

## 曲足蘭根尖類原球體之誘導與再生

郭瑋玲<sup>1</sup> 林玉富<sup>1</sup> 楊采凌<sup>1</sup> 林雅莉<sup>1</sup> 張耀乾<sup>2</sup> 高建元<sup>1\*</sup>

1. 國立宜蘭大學園藝學系
2. 國立台灣大學園藝學系

### 摘要

曲足蘭為一種熱帶地生蘭，主要是經由有性種子繁殖子代。在本研究中，我們證實曲足蘭根尖形成的植株再生現象是經由根類原球體轉變的一種無性形態發生。曲足蘭的組培苗培養在不添加植物生長調節劑 (plant growth regulators PGRs) 的 MS 培養基中，會零星地從其根部尖端長出類原球體。這些外觀緊實的根尖類原球體最終會發育成熟成為形態正常的幼苗。經由組織學的切片觀察顯示，在根尖類原球體形成的早期階段，根帽組織會漸漸地從根部的頂端分離，根部原有的維管束組織再延伸進入根尖膨大的球體構造，最後形成一個完整成熟的類原球體再發育生長成為植株。類原球體也會從根部的中柱組織發生。將分離的根尖培植體進行培養，在不添加植物生長調節劑的培養基中並不會形成類原球體，但將此分離的根尖培植體培養於添加 10.2 $\mu$ M 吲哚乙酸(IAA)及 9.0 $\mu$ M 噻苯脲(TDZ)的 MS 培養基中則會誘導出根尖類原球體。IAA 及 TDZ 都可以促進離體根尖產生根尖類原球體，然而 TDZ 在沒有 IAA 存在的情況下，無法單獨誘導根尖類原球體的形成，這個結果說明此兩種植物生長調節劑對於根尖類原球體的形成具有協同作用。成熟的根尖類原球體可以在不含有植物生長調節劑的培養基中進行大量增殖並再生成完整植株。根尖培養也許可以被用來作為曲足蘭無性增殖的方式之一。

**關鍵詞：**根尖培養、體胚、無菌繁殖、類原球體、吲哚乙酸、噻苯脲

## Induction and Regeneration of Protocorm-like Bodies from Root Tips of *Cyrtopodium paranaense* (Orchidaceae)

Wei-Ling Guo<sup>1</sup> Yu-Fu Lin<sup>1</sup> Tsai-Ling Yang<sup>1</sup> Ya-Li Lin<sup>1</sup>  
Yao-Chien Alex Chang<sup>2</sup> Chien-Yuan Kao<sup>1\*</sup>

1. Department of Horticulture, National Ilan University
2. Department of Horticulture, National Taiwan University

### Abstract

*Cyrtopodium paranaense* is a tropical terrestrial orchid, which propagates mainly through sexual seed germination. In this study, we document the asexual morphogenesis of the root tip to protocorm-like body (PLB) conversion in *Cyrtopodium paranaense*. Protocorm-like bodies sporadically developed from root tips of

flask-grown seedlings in the absence of any exogenous plant growth regulators (PGRs). The compact PLBs ultimately gave rise to normal plantlets. Histological observations revealed that the root cap became dissociated from the root apex at an early stage followed by dispersed extension of root vascular strands into nascent PLBs. Protocorm-like bodies also developed from the root central stele tissue. In root tip segment cultures, PLBs were not formed without providing PGRs but were efficiently formed from root tips in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 10.2  $\mu\text{M}$  indole-3-acetic acid (IAA) and 9.0  $\mu\text{M}$  thiazuron (TDZ). Both IAA and TDZ promoted the formation of PLBs; however, TDZ did not induce PLB formation in the absence of IAA, indicating a synergistic effect of the two PGRs. Protocorm-like bodies were proliferated and subsequently plants regenerated in PGR-free MS medium. Root tip culture may be used as an alternative method for the propagation of *Cyrtopodium paranaense*.

**Key words:** root tip culture, somatic embryogenesis, in vitro propagation, protocorm-like body, indole-3-acetic acid, thiazuron.

\*Corresponding author. E-mail: cykao@niu.edu.tw

## 前言

曲足蘭屬(*Cyrtopodium*)有30多個原種，是一種熱帶地生蘭，植株的基部會產生厚實的假球莖並抽出總狀花序，可以用作旱地景觀美化之用，大多分布在美國佛羅里達州南部及中南美洲的區域(Pridgeon, 1998)。*Cyrtopodium*在希臘文中意指為“彎曲的小腳”，是由於其花朵中心唇瓣的外型而稱之。曲足蘭屬植物例如*Cyrtopodium cardiochilum*，在巴西境內常被用做傷口的消炎藥使用(Barreto and Parente, 2006; Menezes, 1995a, 1995b)。在自然環境中，曲足蘭主要是透過有性繁殖(即基因重組)的種子發芽成長繁殖子代。曲足蘭之種子發芽長成原球體的培養基前人已有進行研究(Rego-Oliveira and Faria, 2005)，然而文獻中卻沒有關於曲足蘭的類原球體誘導或再生之研究。

近年來世界各地很多商業性的實驗室，藉由植物分生組織培養技術來生產數百萬低成本的蘭花苗(Chen and Chang, 2006; Chugh *et al.*, 2009; Ernst, 1994; Park *et al.*, 2003; Teng *et al.*, 1997)。然而有許多問題會限制組織培養技術中培植體的選擇，包括酚類化合物的產生、有限的分生組織數量、類原球體誘導困難與體細胞變異等(Chugh *et al.*, 2009; Sánchez, 1988)。基於上述的這些因素，在植物組織培養的實務中，蘭花的根尖被認為是較難誘導再生的培植體，但也有研究指出在文心蘭和朵麗蝶蘭等蘭花中，可經由根尖誘導出體胚形成(somatic embryogenesis)而形成類原球體(Kerbaudy, 1984; Park *et al.*, 2003)。本實驗之目的在研究無菌條件下，以IAA和TDZ誘導曲足蘭的實生組培苗根尖形成類原球體的效果，並利用組織切片技術來觀察曲足蘭根尖類原球體在不同發育時期之變化。

## 材料與方法

### 一、種莢播種和培植體製備

本實驗所用的實驗材料為曲足蘭(*Cyrtopodium paranaense*)成熟種子發芽的實生組培苗。蒴果先以70%酒精浸泡30秒後，再用含有0.6%次氯酸鈉及0.1% Tween 20 (Sigma, St. Louis MO)之溶液，浸泡15分鐘消毒蒴果表面，並用無菌水清洗三次。洗淨的蒴果置於無菌操作台上吹乾，然後將蒴果縱切，並將蒴果內的種子撒播在經殺菌釜滅菌過的生長培養基上。培養基成份為MS無機鹽(Murashige and Skoog, 1962)、2 g·L<sup>-1</sup> Bacto-tryotone (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、35 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖、10 g·L<sup>-1</sup> 洋菜(Bacto-agar; BD Biosciences)，pH值調整至5.4，以滅菌釜於121℃、1.1 kg·cm<sup>-2</sup>，滅菌25分鐘。以500 mL三角瓶為培養容器，其中填充入100 mL之培養基。培養室溫度維持於25至27℃，光週期16小時，以冷白螢光燈管作為光源，光強度約30  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。在無菌瓶內培養約3個月的曲足蘭組培苗，切下長度約1公分的根尖部分，做為誘導根尖類原球體之材料。

### 二、根尖類原球體之誘導

將切下的根尖培植體放置於直徑6公分的培養皿上，內含10 mL經殺菌釜滅菌過的生長培養基。生長培養基中分別添加0、2.5、5.1、10.2  $\mu\text{M}$ 之IAA和0、2.3、4.5、9.0  $\mu\text{M}$ 之TDZ。每個試驗三重複，每重複含有五個根尖培植體。置於組培室中培養，溫度維持在25至27℃。培養三週後，評估不同處理條件誘導出根尖類原球體的比例並測量類原球體的直徑。實驗採完全隨機設計，每個培養皿當作一個實驗單位，實驗數據是由測量每個培養皿中根尖類原球體的數據之平均數而獲得(Steel *et al.*,

1997)。本實驗以 CoStat 6.1 (CoHort Software, Monterey, CA)計算最小顯著性差異測驗( $P \leq 0.05$ )來進行統計分析。

### 三、組織學切片觀察

根尖培植體材料分別在培養 0、16、25 和 35 天後，將其根尖部分切下，在室溫下以 F.A.A 溶液固定，固定液成份比例為 5% 福馬林、5% 冰醋酸和 50% 的酒精加 90%。再用 TBA 脫水後以石蠟包埋根尖部分 (Johansen, 1940)。使用切片機連續切出厚度約 8 到 10  $\mu\text{m}$ ，長度由基部到尖端約 1 公分之組織切片，切出的片段使用 hematoxylin 或 safranin 和 Fast green 來染色 (Schneider, 1981)。最後使用顯微鏡 (SMZ1000; Nikon, Tokyo, Japan) 來觀察切片上的組織並用數位相機 (COOLPIX 5400; Nikon) 拍照紀錄。

## 結果與討論

曲足蘭的實生組培苗培養在不添加植物生長調節劑的生長培養基上，可觀察到植株根部的根尖部分 (圖 1A) 與非根尖部分形成之類原球體 (圖 1B)。這些類原球體會再生成完整的植株，卻仍相連於親本的原有根上 (圖 1C與D)，其再生株的型態與親本相似並可成功地馴化種植於土壤中。然而，用相同的生長培養基來培養曲足蘭的離體根尖或根段，並沒有觀察到有根尖類原球體的生成。由此可知，在不添加植物生長調節劑的培養環境下，實生苗個體的根尖才能誘導生成類原球體，而在相同的條件下離體根尖或根段並不會形成類原球體，亦即類原球體只在完整實生苗的根尖或根成熟區才能形成 (圖 1)，因此曲足蘭植株的完整性對於其根尖類原球體的誘導有重要的影響。而根尖類原球體的外觀形態與由親本種子所得的原球體並無差異 (圖 2A)，亦可以刺傷其表面來誘導出更多的類原球體 (圖 2B)，這些根類原球體在不含生長調節劑的培養基中，都可獨立發育成正常的植株，達到大量增殖目的。

添加不同濃度之 IAA 與 TDZ 於基本 MS 生長培養基中，研究其誘導離體根尖產生類原球體之能力。統計分析結果顯示，IAA 與 TDZ 兩者皆有促進根尖類原球體形成之效果，且兩種植物生長調節劑之間有顯著的交互作用 (表 1)。生長培養基單獨添加 IAA 時，只有在濃度到達 10.2  $\mu\text{M}$  時，根尖培植體才會形成類原球體。而另一方面，單獨添 TDZ 於基本 MS 生長培養基中，在所實驗的濃度範圍內不論其濃度為何，皆無法誘導類原球體的產生。然而，生長培養基同時添加 IAA 與 TDZ 進行處理時，則大大地促進類

原球體形成的比例 (表 1)。離體根尖培養於含有 IAA 濃度 10.2  $\mu\text{M}$  或 IAA 濃度 5.1  $\mu\text{M}$  及 TDZ 濃度 9.0  $\mu\text{M}$  的培養基中，3 週後便能發育形成肉眼可見的類原球體，其直徑約為 1.3 至 1.4 mm。此數據顯示，針對曲足蘭根尖類原球體的誘導，植物賀爾蒙中的生長素 (auxin) 和細胞分裂素 (cytokinin) 之間有明顯的協同作用產生 (表 1)。在前人研究中已知不同的植物生長調節劑，可促進誘導其他種蘭花離體根尖類原球體之形成 (Churchill *et al.*, 1972; Kerbauy, 1984; Park *et al.*, 2003; Sa'nchez, 1988; Stewart and Button, 1978)。

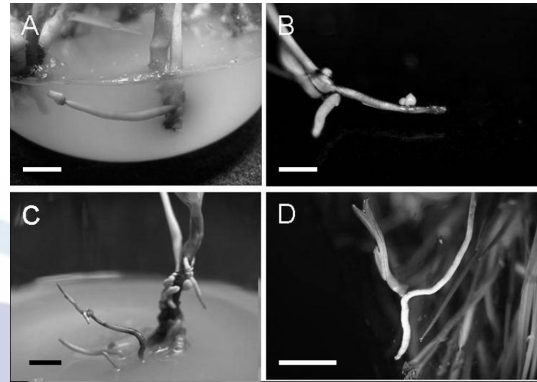


圖 1 曲足蘭在無添加植物生長調節劑的生長培養基中，根尖與根中間部分形成之類原球體及其成長之植株。(A)實生組培苗根尖形成之類原球體；(B)實生組培苗的根中間部分形成之類原球體；(C)與母本相連之根尖類原球體所形成的植株；(D)從母本的根中間部分形成之類原球體所發育的植株。Bars = 10 mm.

Fig.1 Root tip and central stele-derived protocorm-like body (PLB) and subsequent plantlets of *Cyrtopodium paranaense* in Murashige and Skoog medium without plant growth regulator. (A) PLB formed from the root tip of aseptically grown seedling; (B) a developing PLB formed from central stele tissue of an aseptically grown seedling; (C) rooted plantlet from root tip PLB while connecting to the maternal plant; (D) well-developed plantlet from a root central stele-derived PLB of maternal plant. Bars = 10 mm.



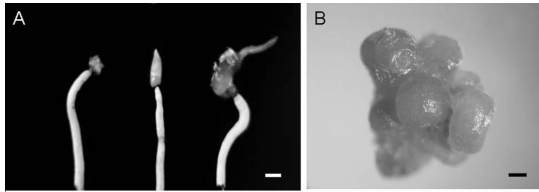


圖 2 曲足蘭之根尖類原球體。(A) 根尖類原球體外觀與再生分化之幼苗；(B) 曲足蘭根尖類原球體刺傷誘導出更多的類原球體。Bar = 1 mm.

Fig. 2 The protocorm-like body of *Cyrtopodium paranaense*. (A) The appearance looks no different between root-tip PLBs and the PLBs of maternal plants; (B) Puncturing root-tip PLBs induces more PLB. Bar = 1 mm.

表 1 Indole-3-acetic acid (IAA) 與 thidiazuron (TDZ) 的濃度對於 *Cyrtopodium paranaense* 離體根尖之類原球體形成的作用。

Table 1 Effects of concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) and thidiazuron (TDZ) on formation of protocorm-like bodies (PLBs) from excised root tip of *Cyrtopodium paranaense*.<sup>z</sup>

IAA concn (μM)	TDZ concn (μM)	Explant with PLB formation(%)	Diam of PLBs (mm) <sup>x</sup>
0	0	0e <sup>y</sup>	NA
	2.3	0e	NA
	4.5	0e	NA
	9.0	0e	NA
2.5	0	0e	NA
	2.3	0e	NA
	4.5	13d	1.1b
	9.0	20d	1.1b
5.1	0	0e	NA
	2.3	40c	1.1b
	4.5	80b	1.1b
	9.0	80b	1.3a
10.2	0	80b	1.3a
	2.3	100a	1.3a
	4.5	80b	1.4a
	9.0	100a	1.4a
Significance			
IAA concn(I)		***	***
TDZ concn(T)		***	NS
1×T		***	NS

<sup>z</sup>數據為培養3週後所記錄。

<sup>y</sup>經由最小顯著差異試驗，同一列之不同英文字母表示在 $P \leq 0.05$ 時有顯著性差異( $n = 3$ )。

<sup>x</sup>數據不包括沒有類原球體形成之培植體且只有經由處理形成之類原球體進行統計分析。

在 $P \leq 0.001$ 時，NS，沒有顯著性差異；\*\*\*，顯著

性差異。

NA 為沒有形成根尖類原球體。

<sup>z</sup>Data were collected 3 weeks after incubation.

<sup>y</sup>Means followed by a different letter in the same column are significantly different at  $P \leq 0.05$  by least significant difference test ( $n = 3$ ).

<sup>x</sup>Data excluded explants without PLBs formation and statistical analysis were only conducted to treatments with occurrences of PLB formation.

NS, \*\*\*Nonsignificant or significant at  $P \leq 0.001$ .

NA = not applicable for no PLB initiation.



圖 3 在 MS 生長培養基中離體根尖培植體所形成的根尖類原球體 (PLBs)。在含有 10.2μM IAA 和 9.0μM TDZ 的 MS 生長培養基中，根尖培植體所形成的根尖類原球體(右)與對照組在不合任何生長調節劑之生長培養基中，根會持續伸長但無根尖類原球體的形成(左)。Bar = 10 mm.

Fig. 3 Formation of protocorm-like bodies (PLBs) from excised root tip explants cultured in Murashige and Skoog (MS) medium. Formation of PLB from root tip explants (right) cultured in MS medium containing 10.2 μM indole-3-acetic acid and 9.0 μM thidiazuron in comparison with no PLBs forming (left) but growing longer with no plant growth regulator added to the medium. Bar = 10 mm.

在本實驗中，不同濃度處理的結果顯示出，生長素對曲足蘭根尖類原球體的誘導效果較細胞分裂素好，而且單獨使用高濃度的 IAA，就可誘導其根尖形成類原球體，但在前人研究中，也有報導用不含任何植物生長調節劑之 MS 培養基，可誘導 *Catasetum fimbriatum* 與 *Catasetum pileatum* 之離體根尖形成類原球體 (Colli and Kerbaux, 1993; Kraus and Monteiro, 1989)。這些結果顯示，在培養基中有無添加植物生長調節劑，對於根尖類原球體的形成是依植物種類而異。

在此實驗中我們也觀察到，IAA 及 TDZ 存在於培養基時，曲足蘭的根尖培植體會停止伸長並在尖端部分形成明顯的圓球狀構造；反之，根尖培植體在缺乏 IAA 及 TDZ 的培養基中，只會維持原來根的形態並持續的增加長度(圖 3)。因此在曲足蘭

的離體根尖培植體中，根尖分生組織的橫向分裂及其對伸長的抑制，對於根尖類原球體的形成是重要的因素。

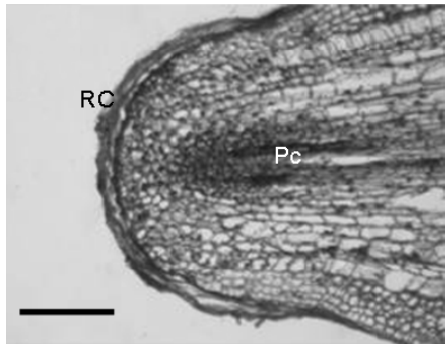


圖 4 未經誘導處理的根尖培植體縱切面，顯示出根尖區域包括原始形成層 (Pc) 和包圍著根尖的根帽 (RC)。Bar = 0.25mm。

Fig. 4 Longitudinal section of root apex used as the typical explants, showing a root tip with procambium (Pc) and surrounded by root cap (RC)。Bar = 0.25mm.

曲足蘭的根部組織結構與其他地生蘭相似，其組培苗的根尖區是由多個細胞層所組成 (Arditti, 1992)。根帽細胞以內，包括了原分生組織、原表皮層和原始形成層等構造。這些組織層緊密連著根帽，其中間之靜止區域，是調控根部伸長及根帽生成的細胞分裂區。將離體根尖培植體培養於含有 10.2μM IAA 的生長培養基中，兩週後經由組織切片的解剖觀察發現，根尖組織的構造發生很大的轉變 (圖 5)。在培養的早期，根尖部份的細胞會進行分裂而造成膨大的圓球狀構造，這個膨大的球狀組織持續不斷地分裂及膨大，使其體積增大而形成肉眼可見的根尖類原球體。每一個根尖培植體只能誘導出來單一個根尖類原球體。在根尖類原球體形成的過程中，根帽組織會脫落而與其尖端部分分離 (圖 5A)。前人研究中也曾觀察到瓢唇蘭根帽消失的現象 (Kraus and Monteiro, 1989)；而在玉米 (*Zea mays*) 和豌豆 (*Pisum sativum*) 的研究中，根帽脫落的現象被認為是與分生組織的細胞分裂活動有關 (Barlow and Hines, 1982)。組織切片的觀察結果也顯示出，在形成根尖類原球體的早期，原本緊密並呈收縮狀的根尖維管束組織 (圖 4)，會在根頂端處轉變成分散狀並且延伸進入膨大的圓球體結構中 (圖 5B)，這個分散狀的維管束會促進根尖類原球體的膨大，似乎是與根尖類原球體形成的早期相關。根尖類原球體進一步的發育，其切面可以清楚觀察到芽原基並且根原基也在類原球體的中間形成 (圖 5C, 5D)，

根尖類原球體接著分化出維管束系統。雖然此時的根尖類原球體與原有的根尖相連，但這兩個器官的維管束系統--即根尖類原球體及根尖培植體的維管束，卻各自分離獨立而不相連。由此可知曲足蘭根尖所形成的根尖類原球體是一種特別的形態發生現象，與其他蘭花經由胚胎再生而形成的類原球體的發生形態不同 (Kerbaudy, 1984; Park *et al.*, 2003)。在本實驗中也發現，根尖類原球體成熟後，原本已呈分散狀的根尖維管束系統會再轉變成緊密收縮狀，恢復母本原有的根尖維管束結構。根尖類原球體也可以誘導出許多相連的類原球體 (圖 2A)，這些外表緊密相連的類原球體經由石蠟切片觀察發現，先從頂芽長出維管束再延伸至類原球體中 (圖 5E, 5F)，過程和其他蘭科植物的類原球體發育過程相似，但這與本實驗所觀察到的根尖類原球體的發育過程呈明顯的對照。曲足蘭實生組培苗培養在不添加植物生長調節劑的生長培養基上，也可觀察到非根尖部分形成之類原球體 (圖 1B)，從解剖學的切片可以觀察到這些非根尖部分形成之類原球體是由根的中柱組織 (圖 6) 表面長出。然而，想要藉由機械傷害來誘導根段培植體產生類原球體，經由實驗結果顯示是無效的。

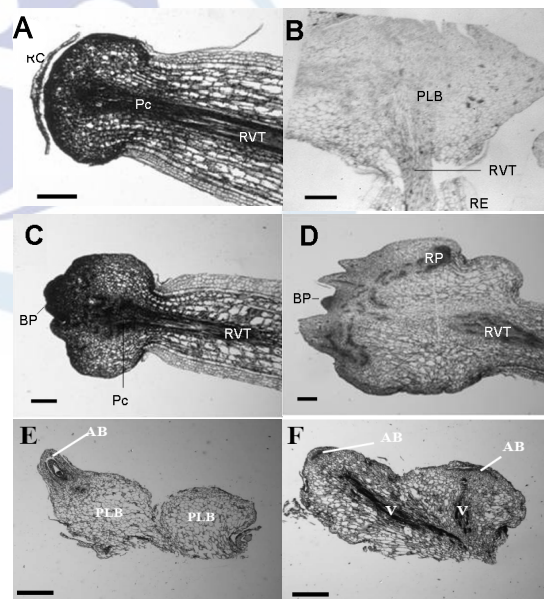
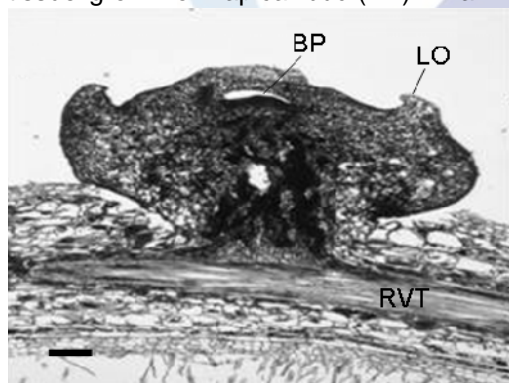


圖 5 曲足蘭的根尖和根中柱類原球體形成之組織切片 (A) 誘導處理第 16 天後，根帽 (RC) 分離且在根維管束 (RVT) 末端發育形成膨大的球體；(B) 初生的根尖類原球體，可見維管束組織從根培植體 (RE) 延伸進入球體並呈發散狀；(C) 培養第 25 天後，根尖類原球體的分生細胞分化形成頂芽原基 (BP)；(D) 35 天後，明顯可見的芽原基 (BP)；(E) 培養第 40 天後，可見芽原基 (BP) 和根原基 (AB) 在類原球體中間形成；(F) 培養第 45 天後，可見芽原基 (BP) 和根原基 (AB) 在類原球體中間形成。

和根原基 (RP); (E) 根尖類原球體再誘導出類原球體之縱切片; (F) 根類原球體頂芽 (AB) 的生長及從頂芽再分化長出的維管束組織 (V)。Bar = 0.25 mm.

Fig. 5 Histological sections from the root tip and central stele of *Cyrtopodium paranaense* during protocorm-like body (PLB) formation. (A) after 16 d of incubation, the root cap (RC) was disorganized and globular expansion was developed on the end of root vascular tissue (RVT); (B) nascent root tip PLB containing dispersed vascular strands extended from root explant (RE); (C) after 25 d of incubation, PLB formation with meristematic cells in apical bud primordium (BP); (D) after 35 d, well-defined bud (BP) and root primordia (RP) were visible in the anterior and middle regions of the PLB; (E) The slice of root tip PLBs regenerate of PLB; (F) Root tip PLB induce apical bud and vascular(V) tissue grow from apical bud.(AB) . Bar =



0.25 mm.

圖 6 從根的中柱維管束組織 (RVT) 形成之根類原球體,可清楚的觀察到芽原基 (BP) 及類似葉的器官 (LO)。Bar = 0.25 mm.

Fig. 6 Nascent PLB originating from vascular tissue (RVT) of the root central stele of an intact seedling with bud primordium (BP) and leaf like organ (LO) visible. Bars = 0.25 mm.

## 結 論

本實驗結果清楚的說明, 曲足蘭的實生組培苗可以在不含植物生長調節劑的MS生長培養基中, 誘導出根尖類原球體, 也可以在含有植物生長調節劑 IAA 或 TDZ 的生長培養基中, 誘導離體之根尖培植體產生根尖類原球體。從組織學的切片分析發現

根尖類原球體在發育早期, 其親本根尖區域的維管束系統會從收縮封閉狀態逐步轉變成為分散的型態並延伸進入類原球體中。這些曲足蘭的根尖類原球體, 最後會各自形成獨立的維管束系統並與親本的根分離。本實驗結果也說明了曲足蘭從根尖和根中柱組織無性增殖發育出根類原球體的早期發育關鍵, 是與親本的根部維管束組織有明顯關係。

## 參考文獻

- Arditti, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. p. 307-330. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Barlow, P.W. and E.R. Hines. 1982. Regeneration of the root cap of *Zea mays* L. and *Pisum sativum* L.: A study with the scanning electron microscope. *Ann. Bot. (Lond.)* 49:521-539.
- Barreto, D.W. and J.P. Parente. 2006. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. *Carbohydr. Polym.* 64:287-291.
- Chen, J.T. and W.C. Chang. 2006. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biol. Plant.* 50:169-173.
- Chugh, S., S. Guja, and I.U. Rao. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Sci. Hort.* 122:507-520.
- Churchill, M.E., E.A. Ball, and J. Arditti. 1972. Tissue culture of orchids: II. Methods for root tips. *Amer. Orchid Soc. Bul.* 41:726-730.
- Colli, S. and G.B. Kerbauy. 1993. Direct root tip conversion of *Catasetum* into protocorm-like bodies: Effects of auxin and cytokinin. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:39-44.
- Ernst, R. 1994. Effect of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:273-275.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. p.523. McGraw Hill, New York, NY.
- Kerbauy, G.B. 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Rep.* 3:27-29.
- Kraus, J.E. and W.R. Monteiro. 1989. Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated in



- vitro*: I. Morphological aspects. Ann. Bot. (Lond.) 64:491–498.
- Menezes, L.C. 1995a. *Cyrtopodium* in Brasil: Part 1. Introduction and five attractive species. Amer. Orchid Soc. Bul. 64:4–9.
- Menezes, L.C. 1995b. *Cyrtopodium* in Brasil: Part 2. The yellow-flowered species. Amer. Orchid Soc. Bul. 64:248–251.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco Tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.
- Park, S.Y., H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. Plant Sci. 164:919–923.
- Pridgeon, A. 1998. The illustrated encyclopedia of orchids. p. 84–85. Timber Press, OR.
- Rego-Oliveira, L.V. and R.T. Faria. 2005. In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Maringá 27:1–5.
- Sánchez, M. 1988. Micropropagation of *Cyrtopodium* (Orchidaceae) through root-tip culture. Lindleyana 3:93–96.
- Schneider, H. 1981. Plant anatomy and general botany, p. 315–333. In: Clark, G. (ed.). Staining procedures used by the Biological Stain Commission. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie, and D.A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 3rd Ed. McGraw-Hill, New York, NY.
- Stewart, J. and J. Button. 1978. Development of callus and plantlets from *Epidendrum* root tips cultured *in vitro*. Amer. Orchid Soc. Bul. 47:607–612.
- Teng, W.L., L. Nicholson, and M.C. Teng. 1997. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. Plant Cell Rep. 16:831–835.

99年8月25日投稿

99年11月23日接受