

種子成熟度與播種介質對台灣白及種子 瓶外非共生發芽之影響

曹進義¹ 陳威臣² 吳姿穎³ 夏奇鈺^{4*}

摘要

曹進義、陳威臣、吳姿穎、夏奇鈺。2021。種子成熟度與播種介質對台灣白及種子瓶外非共生發芽之影響。台灣農業研究 70(2):129–139。

本研究以自花授粉後 60、90、120、150 及 165 d 之台灣白及 [*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.] 種子，播種於 3 種單一介質，分別為：水苔 (介質 1)、泥炭土 (介質 2)、炭化稻殼 (介質 3)，以及 2 種混合介質配方，分別為砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石 = 1:1:1:1 (介質 4) 與砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石 = 1:1:1:1 (介質 5)。5 種介質皆分別經高溫高壓滅菌或不滅菌之處理方式，以探討台灣白及不同成熟度種子在不同介質中於缺乏蘭菌共生情況下 (滅菌介質)，對種子發芽與小苗生長發育之影響。試驗結果顯示，台灣白及在滅菌和未滅菌介質中均可發芽及生長。授粉後 60 d 的種子即具有發芽能力，但以授粉後 165 d 的種子發芽所需時間最短，僅需 9 d。授粉後 90 d 種子之發芽率，在適當培養介質均可達 80% 以上，個別介質中發芽率最高者為滅菌之泥炭土 (84.1%)，其次為滅菌之混合介質 4 (81.1%) 及介質 5 (72.6%)。觀察小苗存活率，在不同授粉日數種子於不同介質中生長之表現並不一致，但以授粉後 120 d 種子在適當介質中皆可達 70% 以上。將授粉後 120 d 種子播種於已滅菌或未滅菌之不同介質中，結果顯示滅菌處理與不同介質對小苗生長發育均呈極顯著影響，且兩者間具交感效應。其中，以經滅菌處理之泥炭土介質為最佳，小苗平均有 3.5 片葉、葉幅為 7.0 mm。本研究之結果顯示，台灣白及具一定成熟度之種子 (60 d)，在適當之培養介質中具有自營發芽與生長之特性。授粉後 120 d 種子在播種後 10 d 即可見種子胚膨大轉綠，17 d 後可見原球體 (protocorm) 分化長出第一片葉，在 120 d 後即可分化成完整植株。介質種類與種子成熟度會影響台灣白及發芽所需時間，而介質滅菌與否對較成熟種子 (≥ 120 d) 的發芽時間影響不顯著。綜此，介質種類、滅菌處理及種子成熟度等因子對種子發芽率與存活率皆有極顯著之影響，且因子間之交感效應顯著。

關鍵詞：蘭花種子、非共生發芽、蘭菌。

前言

台灣白及 [*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.] 為地生類蘭科植物 (terrestrial orchid)，生長地分布於台灣全境之平地與高山地區。台灣白及與中藥材所用之白及為同屬異種，其塊莖亦可作為藥材使用，植株並兼具園藝觀賞價值 (Masuhara & Katsuya 1989)。由於原生地遭受破壞及人為過度採集，台灣白及與中國白

及的野生族群皆在快速減少 (Lin *et al.* 1994; Zhu & Wang 1999; Fu *et al.* 2006)，中國並已將白及列為珍稀瀕危的保護植物 (Peng *et al.* 2004)。台灣白及為台灣特有種，有鑑於其族群的快速消失，研究以人工方式大量繁殖其種苗以保護種原之存在有其必要性。根據研究顯示，蘭科植物成熟種子非常細小，單粒重約 0.3–14.0 μg ，長 0.25–1.20 mm，外披透明

投稿日期：2020 年 12 月 31 日；接受日期：2021 年 3 月 1 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

單層細胞之種皮，細胞內容物已消失，胚亦只發育到圓球胚 (globular embryo) 階段即停止，不具胚乳亦無子葉、胚根及胚芽等組織 (Lee 1990)。蘭科植物之種子因發育不全，於自然狀態下其種子發芽需藉由與菌根菌 (mycorrhiza) 共生取得養分，才能發芽進而發育成正常之幼苗 (Arditti 1966, 1967; Yamamoto *et al.* 2017)。此外，利用植物組織培養技術進行蘭科植物無菌播種，以培養基中的營養成分取代菌根菌的功用，則是蘭花人工繁殖上很大的突破 (Juang & Lee 1985)。本研究團隊過去利用無菌播種與試管內培養方式，已成功改進台灣白及種子發芽與小苗之生長 (Tsao *et al.* 2011)，但仍思考是否有更簡單易行之人工繁殖方式可作為台灣白及就地復育之用。由於觀察到少數幾種人工栽培之地生蘭如台灣白及、綫草屬 (*Spiranthes*) 及苞舌蘭屬 (*Spathoglottis*) 之種子，具有自行發芽並長成小苗之現象。為證明此一觀點應用於台灣白及之可行性及其所需之條件，本研究將台灣白及不同成熟度種子播種於滅菌或未滅菌之不同介質中，觀察種子成熟度與介質種類對種子發芽與小苗生長之影響。本研究之目的，除欲證實蘭科植物可以不經由與菌根菌共生而正常發芽生長外，更期望此一簡單之人工大量繁殖方式能幫助台灣白及免除種原滅絕危機。

材料與方法

試驗材料

本研究使用之台灣白及採集自新北市平溪地區，植株種植於行政院農業委員會農業試驗所溫室內，開花後進行人工自花授粉。種子成熟度依授粉後天數區分，分別為 60、90、120、150 及 165 d，其中 120 d 果莢已轉黃，150 d 及 165 d 之果莢已開裂。播種時，取上述授粉後不同天數之種子作為播種材料。

播種介質與酸鹼值檢測

播種用介質分別為單一介質之水苔 (介質 1)、泥炭土 (介質 2)、炭化稻殼 (介質 3)，以及混合介質，其配方分別為砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石 (粒徑 2–5 mm) (體積比 = 1 : 1 : 1 : 1)

(介質 4) 及砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石 (粒徑 5–6 mm) (體積比 = 1 : 1 : 1 : 1) (介質 5)，介質中之砂與壤土取自農試所田區。播種介質以 121°C、1.21 kg cm⁻² 進行二次 40 min 的高溫高壓滅菌。將滅菌或未滅菌介質平鋪於直徑 90 mm、高度 15 mm 的無菌透明塑膠培養皿內備用。以酸鹼檢測儀 (S20 SevenEasy™ pH, Mettler Toledo, Zürich, Switzerland) 檢測滅菌或未滅菌介質之酸鹼值，取樣方式為分別隨機取 3 g 介質，加入 100 mL 去離子水，浸泡 24 h 後進行 pH 值檢測 (Chang *et al.* 2006)。

種子播種與小苗移植

由於台灣白及種子外觀較其他蘭花種子大且明顯，容易藉由肉眼挑選較均質一致的種子，因此以人工分別挑選外觀飽滿完整與大小趨近一致較均質之 5 種不同授粉天數種子，分別播種於上述 5 種介質中。每一培養皿皆均勻播種 300 粒種子為 1 重複，共進行 4 重複。將加蓋之培養皿放置於農業試驗所生技組具風扇水牆之環控溫室內，播種後水分管理以滅菌之去離子水以塑膠噴壺水霧噴濕，每隔 3 d 噴水 1 次。培養期間除噴霧加濕時掀開上蓋，其餘時間均保持蓋上之狀態。播種後，以每皿 50 粒種子以上發芽，則調查其起始發芽天數。種子發芽以長出第一片葉作為標準，於播種 60 d 後調查發芽率，而於 120 d 後計算小苗存活率。因授粉後 120 d 種子已有良好之發芽能力，同時評估其發芽天數、發芽率以及存活率。因此，在另一個試驗以授粉後 120 d 之種子播種於已滅菌之 5 種介質中，每一培養皿均勻播種 300 粒種子為 1 重複，共進行 4 重複。分別於播種後 60 d 與 120 d 後，調查小苗之葉數與葉幅，之後將存活之小苗單株移植至盛裝有泥炭土介質 (PEAT MOSS 7-1, Bas van Buuren B.V., De Lier, The Netherlands) 之 72 孔穴盤定植。

統計分析

試驗採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗資料先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。若處理間差異顯著，再進行最小顯著差異性測驗 (least significant difference; LSD) 比較各處理平均值

間的差異性。其中，發芽率與存活率之數據先經 \sin^{-1} 角度轉換後，再進行統計分析。各項分析工作利用 SAS Enterprise Guide 7.1 統計分析套裝軟體進行。

結果

不同授粉後天數種子與播種介質對於種子發芽之影響

比較3種單一介質(介質1、介質2、介質3)及2種混合介質(介質4、介質5)之已滅菌與未滅菌介質之pH值，結果顯示相同介質在未滅菌與滅菌處理後其pH值之差異不大，其中水苔、泥炭土為弱酸性，pH分別為4.36–4.92與5.90–6.03，而炭化稻殼及混合介質4與介質5為中性，pH為6.86–7.42(表1)。

表2顯示台灣白及不同授粉後天數種子於5種介質中發芽所需之最少天數，其中介質是否滅菌對發芽天數之影響多不顯著，僅授粉後90 d之種子在介質3、介質4及介質5中有較明顯差異，但皆以未滅菌介質中之發芽天數較低。此外，在授粉後60 d種子即有發芽能力，但發芽僅見於介質2，於其他4種介質中皆未

見種子發芽。授粉90 d後之種子，可於所有介質中發芽。觀察同一介質中隨著種子之授粉後天數增加，種子發芽所需時間有縮短之趨勢，以授粉後165 d(果莢已自然黃熟裂開)之種子所需發芽天數最短，僅需9 d；但其中授粉後150 d之發芽天數較為偏高。觀察相同授粉後天數之種子在相同介質中之發芽天數，以介質2所需天數較短，在9–21 d之間(表2)。

表1. 台灣白及播種所使用未滅菌及經高溫滅菌之5種介質酸鹼值。

Table 1. Effect of an autoclave on the changes of pH value in 5 growth media used for germination test of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. seeds.

Medium No. ^z	pH	
	Non-autoclaved	Autoclaved
1	4.92	4.36
2	5.90	6.03
3	7.42	7.21
4	7.21	7.23
5	6.96	6.86

^z Media from 1 to 5 were sphagnum moss, peat moss, carbonized rice husk, sand : loam : carbonized rice husk : perlite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v), and sand : carbonized rice husk : perlite : vermiculite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v), respectively.

表2. 台灣白及不同授粉後天數種子於滅菌或未滅菌5種介質中對發芽天數之影響。

Table 2. Effects of seed maturity, growth media composition and sterilization of growth media on seed germination of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.^z

Media	Autoclave	Seed maturity (d) ^y				
		60	90	120	150	165
1	No	- ^x	43 _d ^{Dw}	30 _c ^B	34 _c ^C	23 _c ^A
1	Yes	-	43 _d ^D	30 _c ^B	34 _c ^C	23 _c ^A
2	No	16 _a ^B	21 _a ^C	10 _a ^A	19 _a ^C	9 _a ^A
2	Yes	16 _a ^B	21 _a ^C	10 _a ^A	19 _a ^C	9 _a ^A
3	No	-	28 _b ^B	37 _d ^D	34 _c ^C	16 _b ^A
3	Yes	-	43 _d ^D	37 _d ^C	34 _c ^B	16 _b ^A
4	No	-	21 _a ^C	16 _b ^B	26 _b ^D	9 _a ^A
4	Yes	-	35 _c ^D	16 _b ^B	26 _b ^C	9 _a ^A
5	No	-	21 _a ^C	16 _b ^B	19 _a ^C	9 _a ^A
5	Yes	-	28 _b ^D	16 _b ^B	19 _a ^C	9 _a ^A

^z Each treatment had 4 replications and each replication contained 300 seeds in a petri dish. Germination day was recorded while more than 50 seeds germinated in a petri dish.

^y Seed maturity was days after pollinating.

^x -: no seed germination.

^w Means in the same column with different subscript letters or A, B, C, D in the same row with different capital letters are significantly different at $P < 0.05$ by least significant difference (LSD) test.

介質滅菌處理、不同授粉後天數種子及介質種類對於種子發芽率與小苗存活率之影響

介質是否滅菌處理、不同授粉後天數種子、介質種類 3 個單因子、兩兩單因子間及 3 個因子間之交感，皆顯著影響種子發芽率與小苗存活率。滅菌處理對發芽造成之影響在介質 2 和介質 4 較明顯，而在介質 1 之差異最不明顯 (表 3)。觀察滅菌處理對小苗存活之影響，則以介質 4 之差異最明顯，而以介質 1 最不明顯。綜觀同一授粉後天數之種子在相同介質中之發芽率及存活率，滅菌或未滅菌處理大都在

統計上有相似之結果。若有顯著差異者，則大都以滅菌介質表現較未滅菌處理為佳。比較相同授粉後天數種子在相同介質中之發芽率，大致以滅菌之介質 2、介質 4 及介質 5 較高；所有介質中除介質 3 之存活率較差外，其餘介質對存活率之影響表現並不一致；但針對不同授粉後天數種子，則以介質 4 之整體表現最佳。觀察不同授粉後天數種子之表現，顯示授粉後 60 d 種子只在滅菌介質 2 具發芽率，但授粉後 90 d 種子則在不同介質中均能發芽，但以授粉後 120 d 之後的種子發芽率明顯提高。整體而言，除少數介質如滅菌介質 4 與未滅菌介質 2 組外，皆以授粉後 165 d 之種子有較高之發芽

表 3. 台灣白及不同授粉後天數種子於 5 種介質中對發芽與小苗存活之影響。

Table 3. Effects of seed maturity and growth media composition on asymbiotic seed germination and survival rates of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.

Media ^z	Autoclave	Germination rate (%) ^y					Survival rate (%) ^x				
		60 d	90 d	120 d	150 d	165 d	60 d	90 d	120 d	150 d	165 d ^w
1	No	0.0 _c ^v	34.4 _{cd} ^B	42.8 _e ^{AB}	45.8 _c ^A	42.1 _d ^{AB}	- ^u	30.1 _{ab} ^B	15.3 _{cd} ^C	42.7 _c ^A	32.5 _b ^B
1	Yes	0.0 _c ^C	34.4 _{cd} ^B	40.3 _e ^{AB}	43.8 _c ^A	40.1 _d ^{AB}	-	30.0 _{ab} ^B	14.1 _{cd} ^C	40.7 _c ^A	31.5 _b ^B
2	No	19.5 _b ^E	27.9 _d ^D	71.8 _{bc} ^A	61.5 _b ^B	42.8 _d ^C	0.0 ^B	2.2 _d ^B	29.2 _{bc} ^A	7.0 _d ^B	11.8 _{cd} ^B
2	Yes	38.8 _a ^C	75.8 _b ^B	90.0 _a ^A	84.4 _a ^{AB}	86.2 _{ab} ^{AB}	0.0 ^D	6.0 _d ^D	73.2 _a ^A	43.1 _c ^B	16.3 _{cd} ^C
3	No	0.0 _c ^D	33.0 _{cd} ^C	52.8 _{de} ^B	27.9 _d ^C	80.9 _b ^A	-	16.0 _{cd} ^B	4.1 _{de} ^B	14.2 _d ^B	39.6 _b ^A
3	Yes	0.0 _c ^D	44.1 _c ^B	43.8 _e ^B	20.4 _d ^C	61.9 _c ^A	-	11.3 _{cd} ^B	0.7 _e ^C	14.2 _d ^B	23.3 _{cd} ^A
4	No	0.0 _c ^E	35.2 _{cd} ^D	62.2 _{cd} ^B	49.1 _{bc} ^C	82.4 _b ^A	-	3.6 _d ^B	0.0 _e ^B	6.5 _d ^B	40.4 _b ^A
4	Yes	0.0 _c ^D	95.5 _a ^A	69.8 _{bc} ^C	75.8 _a ^B	83.2 _{ab} ^B	-	31.3 _a ^B	38.8 _b ^B	61.4 _{ab} ^A	77.1 _a ^A
5	No	0.0 _c ^C	25.8 _d ^B	70.6 _{bc} ^A	79.6 _a ^A	60.9 _c ^A	-	16.7 _{bcd} ^B	22.0 _{bcd} ^{AB}	45.4 _{bc} ^A	45.2 _b ^A
5	Yes	0.0 _c ^C	40.4 _c ^B	80.1 _{ab} ^A	76.5 _a ^A	93.2 _a ^A	-	23.4 _{abc} ^B	14.6 _{cde} ^{BC}	71.8 _a ^A	6.6 _d ^{BC}
Significance			Germination (%)	Survival (%)							
Day (D)			** _t	**							
Media (Me)			**	**							
Autoclave (A)			**	**							
D × Me			**	**							
A × Me			**	**							
A × D			**	**							
D × Me × A			**	**							

^z Media from 1 to 5 were sphagnum moss, peat moss, carbonized rice husk, sand : loam : carbonized rice husk : perlite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v), and sand : carbonized rice husk : perlite : vermiculite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v), respectively.

^y Germination rates were recorded 60 d after sowing.

^x Survival rates were recorded 120 d after sowing.

^w Seed maturity were days after pollinating.

^v Means in the same column with different subscript letters or A, B, C, D, E in the same row with different capital letters are significantly different at $P < 0.05$ by least significant difference (LSD) test.

^u -: no seed Germination.

^t **: significant at 0.01 level.

率。不同授粉後天數之種子在同一介質中之存活率表現較不一致，如授粉後 150 d 種子之最佳存活率為介質 5，授粉後 120 d 種子則以介質 2 為最高，授粉後 165 d 種子則以介質 3、介質 4 及介質 5 (未滅菌) 為最高。綜合結果顯示，授粉後 60 d 之種子播種於已滅菌之介質 2 即具發芽能力，但於播種後 120 d 調查小苗之存活率皆為 0%。授粉後 90 d 以上之種子播種於 5 種介質中皆可發芽，但於滅菌之介質 4 中有最高之發芽率為 95.5%，但其存活率僅 38.8%。授粉後 120 d 之種子播種於滅菌介質 2 有高發芽率及存活率，分別為 90.0% 與 73.2%。授粉後 150 d 與 165 d 果莢之種子分別播種於滅菌之介質 4 與介質 5，發芽率分別為 75.8% 和 93.2%，存活率除授粉後 165 d 種子於滅菌介質 5 之 6.6% 較低外，其餘存活率在 61.4–77.8% 之間 (表 3)。綜合發芽率與存活率來看，以授粉後 120 d 之種子播種於滅菌介質 2 為最佳，發芽率與存活率在不同授粉天數種子則以滅菌之介質 4 表現較為一致。

以授粉後 120 d 種子播種於 5 種介質在生

長 120 d 後觀察小苗於滅菌或未滅菌不同介質中生長之情形，結果顯示以滅菌之介質 2 對小苗生長與發育為最佳，平均葉數為 3.5 片葉，雙葉幅可達 7.0 mm，而以介質 1 與介質 3 為最差，小苗生長與發育極為緩慢 (表 4、圖 1)。本試驗以授粉後 120 d 果莢之種子播種於滅菌介質 2 為模式，觀察台灣白及種子發芽與發育之過程顯示，在播種後第 10 天，種子胚已膨大轉綠；在第 17 天時，原球體 (protocorm) 開始分化長出第一片葉；在第 31 天時，第一片葉分化生長完成；在第 60 天時，長出第二片葉；在第 120 天時，開始長出第三片葉與根發育成完整植株 (圖 2)。此外，觀察小苗生長過程中發現，小苗易遭受蟲害啃食與青苔等綠色黏稠狀物質覆蓋 (未顯示)，因而影響後期小苗生長與存活之情形，將已存活之小苗個別移植至已滅菌之泥炭土介質，小苗可繼續正常生長發育 (圖 3)。

討論

蘭科植物種子非常細小，通常只發育至圓

表 4. 不同介質對台灣白及種子小苗生長之影響。

Table 4. Effects of growth media composition on the growth of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. seedlings^z.

Medium	Autoclave	60 d after sowing		120 d after sowing	
		Leaf number	Leaf span (mm)	Leaf number	Leaf span (mm)
1	No	1.0 c ^y	0.9 d	1.2 c	1.2 cd
1	Yes	1.0 c	0.8 d	1.2 c	1.3 cd
2	No	1.3 b	2.3 b	2.0 b	3.2 b
2	Yes	1.9 a	2.9 a	3.5 a	7.0 a
3	No	1.0 c	0.7 de	1.0 c	0.7 d
3	Yes	1.0 c	0.6 e	1.0 c	0.7 d
4	No	1.0 c	1.0 d	- ^x	-
4	Yes	1.1 c	1.4 c	2.0 b	1.8 cd
5	No	1.1 c	1.5 c	2.0 b	3.2 b
5	Yes	1.1 c	1.6 c	2.0 b	2.3 bc
Significance					
Media (Me)		** ^w	**	**	**
Autoclave (A)		**	**	**	**
A × Me		**	**	*	**

^z Seeds were taken from the capsule which was 120 d after pollination.

^y Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by least significant difference (LSD) test.

^x -: no seedling survived.

^w*, **: significant at 0.05 and 0.01 level, respectively.

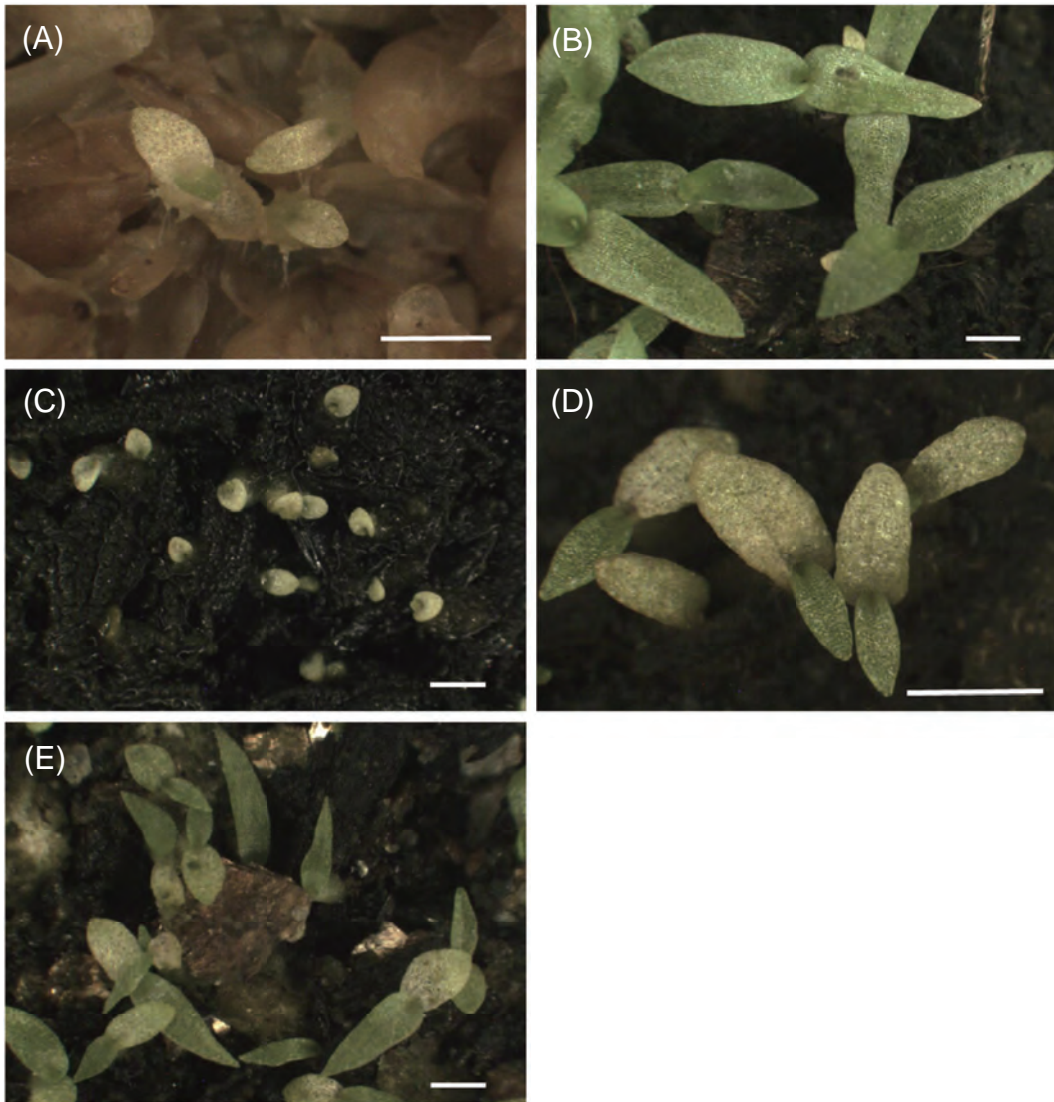


圖 1. 以授粉後 120 d 之台灣白及種子播種於已滅菌處理之 (A) 水苔; (B) 泥炭土; (C) 炭化稻殼; (D) 砂: 壤土: 炭化稻殼: 珍珠石 (1 : 1 : 1 : 1) 混合介質; (E) 砂: 炭化稻殼: 珍珠石: 蛭石 (1 : 1 : 1 : 1) 混合介質, 在播種後 120 d 小苗之生長情形。Bar = 1 mm。

Fig. 1. Growth of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. seedlings on different compositions of growth media after asymbiotic germination from seeds collected 120 days after pollination (DAP). Growth medium of (A) sphagnum moss; (B) peat moss; (C) carbonized rice husk; (D) sand : loam : carbonized rice husk : perlite = 1 : 1 : 1 : 1; (E) sand : carbonized rice husk : perlite : vermiculite = 1 : 1 : 1 : 1. Bar = 1 mm.

球胚期即停止發育, 屬於未成熟胚, 於野生狀態下必需藉由菌根菌 (mycorrhiza) 提供種子發芽養分才能繼續發育長成小苗 (Arditti 1966, 1967; Yamamoto *et al.* 2017)。過去的研究顯示, 蘭科植物種子之發芽及後續發育可藉由人工接種菌根菌, 藉由共生菌幫助種子水分與

養分之吸收並促進苗株生長 (Lin 2002; Kang 2004; Rasmussen *et al.* 2015; Alghamdi 2019; Yeh *et al.* 2019)。目前有關蘭科植物不藉由菌根菌共生或組織培養方式, 其種子仍可正常發芽並完成後續發育之相關研究甚少。Su (1996) 研究顯示, 於台灣白及生育地取樣土壤, 進行

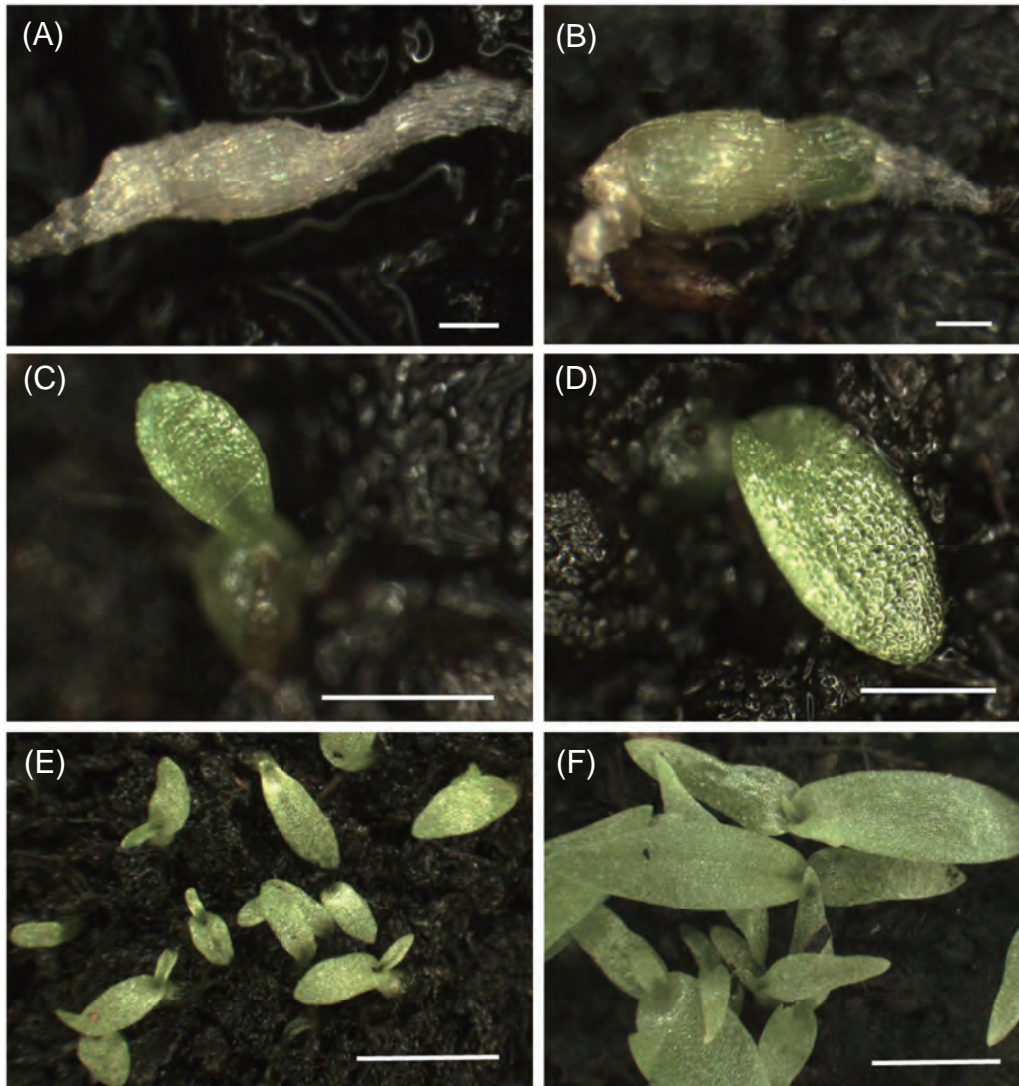


圖 2. 以授粉後 120 d 之台灣白及種子播種於已滅菌處理泥炭土介質，種子發芽與生長之情形。(A) 播種後 3 d；(B) 播種後 10 d；(C) 播種後 17 d；(D) 播種後 31 d；(E) 播種後 60 d；(F) 播種後 120 d。(A–B) bar = 0.1 mm；(C–D) bar = 1 mm；(E–F) bar = 3 mm。

Fig. 2. Germination and seedlings growth of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. Seeds were collected from a capsule in 120 days after pollinating and were sown in an autoclaved peat moss medium for (A) 3 d; (B) 10 d; (C) 17 d; (D) 31 d; (E) 60 d; and (F) 120 d. (A–B) bar = 0.1 mm; (C–D) bar = 1 mm; and (E–F) bar = 3 mm.

種子發芽與生長測試，結果顯示種子可發芽但僅能維持短期之生長。本研究以成熟自然開裂之台灣白及果莢種子，播種於自行混合之炭化稻殼：壤土：細砂（體積比 = 1 : 1 : 1）介質中，觀察發現台灣白及種子極易發芽，且可長成完整植株（資料未顯示），此種混合介質已有良好發芽與生長效果。因此，本試驗所使用之 2 種

混合介質不再添加泥炭土，並減少混合介質的複雜性，以評估是否有更好之發芽與栽培介質。另為排除播種介質中具有菌根菌的可能性，故進行較嚴謹之介質滅菌試驗，並測試不同授粉後天數之種子播種於滅菌之不同介質中，觀察種子發芽及小苗生長之情形，藉以證實台灣白及種子是否具有發芽與自營生長之特性。



圖 3. 從培養皿移植至含泥炭土生長 60 d 後台灣白及小苗生長情形。Bar = 1 cm。

Fig. 3. Growth of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. seedlings after transplanting from *in vivo* cultivation to sterilized peat moss medium for 60 d. Bar = 1 cm.

研究顯示蘭科植物種子成熟度會影響其發芽能力，蝴蝶蘭白花雜交種授粉後 110 d 採收之果莢於無菌播種後 10 d 即可發芽，若延至果莢黃熟甚至開裂才行播種，亦不影響種子發芽能力及原球體發育 (Tu & Lee 1988)。然在萬代蘭屬 (*Vanda*) (Helena Mathews & Rao 1980) 與喜普鞋蘭屬 (*Cypripedium*) (Harvais 1980) 的研究顯示，黃熟期果莢之種子於無菌播種後，種子不發芽或發芽率不佳，甚至影響小苗之生長。本研究取自 5 個不同授粉後天數之台灣白及種子，播種於 5 種完全滅菌之單一或混合介質中進行發芽 (表 2)，顯示授粉後 60 d 之種子即具有發芽能力，播種於泥炭土後 16 d 即可發芽。隨著種子成熟度增加，於授粉後 120 d (果莢黃熟) 及 165 d (果莢開裂後 15 d) 之種子分別播種於泥炭土、砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石及砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質，可縮短發芽天數於 9–10 d。此結果與 Tsao *et al.* (2011) 取授粉後 120 d 黃熟台灣白及果莢之種子，以無菌播種方式於播種後 8 d 可見種子發芽之時間相近，但與 Lin *et al.* (1994) 的研究指出果莢黃熟尚未開裂之種子無法發芽之結果不同，推測原因可能與材料來源、播種處理及培養方式不同而有所差異。除授粉後 90 d 之種子在未滅菌之炭化稻殼介質、砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石及砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質中發芽天數較滅菌介質短之外，大多數之介質滅菌與否並不影響不同

授粉後天數種子的發芽時間 (表 2)。惟對播種後之發芽率及存活率的影響，則極為顯著。授粉後 90 d 種子雖於未滅菌之炭化稻殼介質、砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石及砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質發芽天數較滅菌處理介質為短 (表 2)，但介質滅菌處理後其發芽率及存活率則較未滅菌處理介質高 (表 3)。結果顯示，滅菌處理可去除介質中有害微生物或延緩種子及小苗感染傷害，亦可能與未熟種子狀態有關。

本研究之結果顯示授粉後 60 d 種子雖然已具發芽能力，但小苗存活率低，顯示其種子成熟度仍不足 (未鏡檢)。授粉後 90 d 種子即具有良好之發芽能力，推測此時期之種子應已具備基本之成熟度，且隨著授粉後日數增加，種子成熟度增加，發芽率漸增。但是，此一趨勢在存活率方面表現不一致。在介質方面，除泥炭土介質與砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石混合介質有利於早期發芽，砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質亦有利於發芽，但在存活率方面，僅砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石混合介質 (滅菌) 之表現較為穩定。根據本研究結果顯示，高發芽率不一定相對應有高存活率，發芽率與存活率受種子成熟度、介質種類、滅菌處理因子以及因子間之交感效應等因素影響。授粉後 90 d 之種子，雖然播種於滅菌之砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石混合介質發芽率為 95.5%，但其小苗存活率僅 31.3%，而授粉後 120 d 之種子播種於滅菌之砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石混合介質之發芽率為 90.0%，小苗存活率可達 73.2%；而授粉後 165 d 之種子播種於滅菌之砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質雖發芽率為 93.2%，但存活率僅剩 6.6%，主要可能係後端生長過程中受到蟲害及苔癬等試驗干擾因子影響。授粉後 150 d 與 165 d 之種子分別播種於砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質與砂：壤土：炭化稻殼：珍珠石混合介質，發芽率分別為 76.5–79.6% 以及 82.4–83.2% 相對較高，但存活率則明顯以滅菌介質為佳，仍可達 71.8% 與 77.1%。顯示滅菌介質對小苗生長較為有利 (表 3)，亦需注意在培養過程中遭受外在生物入侵危害小苗生長。

不同介質顯著影響小苗生長與發育，以授

粉後 120 d 之種子播種於 5 種滅菌介質後 120 d，顯示出以富含有機質之泥炭土介質為最佳，可能與台灣白及屬於地生蘭 (terrestrial orchid) 之習性有關。小苗生長與發育較快速，其次為砂：炭化稻殼：珍珠石：蛭石混合介質，最差者為單一介質之水苔及炭化稻殼，小苗生長與發育極為緩慢 (表 4、圖 1)。根據研究顯示，蘭科植物種子在環境適宜時，吸水發芽後其胚膨大突出種皮，此時已有葉綠素形成，但無光合作用能力，於野生狀態下若無菌根菌共生，則無法繼續發育完整植株 (Juang & Lee 1985; Lee 1990)。本研究以授粉後 120 d 之種子播種於滅菌泥炭土介質，觀察台灣白及種子發芽與分化發育之過程，顯示播種後第 10 天之種子胚已膨大轉為綠色，並於第 120 天開始長出第三片葉與根系生長，生長成完整植株 (圖 2)。而將存活之單株小苗移植至已滅菌處理之泥炭土介質可持續正常生長 (圖 3)，證實台灣白及可自行發芽，且不必藉由菌根菌即能自營生長。因此，只要選擇足夠成熟之種子，播種於適合之介質中並給予適量之水分，台灣白及種子無須借助菌根菌或組織培養即可正常發芽並分化成完整植株，與大多數蘭科植物種子之發芽機制有所不同。未來仍需更進一步探討台灣白及種子與其他蘭科植物在構造及胚養分含量與成分組成上是否具有差異性，造成其獨特的種子發芽與自營生長特性。

蘭科植物白及屬之台灣白及在授粉後 60 d 後的種子即有發芽能力，不需經由蘭菌共生與無菌播種之異營生長方式，且可經由種子成熟度與介質種類以及介質滅菌與否等因子來提高其瓶外播種之發芽率。在適量水分管理下即可成功發育成完整植株，顯示台灣白及具有自營發芽及生長之特性。在本研究眾多組合中，以授粉後 120 d 之種子播種於滅菌泥炭土介質中對種子發芽速度、發芽率及小苗生長最為有利，種子發芽率可達 90.0%，小苗存活率達 73.2%。顯示台灣白及種子發芽與生長偏好弱酸性，以及質地細緻鬆軟、透氣與保水之富含有機質之介質。此一自營發芽與成長之模式，雖然在小苗存活率、生長速度與培養效率不及無菌播種模式，但在許多原生地只要選擇適當成熟期種子與介質，即可就地成功培養出完整

小苗，不需借助組織培養設備及操作之配合，亦毋須人工接種菌根菌是其優點。此一模式將有助於台灣白及之簡易保存與在地繁殖，更有助原生蘭種之快速復育。

誌謝

本研究承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助論文審閱與校正，特此致謝。

引用文獻

- Alghamdi, S. A. 2019. Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi J. Biol. Sci.* 26:495–502. doi:10.1016/j.sjbs.2017.10.021
- Arditti, J. 1966. *Orchids. Sci. Amer.* 214:70–78. doi:10.1038/scientificamerican0166-70
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1–97. doi:10.1007/BF02858656
- Chang, G. H., T. E. Dai, S. C. Huang, C. Y. Tsao, W. T. Tsai, F. N. Wang, A. H. Chang, and F. W. How. 2006. Application of artificial textile fiber as growing medium for *Phalaenopsis* cultivation. *J. Taiwan Soc. Hort. Sci.* 52:71–80. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JTSHS.200603.0071
- Fu, Z. H., J. X. Zhang, H. L. Li, and B. Yang. 2006. Study on seed germination and rapid propagation of *Bletilla striata* Rchb. f. *J. Wuhan Bot. Res.* 24:80–82. (in Chinese with English abstract)
- Helena Mathews, V. and P. S. Rao. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. *Plant Sci. Lett.* 17:383–389. doi:10.1016/0304-4211(80)90171-6
- Harvais, G. 1980. Scientific notes on a *Cypripedium reginae* of northwestern Ontario, Canada. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 49:237–244.
- Juang, J. H. and N. Lee. 1985. Physiology of orchid seedling under symbiotic growth. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 31:189–200. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JCSHS.198512.0189
- Kang, C. W. 2004. Effect of orchid mycorrhizal fungi and plant growth substance on the growth and development of medical *Dendrobium* spp. Master Thesis. Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 69 pp. (in Chinese with English abstract)
- Lee, N. 1990. Embryo culture of orchids. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 36:223–244. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JCSHS.199012.0223

- Lin, C. F. 2002. Effect of Orchid Mycorrhizal Fungi on Seed Germination and the Seedling Growth of *Dendrobium*. Master thesis. Department of Horticulture. National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 78 pp. (in Chinese with English abstract)
- Lin, Y. J., C. C. Chuan, F. T. Yeh, N. Y. Chiu, and H. S. Tsay. 1994. Tissue culture of *Bletilla formosana*. I. The influence of seed maturity and pretreatment on seed germination and seedling development. *J. Agric. Res. China*. 43:40–50. (in Chinese with English abstract) doi:10.29951/JARC.199403.0004
- Masuhara, G. and K. Katsuya. 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. *Sci. Hort.* 37:331–337. doi:10.1016/0304-4238(89)90144-1
- Peng, L., X. D. Liu, H. Liu, and X. W. Liu. 2004. Tissue culture and rapid propagation of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. *Chinese Wild Plant Res.* 23:65. (in Chinese with English abstract)
- Rasmussen, H. N., K. W. Dixon, J. Jersáková, and T. Těšitelová. 2015. Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Ann. Bot.* 116:391–402. doi:10.1093/aob/mcv087
- Su, M. C. 1996. Preliminary study of the symbiosis *Bletilla formosana* in Taiwan. Master Thesis. Department of Forestry, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 77 pp. (in Chinese with English abstract)
- Tsao, C. Y., U. C. Chen, and C. N. Hsia. 2011. Effect of basal salts, active charcoal, and vegetable/fruit homogenates on seed germination and seedling development *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *in vitro* culture. *J. Taiwan. Agric. Res.* 60:77–88. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2011.06002.01
- Tu, M. C. and N. Lee. 1988. Effect of Nitrogen, sucrose concentration and light intensity on seed germination and seedling growth in *Phalaenopsis* white hybrid. *J. Chinese Soc. Hort. Sci.* 34:293–302. (in Chinese with English abstract) doi:10.6964/JCSHS.198812.0293
- Yamamoto, T., C. Miura, M. Fuji, S. Nagata, Y. Otani, T. Yagame, M. Yamato, and H. Kaminaka. 2017. Quantitative evaluation of protocorm growth and fungal colonization in *Bletilla striata* (Orchidaceae) reveals less-productive symbiosis with a non-native symbiotic fungus. *BMC Plant Biol.* 17:50. doi:10.1186/s12870-017-1002-x
- Yeh, C. M., K. W. Chung, C. K. Liang, and W. C. Tsai. 2019. New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Appl. Sci.* 9:585. doi:10.3390/app9030585
- Zhu, Y. Q. and X. G. Wang. 1999. Fast propagation techniques of *Bletilla ochracea* by means of tissue cultures. *J. Zhejiang For. Coll.* 16:164–169. (in Chinese with English abstract)

Effects of Seed Maturity and Growth Media Composition on *In Vivo* Asymbiotic Germination of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.

Chin-Yi Tsao¹, Uei-Chern Chen², Tzu-Ying Wu³, and Chi-Ni Hsia^{4,*}

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2021. Effects of seed maturity and growth media composition on *in vivo* asymbiotic germination of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(2):129–139.

This study was conducted to verify the effects of seed maturity, growth media composition and media sterilization on *in vivo* asymbiotic germination and seedlings growth of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. Seeds collected from pods 60, 90, 120, 150 and 165 d after pollination (DAP) were sown on autoclaved or non-autoclaved media, including sphagnum moss (medium 1), peat moss (medium 2), carbonized rice husk (medium 3), and mixed media of sand : loam : carbonized rice husk : perlite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v) (medium 4) and sand : carbonized rice husk : perlite : vermiculite = 1 : 1 : 1 : 1 (v/v) (medium 5). Results showed that seeds of *B. formosana* were able to germinate and to grow normally on various autoclaved media. Growth media composition, seed maturity and their interactions were found to have statistically significant effect on days needed for germination. However, a less significant effect was found between autoclaved media and seed matured after 120 DAP. In this study, immature 60 DAP seeds were capable to germinate, and the shortest time for germination was observed in 165 DAP seeds. Factors of growth media, autoclave and seed maturity as well as their interactions showed significant effects ($P < 0.01$) on seed germination. It was observed that seeds of 90 DAP had germination rates higher than 80% in the appropriate growth media, and the highest germination rate was found on the autoclaved peat moss (84.1%), followed by the autoclaved medium 4 (81.1%), and the autoclaved medium 5 (72.6%). Although survival rates of seedlings derived from different maturity of seeds sown in various media with or without an autoclave with no consistency, it was found that seeds of 120 DAP sown in appropriate growth media had survival rates higher than 70%. An separated experiment using seeds of 120 DAP was conducted by sowing seeds in various autoclaved or non-autoclaved growth media for evaluation of seedlings growth. Results showed that factor of an autoclave work and types of media as well as their interactions all had statistically significant effects at 0.01 level. It was found that autoclaved peat moss showed the best result on the growth of seedlings. In average, 3.5 leaves and 7.0 mm in leaf span were found per plant. The results confirmed that *B. formosana* had autotrophic feature during seed germination and seedling growth when mature seeds were germinated on appropriate growth medium. It was observed that embryos of seeds were enlarged and turned into green in 10 d after sowing, and the first leaf appeared in 17 d after sowing from protocorms, and a complete plant with roots was obtained in 120 d after sowing. Growth media and maturity of seeds and their interactions were all found had significant effects on days needed for germination. However, a less significant effect by an autoclave was found from the more mature seeds (≥ 120 d). Factors of growth media, autoclaving and seed maturity as well as their interactions showed significant effects ($P < 0.01$) on seed germination and survival of seeding.

Key words: Orchid seed, Asymbiotic germination, Orchid mycorrhiza.

Received: December 31, 2020; Accepted: March 1, 2021.

* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

¹ Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.