

## 種子預措處理對報歲蘭'達摩'種子發芽之影響

黃瓊慧<sup>1)</sup> 王才義<sup>2)</sup>

關鍵字：達摩報歲蘭、無菌發芽、前處理

**摘要：**達摩報歲蘭(*Cymbidium sinense* 'Da-mo')種子以超音波震盪處理 60 和 90 分鐘、0.5%次氯酸鈉溶液處理 20 分鐘或以液體振盪處理 30 天可明顯增加種子發芽率，其發芽率皆有 60%以上，較未經處理者高出 2 倍。以 0.01N NaOH 溶液處理者，促進種子發芽的效果較不顯著。而以 0.01N KOH 溶液或低溫進行預措處理，可能是胚受到傷害，有抑制種子發芽的現象產生。

### 前 言

報歲蘭(*Cymbidium sinense*)為地生性蕙蘭，屬於東洋蘭和國蘭，原產於台灣和中國大陸。報歲蘭除了可欣賞其高雅的花形、花色外，也強調葉形與生長的彎曲弧度。此外，部分缺乏葉綠素或突變的藝蘭，其線藝色彩更是受人矚目，即使在非開花期的植株也具有觀賞價值(羅，2006)。目前商業上栽培報歲蘭仍以分株繁殖為主，繁殖速率緩慢，且變異產生較少。利用種子繁殖，不僅繁殖快速，且產生變異的機率也相對提高。但報歲蘭'達摩'(Cymbidium sinense 'Da-mo')屬於地生蘭類，地生蘭類種子發芽較困難，可能是因種子於成熟期間種皮不通透性的阻礙(Lee *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Yamazaki and Miyoshi, 2006)，或是在種子發育期間內生抑制物質的產生(Lee *et al.*, 2007)。因此，利用種子預措處理使種子發芽率提高，縮短實生繁殖時間，提高繁殖速率，並期望所生產的實生苗具有多樣的葉藝及花藝，增加其觀賞價值。

---

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。

## 材料及方法

### 一、試驗材料

選取國立中興大學精密溫室內容器栽培之生長整齊、健壯的達摩報歲蘭「十公」(Da Mo orchid 'Ten persons')植株，於植株開花期間進行標示及人工自花授粉，每一花梗限制授粉3朵花，以免過量的著果而抑制蒴果的發育。無菌播種時，蒴果分別取自不同的達摩報歲蘭植株，蒴果自植株取下後於當日進行播種。所有蒴果於採收後先以75%(v/v)酒精擦拭表面及溝紋，再浸泡於含有1滴Tween-20的次氯酸鈉(NaOCl)(有效氯1%)溶液中表面消毒10分鐘，在無菌操作台內以無菌去離子水清洗5次至無泡沫。蒴果風乾後，在無菌培養皿上將其剖開，挖取內部種子，將全數種子浸泡於100 ml無菌水中製成種子懸浮液後進行試驗。

### 二、培養基製備

培養基的基本鹽類均以半量的MS(1/2MS; Murashige and Skoog, 1962)巨量元素，全量的MS微量元素、鐵源及維生素，另添加20 g/L蔗糖，以0.1N NaOH和HCl將pH值調整至 $5.7\pm 0.01$ ，再加入8 g/L洋菜(Bacto™ Agar, France)及2 g/L活性碳作為基本培養基，並於 $121^{\circ}\text{C}$ 、110 kpa高溫高壓20分鐘。滅菌後將培養基倒入無菌塑膠培養皿(Petri Dish, Alpha Plus Scientific corp, Taiwan)(55 mm×15 mm)中備用，每個培養皿內含10 ml的上述固體培養基。

### 三、培養環境條件

所有試驗的種子於播種後皆置於暗環境下培養4週後，再移至由旭光牌冷白螢光燈(FL40D/38)提供1400 lux，每日16小時光期、8小時暗期，溫度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 環境下培養。

### 四、試驗方法

#### (一) 超音波震盪處理

取授粉後150天的蒴果各3個，種子分別混合後進行超音波震盪處理。種子懸浮液(100 ml)以超音波震盪器處理0、15、30、45、60、75或90分鐘，震盪後以無菌的定量吸管吸取1 ml種子懸浮液，直接播種於含固體培養基的無菌塑膠培養皿中，並以2層石蠟膜密封。每一培養皿為1重複，每處理共10重複。

#### (二) 化學藥劑處理

取授粉後150天的蒴果3個，混合種子後進行NaOH、KOH和NaOCl溶液處理。種子分別以0.01N NaOH或KOH處理0、5、10、20或40分鐘，或以有效氯0.5% NaOCl溶液處理0、10、20或30分鐘。種子於化學藥劑處理後以無菌的濾紙(110 mm, Advantec, Japan)過濾，再以無菌水沖洗5次，每一預措處理的種子加入20 ml無菌水中製成種子懸浮液後，再以無菌的定量吸管吸取1 ml種子懸浮液，播種於含固體培養基的無菌塑膠培養皿中，並以2層石蠟膜密封。每一培養皿為1重複，每處理共10重複。

#### (三) 低溫貯藏處理

取授粉後 170 天的蒴果 3 個，混合種子後進行低溫貯藏。將 100 ml 種子懸浮液置於 4°C 的冰箱中冷藏 10、20 和 30 天。低溫貯藏後以無菌的定量吸管吸取 1 ml 種子懸浮液，播種於含固體培養基的無菌塑膠培養皿中，並以 2 層石蠟膜密封。每一培養皿為 1 重複，每處理共 10 重複。

#### (四) 液體振盪處理

取授粉後 130 天的蒴果 3 個，混合種子後倒入 100 ml 無菌水進行液體振盪處理。將種子懸浮液置於迴轉式振盪器上，於轉速 110 rpm 下振盪處理 10、20、30、40、50 和 60 天。振盪處理後以無菌的定量吸管吸取 1 ml 種子懸浮液，播種於含固體培養基的無菌塑膠培養皿中，並以 2 層石蠟膜密封。每一培養皿為 1 重複，每處理共 10 重複。

#### 五、調查項目

以解剖顯微鏡(Nikon SMZ645, Japan)觀察並調查種子發芽率。於播種後 28 週觀察並記錄，含胚種子率=(有胚種子數/總種子數)×100%；當種子胚膨大至兩倍以上且突破種皮時視為發芽，種子發芽率=(發芽種子數/有胚種子數)×100%；若原球體和根莖呈現橙紅或鐵銹色即視為褐化，褐化率=(褐化數/發芽種子數)×100%。計算發芽率後以數位相機(Olympus E-330, Japan)進行拍照記錄。

#### 六、統計分析

試驗採完全隨機設計(Complete randomized design; CRD)，試驗結果以 SAS 統計軟體進行一般線性模型(General linear model; GLM)測試顯著性，再以最小顯著性差異測試(Least significance difference test; LSD)比較各處理間 5% 差異顯著性。

## 結 果

### 一、超音波震盪處理對種子發芽率之影響

授粉後 150 天的達摩報歲蘭種子進行超音波震盪處理可有效的提高種子發芽率，經處理者種子發芽率皆較未經處理者(發芽率 19.5%)高出二倍以上，且隨著處理時間的延長，其種子發芽率亦會隨之提高，其中以超音波震盪處理 60 和 90 分鐘時，其種子發芽率分別為 62.1 和 65.5%，較其他處理時間佳(表 1)。

### 二、化學藥劑處理對種子發芽率之影響

以 0.01N NaOH 溶液處理授粉後 150 天的達摩報歲蘭種子，可觀察到經 NaOH 溶液處理者可些微促進種子發芽，但與未處理者無顯著性差異，其種子發芽率皆有 19% 以上，處理者以 40 分鐘處理時較佳，其種子發芽率為 22.2%(表 2)。種子經 0.01N KOH 溶液處理，其種子發芽率會明顯下降，隨著處理時間延長至 20 分鐘以上，其種子發芽率則快速降低，從未經處理的 19.5% 下降至 7.3%，且經 KOH 溶液處理後，會增加原球體和根莖的褐化率，以處理 40 分鐘時較高，達 60.5%(表 2)。以有效氯 0.5% 的次氯酸鈉溶液進行預措處理，可

明顯提高其種子發芽率，不論其處理時間為何其發芽率皆較未處理者(19.5%)佳，且種子發芽率隨著處理時間的延長而逐漸增加，以處理 20 分鐘時較高，其種子發芽率為 64.0%，然而，當處理時間延長至 30 分鐘時，則發芽率些微下降至 54.6%。在褐化率方面，亦以處理 20 分鐘時達 63.3%，最為嚴重，而將處理時間延長至 30 分鐘，則褐化率下降至 31.6% (表 3)。

表 1. 超音波震盪處理時間對授粉後 150 天之'達摩'報歲蘭種子總發芽率之影響<sup>z</sup>

Table 1. Effects of ultrasonic treatment on seed germination *in vitro* of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'<sup>z</sup>.

Duration	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)
0	52.5	19.5 e <sup>y</sup>	29.1 bc
15	53.5	42.8 d	41.4 b
30	50.9	43.7 cd	28.8 bc
45	50.7	42.1 d	18.3 c
60	44.3	62.1 ab	62.9 a
75	41.3	53.7 bc	16.2 c
90	30.3	65.5 a	68.8 a

z: Data were collected after 28 weeks of culture.

y: Means in column with the same letters are not significantly different by LSD test at 5% level.

表 2. 鹼液處理時間對授粉後 150 天之報歲蘭'達摩'種子發芽率之影響<sup>z</sup>

Table 2. Effects of soaking duration in alkali solution on *in vitro* seed germination of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'<sup>z</sup>.

Duration (min.)	0.01N NaOH			0.01N KOH		
	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)
0 <sup>y</sup>	52.5	19.5 a <sup>x</sup>	29.1 b	52.5	19.5 a	29.1 b
5	57.4	19.3 a	38.9 ab	56.4	11.4 ab	51.2 a
10	54.6	21.6 a	41.5 a	57.3	16.1 a	27.8 b
20	55.3	21.5 a	37.3 ab	57.4	7.7 b	55.5 a
40	56.1	22.2 a	38.5 ab	57.5	7.3 b	60.5 a

z, y: The same as Table 1.

### 三、低溫貯藏處理對種子發芽率之影響

授粉後 170 天的達摩報歲蘭種子先經 4°C 的低溫處理一段時間後再進行無菌播種，其種子發芽率會隨著處理時間的延長而逐漸下降，其中以處理 30 天者最差，播種後 28 週其種子發芽率自對照組(未處理者)29.0%下降至 10.2%。然而，低溫處理卻可減緩褐化的發生情形，原球體和根莖的褐化數在長時間的低溫貯藏(處理 30 天)下，其褐化率可下降至 16.8% (表 4)。

表 3. 次氯酸鈉溶液處理對授粉後 150 天之'達摩'報歲蘭種子發芽率之影響<sup>z</sup>

Table 3. Effects of soaking duration in NaOCl solution on *in vitro* seed germination of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'<sup>z</sup>.

NaOCl soaking (min.)	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)
0 <sup>y</sup>	52.5	19.5 b <sup>x</sup>	29.1 b
10	51.6	51.8 a	52.1 a
20	46.0	64.0 a	63.3 a
30	51.9	54.6 a	31.6 b

z: Data were collected after 28 weeks of culture.

y: In the control, seeds were soaked only in water.

x: Means in column with the same letters are not significantly different by LSD test at 5% level.

表 4. 低溫(4°C)貯藏對授粉後 170 天之'達摩'報歲蘭種子發芽率之影響<sup>z</sup>

Table 4. Effects of low temperature storage on *in vitro* seed germination of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'<sup>z</sup>.

Duration (days)	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)
0	64.3	29.0 a <sup>y</sup>	42.3 a
10	67.8	27.6 ab	23.9 b
20	60.3	16.0 bc	21.7 b
30	60.5	10.2 c	16.8 b

z: Data were collected after 28 weeks of culture.

y: Means in column with the same letters are not significantly different by LSD test at 5% level.

#### 四、液體振盪處理對種子發芽率之影響

將授粉後 130 天的種子浸泡於無菌水中，再置於迴轉式振盪器上進行液體振盪處理，此處理可有效的促進種子發芽，播種後 28 週其種子發芽率皆可提升至 50% 以上，其中以液體振盪處理 30 天，可促進種子發芽率達 60.5%。在褐化率方面，則以液體振盪處理 10 天者，其褐化率有 73.5% 最高，以振盪處理 40 和 50 天者較低，其褐化率有 24.6% 和 26.5% (表 5)。

表 5. 液體振盪處理對授粉後 130 天之'達摩'報歲蘭種子發芽率之影響<sup>z</sup>

Table 5. Effects of liquid treatment on *in vitro* seed germination of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'<sup>z</sup>.

Duration (days)	Embryoed seed (%)	Seed germination (%)	Browning (%)
0	49.4	32.2 c <sup>y</sup>	48.3 b
10	31.3	55.3 ab	73.5 a
20	29.2	58.1 a	32.3 cd
30	26.5	60.5 a	37.4 c
40	23.9	49.5 b	24.6 d
50	20.8	49.4 b	26.5 d
60	19.8	56.2 ab	55.8 b

z: Data were collected after 28 weeks of culture.

y: Means in column with the same letters are not significantly different by LSD test at 5% level.

## 討 論

達摩報歲蘭授粉後 150 天的種子進行超音波震盪處理可有效的提高種子發芽率，經處理者種子發芽率皆較未經處理者高出二倍。Lee *et al.*(2007)指出繡邊根節蘭(*Calanthe tricarinata*)其種子經超音波震盪處理後內生 ABA 濃度由 11.6 ng mg<sup>-1</sup> FW 下降至 6.6 ng mg<sup>-1</sup> FW。而菲律賓拖鞋蘭(*Paphiopedilum phieippinense*)種子經超音波震盪處理 90 分鐘後，可觀察到種皮破裂之情形(李和陳，1997)。因此，超音波震盪處理可能是由於降低或除去達摩報歲蘭種子的抑制物質，或因震裂種皮，促進胚吸收水分和養分，進而使種子發芽率提高。達摩報歲蘭種子以超音波震盪處理 60 和 90 分鐘時發芽率(62.1%和 65.5%)較高(表 1)，繡邊根節蘭以超音波震盪處理 45 分鐘，其種子發芽率較短時間處理者(30 分鐘以

內)佳,但長時間的超音波震盪處理(60 分鐘)可能會造成胚或原表皮細胞受傷,使發芽率下降(Lee *et al.*, 2007),由此結果得知,達摩報歲蘭種子較繡邊根節蘭種子耐超音波震盪。

鳳蘭(*Cymbidium dayanum*)種子非常脆弱,授粉後 8 個月的種子以 0.1M KOH 浸泡 5 分鐘皆完全不發芽(呂和李, 1990),此結果與本研究結果相似,授粉後 150 天的達摩報歲蘭種子經 0.01N NaOH 和 0.01N KOH 溶液處理者,其促進種子發芽的效果不明顯,且 KOH 溶液處理會抑制種子發芽(表 2),可能種子已受到消毒液的傷害。根據 Van Waes and Debergh(1986a)的結果,以次氯酸鹽類溶液處理,種皮經鹼化和氧化而被剝蝕,可增加水分的擴散和滲透。達摩報歲蘭種子以有效氯 0.5%的次氯酸鈉(NaOCl)溶液處理,則可明顯提高種子發芽率,且種子發芽率隨著處理時間的延長而逐漸增加(表 3),此研究結果與吳和李(1991)報告結果相似,紅花鶴頂蘭以 0.5% NaOCl 溶液消毒 15 分鐘,可促進其種子發芽率提高至 60%以上。繡邊根節蘭種子以 1% NaOCl 或 1N NaOH 溶液處理,可使發芽率提高至 30%以上,且其種子內生 ABA 濃度會隨著處理時間延長濃度就越低(Lee *et al.*, 2007)。而奇萊喜普鞋蘭(*Cypripedium macranthos*)以 0.5% NaOCl 溶液處理 60 分鐘,在播種後 3 個月發芽率可達到 72%,而以 1% NaOCl 溶液處理 60 分鐘,則種子發芽率下降到 0%(Miyoshi and Mii., 1998)。上述結果之預措處理後的差異可能與不同物種間種皮的厚度和滲透性有關(Lee *et al.*, 2007; Van Waes and Debergh, 1986a)。

奇萊喜普鞋蘭(*Cypripedium macranthos*)(Miyoshi and Mii, 1998)和芭菲爾鞋蘭(*Paphiopedilum purpuratum*)(劉黃, 1995)種子先於 4°C 下低溫培養一段時間,可打破種子休眠,促進種子發芽,但在本研究中,先經 4°C 的低溫處理一段時間後再進行無菌播種,達摩報歲蘭種子發芽率會隨著處理時間的延長而逐漸下降(表 4),此結果反而與 Van Waes and Debergh(1986b)結果相同,西歐蘭花於播種前先以低溫(6°C)處理一段時間,對種子發芽有抑制的作用,此原因可能與物種本身的生育環境有關。

Van Waes and Debergh(1986a)觀察到根爪蘭(*Dactylorhiza maculata*)種子以無菌去離子水浸泡時間愈久,以 TTC 溶液測定的胚染色率就愈高。達摩報歲蘭授粉後 130 天的種子浸於無菌水中,再置於迴轉式振盪器上進行液體振盪處理 30 天,可促進有胚種子發芽率達 60.5%(表 5),可能是種子浸泡於水中一段時間後,其種皮的滲透性增加的緣故。

## 參 考 文 獻

- 呂依倫、李晔。1990。鳳蘭之無菌發芽。中國園藝 36: 198-209。
- 李晔、陳美惠。1997。拖鞋蘭之果莢成熟度和種子前處理對無菌發芽之影響。p.630-644。園藝種苗科技研究成果發表會專集。
- 吳新棋、李晔。1991。紅花鶴頂蘭之無菌發芽。中國園藝 37: 183-198。
- 劉黃碧圓。1995。芭菲爾鞋蘭無菌播種之研究。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。

- 羅英妃。2006。蕙蘭類栽培管理要點。p.43-55。蕙蘭栽培管理手冊。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。台北市。
- 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 a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132: 246-252.
- Lee, Y. I., E. C. Yeung, N. Lee, and M. C. Chung. 2006. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. Annals of Botany 98: 1311-1319.
- Lee, Y. I., N. Lee, E. C. Yeung, and M. C. Chung. 2005. Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 747-753.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1998. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. Physiol. Plant. 102: 481-486.
- Van Waes, J. M. and P. C. Debergh. 1986a. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. Physiol. Plant. 66: 435-442.
- Van Waes, J. M. and P. C. Debergh. 1986b. *In vitro* germination of some Western European orchids. Physiol. Plant. 67: 253-261.
- Yamazaki, J. and K. Miyoshi. 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcate* (Orchidaceae). Annals of Botany 98: 1197-1206.



## Effects of Seed Pretreatment on Seed Germination *in vitro* of *Cymbidium sinense* 'Da-mo'

Chiung-Hui Huang<sup>1)</sup> Tsai-Yih Wang<sup>2)</sup>

Key words: *Cymbidium sinense* 'Da-mo', Asymbiotic germination, Pretreatment

### Summary

Seeds of *Cymbidium sinense* 'Da-mo' with ultrasonic treatment for 60 min. and 90 min., 0.5% NaOCl solution for 20 min. or liquid treatment for 30 days could increase the seed germination percentage to 62.1% and 65.5%, 64.0% or 60.5%, double higher than control. No significant improvement on germination was found in 0.01N NaOH solution. Seed germination was inhibited, when seeds pretreatment with 0.01N KOH solution and low temperature treatment.

- 
- 1) Graduate student in MS. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
  - 2) Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.  
Corresponding author.

