

研究報告

著生杜鵑之微體繁殖

何雅齡¹⁾ 廖宇賡^{2,3)}

摘 要

本研究以植物組織培養技術建立臺灣原生著生杜鵑(*Rhododendron kawakamii* Hay.)大量繁殖之方法。以著生杜鵑成熟種子經無菌消毒並播種，生長6-8 wk後，取無菌苗頂芽作為培植體，培養於含有1.07~34.4 μM 6-(γ - γ -dimethylallylamino) purine (2iP)之1/2 Anderson培養基中24 wk，結果顯示以17.2 μM 2iP處理者可獲得最高芽體數(533.8個)，將叢生小芽體接續繼代到含有較低濃度(4.3~8.6 μM) 2iP之培養基中促進生長。將培養8 wk後的叢生芽團整塊未切移入添加有0~2 μM indole-3-butyric acid (IBA)的洋菜培養基中誘導發根，可獲得短根、長根及叢根等不同根形態。調查單一小苗之發根率，顯示以1~2 μM IBA處理發根率最高(> 97.5%)，且有超過80%屬於長根及叢根。將具有不同形態根系之小苗移出瓶外種植，三種形態根系小苗其馴化成活率均達95%以上，這些小苗在溫室培養1年後苗高可達8 cm。本研究使用少量種子建立著生杜鵑組織培養繁殖方法，在繁殖材料採集不易情形下，利用此法可於短時間內生產大量種苗作為復育之用。

關鍵詞：馴化、杜鵑、發根、芽體增殖。

何雅齡、廖宇賡。2020。著生杜鵑之微體繁殖。台灣林業科學35(2):161-72。

¹⁾行政院農業委員會林業試驗所中埔研究中心，600054嘉義市文化路432巷65號 Chungpu Research Center, Taiwan Forestry Research Institute. No. 65, Lane 432, Wenhua Rd., Chiayi 600054, Taiwan, ROC.

²⁾國立嘉義大學森林暨自然資源學系，600355嘉義市學府路300號 Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi Univ., No. 300, Xuefu Rd., Chiayi 600355, Taiwan, ROC.

³⁾通訊作者 Corresponding author, e-mail:yklliao@mail.ncyu.edu.tw

2020年3月送審 2020年7月通過 Received March 2020, Accepted July 2020.

Research paper

***In vitro* Micropropagation of *Rhododendron kawakamii* Hay.**Ya-Ling Ho,¹⁾ Yue-Ken Liao^{2,3)}

【 Summary 】

Plant tissue culture techniques were used for the mass propagation of the native Taiwanese azalea, *Rhododendron kawakamii* Hay., in this study. Apical shoots of 6~8-wk-old *in vitro* seedlings derived from mature seeds of *R. kawakamii* were collected as explants for shoot proliferation. Explants, cultured for 24 wk, were incubated in a 1/2 Anderson medium containing 1.07~34.4 6-(γ - γ -dimethylallylamino) purine (2iP) to induce shoots. The highest shoot production (533.8 shoots explant⁻¹) was obtained from medium supplemented with 17.2 μ M 2iP. Shoot elongation was enhanced in media containing lower levels of 2iP (4.3~8.6 μ M) with 8 wk of culturing. Multiple shoots in clumps obtained from the shoot elongation stage were subcultured as 1 unit without separation in agar medium supplemented with 0~2 μ M indole-3-butyric acid (IBA) for root induction. Various types of adventitious roots including short, long and cluster-rooted types were observed in rooting culture. The highest rooting percentages (> 97.5%) were observed in media containing 1~2 μ M IBA, among which over 80% were of the long and clustered types of roots. High survival rates (> 95%) were obtained from explants with various types of roots after acclimatization. Plants of 8 cm in height were obtained after 1 yr of cultivation in a greenhouse. In the present study, an *in vitro* propagation protocol was successfully established using limited seeds for indigenous *R. kawakamii* which is rare in Taiwan nowadays and difficult to collect in the field.

Key words: acclimatization, azalea, rooting, shoot proliferation.

Ho YL, Liao YK. 2020. *In vitro* Micropropagation of *Rhododendron kawakamii* Hay.. Taiwan J For Sci 35(2):161-72.

緒言

杜鵑花科(Ericaceae)杜鵑花屬(*Rhododendron* L.)內有許多植物是世界著名的觀賞花卉，具有很高的經濟價值。早在1975年時Wilbur C. Anderson就成功的應用組織培養技術在杜鵑屬植物的繁殖(Anderson 1975)，近代隨著組培技術發展，更將產能不斷提升，其中德國花卉市場杜鵑花組培苗年產量曾達100~200萬株(Winkelmann et al. 2006)。除了商業上的利用之外，組織培養技術亦應用在瀕危或稀有杜鵑的復育。檢視相關案例，這些物種或因棲地特殊(Singh et al. 2013)，或因在原生的自然環境無

法繁殖更新(Almeida et al. 2005)，或是因族群稀少又遭受環境及人為干擾(Singh 2008, Singh and Gurung 2009, Mao et al. 2011, 2018, Singh et al. 2016)，導致野外族群受到威脅而逐漸絕跡。因應上述問題之策略，就是以組織培養技術在短期內增殖大量族群做為繁殖母本，既可選擇回到原棲地栽植(*in situ* planting)，又能建立區外保育(*ex situ* conservation)以進行後續有性或無性的繁殖。

著生杜鵑(*Rhododendron kawakamii* Hay.)又稱川上杜鵑，是臺灣17種原生杜鵑中唯一具

有黃色花冠者，以著生方式附著樹冠層枝條、枯倒木或於岩壁上生長之小灌木(Fig. 1)。分佈於臺灣海拔1500到2500 m山區，為臺灣霧林帶的指標植物。植物學者認為，依世界植物地理而言，臺灣可能是東印度群島著生型杜鵑分布的北界。由於著生杜鵑族群在臺灣並不常見，且植株位於高處不利採集，因此較少有人工栽培育苗。惟杉林溪各步道間仍可見零星植株分布，5~7月是盛花期，若能人工大量繁殖後，再於當地種植復育，不僅可營造獨特性的景觀，還兼具生態價值。

杜鵑屬植物大部份根系纖細如絮且分布很淺，喜歡鬆散且通氣良好的酸性土壤，為配合此特性，組織培養在誘導發根時，常會使用結構疏鬆的物質如脫脂棉(Mao et al. 2004)、紗布(Liao and Chuang 2015)、珍珠石(Jesionek et al. 2016)或濾紙床(Singh et al. 2016)取代洋菜作為發根介質以提高發根率。如此雖然可提高發根率但較為耗費人力。本研究以少量種子建立著生杜鵑組織培養繁殖系統，並調整傳統發根方法，除提高發根率外並節省操作之人力。期望著生杜鵑在苗木數量增加之後，除可在原棲地繁殖恢復生態景觀外，更能作為育種材料，進行新品種培育。

材料與方法

一、材料準備

著生杜鵑成熟的蒴果(capsule)於2014年11月由杉林溪地區採集，待其開裂後收集散出之細小種子進行殺菌，將種子分裝在以Whatman 54號濾紙製作之小袋中，以10% (v/v)商用漂白水(Clorox®, Oakland, CA, USA) 100 ml (次氯酸鈉濃度 0.55%)內加1~2滴商用清潔劑震盪清洗3 min，再以70% (v/v)乙醇(ethanol)清洗30 s，最後使用滅菌之二次蒸餾水(double-distilled water, ddH₂O)清洗3 min並重複3次。將殺菌後種子播種在1/2 MS 培養基(Murashige and Skoog 1962)上，培養基中添加1.5% (w/v)蔗糖，0.75% (w/v) Difco Bacto agar (pH 5.8)。培養基先經1.2 kg cm⁻²，121°C 高溫高壓滅菌15 min。培養容器使



Fig. 1. Plant of *Rhododendron kawakamii*, the only native *Rhododendron* species in Taiwan with a distinctive yellow corolla. Bar = 1 cm.

用90 (直徑)×15 mm (高)無菌塑膠培養皿，內含25 ml培養基。

二、芽體增殖

切取發芽無菌苗莖頂長約1.0 cm的芽體做為培植體，以垂直方式植入增殖培養基。基本培養基內含1/2 Anderson鹽類配方(Anderson 1984)，並添加3% (w/v)蔗糖，0.8% (w/v) Difco Bacto agar (pH 5.2)，增殖培養基是於基本培養基中分別添加0、1.075、4.3、17.2、34.4 μM 6-(γ-γ-dimethylallylamino) purine (2iP)。每一處理使用6皿，每一皿接種5個培植體，共30個培植體，每4 wk繼代1次，繼代4次後(16 wk時)，將培植體由90 (直徑)×20 mm (高)無菌培養皿繼代至95 (直徑)×105 mm (高)之蘭花育苗培養盒(Type CK-B, 清科企業, 桃園, 臺灣)中，繼續培養8 wk (繼代2次)。在繼代4次(第16 wk)時取出半數(15個培植體)進行調查，剩餘半數在繼代6次(第24 wk)後亦進行相同調查。本試驗重複進行2次。

三、芽體抽長

將增殖階段以最佳之處理培養24 wk後的多芽體團塊分切成1.0 cm²大小，接種於添加4.3、8.6及17.2 μM 2iP之基本培養基中，每4 wk繼代1次，在培養8 wk後進行芽體長度之測量。每一處理使用15個芽體團塊，本試驗重複進行2次。

四、芽體發根

將抽長後的多芽體團塊植入分別添加0、0.25、0.5、1及2 μM indole-3-butyric acid (IBA) 的基本培養基中進行誘導發根。一個培養盒中放置5個團塊，共使用15個芽體團塊，於第4 wk時繼代於相同培養基，之後不再更換培養基，於第12 wk結束培養時進行調查。調查時將叢生芽團中每一抽長芽體分離後個別量測，除未發根苗外(Fig. 2A)，根據其根之外觀形態、根長及數量，將發根苗區分為3類，分別為短根(根長均小於0.2 cm)(Fig. 2B)、長根(根長大於0.2 cm，單一根系，少有側根)(Fig. 2C)及叢根(根長大於0.2 cm，根系側根多呈鬚狀發展)(Fig. 2D)。以團塊為單位，調查其中芽體之發根形態，並計算其百分比。本試驗重複進行2次。各處理中均分別量測四種發根形態小苗之最大葉幅(以葉片長軸 \times 葉片寬軸為指數)，四種根形態逢機抽測30株，每一株選取1片最大葉幅之葉片，作為評估其葉片伸展狀態的依據。本試驗

發根率計算如下：

$$\text{發根率}(\%) = (\text{短根} + \text{長根} + \text{叢根} / \text{總芽體數}) \times 100\%$$

五、植株馴化

將具有短、長及叢根的發根小植株各取25株，植入椰纖(SANDA[®], Colombo, W. Province, Sri Lanka)介質中，並置於馴化室中培養，於栽植容器上方覆蓋透明壓克力板保持相對濕度，並以漸進方式逐步開啟壓克力板，待4 wk馴化期結束後，記錄存活株數並計算其馴化率。試驗重複進行3次。將馴化存活的小植株，移至溫室中栽培4 wk後，再移栽至9(直徑) \times 7.8 cm(高度)的黑色軟盆(側邊打孔)，栽培介質為珍珠石、蛭石、樹皮等體積混合，進行成苗培育。

六、培養條件

從種子無菌播種開始至芽體發根階段，皆置於 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 之培養室，以冷白螢光燈(cool

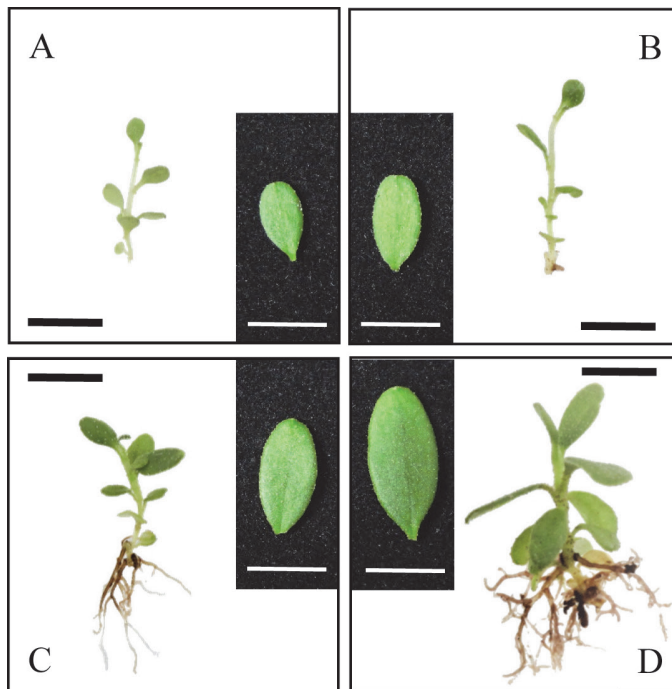


Fig. 2. Micropropagated shoots of *Rhododendron kawakamii* with different rooting types and their largest leaf. (A) Non-rooted, (B) short-rooted, (C) long-rooted and (D) cluster-rooted. Bars = 0.5 cm.

white fluorescent light)提供30~35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之光照，光週期為光照16 h/黑暗8 h。馴化培養環境則維持相同之光週期但溫度為 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，以冷白螢光燈及白熾燈泡(incandescent light)提供28~30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 之光照。

七、統計分析

各試驗皆採完全逢機設計(completely randomized design)，數據以SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)套裝軟體進行單因子變異數分析(one-way analysis of variance (ANOVA))，惟發根率、各發根形態百分比及馴化率值係先經角度轉換後再加以分析，處理間有顯著差異時($p < 0.05$)再以Tukey's honest significant difference (HSD)，檢定各處理均數間之差異顯著性。

結果

一、芽體增殖

著生杜鵑成熟種子無菌播種後10 d發芽，接續子葉展開，培養4 wk後可長出第1片葉子，5 wk時則有第2片葉子，待無菌苗長至1.5 cm時(約6~8 wk)即可取作供試材料。無菌頂芽在不同濃度的2iP培養基中生長16及24 wk後其芽體增殖情形有顯著差異(Table 1)，在16 wk時，以高濃度的17.2及34.4 μM 之芽數為最高，分別為18.6及22.9個，其次為4.3 μM 可得8.8個，顯示高濃度處理有利於芽體增殖，芽體增殖數會隨2iP濃度增加而提高(Fig. 3A)。若培養時間延長至24 wk時，則以17.2 μM 處理最高，

其芽體數達533.8個(Fig. 3B)，顯著優於其它處理($p < 0.05$)，其增殖倍數是16 wk時的28.7倍，增殖效率最優異，但最高濃度34.4 μM 之芽體繁殖倍率則有下降之現象(Table 1)。

二、芽體生長

取自增殖試驗之芽體於含有不同濃度2iP的培養基中進行8 wk培養，結果顯示以低濃度處理(4.3~8.6 μM)對芽體抽長的效果顯著優於17.2 μM 處理(Table 2)，表示芽體生長階段減少培養基中2iP濃度，較有利於芽體伸長。此外，在增殖階段芽體長度約為0.5 cm，在生長階段後可達0.9 cm (Fig. 4)，且植體較未抽長前壯碩。

三、芽體發根

芽體在含有IBA之發根誘導培養基中培養8 wk後不定根陸續長出，於第12 wk時發根率皆可達90%以上，根系細長且伸展良好，主要根系由暴露在培養基上方的莖節段長出，沒入洋菜中生長的組織則呈現褐色(Fig. 5)。IBA濃度增加可提高發根率，呈現顯著差異(Table 3)，其中以1~2 μM 的處理發根率最高，根形態則以長根占多數，叢根居次，二者合計超過80%。

以發根形態而言，在不同濃度處理中，長根所占的比例皆高於其它形態且其差異性達5%顯著水準，但長根的比例並未受到IBA濃度提高而增加；隨IBA濃度增加則短根出現的比例會遞減，而叢根則有遞增的趨勢，在濃度為1或2 μM 時叢根顯著多於短根(Table 3)。

比較不同根形態小苗之最大葉幅，在不

Table 1. Effects of 6-(γ -dimethylallylamino) purine (2iP) concentrations on *in vitro* shoot proliferation of *Rhododendron kawakamii*

2iP (μM)	Number of shoots per explant ¹⁾		Multiplication rate ²⁾
	16 wk	24 wk	
0	0.0 \pm 0.0 ^c	0.6 \pm 0.2 ^d	0.6
1.07	1.1 \pm 0.2 ^c	11.9 \pm 2.4 ^{cd}	10.8
4.3	8.8 \pm 1.6 ^b	140.8 \pm 28.3 ^c	16.0
17.2	18.6 \pm 1.5 ^a	533.8 \pm 55.5 ^a	28.7
34.4	22.9 \pm 1.5 ^a	386.3 \pm 41.5 ^b	16.9

¹⁾ Means in the same column with different letters significantly differ at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test.

²⁾ Number of shoots per explant at 24 wk (Number of shoots per explant at 16 wk)¹⁾.

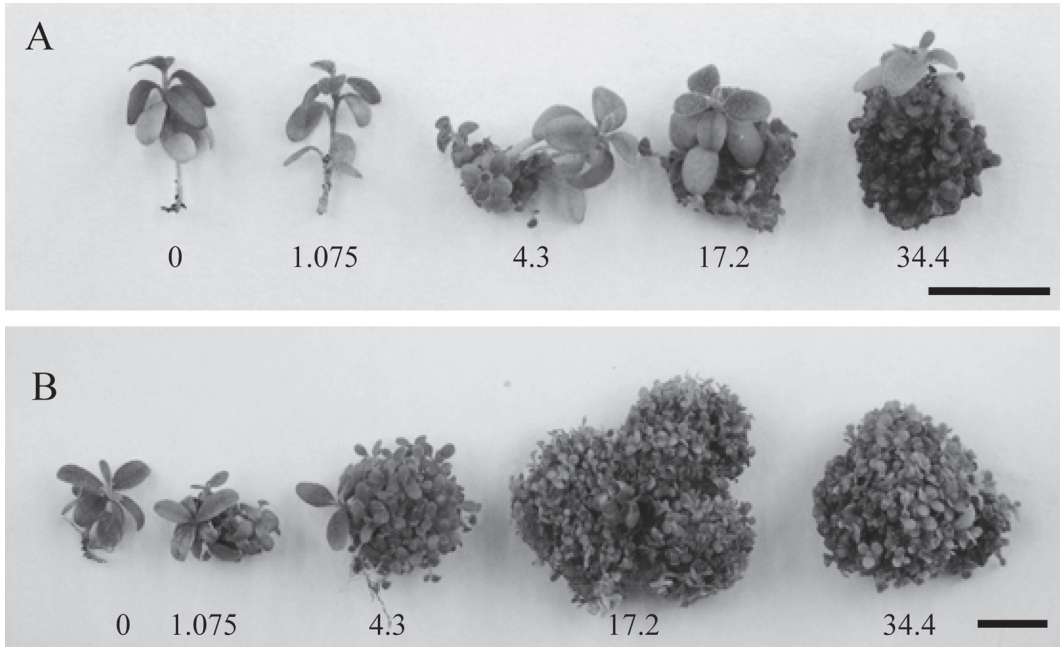


Fig. 3. *In vitro* shoots of *Rhododendron kawakamii* proliferating in medium containing various concentration of 6-(γ - γ -dimethylallylamino) purine (2iP) (μ M, as noted) after (A) 16 and (B) 24 wk of culture. Bars = 1 cm.

Table 2. Effects of 6-(γ - γ -dimethylallylamino) purine (2iP) concentrations on *in vitro* shoot elongation of *Rhododendron kawakamii*

2iP (μ M)	Shoot length (cm) ¹⁾
4.3	0.92 \pm 0.01 ^a
8.6	0.91 \pm 0.01 ^a
17.2	0.84 \pm 0.01 ^b

¹⁾ Means in the same column with different letters significantly differ at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test.

同的IBA濃度中都有相同的趨勢，亦即叢根小苗的葉幅皆大於未長根、短根及長根者，葉幅會隨根量愈多而愈大(Table 4, Fig. 2)，推測根量愈多有助芽體形成較大之葉面積及健壯的個體。

四、植株馴化

將發根的叢生芽體個別分開後，小苗依據其發根形態分別移入椰纖介質進行馴化，其

整體馴化存活率在95~100%之間(Table 5, Fig. 6)，三種根形態間未達顯著差異(Table 5)。顯示芽體只要有根，根的長短及根量的多寡並不影響馴化率，但以叢根小苗在後續生長之速率上較具優勢(Fig. 6)。在溫室生長1年的小苗，植株高度可達8 cm (Fig. 7)。

討論

本研究選用2iP作為增殖階段使用的細胞分裂素(cytokinin)，主要是參考Liao and Chuang (2015)對唐杜鵑(*R. simsii* Planch.)芽體誘導增殖研究的結果，亦即2iP的效果優於6-benzylaminopurine (BAP)；同樣使用2iP作為杜鵑類物種芽體誘導之報告相當多(Kumar et al. 2004, Singh and Gurung 2009, Mao et al. 2011, 2018, Singh et al. 2013, 2016)，表示2iP對杜鵑類作物而言是一種有效的細胞分裂素。這些學者在不同種杜鵑的芽體誘導，以無菌培養種子苗的頂芽作為供試材料，培養時間在4~13 wk

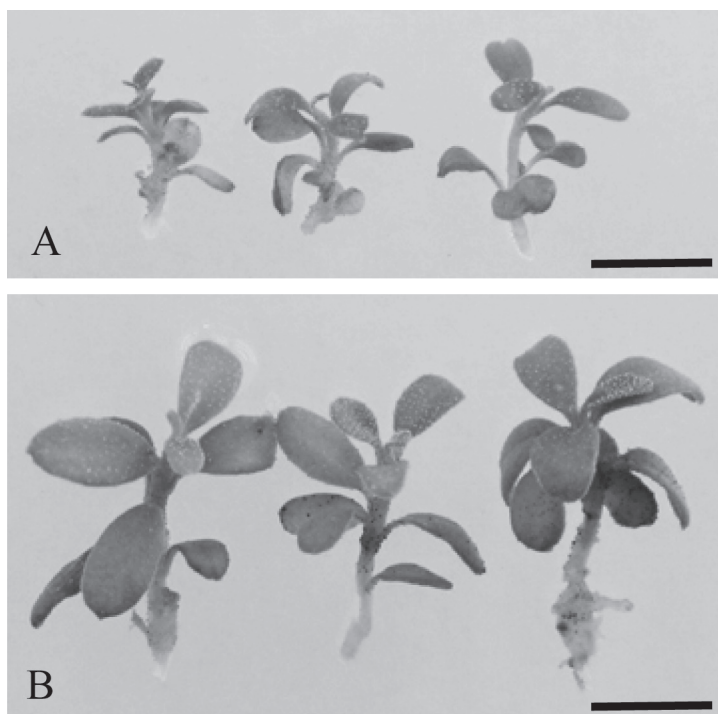


Fig. 4. *In vitro* shoots of *Rhododendron kawakamii* cultured in medium containing lower 6-(γ - γ -dimethylallylamino) purine (2iP) concentrations for shoot elongation. Shoots were individually harvested from multiple shoot clumps before taking the photo for detailed observation. Shoot lengths were (A) about 0.5 cm before elongation and (B) 0.9 cm after culturing. Bars = 0.5 cm.

Table 3. Effects of indole-3-butyric acid (IBA) concentrations on *in vitro* rooting of *Rhododendron kawakamii*

IBA (μ M)	Rooting type (%) ¹⁾				Total rooting (%) ¹⁾
	Non-rooted	Short-rooted	Long-rooted	Cluster-rooted	
0	8.2 \pm 1.3 ^a C	25.6 \pm 2.4 ^a B	43.9 \pm 3.1 ^a A	22.3 \pm 2.0 ^b B	91.8 \pm 1.3 ^c
0.25	4.6 \pm 0.8 ^{ab} C	24.6 \pm 2.0 ^a B	49.6 \pm 2.4 ^a A	21.3 \pm 2.1 ^b B	95.4 \pm 0.8 ^{bc}
0.5	4.5 \pm 0.8 ^{ab} C	22.0 \pm 2.1 ^{ab} B	42.9 \pm 3.2 ^a A	30.6 \pm 2.9 ^{ab} B	95.5 \pm 0.8 ^{bc}
1.0	2.5 \pm 0.6 ^{bc} D	14.0 \pm 1.4 ^c C	49.6 \pm 3.2 ^a A	33.8 \pm 2.7 ^a B	97.5 \pm 0.6 ^{ab}
2.0	1.8 \pm 0.6 ^c D	16.3 \pm 1.6 ^{bc} C	49.6 \pm 3.3 ^a A	32.3 \pm 2.8 ^a B	98.2 \pm 0.6 ^a

¹⁾ Means in the same column with different superscript letters or in the same row with different capital letters significantly differ at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test. Percentage data were all arcsine-transformed prior to analysis.

之間，使用2iP的濃度範圍介於2.46~78.72 μ M間，其中以24.6~39.36 μ M有較佳的效果，可誘導出較多的芽體(7~22個)。本研究則以17.2~34.4 μ M效果最佳，培養時間16 wk時可獲得18.6~22.9個芽體，雖所費時間稍長，但已與

前述文獻中所載相近，若再持續培養至24 wk則高達533.8個。經比較培養16 wk 前後芽體增殖率，前16 wk從單一芽體增殖到18.6個芽體，增殖率即為18.6 (Table 1, 2iP濃度17.2 μ M)，然16至24 wk 時增殖率提升至28.7 (Table 1, 相同2iP

Table 4. Leaf size indexes of *Rhododendron kawakamii* in vitro shoots with different types of roots induced by indole-3-butyric acid (IBA)

Rooting induction IBA (μM)	Leaf index (length \times width) ¹⁾			
	Non-rooted	Short-rooted	Long-rooted	Cluster-rooted
0	0.08 \pm 0.01 ^{ab} C	0.13 \pm 0.01 ^{BC}	0.16 \pm 0.01 ^b B	0.34 \pm 0.02 ^{ab} A
0.25	0.09 \pm 0.01 ^{ab} C	0.20 \pm 0.01 ^a B	0.25 \pm 0.02 ^a B	0.32 \pm 0.02 ^b A
0.5	0.14 \pm 0.02 ^a C	0.19 \pm 0.01 ^{ab} C	0.27 \pm 0.01 ^a B	0.40 \pm 0.02 ^a A
1.0	0.14 \pm 0.03 ^a C	0.17 \pm 0.01 ^{abc} BC	0.25 \pm 0.01 ^a B	0.35 \pm 0.02 ^{ab} A
2.0	0.07 \pm 0.01 ^b D	0.16 \pm 0.01 ^{bc} C	0.26 \pm 0.02 ^a B	0.37 \pm 0.02 ^{ab} A

¹⁾Means in the same column with different superscript letters or in the same row with different capital letters significantly differ at $p < 0.05$ by Tukey's HSD test.

處理)，顯示適度延長培養時間，可以有效增加芽體數量。雖其增殖所得之芽體均顯纖細，但經本研究發展之芽體生長(伸長)處理培養後，復經叢生芽發根誘導，增殖所得之芽體皆為可用之材料，為本研究改善繁殖效率之關鍵。Singh and Gurung (2009)及Mao et al. (2011, 2018)的試驗指出2iP濃度若超過60 μM 其誘導增殖的效果反而下降，會減少芽體數量。本研究在濃度由17.2 μM 增加至34.4 μM 時，若延長培養時間至24 wk，亦出現增殖率下降之情形。但也有使用濃度高達73.8 μM 而得最佳效果者(Douglas 1984)。顯示不同種的杜鵑雖同樣使用2iP，但其反應各異。



Fig. 5. In vitro rooting of *Rhododendron kawakamii* shoots. Shoot clumps on agar medium with roots frequently emerging from stem segments above the medium surface; basal part of a brown color was tissue submerged in the medium. Bar = 0.5 cm.

本研究中以17.2 μM 2iP處理可獲得最多的芽體(Fig. 3)，但其芽體過於密集矮小，為使芽體增殖後能順利發根，須先促進芽體生長使其長度適合誘導發根。在這種生長階段的轉換，Blazich et al. (1986)曾表示2iP濃度要維持增殖時的濃度，若將2iP濃度升高或降低其效果反而較差，而Jesionek et al. (2016)則指出要將增殖階段使用的2iP濃度升高才能得到伸長的芽體，但檢視該研究在芽體誘導及增殖時，除2iP之外又添加了1.0 μM thidiazuron (TDZ)，後續在芽體伸長階段，在升高2iP的同時，也移除了TDZ，因此其實是降低了cytokinin的總量。而本研究數據則顯示降低2iP濃度可有效促進芽體生長(Table 2)，此結果與降低cytokinin總量的建議較為一致。

杜鵑誘導發根使用的生長素(auxin)有 indole-3-acetic acid (IAA)、IBA 及 1-naphthaleneacetic acid (NAA)，許多報告驗證IBA是誘導根系形成最適合的生長素(Kumar et al. 2004, Singh and Gurung 2009, Mao et al. 2011, Singh et al. 2013, Jesionek et al. 2016, Wei et al. 2018)，而使用的濃度則依杜鵑種類及發根介質不同而異。杜鵑屬植物一般為淺根性或附生型，大部份喜好生長於透氣性高的土壤，所以學者嘗試使用通氣性較洋菜為佳的介質做為發根介質，例如以濾紙床為介質者，其發根率達48~93% (Kumar et al. 2004, Singh 2008, Singh and Gurung 2009, Singh et al. 2013, 2016)。在馬纓杜鵑(*R. delavayi* Franch.)的試驗中，使用脫脂棉的發根率達96%，高於洋菜的

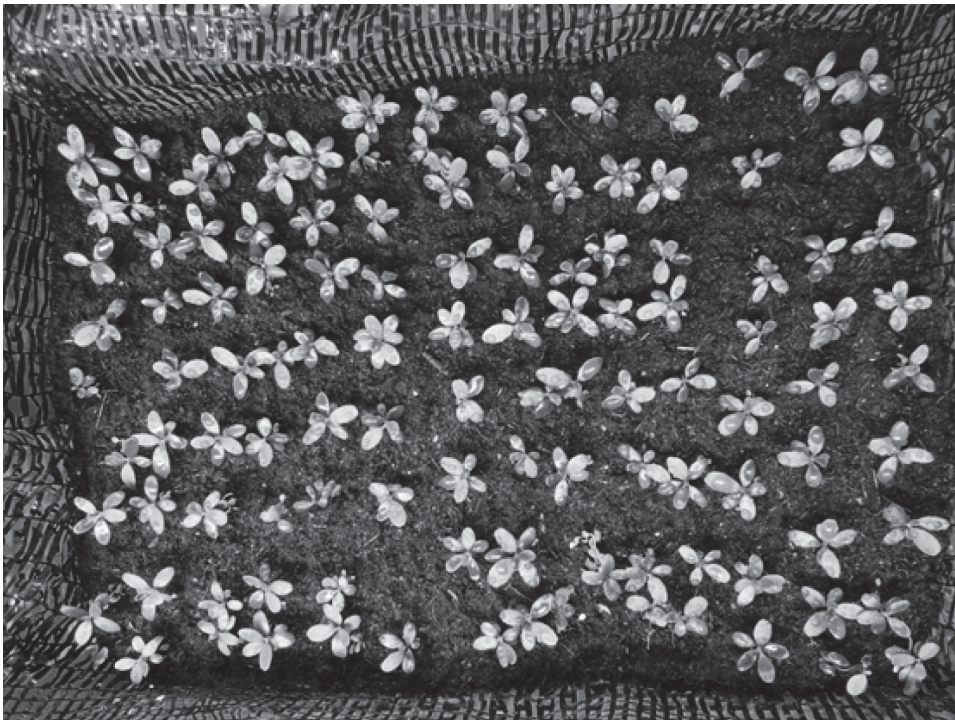


Fig. 6. Off-bottle *in vitro* plantlets of *Rhododendron kawakamii* transplanted into the planting substrate, and acclimatized in a culture room for 4 wk.

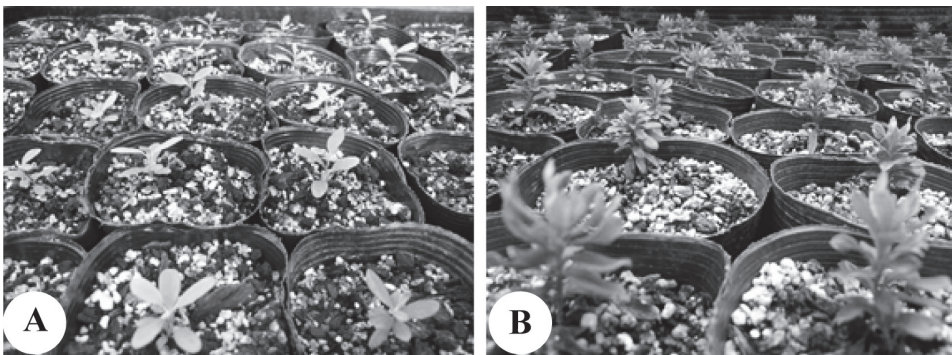


Fig. 7. *In vitro* derived plants of *Rhododendron kawakamii* continuously acclimatized in a greenhouse for 1 mon, followed by transplantation to pots for 6 mon (A) and (B) 1 yr of growth.

90% (Mao et al. 2004)。相同的結果也出現在唐杜鵑中，以紗布為介質的發根率為80%，明顯優於洋菜的58% (Liao and Chuang 2015)。另外每個芽體的平均根數，亦有研究指出珍珠石高於洋菜者 (Jesionek et al. 2016)，上述結果皆顯示出通氣性佳的介質有助於發根率提高。惟這

些報告中使用的芽體長度都大於1 cm，且為單獨切離後進行發根培養。而本研究使用之芽體較上述描述的長度為短，且由於其密集聚生而較纖弱，不易將芽體從叢生芽團中個別分開，因此繼代時之操作方式為將叢生芽整團移入洋菜培養基中進行發根，在培養結束後再行拆解

Table 5. Survival percentage of *in vitro* plantlets of *Rhododendron kawakamii* with different rooting types after 4 wk of acclimatization

Rooting type	Survival rate (%) ¹⁾
Short-rooted	95.3 ± 2.6
Long-rooted	98.3 ± 1.7
Cluster-rooted	100 ± 0

¹⁾ Data (mean ± SE) presented in the column showed no significant difference ($p > 0.05$) among treatments.

成單一芽體。此法之發根率達98%，且根的分化形態以長根及叢根占多數(Table 3)，根系發育茂密，主要由暴露於培養基上的莖節部位產生分枝狀的主側根(Fig. 5)，並無發根困難或不良的情形，顯示本研究使用的方法可以讓著生杜鵑以洋菜做為發根介質，並且發根良好。

本研究同時觀察到不添加IBA的處理其發根率亦有91.7%，類似的現象在不同種的杜鵑中發根率也可達22~95.8% (Kumar et al. 2004, Mao et al. 2011, Jesionek et al. 2016, Wei et al. 2018)，但也有案例顯示不添加IBA則無法發根(Singh et al. 2013, 2016)，惟這二種情形在額外添加IBA時皆可顯著提高發根率、增加根數量及根長，與本研究之結果相同。推測其原因可能與培植體內生的auxin與cytokinin含量不同有關，添加IBA有助於增加發根誘導物質，或是減少發根抑制物質的含量(Singh and Gurung 2009, Singh et al. 2016)。

誘導發根之效果主要以計算芽體發根率為主，其次為評估發根數量及比較最長根長(Liao and Chuang 2015)，本研究將其整合成發根形態加以調查(Fig. 2)，叢根為發根數量最多及根長最長者，短根則相反。進一步觀察不同形態根系其地上部葉片生長之情形，結果顯示小植株根系之形態與葉片大小有密切關係，亦即長根及叢根之小苗具有較大之葉片(Table 4)。本研究以叢生芽團為單位來進行發根，在後續馴化時將已發根的植株個別分開，而傳統方式為在操作檯內先將芽體分開後，再個別接種進行發根誘導，本研究改進之方法在操作上較簡單及

省時，尤以出瓶前最後培養階段，可從1個育苗盒獲得約167株發根的小植株進行馴化，繁殖空間的利用效率極高，且以根系旺盛葉幅較大者居多，可縮短育苗期，節省空間及成本。

結論

本研究成功的建立臺灣原生著生杜鵑之微體繁殖技術，利用由種子苗而來之芽體，經過增殖及抽長階段，並使用IBA誘導叢生芽團在洋菜上發根，是一個繁殖效率高、操作簡便且具高發根率及高馴化率的培養系統，為數量稀少之著生杜鵑提供一個快速量產的途徑。經估算以單一種子在�方法之操作下，在一年間可繁殖出近500株小苗，這些小苗在溫室培養1年後，苗高可達8 cm，有助原生物種的快速復育。

本研究發展之方法讓著生杜鵑可以從極少量的材料開始，在一年內即可快速生產大量種苗，提供著生杜鵑復育之用。繁殖流程中所實施的芽體增殖方法及其發根策略，未來亦可嘗試套用在杜鵑商業苗木大量生產之用，則其應用性將更為寬廣。

誌謝

本研究承蒙杉林溪森林生態渡假園區協助植物材料之採集，謹此致謝。

引用文獻

- Almeida R, Goncalves S, Romano A. 2005.** *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodivers Conserv* 14:1059-69.
- Anderson WC. 1975.** Propagation of rhododendrons by tissue culture. Part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Comb Proc Int Plant Propag Soc* 25:129-35.
- Anderson WC. 1984.** A revised tissue culture

medium for shoot multiplication of rhododendron. *J Am Soc Hort Sci* 109:343-7.

Blazich FA, Giles CC, Haemmerle CM. 1986. Micropropagation of *Rhododendron chapmanii*. *J Environ Hort* 4:26-9.

Douglas GC. 1984. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron in vitro* using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots *in vivo*. *Sci Hort* 24:337-47.

Jesionek A, Kokotkiewicz A, Krolicka A, Zabiegala B, Luczkiewicz M. 2018. Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) bioreactor-grown microshoots. *Ind Crops Prod* 123:461-9.

Jesionek A, Kokotkiewicz A, Wlodarska P, Zabiegala B, Bucinski A, Luczkiewicz M. 2017. Bioreactor shoot cultures of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) for a large-scale production of bioactive volatile compounds. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131:51-64.

Jesionek A, Kokotkiewicz A, Wlodarska P, Filipowicz N, Bogdan A, Ochocka R, et al. 2016. *In vitro* propagation of *Rhododendron tomentosum*--an endangered essential oil bearing plant from peatland. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 58:29-43.

Kumar S, Singh KK, Rai LK. 2004. *In vitro* propagation of an endangered Sikkim Himalayan *Rhododendron* (*R. maddenii*) from cotyledonary nodal segments. *J Am Rhododendron Soc* 58:101-5.

Liao YK, Chuang WT. 2015. Micropropagation of *Rhododendron simsii* Planch., a native ornamental plant in Kinmen. *Q J Chin For* 48:1-16. [in Chinese with English summary].

Liu Y, Wang JH, Chen X, Gao GL. 2010. Study on tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron decorum* screening the basic explants and inducement medium in primary culture. *Seed* 29:34-7. [in Chinese with English summary].

Mao AA, Vijayan D, Singha RKN, Pradhan S. 2018. *In vitro* propagation of *Rhododendron wattii* Cowan: a critically endangered and endemic plant from India. *In Vitro Cell Devel Biol-Plant* 54:45-53.

Mao AA, Kaliamoorthy S, Ranyaphi RA, Das J, Gupta S, Athili J, et al. 2011. *In vitro* micropropagation of three rare, endangered, and endemic rhododendron species of North-east India. *In Vitro Cell Devel Biol-Plant* 47:674-81.

Mao YR, Lu Q, Tang M, Zhou GY. 2004. Factors effecting the rooting of *Rhododendron delavayi*. *J Qufu Normal Univ* 30:88-91. [in Chinese with English summary].

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-97.

Singh KK. 2008. *In vitro* plant regeneration of an endangered Sikkim Himalayan *Rhododendron* (*R. maddenii* Hook. f.) from alginate-encapsulated shoot tips. *Biotechnology* 7:144-8.

Singh KK, Gurung B. 2009. *In vitro* propagation of *R. maddenii* Hook. F. an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *Not Bot Hort Agrobot Cluj Napoca* 37:79-83.

Singh KK, Rai LK, Nepal LH. 2013. *In vitro* propagation of *Rhododendron niveum* Hook F (state tree of Sikkim) an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *CIBTech J Biotech* 2:53-60.

Singh KK, Singh M, Chettri A. 2016. *In vitro* propagation of *Rhododendron griffithianum* Wt.: an endangered *Rhododendron* species of Sikkim Himalaya. *J Appl Biol Biotechnol* 4:72-5.

Ureshino K, Miyajima I, Akabane M. 1998. Effectiveness of three-way crossing for the breeding of yellow-flowered evergreen azalea. *Euphytica* 104:113-8.

Wei X, Chen J, Zhang C, Wang Z. 2018. *In vitro* shoot culture of *Rhododendron fortunei*:

an important plant for bioactive phytochemicals. *Ind Crops Prod* 126:459-65.

Winkelmann T, Geier T, Preil W. 2006.

Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86:319-27.