

四季蘭無菌播種之研究

張倍瑜¹⁾ 王才義²⁾

關鍵字：種子發芽、預措處理

摘要：無菌播種是獲得實生苗之的過程，四季蘭種子培養於 1/6 MS 培養基，其發芽率達到 10.9%，於含有 20 g/l 蔗糖的培養基中發芽率可達到 5.3%，而未添加蔗糖者未有種子發芽。將授粉後 250 天的種子進行前處理，使用超音波震盪處理可有效的提升種子的發芽率，而使用 1% NaOCl 及 0.1 N NaOH 處理則會傷害到胚，而使發芽率下降，但是處理授粉後 380 天之種子 30 分鐘可提升種子的發芽率，其發芽率分別為 4.6 % 和 4.2%。授粉後 380 天的種子進行液體培養，培養 4 週後，有較好的發芽率 10.6%，但是也有高的褐化率 8.7%。

前 言

四季蘭(*Cymbidium ensifolium* (L) Sw.)為台灣原生種，其株型較小，唇瓣上有斑點，萼片上之紅條紋並不明顯。開花期約在 4-10 月，可達半年之久。其生長速率快、成本低、產量高、香味濃郁、市場的需求量最高。常見的品系有觀音素心、鐵骨素心、馬耳、彩虹、金絲馬尾(羅，2005)。目前台灣包含四季蘭在內的國蘭類的栽培面積約 100 公頃，年輸出數量約二千五百萬芽，外銷總值約八億至十億(魏，1999)，在台灣農業部門屬於極有競爭力的項目之一。但四季蘭種子之萌發過程緩慢，萌發百分率低，可能是由於種皮及胚表面細胞的外壁加厚，或附有角質層使得其通透性降低(田等，1985)。呂等(1992)認為素心蘭在播種後發芽率低，並非胚活力問題，於光學顯微鏡及掃描電子顯微鏡的觀察，認為於圓球胚發育後期，圓球胚外面覆一層厚膜。王(1981)認為溫帶性蕙蘭發芽困難原因可能是因為種皮阻礙水及空氣通過，種皮或胚內含有發芽抑制物，種子活力降低，胚活力衰弱，缺乏胚之發芽促進物質。於其他地生蘭中也常有種皮抑制物或種子內的發芽抑制物而導致

1) 國立中興大學園藝學系碩士班學生。

2) 國立中興大學園藝學系副教授，通訊作者。

種子發芽受阻(Lee and Lee, 2005; Lee *et al.*,2007; Yamazaki and Miyoshi, 2006)。本研究利用不同種子前處理及培養基成份增加發芽率及生長整齊，期可獲得大量的實生苗，並產生多樣不同的變異性植株，增加其觀賞價值。

材料及方法

一、試驗材料

中興大學園藝系精密溫室內所栽植的‘彩虹’四季蘭，於 2006、2007 年的 6-8 月盛花期進行人工自花授粉。每一花梗授粉 3 朵花，所結的蒴果作為試驗材料。

二、培養基製備

試驗培養基除了鹽類濃度、糖類濃度試驗外，基本培養基均為 1/6 量 MS (Murashige and Skoog, 1962) 巨量元素，全量的 MS 微量元素、鐵源、100 mg/l myo-inositol、0.5 mg/l nicotinic acid、0.1 mg/l glycine、0.5 mg/l pyridoxine HCl、0.1 mg/l thiamine HCl，再添加 20 g/l 蔗糖、7 g/l 洋菜及 2 g/l 活性碳，將 pH 值調整至 5.2±0.02，每支試管(150 mm×20 mm)注入 10 ml 培養基後，以 121℃、110kpa 滅菌 20 分鐘，製成斜面培養基。

三、培養環境條件

種子播種後皆置於暗室 1 個月，之後放置於 25±1℃，光強度為 1400 Lux，光週期皆為光期 16 小時，暗期 8 小時。

四、試驗方法

將採收的蒴果以 95% 酒精表面消毒後，再將其浸泡於含有 Tween-20 的 1% NaOCl 溶液中消毒 10 分鐘，在無菌操作台中以無菌水清洗 3 次，蒴果表面風乾後以利進行播種試驗。種子播於試管內的斜面培養基(150 mm×20 mm)，每月調查其種子發芽率，當胚突破種皮視為發芽。發芽率=種子發芽數/總種子數×100%。

(一) MS 鹽類濃度試驗

以 2006 年授粉所結的蒴果作為試驗材料，取不同授粉後天數 250 天之已消毒蒴果各 2 個。將蒴果縱切，取出種子播於 1/2、1/4、1/6 MS 培養基。每 1 試管為 1 重覆。每處理為 10 支試管。

(二) 糖類濃度試驗

以 2007 年授粉所結的蒴果作為試驗材料，取 4 個授粉後 250 天的蒴果，依上述蒴果消毒方法處理後，將種子播種於蔗糖濃度為 0、20、30 和 40 g/l 的 1/6 MS 培養基中。每 1 試管為 1 重覆，每處理 8 支試管。

(三) 超音波震盪處理

於 2007 年授粉所形成的蒴果作為試驗材料，取 4 個授粉後 250 天蒴果，將其種子混合後置於含無菌水的血清瓶中並放入以滅菌過之磁石，以磁石攪拌器進行攪拌，將種子拌

入水中，再以超音波震盪處理 0、15、30 和 45 分鐘，震盪後種子懸浮液以無菌的濾紙過濾後，將種子播種於含 1/6 MS 培養基的斜面試管中。每 1 試管為 1 重覆，每處理 8 支試管。

(四) 化學藥劑處理

以 2007 年授粉所結的蒴果作為試驗材料，各取 4 個授粉後 250 及 380 天蒴果，內種子以 0.1N NaOH 和 1% 次氯酸鈉(NaOCl)溶液進行預措處理。種子浸泡於含有處理溶液的血清瓶中，以磁石攪拌器攪拌，授粉 250 天蒴果種子的處理時間為 0、15、30、45 分鐘，授粉 380 天蒴果種子的處理時間為 0、5、15、30 分鐘，之後種子懸浮液以無菌的濾紙過濾，再以無菌水沖洗 2 次，將種子播種於含 1/6 MS 培養基的斜面試管中。每 1 試管為 1 重覆，每處理 8 支試管。

(五) 液體培養：

取四季蘭授粉後 380 天的蒴果內種子置於含 1/6MS 液體培養基的錐形瓶(125 ml)中，以超音波震盪處理 60 分鐘，放置於水平震盪器，以 110 rpm 速率震盪培養，分別培養 1、2、3、4 週，之後取出種子，使用無菌濾紙過濾後培養液後，將種子播種於含 1/6 MS 固體培養基的斜面試管中。每 1 試管為 1 重覆，每處理 8 支試管。

五、統計分析

試驗採完全隨機設計(Complete Randomized Design)，所得數據以變方分析(Analysis of Variance)測試顯著性，並進行最小顯著性差異測試(Least Significant Difference Test; LSD)，分析比較各處理之差異。

結 果

一、不同鹽類濃度對於四季蘭種子發芽之影響

授粉後 250 天的蒴果種子，在播種後 1 個月並未觀察到種子發芽，種子播於 1/6 MS 及 1/8 MS 培養基二個月後，其發芽率較 1/10 MS 培養基好，而在後續的培養仍以 1/6 MS 培養基的發芽率較好，發芽率達到 10.9%(表 1)。

二、蔗糖濃度對於四季蘭種子發芽之影響

培養基的蔗糖濃度對於種子發芽的影響，全部試驗中，播種的初期種子發芽率較低，各處理間則是無明顯的差異，但以 20 g/l 蔗糖濃度最適合種子發芽，其發芽率於播種後 7 個月為 5.3%，30 g/l、40 g/l 蔗糖濃度發芽率分別為 3.4%、3.3%(表 2)。

三、不同預措處理對於四季蘭種子發芽之影響

取授粉後 250 天的四季蘭蒴果未處理種子進行播種，播種後 1 個月尚未觀察到有種子發芽，但使用超音波震盪處理 45 分鐘後，其發芽率達到 3.1%，較其他處理高，在播種 7 個月後，不同處理時間則是無顯著差異，但都高於未處理的對照組(6.2%)高(表 3)，使用 0.1N NaOH 處理種子 15 分鐘後，其發芽率極低，於播種後 7 個月其發芽率只有 0.3%，而

隨著處理時間的增加，其發芽率降至 0%。1% NaOCl 處理種子 15 分鐘後，其發芽率為 9.2% 較未處理之對照組的發芽率 6.2% 佳，但隨著處理時間之拉長，發芽率則下降。

四、液體培養時間對四季蘭種子發芽之影響

液體培養試驗取自授粉後 380 天的種子進行試驗，種子在液體培養基培養 1 星期後移至 1/6 MS 固體培養基，過了 7 個月的培養發芽率為 3.8%，不過此時有較明顯的褐化現象出現，大多呈褐色現象出現在種子吸水膨大及突破種皮前後，就無下一生長階段的進行，組織後來就褐化壞死，而隨著液體培養週數的增加，移到 1/6 MS 固體培養基時，雖有高的發芽率，但是褐化的比例也增加，在液體培養四週後，移至 1/6 MS 固體培養基栽培 7 個月後，其發芽率為 10.6%，而褐化率達到 8.7%(表 4)。

表 1. 培養基中不同巨量元素濃度對四季蘭種子發芽之影響。

Table 1. The effect of major salt concentration of medium on seed germination of *Cymbidium ensifolium* (L) Sw.

Medium	Germination(%) ^y						
	Months after sowing						
	1	2	3	4	5	6	7
1/6MS	0 a ^z	2.9 a	5.3 a	8.5 a	10.5 a	11.4 a	10.9 a
1/8MS	0 a	1.9 ab	2.4 b	4.1 b	5.6 b	6.4 b	6.8 b
1/10MS	0 a	1.5 b	1.7 b	2.7 b	3.6 b	4.3 b	5.6 b

^z Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

^y The seed maturity is 250 days after pollination, culture duration was 7 months culture.

表 2. 培養基中不同蔗糖濃度對四季蘭種子發芽之影響。

Table 2. The effect of sucrose concentration of medium on seed germination of *Cymbidium ensifolium* (L) Sw.

Sucrose(g/l)	Germination(%) ^y						
	Months after sowing						
	1	2	3	4	5	6	7
20	0.0 a ^z	0.5 a	1.0 a	2.1 a	2.8 a	3.9 a	5.3 a
30	0.1 a	0.5 a	0.7 a	1.4 a	1.9 a	2.3 b	3.4 b
40	0.1 a	0.1 b	0.7 a	1.4 a	2.2 a	2.6 b	3.3 b

^z Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

^y The seed maturity is 250 days after pollination, culture duration was 7 months culture.

表 3. 不同預措處理對於四季蘭種子發芽之影響。

Table 3. Effect of various seed pretreatments on seed germination of *Cymbidium ensifolium* (L) Sw.

Treatment (min)	Germination(%) ^y		
	1% NaOCl	0.1N NaOH	Ultrasound
0	6.2b ^z	6.2 a	6.2 b
15	9.2 a	0.3 b	15.3 a
30	2.7 c	0 b	13.9 a
45	1.2 c	0 b	14.1 a

^z Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

^y The seed maturity is 250 days after pollination, culture duration was 7 months culture.

表 4. 液體培養時間對四季蘭種子發芽之影響。

Table 4. Effect of different liquid culture time on seed germination of *Cymbidium ensifolium* (L) Sw.

Liquid culture period	Germination(%) ^y	Browning(%)
1 week	3.8 b ^z	1.7 b
2 weeks	3.8 b	2.8 b
3 weeks	3.3 b	2.7 b
4 weeks	10.6 a	8.7 a

^z Means with the same letter in a column are not significantly different by LSD test at 5% level.

^yThe seed maturity is 380 days after pollination, culture duration was 7 months culture.

討 論

試驗中基本培養基中添加了不同濃度的蔗糖，觀查不同蔗糖濃度對種子發芽的影響。當蔗糖濃度為 30、40 g/l 時，其發芽率較 20 g/l 蔗糖濃度低，分別只有 3.4% 及 3.3% (表 3)，可能蔗糖濃度過高而影響到培養基的滲透壓，影響胚的吸水，使種子發芽過程中受到抑制。呂(1988)認為素心蘭種子添加 10 g/l 蔗糖時發芽率最好，當濃度過高時則種子發芽數明顯下降，與本實驗有相類似的結果。林 (2003) 也認為播種時蔗糖濃度過高是因為滲透壓太高不利種子發芽。

取授粉後 250 天的蒴果種子，種子播於 1/6 MS 及 1/8 MS 培養基二個月後，其發芽率較 1/10MS 培養基好，而在後續的培養仍以 1/6 MS 培養基的發芽率較好，發芽率達到 10.9% (表 2)。試驗中四季蘭於較低巨量元素濃度對於種子的發芽發芽率較差，推測可能是因為種子發芽對於培養基中巨量元素的需求較高。而呂(1992)與王(1985)則認為素心蘭種子在低鹽濃度的 1/10 MS 及 1/8 MS 培養基就可發芽良好，與本試驗結果相反。

試驗中取授粉天數 250 天的種子進行試驗，觀查到未處理的種子在播種後一個月未觀察到有種子發芽，而使用超音波震盪處理 15 分鐘明顯可提升種子發芽率，在培養 7 個月後其發芽率達到 15.3% (表)，李(1991)與利(1992)使用超音波震盪處理種子，在電子顯微鏡下觀查到超音波震盪可將胚體外之膜狀構造震破，提高發芽率，而隨著震盪的時間愈久，種子則提早發芽，發芽率也較高，本試驗也有類似的結果。試驗中使用 0.1N NaOH 溶液處理種子 15 分鐘後，觀察到其發芽率極低，發芽率只有 0.3%，而隨著處理時間的增加，其發芽率降至 0%。使用 1% NaOCl 溶液處理種子 15 分鐘後，其發芽率為 9.21% 較未處理之對照組的發芽率 6.2% 佳 (表 4)，但處理時間之增長，發芽率則急速下降，此現象推估可能是種子受到傷害。呂(1998)認為超音波是物理性的破壞種皮，而藥劑處理是化學性的，想必化學處理對胚的傷害要比物理處理嚴重得多。化學藥劑處理或是超音波震盪處理除了把種皮破壞之外，另可使種子內發芽抑制物流出，促進種子發芽 (Lee *et al.*, 2007)。

由於種子內所含的種子抑制物質，如 ABA 會影響種子的發芽，液體培養可以增加通氣性或促進培養液均勻分布或沖淡植物所釋放之有毒物 (Arditti, 1977)，取授粉後 380 天的蒴果種子以超音波震盪處理 60 分鐘將種子震裂，在液體培養基中培養 1-4 週，隨著液體培養的時間愈長，其發芽率則愈高，但相對的其褐化率也愈高 (表 4)，此時，胚大部份為突破種皮不久死亡，或是胚膨大後未突破種皮即褐化。種子因長期浸於液體中使得種皮吸水軟化，胚較易吸水膨大進而突破種皮發芽，但可能是因為授粉後 380 天的種子種皮的抑制或胚外有包覆物使得發芽過程中受抑制而死亡，這可能是影響到種子發芽褐化率增加的原因。

參 考 文 獻

- 王博仁。1981。蕙蘭的無菌播種與器官分化。中央研究院植物研究所專刊第四號。
- 王博仁。1985。中國蕙蘭組織培養器官分化之研究。國科會計畫報告。
- 田梅生、王伏雄、錢南芬、孫安慈。1985。四季蘭種子離體萌發及器官建成的研究。植物學報 27(5): 455-459。
- 李志仁。1991。報歲蘭與素心蘭之開花與無菌播種之研究。國立台灣大學園藝學研究碩士論文。
- 呂依倫。1988。素心蘭與鳳蘭之無菌播種與器官分化。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 呂依倫、李志仁、李晔。1992。培養基成分對素心蘭種子無菌發芽之影響。中國園藝 38(3): 161-169。
- 利幸貞。1992。一、素心蘭與四季蘭之無菌播種 二、溫度對四季蘭開花之研究。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。
- 林珈芝。2003。紫背脈葉蘭種子發育與發芽之研究。國立中興大學農藝系碩士論文。
- 魏芳明。1999。台灣地區國蘭產業概況與展望。高雄區農業專訊 27: 10-11。
- 羅英妃。2005。台灣農家要覽—農作篇(二)-增修訂三版 p909-914。財團法人豐年社。台北市。
- Arditti, J.1977.Clonal propagation of orchids by means of tissue culture,a manual. In *Orchid Biology Reviews and Perspectives I*,ed. J. Arditti, pp.202-293.Ithaca and London: Cornell University Press.
- Lee, Y. I.,and N. Lee.2005.Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro.J.Amer. Soc. Hort.Sci. 130(5): 747-753.
- Lee, Y. I., C. F. Lu, M. C. Chung, E. C. Yeung,and N. Lee .2007. Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of terrestrial orchid ,*Calanthe tricarinata* Lindl. J. Amer. Soc.Hort. Sci. 132(2): 246-252.
- Yamazaki, J.,and K. Miyoshi.2006.*In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae).Ann.Bot. 98: 1197-1206.

Study on Asymbiotic Seed Germination of *Cymbidium ensifolium* (L) Sw.

Bei-Yu Chang¹⁾ Tsai-Yih Wang²⁾

Key words: Seed germination, Pretreatment

Summary

Asymbiotic seed germination for *Cymbidium ensifolium* (L)Sw. is programs to produce seedling. The seeds of *Cymbidium ensifolium* sowing on 1/6 MS medium, germination percentage of the seeds is 10.9%. The seeds sowing on 20 g/l sucrose medium, germination percentage were 5.3%, but seed germination percentage of medium without sucrose is 0%. The seed of 250 DAP pretreated with ultrasound 45 min. were effective in improving the germination percentage, but seeds pretreated with 1% NaOCl and 0.1 N NaOH may destroy the seeds and resulted in the decline of germination percentage. The seeds of 380 DAP on liquid culture with 4 weeks, germination percentage were 10.6%, but 8.7% seeds were browning.

1) Graduate student in MS. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.