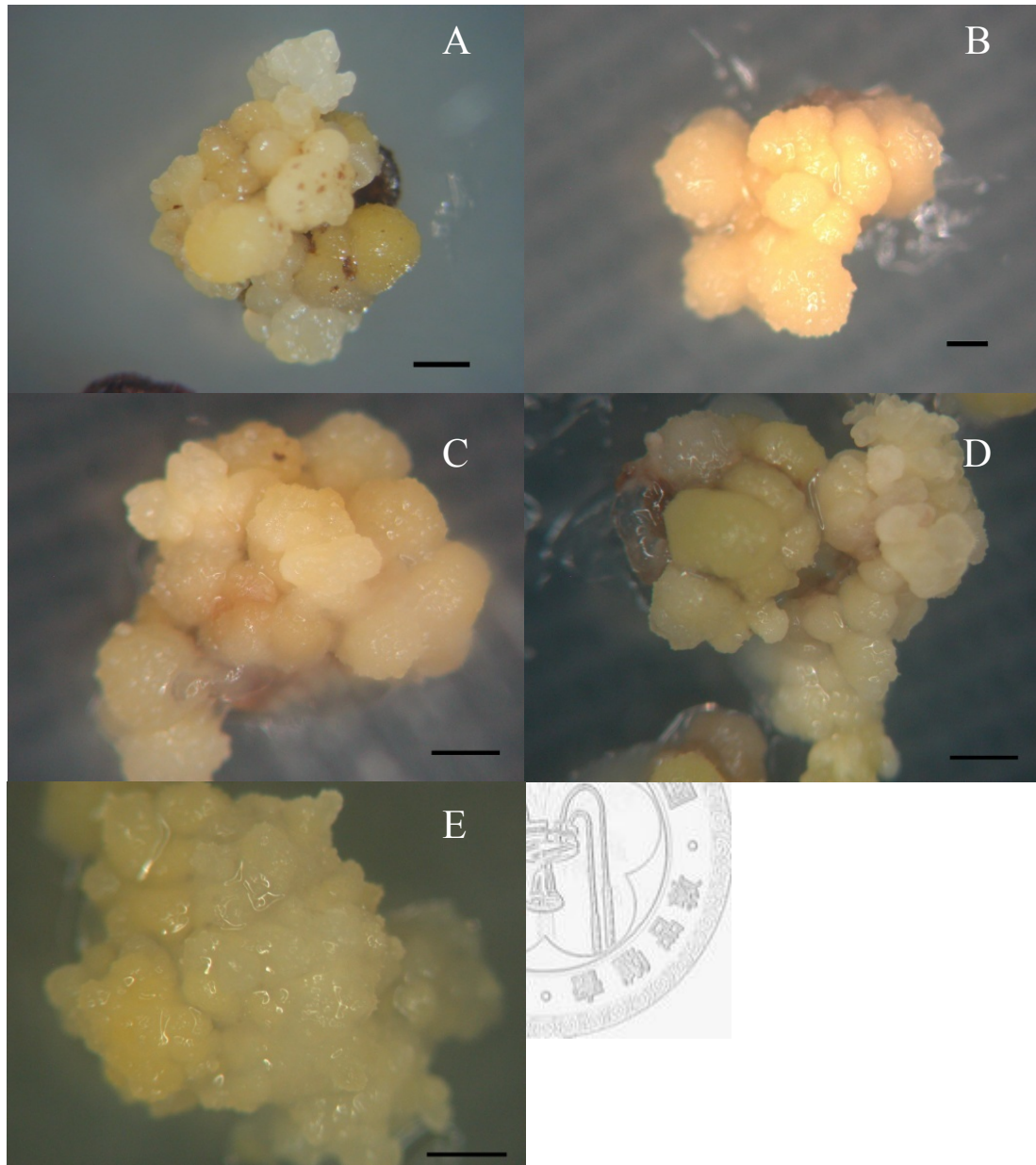


圖 5 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)子房培養衍生癒合組織及繼代增生之情形。

Fig. 5. Formation of granular yellow callus in ovary explant on 1/2 MS+2,4-D 1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L , and proliferation of continued subcultures . (Bar = 1mm)

A. 子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後癒合組織發生之情形。

B、C、D、E 為粒狀癒合組織持續繼代增生之情形。

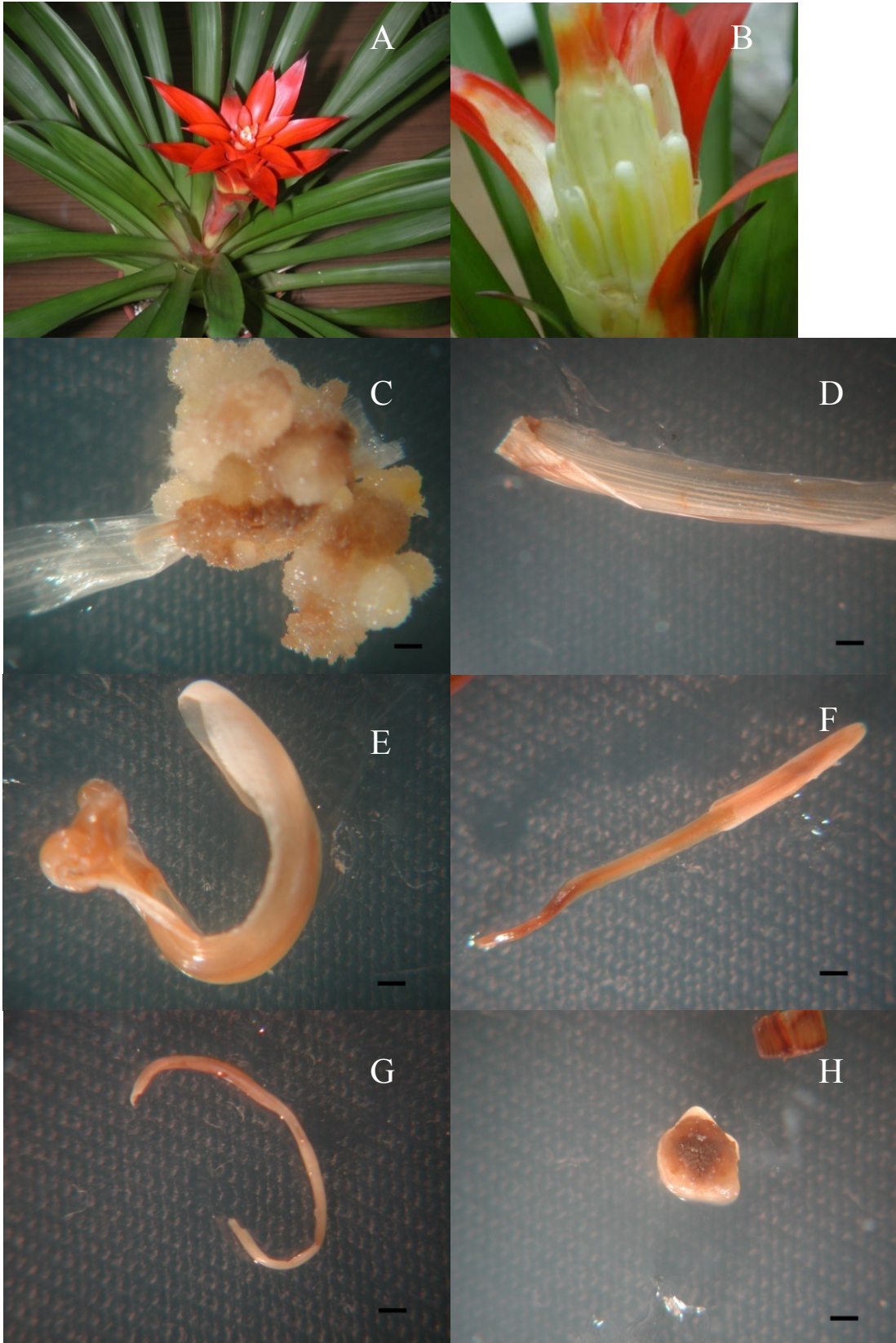


圖 6. 國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)幼小花花器培植體誘導癒合組織之情形。

Fig. 6. The induced callogenesis in the young florel organ culture of *Guzmania* cv. Carine. (Bar = 1mm)

A、B 國王擎天鳳梨之花序與小花結構。

C. 萼片培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後癒合組織發生之情形。

D、E、F、G、H 依序為萼片、花瓣、雄蕊、花柱、子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 褐化之情形。



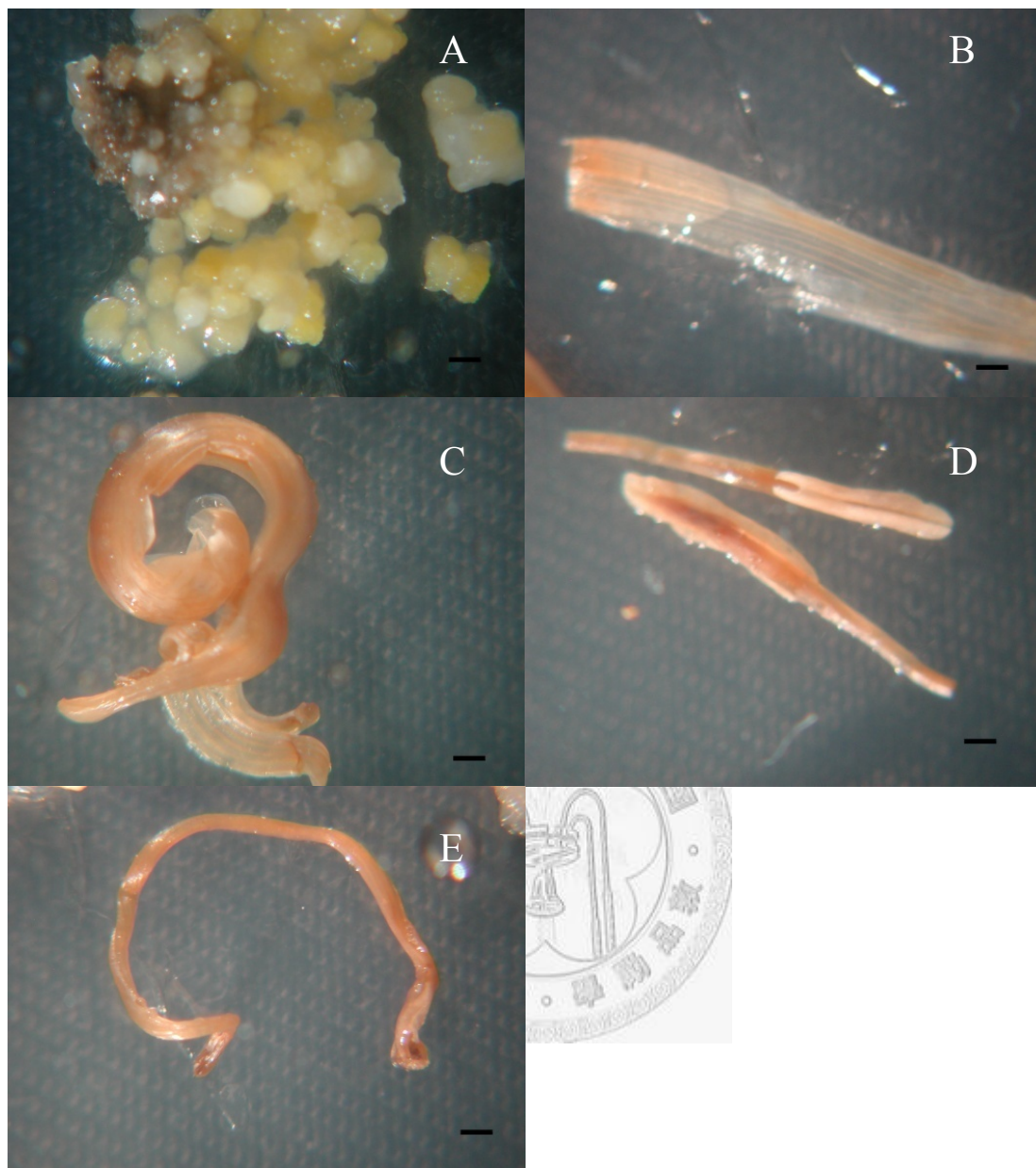


圖 7. 國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. Carine)幼小花花器不同部位接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L 及 NAA 1.0 mg/L 誘導癒合組織之情形。

Fig. 7. The inducible callogenesis in the young floret organ culture on 1/2 MS supplemented with 2,4-D 1.0 mg/L and NAA 1.0 mg/L of *Guzmania* cv. Carine.  
(Bar = 1mm)

(A)子房、(B)萼片、(C)花瓣、(D)雄蕊、(E)花柱培植體接種兩個月後癒合組織發生之情形。

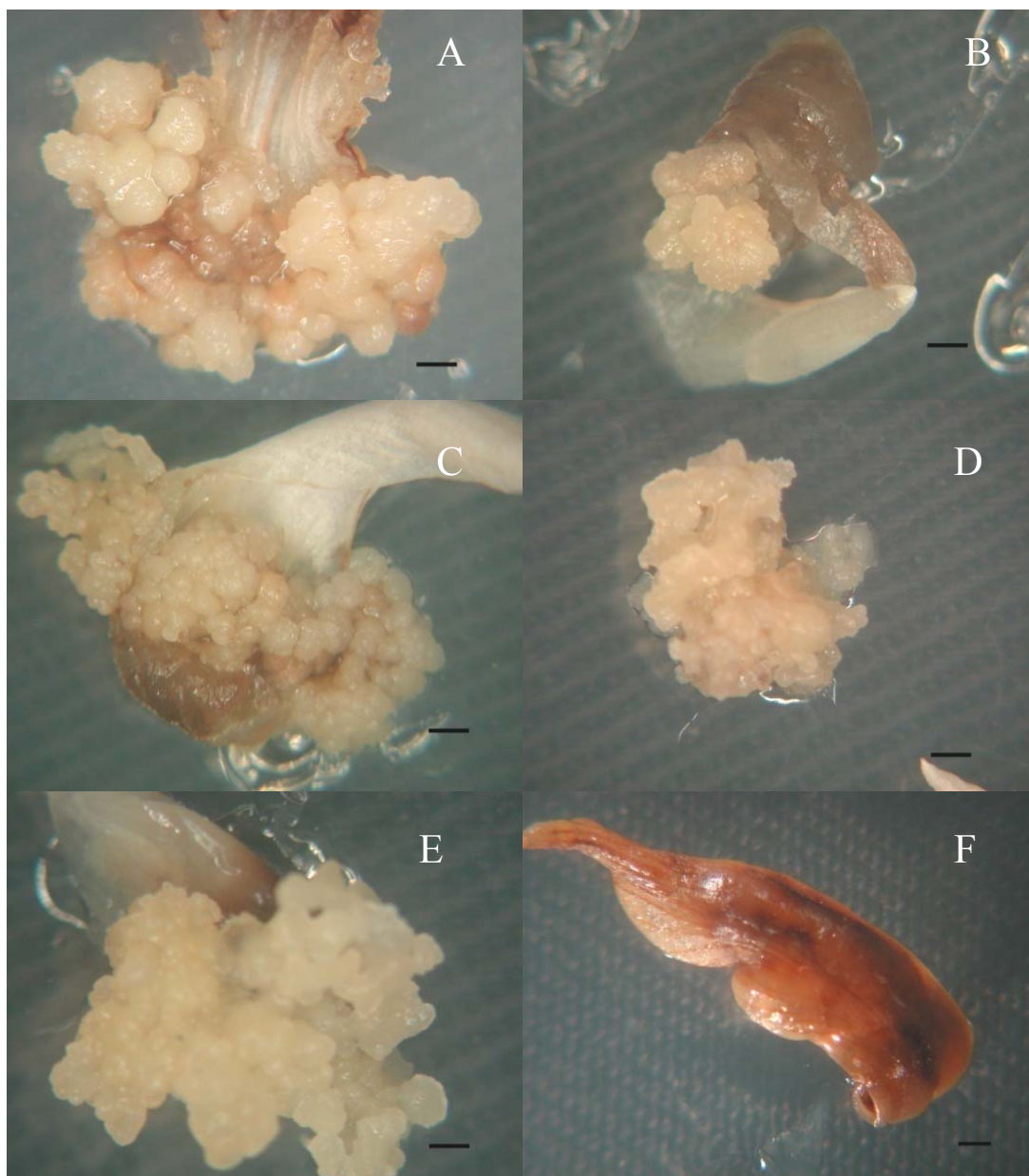


圖 8. 彩葉鳳梨(*Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor)花瓣培植體接種於不同 auxin 與 cytokinins 組合誘導癒合組織之情形。

Fig.8. Callus formation from petal explants of *Neoregelia* cv. Perfecta Tricolor.

(Bar = 1mm)

A 至 F 依序為花瓣培植體接種於表二培養基生長三個月之情形

A 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長三個月之情形。

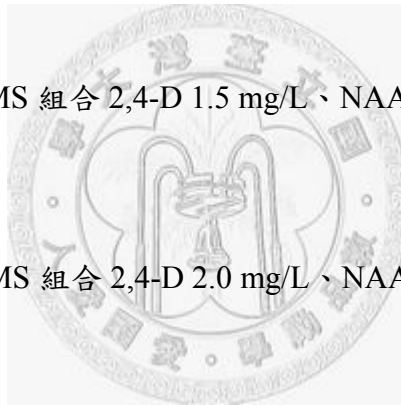
B 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長三個月之情形。

C 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長三個月之情形。

D 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長三個月之情形。

E 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L 培養基生長三個月之情形。

F 對照組，花瓣培植體接種於 1/2 MS 培養基褐化之情形。



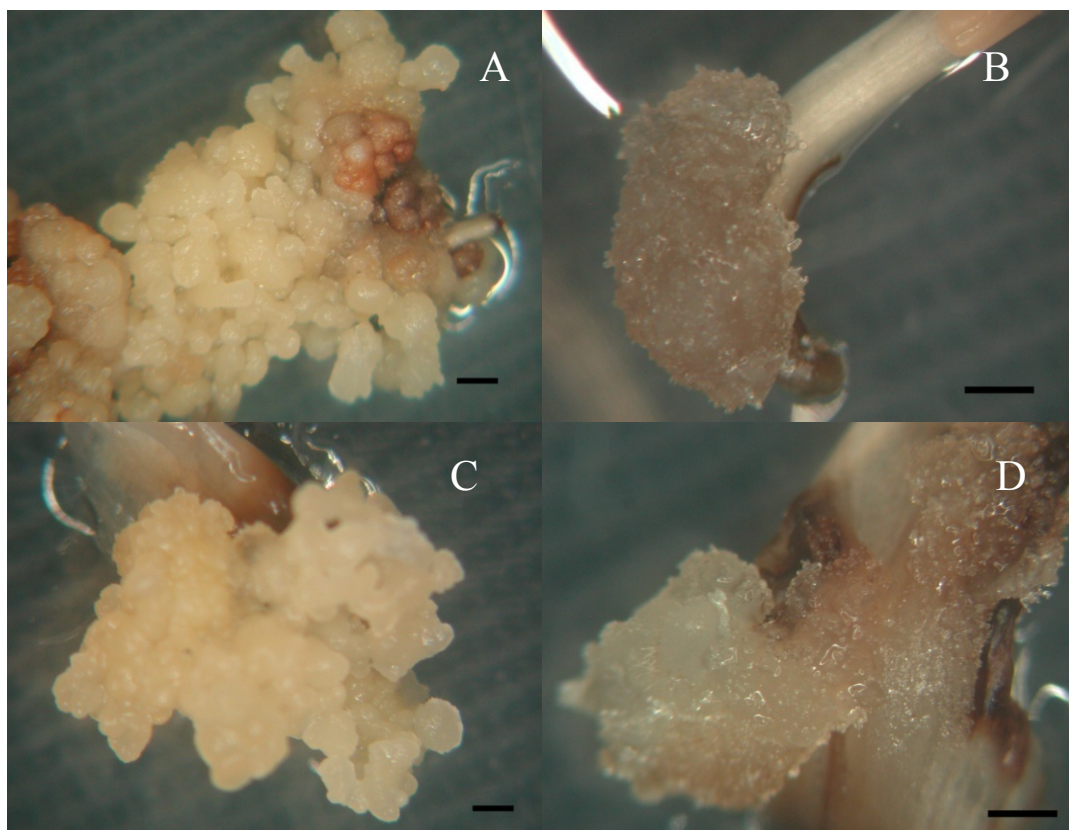


圖 9. 彩葉鳳梨(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*)小花花瓣與雄蕊培植體誘導癒合組織形成之情形。

Fig 9. The callus formation from petal and stamen explants of *Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*.  
( Bar=1mm.)

- A. 雄蕊培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L 培養基生長三個月後形成白色顆粒狀癒合組織。
- B. 雄蕊培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L 培養基生長三個月後形成半透明鬆散狀癒合組織。
- C. 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L 培養基生長三個月後形成白色顆粒狀癒合組織。
- D. 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、BA 0.5 mg/L 培養基生長三個月後形成半透明鬆散狀癒合組織。

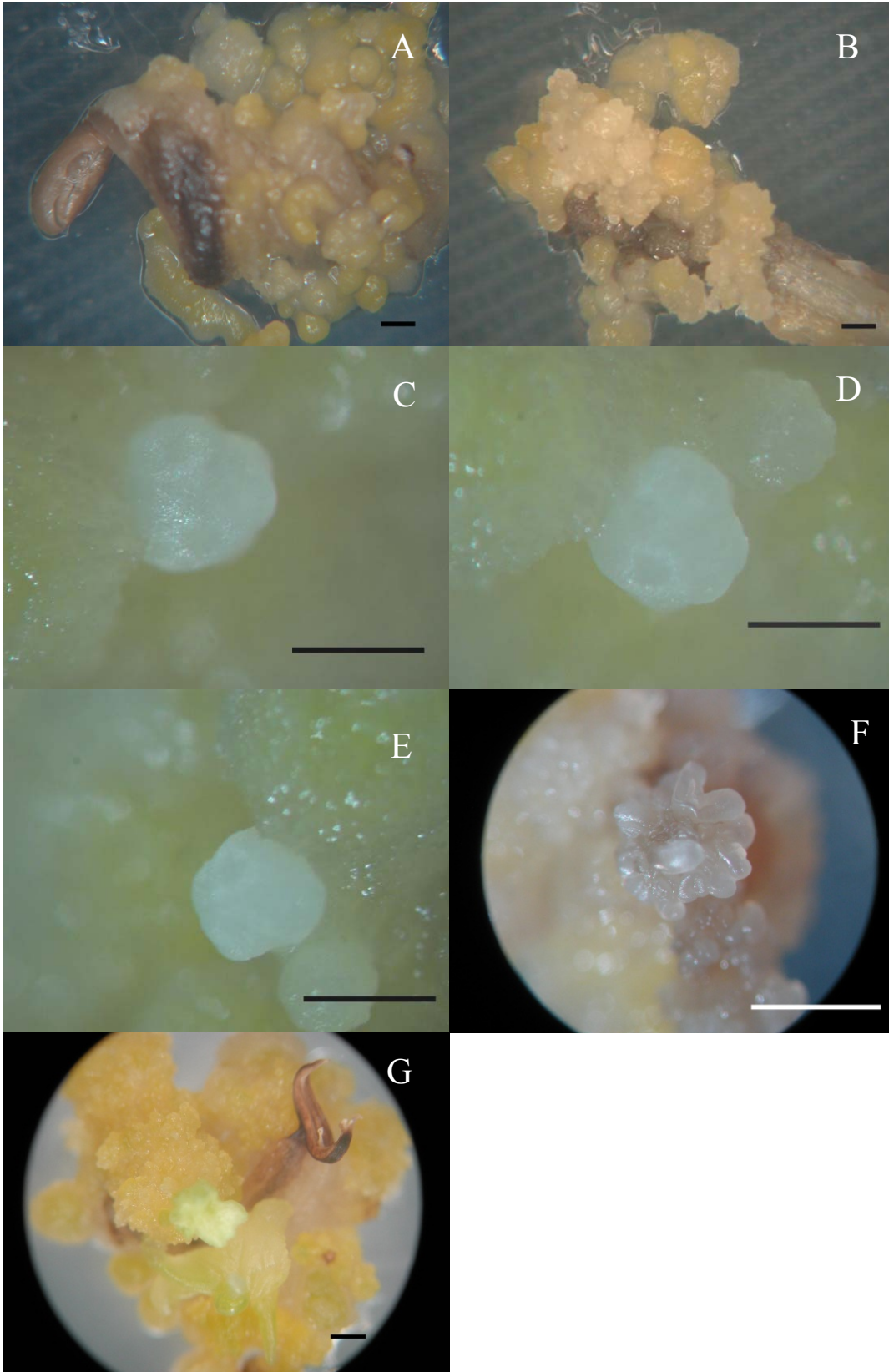


圖 10. 紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Amaranth*)幼小花花器培植體誘導癒合組織之情形。  
( Bar=1mm.)

Fig.10. The induced callogenesis in the young florel organ culture of *Guzmania* cv. *Amaranth*.

A 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後之情形。

B 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後之情形。

C-E 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後持續繼代增生之情形，有擬似體胚之形成。

F 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後持續繼代增生之情形，有擬似畸形叢生體胚之形成。

G 花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基生長二個月後接種於 TDZ 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個月後產生畸形芽體。

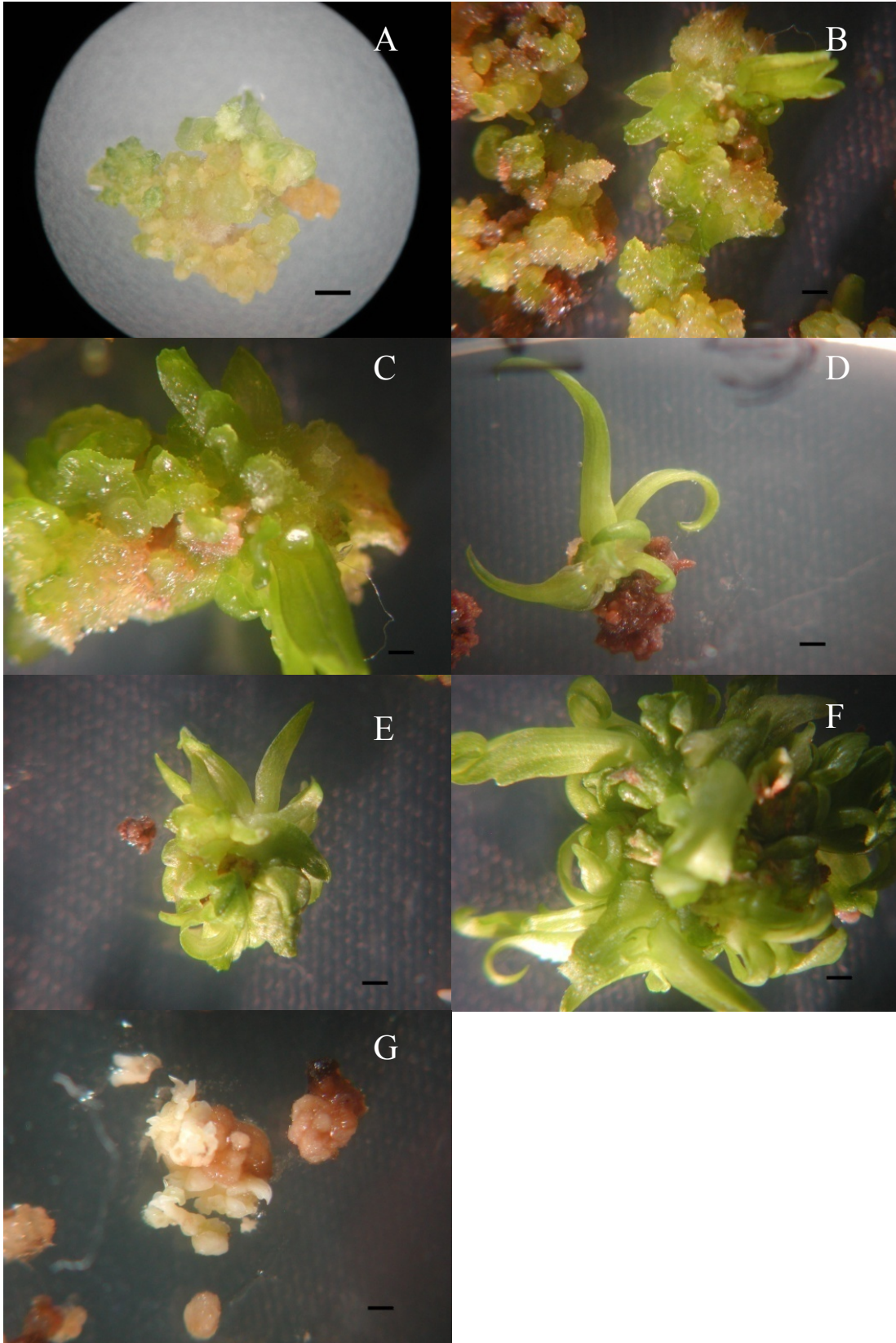


圖 11 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)幼小花子房培植體誘導癒合組織再生不定芽之情形。

Fig. 11. The induction of adventitious buds in ovary-derived callus (2,4-D 1.0 mg/L) of *Guzmania* cv. *Hercules*. (Bar = 1mm)

A、B、C、D 癒合組織接種於 1/2 MS 組合 TDZ 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 兩個月後癒合組織轉綠逐漸形成不定芽。

E、F 不定芽持續繼代於原培養基，側芽增生之情形。

G 癒合組織繼代於 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 培養基產生白化芽體。

(培植體來源為子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 兩個月後所誘導之黃色顆粒狀癒合組織持續繼代增生之癒合組織。)



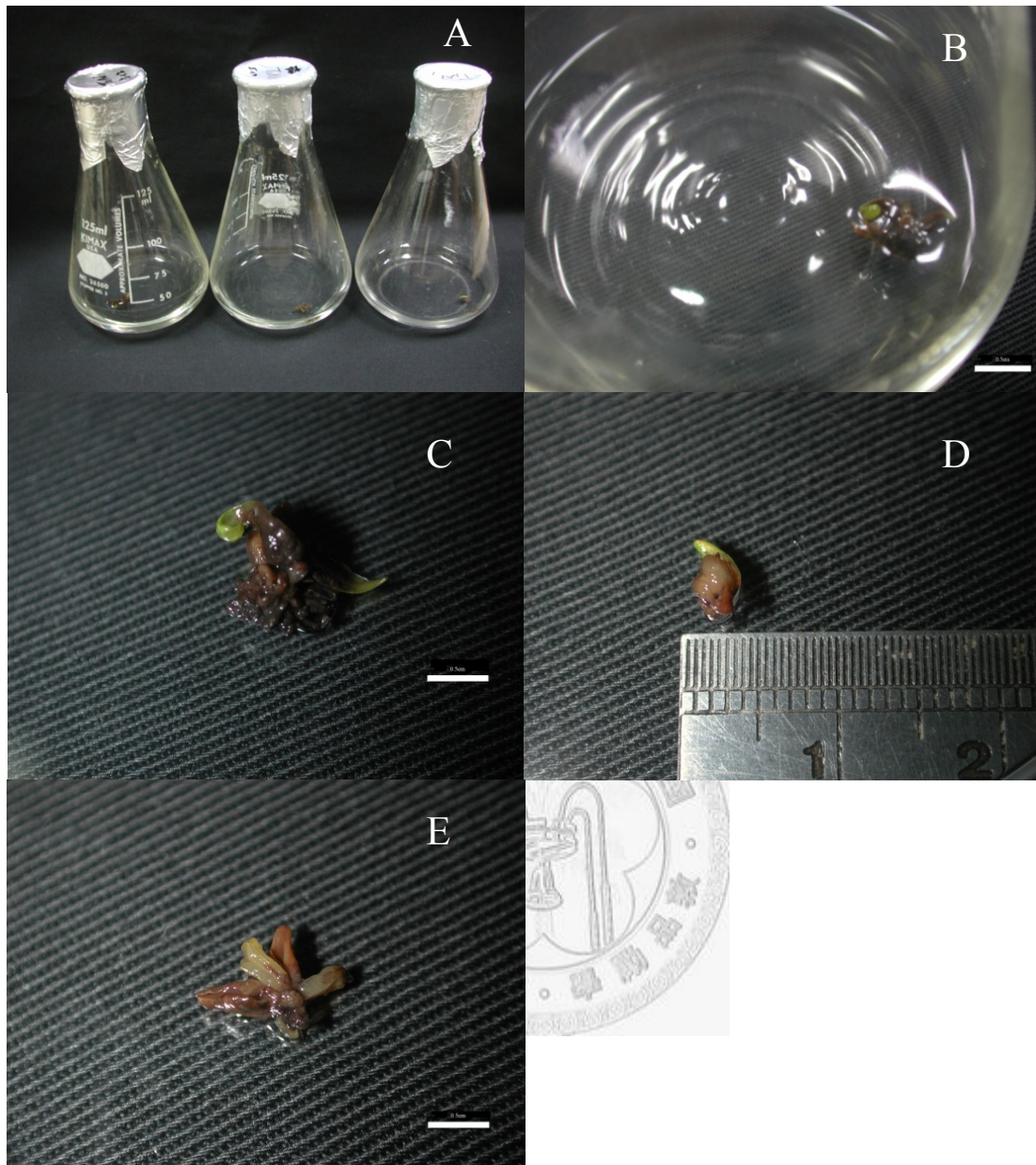


圖 12. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)次生培植體芽體液體培養於 1/2 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基芽體增殖之情形。(Bar=0.5cm)

Fig.12. The bud proliferation of microshoot explants on 1/2 MS medium containing TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L in liquid culture of *Guzmania* cv. Hercules.

A、B 單芽接種於錐形瓶液體培養之情形。

C、D 接種兩週後芽體逐漸褐化之情形。

E、接種三週後芽體完全褐化之情形。

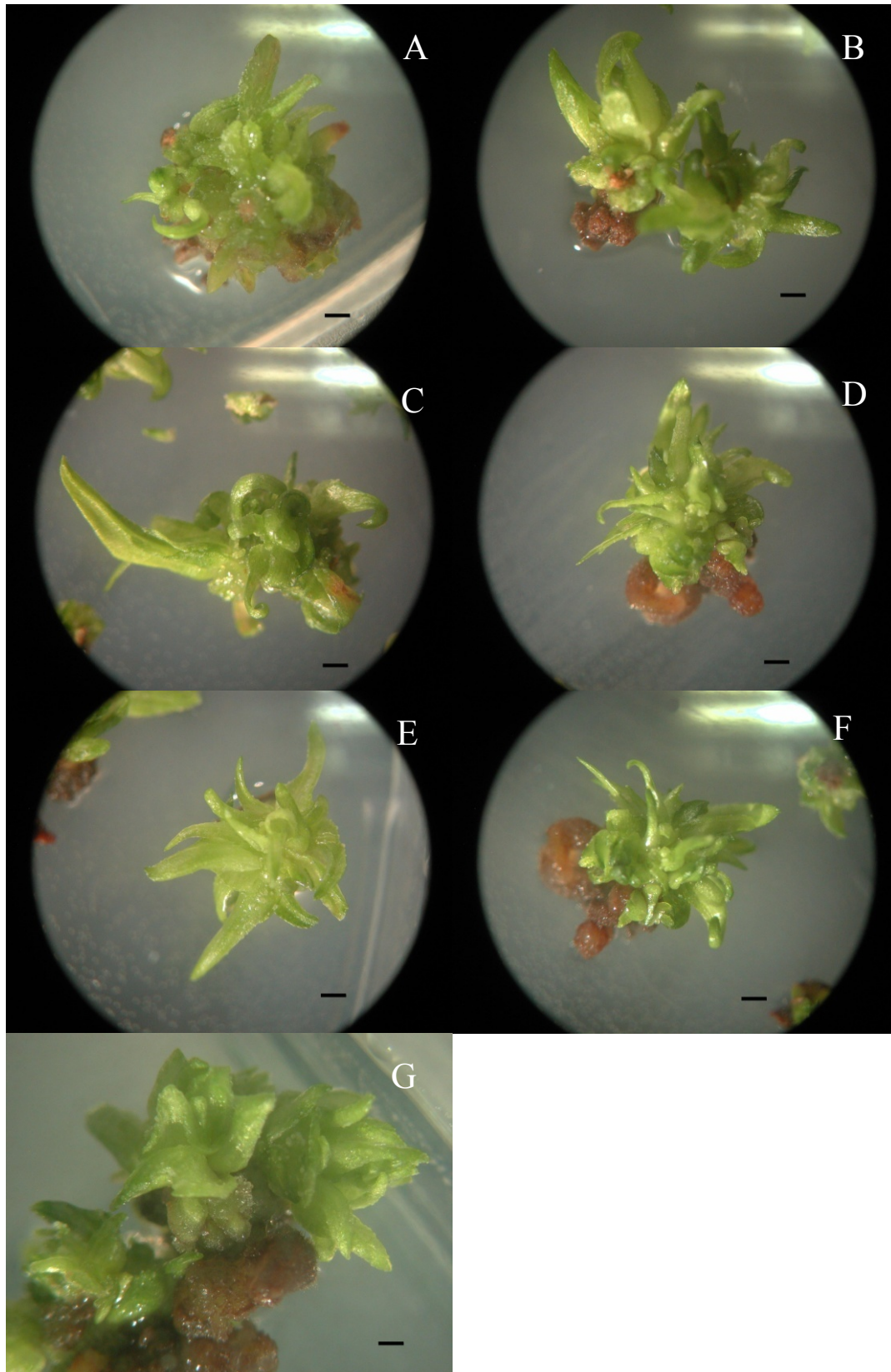


圖 13. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)次生培植體芽塊固體培養於 1/2 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基芽體增殖之情形。(Bar = 1mm)

Fig.13. The bud proliferation of microshoot explants on 1/2 MS medium containing TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L in solid medium culture of *Guzmania* cv. Hercules. (Bar = 1 mm)

A- G 分別為各單芽培植體於 1/2 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基兩個月後增殖與生長之情形。多數培植體葉片顏色深綠色、葉片短縮、芽體叢生，每單芽培植體可產生 1-5 個芽體。



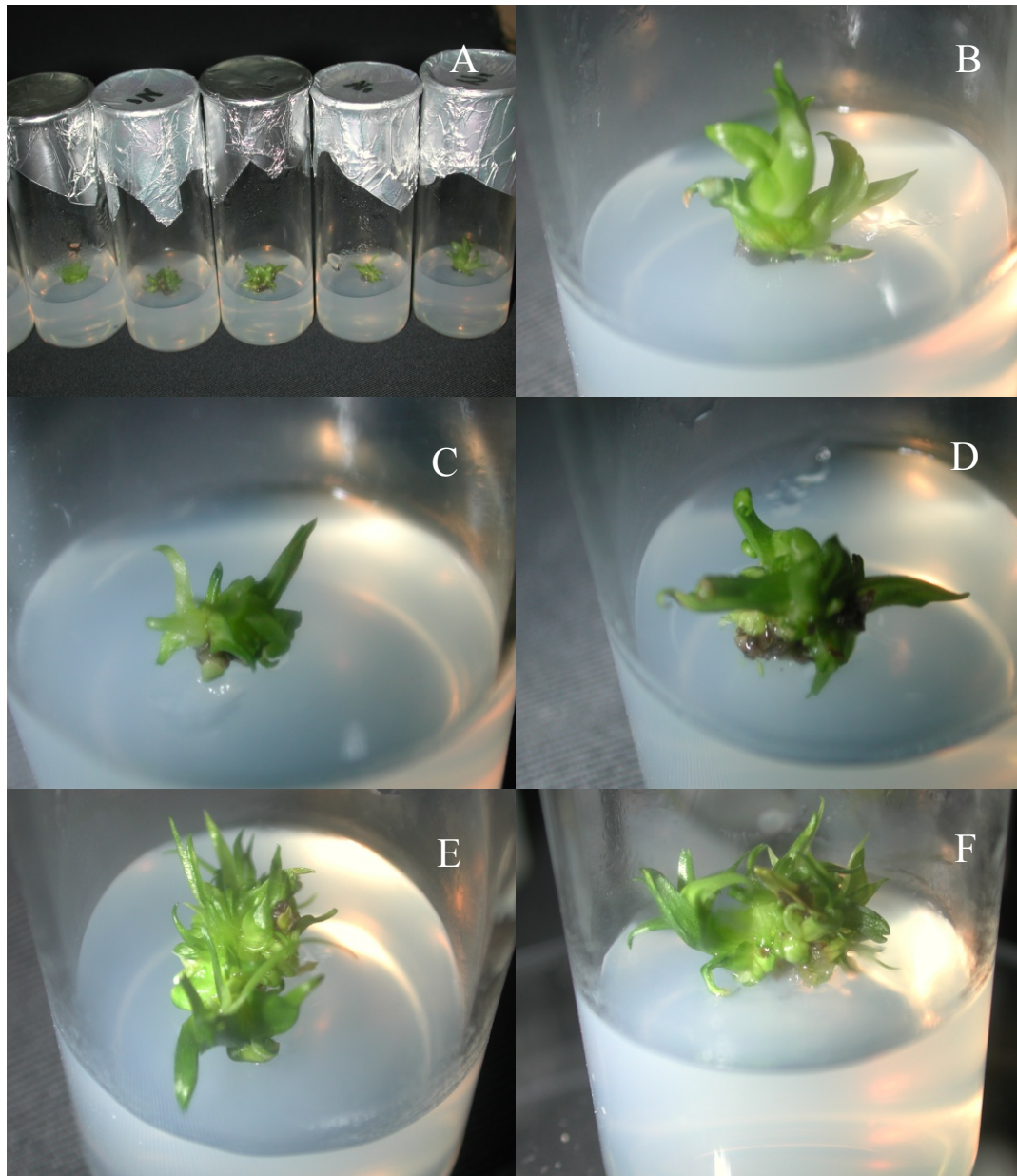


圖 14. 蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)次生培植體芽塊固體培養於 NAA 1.0 mg/L 發根培養基芽體抽長之情形。

Fig.14. The bud elongation of microshoot explants on 1/2 MS medium containing NAA 1.0 mg/L in solid medium culture of *Guzmania* cv. Hercules.

A. 單一芽體接種於 NAA 1.0 mg/L 發根培養基生長一個月後之情形。

B、C、D 芽體抽長之情形。

E、F 芽體抽長但仍呈叢生狀。

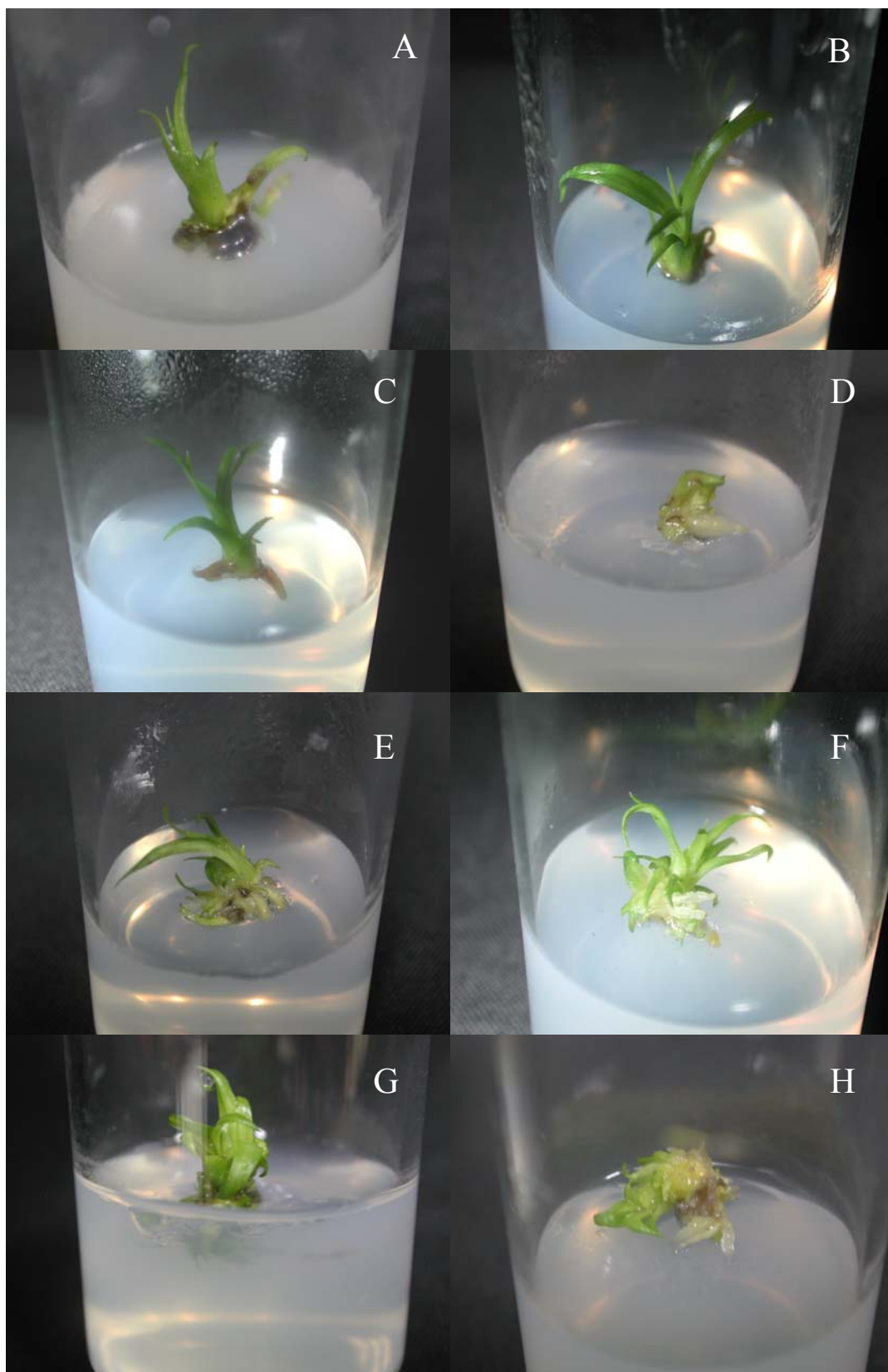


圖 15. NAA 對蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. Hercules)誘導瓶內發根之情形。

Fig.15. Effects of NAA on rooting in adventitious buds of *Guzmania* cv. Hercules in vitro.

A、B 接種於 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 芽體抽長、葉片鮮綠。

C 對照組(1/2 MS)。

D 接種於 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 產生白色肥大的根。

E、F 接種於 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 產生黃綠色與白色的根。

G 接種於 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 發根之情形。

H 接種於 1/2 MS+NAA 2.0 mg/L 發根之情形。



## 討論 (Discussion)

### 一、花器培養污染控制試驗與培植體褐化

參試品種之蠟燭鳳梨、彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*)以及紫擎天鳳梨於幼花序逆分化過程中，易於切口處產生內生菌污染，可能與花器本身構造有關及業者於大量栽培時易使植株與花序受到環境污染、灌溉水污染等因素有關，進而導致組織培養污染率提高，故開花前之栽培管理與消毒亦十分重要，於花芽形成後即須密切關注，或可藉此將組織培養污染率降至更低，以增加花器各部位培植體之可利用性。蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)幼小花以不同濃度次氯酸鈉消毒之處理中，以 1% 次氯酸鈉消毒 15 分鐘之處理，組織培養污染率高達 80%，接種一週至兩週後由各培植體之切口產生內生菌污染情形嚴重(圖 2C-E)；而以 2% 次氯酸鈉消毒 15 分鐘之效果較佳，可將組織培養污染率降低為 25%。

而彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*)以 2% 次氯酸鈉消毒 15 分鐘之組織培養污染率仍有 35%，推估因其頭狀花序深埋於葉杯當中，僅有正當開放時之小花會突出於花序外，故花序極容易受環境污染累積髒汙或受灌溉水污染，導致取用幼花序作為培植體時，組織培養之污染率較高於其他品系之參試材料，故於花序初始形成前便需要加強栽培管理與消毒處理，每週施用兩次稀釋 1000 倍之“免賴得”澆灌於葉杯與介質，而其餘時間則使用二次水並只澆灌介質。於小花即將開放時則盡量維持葉杯不積水與髒汙，並去除花序周圍苞片維持乾燥與清潔。

相較之下，國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Carine*)花器結構與蠟燭鳳梨較為相似，以 2% 次氯酸鈉消毒 15 分鐘之組織培養污染率為 0%。推測原因為其花序上之小花皆會分泌透明膠狀物質於其萼片與花瓣之間，使萼片與花瓣完全閉合而不易受環境污染，因此於本試驗中組織培養之污染率為 0%。三品系組織培養之污染率綜合比較可參見表 1。而採取紫擎天鳳梨小花培植體時，小花內部分泌許多乳汁，於消毒過程中難以去除，而且萼片髒汙，容易造成組織培養污染，而即使消毒前去除萼片不培養，於培養數週後仍有培植體於切口處產生內生菌之污染，故開花前之栽培管理與消毒便更顯其重要性。

然而培養初期培植體之褐化情形，也是影響觀賞鳳梨組織培養誘導胚性癒合組織能力之重要關鍵，而造成培植體褐化之因子可能與切取培植體時，受傷之花器部位產生的酚類化合物有關，也會影響到培植體的再生能力(Das and Mitra, 1990)。

在觀賞鳳梨組織培養上，可利用抗氧化劑如檸檬酸(citric acid)、抗壞血酸(ascorbic acid)、PvP(polycinylypyrrolidone)、活性炭等來降低培植體褐化之程度(邱,1991)。本試驗中於培養基添加抗氧化劑檸檬酸 200 mg/L，以降低培植體之褐化情形，由於檸檬酸遇高溫易分解，故不宜於 121℃ 殺菌釜(autoclave)中滅菌，須於初始培養基 pH 調至 5.7 滅菌後，再經過冷滅而加入檸檬酸 200 mg/L，可減輕培植體褐化之情形。然而於擎天屬國王擎天鳳梨與鶯歌屬金馬鶯歌鳳梨等試驗材料中，多數花器培植體於接種一至兩週後，皆逐漸褐化死亡，曾嘗試將抗氧化劑檸檬酸之含量提高到 400 mg/L 也只延緩褐化之情形數日，最後大多數培植體仍褐化死亡，並無癒合組織之產生。推估與其品種特性有關，或是小花花器表皮較薄與易受消毒時之藥害影響而死亡，故無癒合組織之產生。

## 二、花器培養誘導逆分化、再分化之探討

於適當培養條件下，未成熟花芽具有回復成營養芽之能力，許多被子植物中，未成熟花序為組織培養中很重要的培植體來源，可以用來產生具有細胞全能性之癒合組織(Neeta *et al.*, 2000)。對於某些單莖軸生長，或是營養器官不容易誘導逆分化之單子葉植物，如竹類、椰子以及香蕉，採用花序為培植體材料進行組織培養，經過逆分化可誘導體胚發生(馬及許, 1988)，同時又可不犧牲母株。而且花序培養為生殖組織具有組織幼嫩再生能力強、消毒容易、可作為培植體材料較多、無性繁殖等優點。單子葉植物之花序又可分為萼片、花瓣、花藥、花絲、花托、花梗、子房等許多花器附屬器官，以上述花器之各附屬器官作為培植體都具有不同的分化潛力，可以經由適當的生長調節劑與培養基組合誘導逆分化與再分化。本試驗中以觀賞鳳梨幼嫩小花花器各部位作為培植體，其再生途徑屬於逆分化、再分化的增殖。並未見有直接的器官發生或直接的體胚發生。但可以從逆分化與再分化作用，而導向不同形態發生，以提高增殖效益。以下就影響逆分化與再分化之相關因子分別探討之。

### (一)花器誘導逆分化癒合組織之影響因子

小花花器發育程度同時也會影響到癒合組織形成之情形，選取越幼嫩、越飽滿之小花作為培植體，其所產生之癒合組織形態正常，增生快速，同時亦較不易

褐化，反之若選取發育不佳、遭病蟲害或過度成熟老化(小花已抽出萼片)之小花作為培植體，可能難以產生癒合組織或僅產生少量容易褐化、且增生極為緩慢之癒合組織。擎天屬蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)幼小花花器發育程度誘導癒合組織之情形如表二所示，以肉眼觀察小花外表形態特性，小於 1.9 公分發育不全之小花接種於逆分化培養基約兩週後皆褐化，並無癒合組織產生；而 1.9-2.5 公分發育完整之飽滿未開放小花接種於逆分化培養基兩個月後可產生黃色顆粒狀癒合組織；而小花大於 2.5 公分，花瓣突出萼片 0.5 公分以上之過於成熟小花接種於逆分化培養基約兩週後皆褐化，皆無癒合組織產生。故於觀賞鳳梨花器組織培養過程中，小花花器發育程度與情形亦為影響癒合組織形成與增生之重要因素之一。

本試驗之蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合(表 3)中，花瓣培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 兩個月後只產生極為少量的灰褐色鬆散型癒合組織，並且難以增生；相較之下，子房培植體接種於 1/2 MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 兩個月後所產生之黃色顆粒狀癒合組織繼代於原培養基可大量增生，並且可再進一步誘導不定芽體的產生。然而其餘處理組合皆無癒合組織產生，小花各部位培植體接種於培養基 7-14 天後皆逐漸褐化死亡，可能主要與品種特性與小花花器構造有關，或是消毒時所造成的藥害，而國王擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Carine*)培養後之情形亦與之相似，同樣也是由子房逆分化產生黃色顆粒狀癒合組織，可以持續增生培養，但子房培植體若接種於 2,4-D 2.0 mg/L 兩個月後只產生極少量癒合組織且易於褐化。故推論較低之 2,4-D 濃度(1.0 mg/L)組合 NAA (0.5、1.0 mg/L)較容易誘導子房逆分化黃色顆粒狀型癒合組織。

而彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*) 小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合(表 5)中，花瓣培植體以 2,4-D 0.5-2 mg/L 組合 NAA 0.5 mg/L 皆可誘導產生大量白色顆粒狀癒合組織(圖 8)，且誘導頻率極高，於 2,4-D 1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、1.5 mg/L+BA 0.5 mg/L 四處理組合中其花瓣培植體癒合組織產生頻率分別為 91.6%、83.3%、66.6%、58.3%，而且由花瓣培植體誘導之癒合組織數量也較其他花器培植體為多。與蠟燭鳳梨、國王擎天鳳梨不同的是彩葉屬彩葉鳳梨花器各部位幾乎都可以產生癒合組織，其癒合組織為白色顆粒狀或透明鬆散

狀，且癒合組織產生頻率與數量也相對較多，但其癒合組織容易硬化，不易增生之問題仍有待解決。而以 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L 組合較低濃度之 2,4-D 1.0 mg/L 也可使花器各部位產生之癒合組織頻率較高與數量較多。

另外此彩葉屬栽培種(*Neoregelia* cv. *Perfecta Tricolor*)於 2,4-D 1.5mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 之處理組合中，同一花器部位培植體可能產生表面光滑之白色粒狀型癒合組織或表面粗糙之半透明鬆散型癒合組織兩種形態，或同時具有兩種形態之癒合組織(圖 9)。故推論 2,4-D 之濃度高低並非決定癒合組織形態分化之唯一因子，亦可能與品種本身特性及外加細胞分裂素有關，但就總體而言，低濃度之 2,4-D 可誘導之癒合組織數量較多，其誘導頻率也較高，可誘導再生不定芽體之能力也較高。

紫擎天鳳梨(*Guzmania* cv. *Amaranth*)幼小花花器培植體接種於不同生長調節劑組合中，花瓣培植體接種於 1/2MS 組合 NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.5、2.0 mg/L 約 40 天可產生黃色顆粒狀癒合組織，該癒合組織形態與楊，1999 所培養之龍鳳擎天鳳梨之癒合組織形態相似。而持續繼代增生可產生大量黃白色顆粒狀癒合組織，觀察有擬似體胚以及擬似叢生狀之畸形體胚之形成(圖 10)，但培養過程中由於培植體本身帶有微生物之污染，故於培養後逐漸死亡。

綜合上述各點，可以得知觀賞鳳梨花器培養與再生之情形在不同品種間仍然具有很大的差異性存在。

## (二)癒合組織誘導再分化間接不定芽之影響因子

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv. *Hercules*)子房培植體接種於 1/2MS 組合 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 兩個月後子房培植體產生之黃色顆粒狀癒合組織，持續繼代增生後，該癒合組織以 0.5 公分大小之團塊接種於 1/2MS 組合 TDZ1.0 mg/L、NAA1.0 mg/L 一週後癒合組織可以逐漸轉綠，兩個月後由顆粒狀癒合組織逐漸分化形成不定芽體，持續繼代於原培養基，芽體可持續生長，葉片展開、葉片顏色鮮綠，每團塊約可產生 3-6 個芽體，但芽體仍呈現短縮叢生之情形，若要得到單一正常生長之小植株則須將芽團進行分切並進行微扦插於發根健化之培養基。而即使子房培植體逆分化之癒合組織於長期繼代培養中表面褐化、生長緩慢，但接種於 1/2MS 組合 TDZ1.0 mg/L、NAA1.0 mg/L 再分化之培養基，仍有部分可再分化為芽體。

### 三、次生培植體芽體增殖之探討

本試驗嘗試以癒合組織誘導再生之叢生不定芽團切取 0.5 公分大小之芽塊分別進行固體與液體培養，探討其芽體增殖之情形。

#### (一)芽塊液體培養

本試驗中以蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv.Hercules)子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊為起始培植體，單芽塊液體培養於 1/2MS+TDZ1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L 增殖培養基接種兩週後芽體逐漸褐化(圖 12)，而持續接種三週後芽體則完全褐化，並且無芽體之產生。褐化之情形可能是因為培植體長期浸泡於液體中所導致或是分切後之培植體過於幼小、切口處容易增加酚類化合物產生進而於液體中擴散而導致褐化。

#### (二)芽塊固體培養

以蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv.Hercules)子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊為起始培植體，芽塊固體培養於 1/2 MS+TDZ 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 增殖培養基兩個月後，多數培植體葉片顏色深綠色並且生長良好，但由於細胞分裂效應而呈現葉片短縮、芽體叢生之情形，每芽塊可產生 1-5 個芽體，而接種 15 個 0.5 公分大小之芽塊兩個月後芽體總數為 48 個芽體，總增殖倍率為 3.2 倍(表 8)。而其中培植體生長情況越佳、芽體越大，產生之側芽數量也越多，最大培植體長度為 1.8 公分，芽體數 4 個；而最小培植體長度為 0.6 公分，芽體數兩個。若將芽體持續分切繼代增殖，將可得到以倍速成長之大量芽體，同時亦可建立芽體大量增殖系統。而由組織培養所得之個體，亦會出現有變異的植株，其比例會隨繼代培養次數增加而提高，而鳳梨側芽培植體，在六個月內的分切再培養不可超過三次，應重新採取培植體，以減少變異之發生(馬, 1977)。然而目前於本試驗中，仍未觀察到有

變異苗之出現，該不定芽體持續分切再培養是否會產生有變異之植株以及變異率是否會因而增加仍有待進一步探討。

故於本芽體增殖試驗中，固體培養優於液體培養，可產生較多芽體數，且相較於液體培養，固體培養之組織培養污染率較低，即使培養過程產生污染或培植體帶有內生菌之污染，亦不容易快速擴散於全培養基當中，而液體培養之組織培養污染則容易快速擴散於培養液當中；而酚類化合物亦可藉由培養液而快速擴散，進而導致培植體之褐化情形更為嚴重，而且分切芽體過小又長時間浸泡於液體當中，可能導致培植體缺氧以及對培植體產生毒害，故本試驗中以固體培養之芽體增殖效果較佳。

#### 四、芽體健化與植株建立

觀賞鳳梨之組織培養過程，主要可分為初代培養(逆分化、再分化)、芽體增殖、芽體健化發根、促成小植株等階段。而芽體增殖階段添加之細胞分裂素所產生之細胞分裂效應於鳳梨科植物很明顯，芽體短縮叢生、抽長受到抑制，而濃度過高(10mg/L)時會產生毒害(Mekers, 1977)。故於誘導不定芽再生時，應盡量採用較低濃度之細胞分裂素，並且於芽體誘導增生後，應盡速繼代於不含細胞分裂素之培養基中，以消除其叢生現象，促使芽體正常生長。本試驗中將細胞分裂素移除，並添加 NAA1.0 mg/L，以促進芽體之抽長、健化與發根。

蠟燭鳳梨(*Guzmania* cv.Hercules) 子房培植體接種於 2,4-D 1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L 所誘導之黃色顆粒狀癒合組織繼代增生後接種於 TDZ1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體分切為 0.5 公分大小之芽塊固體培養於 NAA 1.0 mg/L 發根培養基一個月後芽體抽長生長良好(圖 14)，葉片顏色鮮綠，而以 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L 發根培養基持續繼代，皆可觀察到芽體抽長之情形，其中又以 NAA 0.5 mg/L 地上部之抽長情形較佳，而 NAA 0.5、1.0、2.0 mg/L 皆可促進根系形成，可產生黃綠色之細根或褐色之粗根。

雖繼代於發根培養基之過程中可觀察到芽體抽長之情形，但部分芽體仍具有細胞分裂效應而呈現叢生狀，且有不發根之情形，若於不定芽誘導培養基兩個半月後所得到之叢生芽體未分切而直接接種於 NAA 1.0 mg/L 發根培養基，可觀察到芽體抽長之情形，但芽團仍呈現大量芽體叢生、短縮之情形，若芽團之芽體小

而短縮不易分切可將芽團移至不含細胞分裂素之培養基生長 1 個月後芽體較為健壯與抽長後再進行分切，可免於分切過程中造成較小芽體死亡。



## 陸、結語

觀賞鳳梨花器培養與再生之過程可以藉由逆分化培養基誘導大量癒傷組織形成，進而以器官發生之途徑建立大量增殖與再生體系。藉由器官發生之途徑可以快速得到大量叢生不定芽，叢生不定芽分切為單芽，以固體培養短時間內可增殖大量芽體，建立芽體增殖系統，未來亦可參試於不同增殖階段使用固、液體之交互培養，以期建立更完善之芽體快速增殖體系，提高其可利用性。此外，叢生芽分切為單一芽體培養於發根培養基可有利於植株抽長與正常生長以及發根，未分切之芽團則不易發根，或僅產生少數不定根。而觀賞鳳梨之花器培養與再生情形也會因屬、種而具有差異性存在。



### 參考文獻(References)

1. 沈再木、傅仰人、葉德銘、張維斌. 2004 台灣盆花產業之回顧與展望. 台灣花卉園藝之回顧與展望研討會. 台灣花卉園藝. 200:102-117.
2. 阮育雄. 2003. 鳳梨外銷大陸之潛力與策略. 台灣花卉園藝. 198:16-19.
3. 邱金春. 1991. 蜻蜓鳳梨(*Aechmea fasciata* Baker)微體繁殖之研究. 中華農業研究. 40(3): 274-279.
4. 邱金春. 1991. 觀賞鳳梨組織培養繁殖褐化問題解決之道. 台灣省農業試驗所技術服務. 5:10-12.
5. 邱金春 林昭雄. 1987. 觀賞鳳梨組織培養繁殖之研究. 花卉生產改進研討會專集. p. 130-134. 桃園區農業改良場發行
6. 周邵蓮. 1989. 蜻蜓鳳梨的組織培養. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
7. 馬溯軒 王淑娥. 1977. 鳳梨之組織培養繁殖. 中國園藝. 23:107-113.
8. 馬溯軒 許圳塗. 1988. 植物再生與繁殖改良. 園藝作物組織培養之應用研討會專集. p.1-18. 國立台灣大學園藝系. 台北.
9. 陳柏文. 2005. 彩葉屬(*Neoregelia*)、鶯歌屬(*Vriesea*)及空氣屬(*Tillandsia*)觀賞鳳梨組織培養器官發生與體胚發生之研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
10. 陳鴻吉. 2002. 觀賞鳳梨RAPD遺傳親緣性分析及擎天屬龍鳳品種之細胞培養與體胚再生. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
11. 章錦瑜. 1999. 最新室內觀賞植物. 淑馨出版社. 台灣台北. p95-125.
12. 張麗慧. 2003. 玉扇鳳梨( *Tillandsia cyanea* )及擎天屬栽培種( *Guzmania* cv. Cherry)觀賞鳳梨花器衍生癒合組織細胞懸浮培養及再生. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.
13. 楊晴惠. 1999. 觀賞鳳梨組織培養不定芽再生研究. 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文.

14. Alves, G.M., L.L. Dal Vesco, and M.P. Guerra. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*. 110:204-207.
15. Aranda-Peres, A.N., A.P. Martinelli, L.E.P. Peres, and E.N. Higashi. 2009. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The importance of calcium. *Hort Science*. 44:106-112.
16. Aydieh, A.A., M.K.H. Ibrahim, and A. Ibrahim. 2000. In vitro propagation and fruiting of pineapple. *Egyptian Journal of Horticulture*. 27:289-304.
17. Bunn, E., and K.W. Dixon. 1992. Micropropagation of the pineapple lily , *Dasypogon hookeri* J-Drumm. *Hort Science*. 27:369-369.
18. Carneiro, L.A., R.F.G. Araujo, G.J.M. Brito, M. Fonseca, A. Costa, O.J. Crocomo, and E. Mansur. 1998. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R-Graham) LB Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*. 55:79-83.
19. Cueva, A., C. Espinosa, and M. Jordan. 2006. Efficient in vitro multiplication of *Aechmea* 'Little Harv' and *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch. *Propagation of Ornamental Plants*. 6:165-169.
20. Das, T. and G.C. Mitra. 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*. 22:95-103.
21. Devi, Y.S., A. Mujib, and S.C. Kundu. 1997. Efficient regenerative potential from long term culture of pineapple. *Phytomorphology*. 47:255-259.
22. Droste, A., A.M. da Silva, A.V. Matos, and J.W. de Almeida. 2005. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

48:717-722.

23. Duranvila, N., M. Cambra, V. Medina, C. Ortega, and L. Navarro. 1989. Growth and morphogenesis of *Citrus* tissue-cultures infected with *Citrus* tristeza virus and *Citrus* infectious variegation virus. *Phytopathology*. 79:820-826.
24. Endres, L., and H. Mercier. 2003. Amino acid uptake and profile in bromeliads with different habits cultivated in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:181-187.
25. Escalona, M., J.C. Lorenzo, B. Gonzalez, M. Daquinta, J.L. Gonzalez, Y. Desjardins, and C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L-Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*. 18:743-748.
26. Feuser, S., K. Meler, M. Daquinta, M.P. Guerra, and R.O. Nodari. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 72:221-227.
27. Firoozabady, E., and Y. Moy. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* . 40:67-74.
28. Galek, R., and K. Kukulczanka. 1996. Influence of growth regulators (IBA, BA) on anatomical and morphological changes in bromeliads in vitro culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 65:213-219.
29. Gonzalez-Olmedo, J.L., Z. Fundora, L.A. Molina, J. Abdunour, Y. Desjardins, and M. Escalona. 2005. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* . 41:87-90.
30. Greno, V., L. Navarro, and N. Duranvila. 1988. Influence of virus and virus-like

- agents on the development of *Citrus* buds cultured invitro. Plant Cell,Tiss.Organ Cult. 15:113-124.
31. Greno, V., M. Cambra, L. Navarro, and N. Duranvila. 1990. Effect of antiviral chemicals on the development and virus content of Citrus buds cultured invitro. Sci. Hort. 45:75-87.
  32. Guerra, M.P., L.L. dal Vesco, R. Pescador, A.R. Schuelter, and R.O. Nodari. 1999. Establishment of a regenerative protocol for the pineapple micropropagation. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 34:1557-1563.
  33. Hamad, A.M., and R.M. Taha. 2008. Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. Sci. Hort. 117:329-334.
  34. Hasan, S.M.Z., and N.S. Abdullah. 2007. Effect of salinity on growth, proline accumulation and malate content of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) under tissue culture condition. Malaysian Applied Biology. 36:57-63.
  35. Hidalgo, O.B., R. Santos, R.T. Tussel, A. Pires de Matos, R.S. Cabral, M. Arzola, and M.C. Perez. 1999. Phytotoxicity of *Fusarium subglutinans* culture filtrates on in vitro plantlets and calli of resistant and susceptible pineapple (*Ananas comosus*). Plant Pathology. 48:756-758.
  36. Hosoki, T., and T. Asahira. 1980. Invitro-propagation of bromeliads in liquid culture. Hort Science. 15:603-604.
  37. Kanashiro, S., R.D.S. Ribeiro, A.N. Goncalves, V.A. Demetrio, T. Jocys, and A.R. Tavares. 2009. Effect of calcium on the in vitro Growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith Plantlets. Journal of Plant Nutrition. 32:867-877.
  38. Khan, S., A. Nasib, and B.A. Saeed. 2004. Employment of in vitro technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). Pakistan Journal of

Botany. 36:611-615.

39. Kiss, E., J. Kiss, G. Gyulai, and L.E. Heszky. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. Hort Science. 30:127-129.
40. Koh, Y.C., and F.T. Davies. 1997. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. Scientia Horticulturae. 70:301-307.
41. Koh, Y.C., and F.T. Davies. 2001. Mutagenesis and in vitro culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). Scientia Horticulturae . 87:225-240.
42. Lin, H.-S., and Y.-S. Tsay. 2005. Studies on the combination of tissue culture and gamma ray irradiation to induce pineapple mutations. Journal of the Chinese Society for Horticultural Science. 51:241-247.
43. Merks, O. 1977. In vitro propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae) . Acta Hort. 78: 311-320.
44. Meker, O. and J. G . Van Onsem. 1983. In vitro propagation of *Vriesea* Cultivars in comparison with other ornamental Bromeliaceae. Acta Hort. 131:125-130.
45. Mercer, H., and G.B. Kerbaux. 1992. Invitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. Plant Cell,Tiss.Organ Cult. 30:247-249.
46. Mercier, H., B.M. Souza, J.E. Kraus, R.M. Hamasaki, and B. Sotta. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. Brazilian Journal of Plant Physiology. 15:107-112.
47. Moreira, M.A., C.B. Fraguas, J.G. de Carvalho, and M. Pasqual. 2007. Micropropagation of pineapple cv. Perola with urea as nitrogen source. Acta Scientiarum Agronomy. 29:689-693.

48. Neeta, D.S., L. George, and E. Susan. 2000. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 62: 235-238.
49. Nievola, C.C., J.E. Kraus, L. Freschi, B.M. Souza, and H. Mercier. 2005. Temperature determines the occurrence of CAM or C-3 photosynthesis in pineapple plantlets grown in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 41:832-837.
50. Nowak, E.J., and C.E. Martin. 1997. Physiological and anatomical responses to water deficits in the CAM epiphyte *Tillandsia ionantha* (*Bromeliaceae*). *International Journal of Plant Sciences.* 158:818-826.
51. Pasqual, M., F.C. Santos, M.A. de Figueiredo, K.P. Junqueira, J.C. de Rezende, and E.A. Ferreira. 2008. Protocol for in vitro micropropagation of ornamental pineapple. *Horticultura Brasileira.* 26:45-49.
52. Perez, G., E. Yanes, M. Isidron, and J.C. Lorenzo. 2009. Phenotypic and AFLP characterization of two new pineapple somaclones derived from in vitro culture. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 96:113-116.
53. Pickens, K.A., J.M. Affolter, H.Y. Wetzstein, and J.H.D. Wolf. 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. *Hort Science.* 38:101-104.
54. Pickens, K.A., J. Wolf, J.M. Affolter, and H.Y. Wetzstein. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 42:348-353.
55. Poole, R.T., and C.A. Conover. 1976. Nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization of bromeliad, *Aechmea fasciata* Baker. *Hort Science.* 11:585-586.
56. Rech, A., L.L. Dal Vesco, and M.P. Guerra. 2009. Adventitious shoots from nodule

- cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. *Ciencia Rural*. 39:909-912.
57. Rech Filho, A., L.L. Dal Vesco, R.O. Nodari, R.W. Lischka, C.V. Mueller, and M.P. Guerra. 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* . 14:1799-1808.
58. Santos, M.D.M., D.G. Ribeiro, and A.C. Torres. 2008a. Adventitious shoot of ornamental pineapple under benzylaminopurine, naphthalene acetic acid and subculture period effect. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 43:1115-1120.
59. Santos, M.D.M., G.C.S. Buso, and A.C. Torres. 2008b. Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*. 7:1097-1105.
60. Souza, B.M., J.E. Kraus, L. Endres, and H. Mercier. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:733-739.
61. Sriporaya, S., R. Marchant, J.B. Power, and M.R. Davey. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 39:450-454.
62. Teng, W.L. 1997. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. *Plant Cell Reports*. 16:454-457.
63. Vinterhalter, B., and D. Vinterhalter. 1994. True-to-type in-vitro propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae*. 57:253-263.
64. Wang, M.L., G. Uruu, L. Xiong, X. He, C. Nagai, K.T. Cheah, J.S. Hu, G.L. Nan, B.S. Sipes, H.J. Atkinson, P.H. Moore, K.G. Rohrbach, and R.E. Paull. 2009.

- Production of transgenic pineapple (*Ananas cosmos* (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 45:112-121.
65. Zee, F.T., and M. Munekata. 1992. In vitro storage of pineapple (*Ananas-spp*) germplasm. *Hort Science*. 27:57-58.
66. Zhang, Y.-Y., H.-J. Hsu, and W.-L. Huang. 2008. Establishment of callus induction and shoot regeneration system from axillary bud on Taiwanese edible pineapples. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science*. 46:49-56.



## 附錄一

### 擎天屬、彩葉屬觀賞鳳梨花器培養再生之流程

#### 一、花器培植體之取材與消毒：

切取飽滿未開小花(花器官發育程度和構造與其花器大小相關，但因品種不同而有所差異，但選取培植體以花瓣不突出萼片為佳)，以酒精棉片擦拭表面，若小花表面具有透明黏液則先以酒精棉片拭去再以無菌水沖洗。以 1-2% 次氯酸鈉添加 1 滴 Tween20 消毒 15 分鐘，再以無菌水清洗三次。最後分別切取小花之萼片、花瓣、雄蕊、子房與花絲做為培植體（數目分別為 3,3,6,1,1）(圖 2B)，部分品種之萼片由於暴露於環境中十分髒汙，則去除萼片以降低組織培養汙染率。若參試頭狀花序之彩葉屬栽培品種，其花序埋藏於葉杯當中，因此於花序形成、小花尚未開放之時，須加強消毒處理。每週施用兩次稀釋 1000 倍之”免賴得”澆灌於葉杯與介質，而其餘時間則使用二次水並只澆灌介質。於小花即將開放時則盡量維持葉杯不積水與髒汙，並去除花序周圍苞片維持乾燥與清潔。

#### 二、誘導花器培植體逆分化產生癒傷組織：

以不同濃度 2,4-D、NAA 與 BA 等生長調節劑組合進行誘導癒合組織發生之試驗。基本培養基為 1/2 MS，補充有機物包括 Citric acid 200 mg/L、Arginine 50 mg/L、D-pantothen acid 0.5 mg/L、Asparagine 50 mg/L、Glutamine 25 mg/L、Sucrose 30 g/L、Agar 7 g/L。參試生長調節劑為生長素 2,4-D (0、0.5、1、1.5、2 mg/L) 與 2,4-D 1.5 mg/L + BA 0.5 mg/L 分別組合 NAA 0.5、1.0 mg/L。以上不同部位之花器培植體與生長調節劑處理組合皆放置於 25 ± 2 °C 培養室，黑暗環境下生長。

#### 三、間接不定芽誘導：

花器衍生之癒合組織接種於間接不定芽誘導之培養基，每培養皿接種 5 小團各約 0.5 公分大小之癒合組織。培養基配方為 1/2 MS 添加 arginine 50 mg/L、

asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、agar 7 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。生長調節劑組合為 NAA 1.0 mg/L 組合 TDZ 1.0 mg/L。處理組合皆放置於  $25 \pm 2$  °C 培養室，光照環境下生長。

#### 四、芽體增殖：

以 1-2 公分大小之組培苗，分切後將 0.5 公分之芽塊置於增生培養基進行固體培養，誘導芽體由基部增生。培養基配方為 1/2 MS 添加 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。生長調節劑組合為 NAA 1.0 mg/L 組合 TDZ 1.0 mg/L。

#### 五、芽體健化與發根：

取約 0.5 公分大小之芽體，自芽團上分切，置於 1/2 MS 固體培養基，並添加有機物 arginine 50 mg/L、asparagine 50 mg/L、glutamine 25 mg/L、sucrose 30 g/L、malt-extract 100 mg/L，培養基 pH 值於高壓滅菌前調至 5.7。處理組合皆放置於  $25 \pm 2$  °C 培養室，光照環境下生長，光照 16 小時，光強度 1600 lux，溫度維持在  $25 \pm 2$  °C。參試生長調節劑為 NAA 1.0 mg/L。

#### 六、小植株建立：

於發根培養基培養 2 個月後，觀察無側芽增生後之正常生長組培苗出瓶馴化。

