

彩葉蘭授粉期與果莢冷藏對種子發芽之影響¹

蕭翌柱² 夏奇鈺^{2,4} 蔡新聲³

摘 要

蕭翌柱、夏奇鈺、蔡新聲。2004。彩葉蘭授粉期與果莢冷藏對種子發芽之影響。中華農業研究 53:193-200。

彩葉蘭為一種兼具觀賞及藥用價值的蘭科植物，選取最佳成熟度之花粉及子房進行人工自花授粉並冷藏果莢，可以獲得最高的結果率且能適度延長果莢播種期限。研究結果顯示，彩葉蘭花朵於開花後(days after flowering, 簡稱 DAF)第 0-5 天進行授粉，最高結果率達到 100%且種胚播種培養後之萌芽率也有 44.6-45.6%，顯著優於其他各時期授粉之處理組。取花朵開花後 3-5 天的花粉團粒培養於含 10%蔗糖和 0.01%硼酸的液體培養基 18 hr 後，其花粉萌芽率最高達到 98.4%，平均每個花粉團粒有 82.6 條花粉管。另外，將成熟果莢置於 5±1℃ 及 100%相對溼度的冷藏環境下，可適度延長播種期限達 28 天。

關鍵詞：彩葉蘭、蘭科、授粉作用、種子萌芽。

前 言

彩葉蘭 [*Haemaria discolor* (Ker) Lindl.] 為蘭科血葉蘭屬(*Haemaria*)植物，別名「血葉蘭」或「美國金線連」，中國大陸通稱為「石上藕」、「石蠶」或「真金草」(中華本草編輯委員會 1999)，其原生地分布於中國南方、緬甸、馬來半島、蘇門答臘、爪哇以及印尼的一些島嶼(Hawkes 1970; Teo 1978)，咸認世界上僅有一屬一種(Jones 1979; Teuscher 1978)。在中國廣東、福建、廣西和雲南等地區之百姓，習慣採集彩葉蘭全草鮮用或切段曬乾水煮飲用，以治療脾、肺疾病及肺結核、腦神經衰弱等症狀(Teuscher 1978; 邱 & 張 1995)，藥典記載其性味甘涼，能滋陰潤肺、健脾安神(中華本草編輯委員會 1999)。植株葉片經萃取研究，發現含有天冬氨酸-醯氨(asparagines)、穀醯氨(glutamine)、組氨酸(histidine)、絲氨酸(serine)和羥丁氨酸(threonine)等人體必需及非必需氨基酸成分(Arditti 1992)。

彩葉蘭的染色體數 $2n=44$ (Withner 1974)，對環境適應力強且具有耐熱特性，只需注意給予適當的水分和養份即可生長良好，不需使用特別設計的精密溫室(Hawkes 1970)，其株高約10-25公分，匍匐莖節呈肉質狀並互生2-4片葉，墨綠色的葉面散佈著橙紅或金黃色線形葉脈(圖1A)，一般將其視為地生的寶石蘭類草本植物(中華本草編輯委員會1999; Teo 1978; Graf 1986; Chang & Chou 2001)。

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2203 號。接受日期：93 年 7 月 30 日。

2. 本所農藝組助理研究員及副研究員。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

3. 朝陽科技大學生物技術研究所教授。臺灣 臺中縣 霧峰鄉。

4. 通訊作者，電子郵件：hsia@wufeng.tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

開花時總狀花序常著生十數朵雪白花朵(圖1B)，每年的開花期約自10月至翌年2月(Graf 1986)，但在台灣北部溫室培育者，其開花期可延遲自每年的12月底至翌年3月止(Chang & Chou 2001)。

曾有報導指出，利用彩葉蘭莖節誘導芽體增生，能達到大量繁殖種苗目的(Teo 1978)。近年來也陸續完成無菌播種技術之開發與栽培介質調配(周 & 張 1999a, 1999b)，但是，對於彩葉蘭的花粉活力、授粉適期與果莢低溫儲存期限等研究文獻仍不多見。因此，本文目的旨在探討彩葉蘭不同成熟度之花粉及子房對自交和異花授粉著果率及種胚萌芽率的影響，並記錄花朵授粉後正常果莢發育之生長曲線；此外，將成熟果莢利用低溫保濕冷藏，以研究種胚在低溫下的儲存期限，藉由上述幾項試驗結果，希望能了解彩葉蘭的最佳授粉適期並適度延長果莢播種壽命，以期增進優良種苗繁殖效率及授粉成功率，並且在未來進行遠緣、近緣雜交育種工作時，能提供實質的重要參考資料。

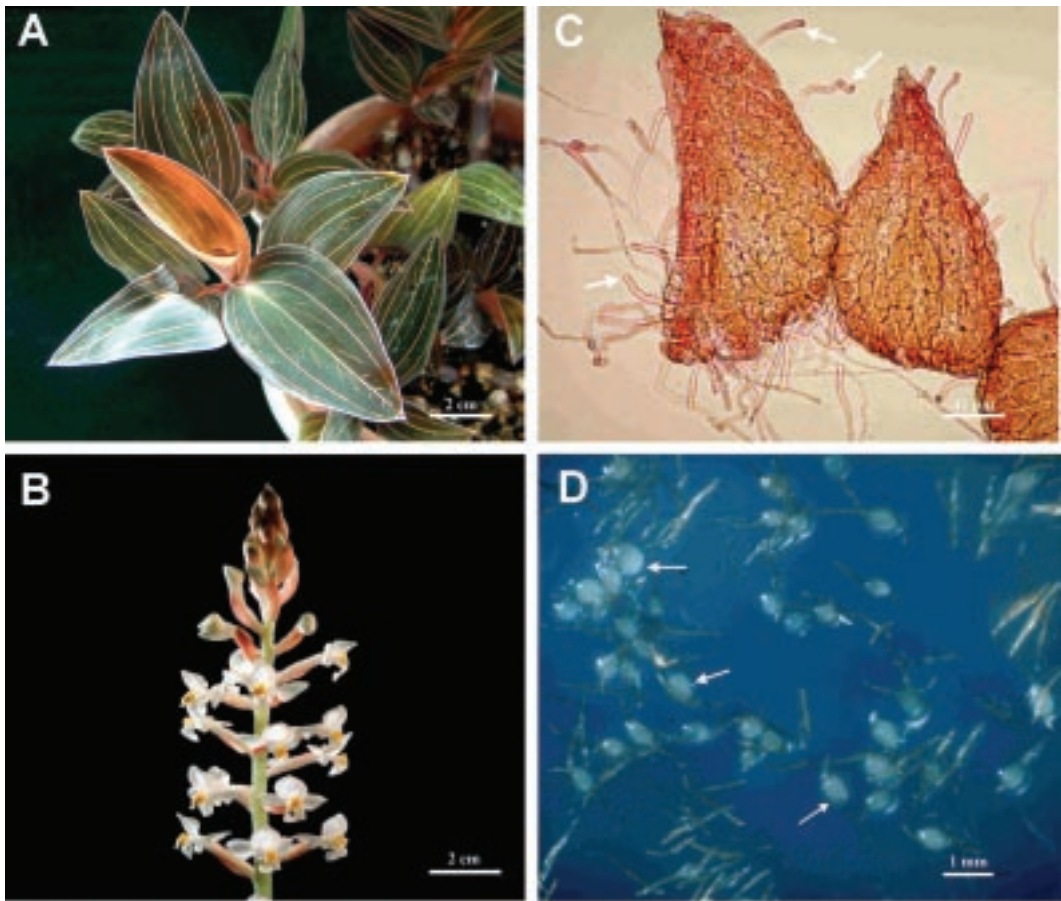


圖 1. 兼具觀賞及藥用價值的彩葉蘭。A. 植株及葉片形態，比例尺=2 cm；B. 花序及花朵，比例尺=2 cm；C. 花粉團粒及萌生的花粉管(箭頭處)，比例尺=41 μm；D. 無菌播種 30 天後膨大的種胚(箭頭處)，比例尺=1 mm。

Fig. 1. An ornamental and medicinal important terrestrial orchid- *Haemaria discolor* (Ker) Lindl. **A.** Plants and leaves of *Haemaria discolor*. Bar= 2 cm; **B.** The inflorescence and flowers. Bar= 2 cm; **C.** The massula showing emergence of pollen tubes (arrows). Bar= 41 μm; **D.** Appearance of seed germination after 30 days cultured *in vitro* (arrows). Bar= 1 mm.

材料與方法

供試植株之培育

選取種植於農業試驗所已達3-4年株齡且高度15-20 cm之彩葉蘭植株進行移植栽培，每週澆水1-2次並適度施用花寶三號(氮：磷：鉀 = 10：30：20)化學肥料，以促進其開花結果，待12月底抽苔並於翌年2月初始花後，選取30株的花莖分別編號作為樣本，每枝花莖約著生22-35朵花，每朵花的始花日期皆予以記錄，供後續人工授粉試驗及花粉活力測定之用。

花粉活力測定

彩葉蘭花朵壽命約27天，因此，自花朵初開後算起至萎凋止，將其區分為下列幾個不同時期：0-2 DAF(days after flowering, 簡稱DAF, 0表示花朵初開、1表示開花後第1天、2表示開花後第2天)、3-5 DAF、6-8 DAF、9-11 DAF、12-14 DAF、15-17 DAF、18-20 DAF、21-23 DAF以及24-26 DAF共九個時期。用鑷子選取上述不同時期花朵的花粉塊，置於載玻片上輕輕擠壓及敲擊，使花粉塊上的花粉團粒(massula)鬆散脫離，再滴上2滴含有10%蔗糖與0.01%硼酸、酸鹼值pH 5.8的無菌培養液在花粉團粒上，將載玻片放入加蓋的培養皿中並保持100%相對濕度，於暗室培養18 hr後取出觀察。觀察時首先用吸水紙小心吸除培養液，讓花粉團粒集中留存於載玻片表面，再滴1-2滴1%的醋酸洋紅(acetocarmine)作為花粉管染色劑，覆上蓋玻片後以光學顯微鏡下鏡檢萌生的花粉管數，每個處理三重覆，每重覆調查30個花粉團粒。

授粉試驗

選取上述不同時期的供試花朵，先使用短尖小鑷子將花朵上的藥帽掀開，夾取花粉塊並自交授粉於柱頭上。其中0-2 DAF和3-5 DAF時期的子房在自交授粉後，每隔七天以微標尺測量及記錄正常發育果莢直徑變化。從第四星期起除了調查結莢率外，並將成熟果莢種子無菌播種於含1/2MS (Murashige & Skoog 1962)基本鹽類和3%蔗糖之固體培養基60天，再以顯微鏡鏡檢種胚萌芽率。此外，另選取0-2 DAF、6-8 DAF、12-14 DAF、18-20 DAF和24-26 DAF五個時期的花朵進行異花授粉。試驗中，每種處理各用15朵花。

果莢冷藏處理

選取授粉後第27-28天成熟度約87.5%飽滿充實的果莢30個，逢機分成6組，每組各5個果莢，分別裝入已編號的塑膠封口袋中。此外，為確保冷藏期間封口袋內100%相對濕度，避免果莢因過度乾燥開裂，各個封口袋皆放入吸足無菌水的紙巾。首先取一組5個果莢作為未經冷藏之對照組並進行無菌播種，第2-6組則置於攝氏5°C冰箱冷藏處理，以後每隔7日依序取出一組進行無菌播種。無菌播種的操作程序如下：(1)以70%酒精消毒果莢外部30秒；(2)用0.5%次氯酸鈉溶液消毒殺菌15分鐘，再置於無菌操作檯上以無菌水清洗2-3次；(3)拿解剖刀切開果莢取出種胚，此時種胚多呈黃褐色鬆散棉絮狀；(4)將各果莢取出之種胚充分混合後，分別播種於內含1/2MS基本鹽類和3%蔗糖之固體培養基中。每個處理組共接種50支試管，置於恆溫 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照強度 $38 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 及14小時光周期的培養室，經播種後60日調查並記錄種胚萌芽率。

試驗結果之統計與分析

試驗數據資料，依“Statistical methods in plant tissue culture” (Lu 1997)進行最小顯著性差異分析(least significant difference, LSD);花粉管數僅計算其平均值和標準偏差;結果莢率則採用二項分佈95%信賴區間(95% confidence limit of binomial variation)比較其差異。

結 果

花粉活力測定

以不同時期花朵的花粉團粒，經暗培養18 hr後，以40-100倍光學顯微鏡鏡檢花粉管萌生情形，結果顯示，花朵開花後第3-5天(即3-5 DAF)採取的花粉活力最高，計算供試花粉團粒的總萌芽率達到98.4%(表1)，與0-2 DAF之94.9%萌芽率或6-8 DAF之93.3%萌芽率相較，雖未達顯著差異水準，但仍高於9-11 DAF、12-14 DAF及15-17 DAF各時期之86.9%、87.6%和80.4%；開花後第18-20天及第21-23天(即18-20 DAF和21-23 DAF)採取的花粉活力已迅速減低，其花粉團粒萌芽率分別降為53.7%與44.7%，至於24-26 DAF的花粉萌芽率，僅有21.6%。

此外，比較各不同成熟度已萌芽花粉團粒的花粉管數(圖1C)，結果也顯示花朵開花後第3-5天(即3-5 DAF)採取的花粉活力最高，平均每個花粉團粒萌生的花粉管數達到82.6(表1)，略高於0-2 DAF的74.5平均值及6-8 DAF、9-11 DAF兩時期之64.2、61.9；在12-14 DAF和15-17 DAF二個時期採取的花粉，其萌芽花粉團粒的花粉管平均數已分別減少為33.2和32.2；至於18-20 DAF、21-23 DAF和24-26 DAF各時期花粉團粒，經培養後萌生之花粉管數已明顯降低至7.7-13.3。

不同成熟度花粉對授粉力之影響

彩葉蘭花朵分別在開花當天到花後17天進行自交授粉，其結莢率皆可達到100%；然在開花後18-20天授粉之結莢率已下降為70%。如在開花21天以後才進行授粉，則結莢率只剩40-50%。鏡檢調查發現，各不同時期花朵自交授粉後所獲得之成熟果莢種胚，經無菌播種於培養基60天後，其萌芽率以0-2 DAF和3-5 DAF時期授粉之45.6%及44.6%最佳，且顯著高於6-8 DAF和9-11 DAF的34.7%與31.5%；在12-14 DAF至24-26 DAF各時期進行授粉所得到的種胚萌芽率僅維持在11.5-22.7%。不同成熟度之彩葉蘭花朵進行異花授粉的結莢率，所得結果與上述自交授粉者相似(資料未列出)，且此種成熟果莢種胚在無菌播種於培養基60天後之萌芽率，亦以0-2 DAF授粉之44.8%最高(表2)，顯著優於6-8 DAF之33.9%與

表 1. 彩葉蘭不同成熟度花朵之花粉活力以及對自交授粉的著果率與種胚萌芽率之影響

Table 1. Effect of flower maturity on pollen viability, fruit set and embryo germination for self-pollination in *Haemaria discolor* (Ker) Lindl.

Pollinia age (DAF) ^z	% massule germination	No. pollen tubes		% Embryo germination
		per massula		
0- 2	94.9 ab ^y	74.5± 31.3		45.6 a ^y
3- 5	98.4 a	82.6± 28.1		44.6 a
6- 8	93.3 ab	64.2± 27.9		34.7 b
9-11	86.9 bc	61.9± 20.6		31.5 b
12-14	87.6 bc	33.2± 15.5		22.5 c
15-17	80.4 c	32.2± 18.3		22.7 c
18-20	53.7 d	13.3± 11.2		12.1 d
21-23	44.7 a	13.3± 15.2		12.6 d
24-26	21.6 f	7.7± 9.4		11.5 d

^z DAF : Days after flowering.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different from each other at the 5% level as determined by LSD test.

^x Values in parentheses are 95% confidence limits of binomial distribution.

12-14 DAF之22.6%；在18-20 DAF和24-26 DAF授粉所得種胚的萌芽率僅有12.2-16.5%。此外，根據花朵授粉後正常著果的果莢發育記錄所繪製的圖形，為略呈S型之生長曲線(圖2)，且授粉後第二週起至第三週之間似為果莢快速膨大時期。

表 2. 彩葉蘭不同成熟度之花粉及子房對異花授粉種胚萌芽率之影響

Table 2. Effect of pollen and ovule maturity on embryo germination rate for cross-pollination in *Haemaria discolor* (Ker) Lindl.

Pollinia age (DAF) ^z	Ovule maturity (DAF) ^z	% Embryo germination ^y
0-2	0-2	44.8 a ^y
6-8	6-8	33.9 b
12-14	12-14	22.6 c
18-20	18-20	16.5 cd
24-26	24-26	12.2 d

^z DAF : Days after flowering.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different from each other at the 5% level as determined by LSD test.

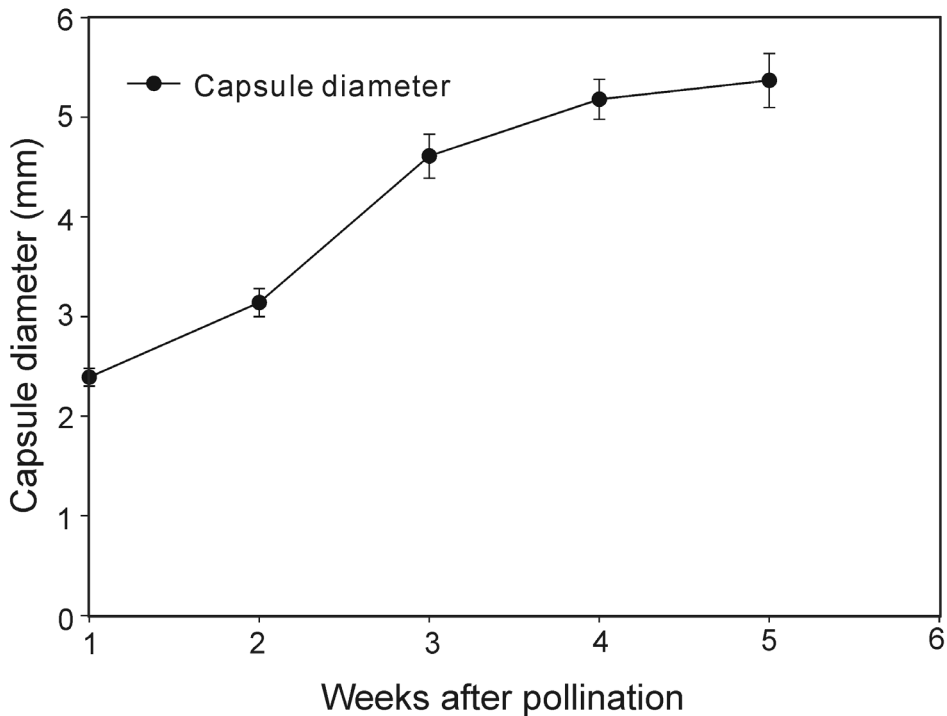


圖 2. 彩葉蘭授粉後正常果莢發育之生長曲線。

Fig. 2. The growth curve in pollinated capsule of *Haemaria discolor* (Ker) Lindl.

果莢冷藏時間對種子萌芽力之影響

彩葉蘭花朵授粉後第27-28天採收的果莢種胚，未經5°C冷藏處理直接播種之種子萌芽率約為47.4% (表3)，冷藏7日後之平均萌芽率仍可達到46.0%；冷藏14-28日後之種子平均萌芽率，則分別略降至40.6-41.2%；如冷藏日數達到35天，不僅種子萌芽率減低至33.5%，甚至果莢外部也開始出現霉爛徵狀。

討 論

彩葉蘭原生在東南亞島嶼及中國大陸南方熱帶、亞熱帶區域，所以栽培品種常表現出較耐熱的特性。據研究(周 & 張 1999a)指出，彩葉蘭植株對生育溫度的變化具有明顯感受性，如將植株置於攝氏15°C環境下，會出現生長勢弱化和停頓的現象；在25-30°C培育溫度下，雖有良好的營養生長，但以20-25°C對花芽分化及誘導較有促進作用。適度冷涼的栽培環境，不但可以促進花芽分化，對於提高蘭科植物之授粉著果率及延長花朵授粉適期可能也有助益。例如白花蝴蝶蘭在25-30°C溫度下的自交授粉期限只有24天，花開30日後之授粉著果率將由100%降至44%；若維持20-25°C生育溫度，則開花後5-60天自交授粉均可獲得100%高著果率(涂 & 李 1987)。另由觀察得知，彩葉蘭完成花芽分化後，自莖頂萌生花苞至第一朵花開約需2.5-3個月時間，其花朵開放後若未經人工或虫媒授粉，在第27-28天花朵便乾枯萎凋，此與台灣金線連的生育習性相似。筆者曾探討台灣金線連花朵壽命約為30天，但自交和異花授粉適期為花朵開放後第2-7天，此時授粉成功率可達80-86.7%；測定花粉活力也得到類似結果，培養花朵開放後7日內的花粉團粒，平均可萌生36.2-56.4條花粉管，如培養開花後第11-13日較老熟的花粉團粒，則萌生之花粉管數平均僅有8.9條(Shiau *et al.* 2002)。本試驗研究結果顯示，彩葉蘭適合自交授粉的期間為花朵開放後第0-17天，此時授粉結莢率皆可達100%(表1)，異花授粉的結莢率也與自花授粉者相似，如再進一步比較各時期的種胚萌芽率或花粉活力表現，不論自交或異花授粉，其最佳授粉期應為開花後第0-5天(表1和表2)。

曾有研究顯示，利用-79°C超低溫儲藏金釵石斛(*Dendrobium nobile*)與根節蘭(*Calanthe urcata*)的花粉塊或種子，可以長期維持其萌芽活力(Ito 1965)。如將嘉德利亞蘭(*Cattleya aurantiaca*)的果莢種子置入內含飽和氯化鈣水溶液(saturated solution of calcium chloride)的密封玻璃容器，經過幾天之後，容器內部的溫度和相對濕度分別維持在20°C和31%，此時種子含水量已降為5-6%，可在3.9-5°C的冰箱冷藏數年之久(Seaton 1994)。上述冷藏技術雖甚具參考價值，但材料處理方法稍嫌繁複且相關設備費用較

表 3. 彩葉蘭果莢冷藏處理(5 ± 1°C)對萌芽率之影響

Table 3. Influence of capsule cold treatment (5 ± 1°C) on seed germination of *Haemaria discolor* (Ker) Lindl.

Duration of 5 ± 1°C treatment (days)	Germination rate ² (%)
0	47.4±5.0
7	46.0±6.8
14	41.2±6.5
21	41.1±7.2
28	40.6±5.8
35	33.5±5.2

² Data collected from seeds which were germinated for 60 days on solidified medium containing half-strength MS basal salt supplemented with 30g/l sucrose.

高，可能不適用於一般的栽培業者；本試驗以常見的塑膠封口袋放入彩葉蘭成熟果莢，並以濕潤紙巾維持袋內100%之相對濕度，置於冷藏溫度為5°C的普通冰箱中可以保存28天，在此一期限內用低溫處理的果莢種胚，經過培養後仍維持適當的萌芽率(表3、圖1D)，顯然已能達到適度延長果莢播種期限的目標，而且方法簡單易行，因此，上述各項的研究結果，對於增進彩葉蘭優良種苗繁殖效率或雜交品系選育工作之進行，應有良好的助益。

引用文獻

- 中華本草編輯委員會。1999。血葉蘭。p.737-738。中華本草第24卷第8冊。上海科學技術出版社。上海。
- 邱年永、張光雄。1995。石蠶蘭。p.277。原色台灣藥用植物圖鑑(3)。南天書局。台北市。
- 周玲勤、張喜寧。1999a。溫度與栽培介質對彩葉蘭生長之影響。中國園藝45(1):11-18。
- 周玲勤、張喜寧。1999b。彩葉蘭之無菌播種與實生苗生長。植物種苗1:57-67。
- 涂美智、李晔。1987。蝴蝶蘭授粉適期與果莢成熟度對種子發芽之影響。中國園藝33(3):190-200。
- Arditti, J. 1992. Proteins and amino acids. p.193. *in*: Fundamentals of Orchid Biology. John Wiley & Sons, Toronto, Canada.
- Chang, C. N. and L. C. Chou. 2001. Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. *Symbiosis* 30:29-40.
- Graf, A. B. 1986. *Haemaria*. p.1013. *in*: TROPICA. Roehrs Company, East Rutherford, U.S.A.
- Hawkes, A. D. 1970. *Haemaria* Ldl. p.238. *in*: Encyclopaedia of Cultivated Orchids. (Hawkes, A. D. ed.) Latimer Trend & Co. Ltd., London, England.
- Ito, I. 1965. Ultra-low temperature storage of orchid pollinia and seeds. *Jpn. Orchid Soc. Bull.* 11(2):4-15.
- Jones, P. J. 1979. Terrarium culture of *Ludisa discolor* var. *dawsoniana*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 48:1007-1009.
- Lu, H. Y. 1997. Statistical methods in plant tissue culture. p.G1-G31. *in*: Proceeding of Symposium of Plant Tissue Culture and Seedling Propagation. (Tsay, H. S. ed.) ARI, Taichung, Taiwan.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Seaton, P. 1994. Orchid seed and pollen storage. *Am. Orchid Soc. Bull.* 63:918-922.
- Shiau, Y. J., A. P. Sagare, U. C. Chen, S. R. Yang, and H. S. Tsay. 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:123-130.
- Teo, C. K. H. 1978. Clonal propagation of *Haemaria discolor* by tissue culture. *Am. Orchid Soc. Bull.* 47:1028-1030.
- Teuscher, H. 1978. Collector's item: *Erythrodes*, *Goodyera*, *Haemaria* and *Macodes* with *Anoectochilus*. *Am. Orchid Soc. Bull.* 47:121-129.
- Withner, C. L. 1974. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. p.444. *in*: The Orchids Scientific Studies. (Withner, C. L. ed.) John Wiley & Sons, Toronto, Canada.

Effect of Pollination Stage and Cold Storage of Capsule on the Seed Germination of *Haemaria discolor* (Ker) Lindl.¹

Yih-Juh Shiau², Chi-Ni Hsia^{2,4} and Hsin-Sheng Tsay³

Summary

Shiau, Y. J., C. N. Hsia, and H. S. Tsay. 2004. Effect of pollination stage and cold storage of capsule on the seed germination of *Haemaria discolor* (Ker) Lindl. J. Agric. Res. China 53:193-200.

Haemaria discolor (Ker) Lindl. is cultivated for the purpose of ornamental and medicinal in Taiwan. We have optimized a method for artificial self-pollination of *H. discolor* and for prolonging capsules storage life by using cold treatment in this study. The highest fruit set (100%) and embryo germination (44.6-45.6%) were obtained when the pollinia and ovules from flower stage of 0-5 DAF (days after flowering) used for pollination. The germination rate of massules from 3-5 DAF stage were 98.4%(82.6 pollen tubes/ massule) when culturing in the liquid medium containing 10% sucrose with 0.01% boric acid for 18hrs. Cold treatment on capsules at $5\pm 1^\circ\text{C}$ with 100% relative humidity was found effective to prolong seed longevity to 28 days.

Key words: *Haemaria discolor*, Orchidaceae, Pollination, Seed germination.

-
1. Contribution No.2203 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: July 30, 2004.
 2. Respectively, Assistant Agronomist and Associate Agronomist, Agronomy Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Professor, Institute of Biotechnology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw ; Fax: (04)23302806.