

玉花四季蘭種子低發芽率致因

林淑婷¹⁾、張正¹⁾

¹⁾ 國立中興大學園藝學系前研究生及副教授(通訊作者)

地址：台中市南區國光路 250 號

電話：04-22840340#803

傳真：04-22860574

電子信箱：chenchang@dragon.nchu.edu.tw

摘要：本試驗以人工自花授粉之玉花四季蘭種子進行播種，探討種子發芽困難的原因及改善方法。玉花四季蘭授粉後 14 週之種子經無菌播種即具有發芽能力，授粉後 22 週種子發芽率較高，僅為 4.2%。授粉後 24 週後的種子發芽率逐漸下降，授粉 28 週後的胚大小不再增加。經切片解剖及染色證明授粉後第 36 週之種子已具有木質化的種皮構造，且胚體外已形成不透水角質層，以次氯酸鈉溶液或超音波震盪處理可破壞外種皮的結構或使種皮與胚分離，並可提高種子發芽率；經 TTC 染色顯示高達 75.9%的胚具有活性，然經種子處理之發芽率僅提高到 22.2%。

關鍵詞：玉花四季蘭、種子發芽、種皮、角質層

前 言

四季蘭〔*Cymbidium ensifolium* (L.) Sw〕為蘭科蕙蘭屬地生習性的植物(Du Puy and Cribb, 2007)，為重要的外銷花卉作物。臺灣將四季蘭歸類於國蘭，四季蘭佔國蘭總裁培量 55.6%，而玉花四季蘭(*Cym. ensifolium* ‘Yuh Hwa’)栽培量佔四季蘭 10.2 %，僅次於鐵骨素心蘭及金針四季蘭 (洪等, 2010)。近年來玉花四季蘭生長勢減弱，育成率降低等品種退化的徵兆，對健康種苗的需求日漸重視，有關組織培養研究日益增加(Lu, *et al.*, 2001；金等, 2007^a；金等, 2007^b；林, 2009；張與陳, 2010)。

陳(2011)無菌播種六種臺灣原生地生性蕙蘭，三個月後種子發芽率介於 0.29%-14.28%之間，呂等(1992)以素心蘭授粉後 190 天以上之種子播種，最高發芽

率僅 1.1 %，顯示國蘭種子發芽率極低。Kano (1968)、Van Waes and Debergh (1986^a)及 Rasmussen (1995)認為蘭科植物種子之外種皮會阻礙水分的通透性。以超音波震盪處理報歲蘭、素心蘭(李, 1991)及根節蘭[(*Calanthe discolorr*) Lindl.] (Miyoshi and Mii, 1988)種子可破壞外種皮之完整性，進而提升發芽率。

Van Waes and Debergh (1986a; 1986b)使用 5 %氯化鈣處理多種原生於西歐的蘭科植物之種子，顯示氯化鈣會造成外種皮氧化而產生裂縫。又奇萊喜普鞋蘭(*Cypripedium macranthos* Sw.)以次氯酸鈉及次氯酸鈣溶液進行浸種處理，也有助於打破種子發芽的物理性障礙(Miyoshi and Mii, 1998b)。

本試驗目的為探討玉花四季蘭成熟種子低發芽率之原因及改善方法，首先測定授粉後不同週齡種子發芽能力，再以授粉後 36 週之種子進行種子活力及染色觀察胚體組成，另外使用超音波震盪處理或次氯酸鈉溶液處理後播種培養以提高種子發芽率，以探究玉花四季蘭低種子發芽率之可能原因。

材料與方法

一、植物材料與無菌播種培養基製備

本試驗植物為玉花四季蘭，購自台中市新社區，種植在國立中興大學園藝試驗場。栽種容器為 5 吋黑色塑膠軟盆，以三分碎石栽植，依國蘭慣行栽培法管理，於夏季開花期自每一花序上行自花授粉兩朵，待結實後供試。

播種培養基以 MS 配方為基礎(Murashige and Skoog, 1962)，除含鐵化合物濃度不變外，其餘鹽類濃度降低至 1/10 濃度，全量 MS 維生素及 Glycine、myo-Inositol $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaH_2PO_4 $170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Peptone $1 \text{ m} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Sucrose $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，另添加椰子水 $150 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ 、活性碳 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，將 pH 值調整為 5.2 後加入 Agar(光惠, 台灣) 8 g/L 微波加熱至沸騰，注入 $20 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ Pyrex (no. 9820)玻璃試管中。將培養基以 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 1.2 kg cm^{-2} 條件下滅菌 15 分鐘後斜放冷卻製作成斜面培養基供試。

二、試驗方法

(一) 果實及種子發育觀察

授粉後第 16-32 週期間，每 4 週進行種子取樣，將種子混合均勻後取樣 3 份

測量其鮮重，隨後置於 70 °C 烘箱內烘乾 72 小時，取出測量乾重並計算種子含水量，每個蒴果為一重複，所有測量皆為 3 個重複。種子含水量 = (鮮重 - 乾重) ÷ 鮮重 × 100 %。

取授粉後第 16-32 週之種子置於滴上甘油的玻片，以蓋玻片覆蓋，再以光學顯微鏡(Primo Star, ZEISS)及微尺測量種子與胚的大小，每個蒴果隨機抽樣 300 個種子計算含胚率及 30 個含胚之種子和胚的長寬大小。

(二) 授粉後週數對於種子發芽試驗

授粉第 14-46 週期間，每隔 4 週採樣 3 個蒴果進行無菌播種，先以 75 % 酒精擦拭果實表面，再以 200 ml 的 1 % 次氯酸鈉溶液(Clorox®，含 6 % 有效氯)與 1 滴 Tween 20 以超音波震盪處理滅菌 12 分鐘後於無菌操作台內取出，經無菌水漂洗 3 次，將子房切開播種。

授粉第 14 週及第 18 週之種子連同胎座刮下進行培養，其它週數之處理則將種子與胎座分離取出後混合均勻，播種於播種培養基表面。每個蒴果為一個重複，每個重複播種 12 支試管，每支試管約 150-180 顆種子。於播種後第 4 週進行觀察胚突破種皮的數量，觀察至播種第 28 週。種子發芽百分率為試管內「總播種種子數 ÷ 總發芽種子數 × 100 %」。培養環境之溫度 25±2 °C、光度 2 μmol · m⁻² · S⁻¹、光週期每日 12 小時光照。

(三) 種子前處理及 2,3,5-tetrazolium triphenyl chloride 活力檢測及發芽試驗

種子活力檢測方法修改自 Vujanovic *et al.* (2000)，將授粉後 36 週之三個蒴果種子取出並混合均勻並隨機取樣置放於 50 mL 離心管中，取種子進行處理。

配製 2,3,5-tetrazolium triphenyl chloride (TTC, Sigma. Co.) 溶液時先行配磷酸緩衝液，再以磷酸緩衝液溶解 TTC。配製磷酸緩衝液過程如下：取 9.078 g 的 KH₂PO₄ 溶於 1000 ml 的去離子水稱溶液 1，取 9.472 g 的 Na₂HPO₄ 溶於 1000 ml 的去離子水稱溶液 2。緩衝液為兩份溶液 1 與三份溶液 2 混合，將 5 g TTC 溶於 1 L 緩衝液，pH 調整到 6.5。

播種前處理分別為以加有 Tween 20 展著劑的 0.5 % 次氯酸鈉溶液以超音波震盪滅菌 10 分鐘、手搖滅菌 10、20 分鐘，及將種子裝至 50 ml 離心管並加滿逆滲透水後以超音波震盪處理 10、20 及 30 分鐘等，上述之處理皆以逆滲透水沖洗三次再行無菌播種，對照組為未處理之種子及以人工切除種子種

皮處理。

預處理後將種子置於含 0.5 % TTC 的固定瓶中，並放置於 27.5 °C 黑暗環境下 24 小時，隨後以顯微鏡觀察胚的染色表現，將胚呈粉紅色或紅色者判定為具有活力，所有處理重複兩次，每次重複得到的染色百分率為 5 個數據平均值，每個數據則由 70-100 個胚進行估算。

將授粉後 36 週之蒴果滅菌後於無菌操成台內剖開，經前述前處理的種子進行無菌播種，每個蒴果為一個重複，每個重複播種 8 支試管，每個重複約 120-140 粒種子，於播種後當週開始觀察胚突破種皮的數量。使用 Duncan's 多變域分析比較處理間的差異。培養環境之溫度 25 ± 2 °C、光度 $2 \text{ umol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$ 、光週期為每日光照 12 小時。

(四) 石蠟切片觀察種子內部構造

種子石蠟切片的製作方法修改自蔡(1975)之方法，將種子以 F.A.A. [Formalin : Acetic acid : 50 % Alcohol = 5 : 5 : 90 (v/v)] 固定，利用真空抽氣馬達抽氣，再經脫水、滲蠟、埋蠟、以轉動式切片機(820 HsitoSTAT, Reichert) 將材料切成 11 μm 厚度之蠟帶。經展片、乾燥，並以 1 % Safranin 及 0.5 % Fast green 染色。以封片膠(Assistant. Co.)封片，蓋上蓋玻片，置於 42 °C 烘箱內乾燥，以光學顯微鏡(Primo Star; ZEISS)觀察種子與胚的構造並以相機(PowerShot A640, CANON)照像記錄。

(五) 掃描式電子顯微鏡

掃描式電子顯微鏡的樣品處理及操作參考 Chang *et al.*, (2005) 的方法，取經不同之處理的玉花四季蘭種子放置於含有 2.5 % 戊二醛之 0.1 M, pH 7.0 之磷酸緩衝溶液固定瓶內，於 5 °C 下固定 2 小時，移除 2.5 % 戊二醛溶液，以磷酸緩衝液沖洗 3 次，每次約 15 分鐘。接著以酒精-丙酮系列脫水。以臨界乾燥機(HPC-2 Critical Point Dryer, HITACHI, Japan)將樣品乾燥，再經鍍膜儀(E-1010 ION SUPTTER, HITACHI, Japan)鍍金 100 秒，以掃描式電子顯微鏡(S-3500N, HITACHI, Japan)在電壓 15kV 下觀察種皮構造並拍照紀錄。

結 果

一、種子發育觀察

玉花四季蘭授粉後時間與種子發育具相關性，授粉後第 16 週至第 20 週之種子含水量為 92.5%-87.7%，至第 28 週時開始有顯著的下降(表一)。於授粉後 24 週 87%種子可於 100 倍光學顯微鏡下觀察到胚體，於第 28 週及 32 週時，種子有胚率達 92.0%-93.2%。

由授粉後第 16 週開始觀察種子發育，至第 28 週到 32 週種子長度與寬度與胚的長度即沒有顯著的增加，而胚的寬度於第 24 週後即沒有顯著增加(表一)，推測授粉後第 28 週之種子發育已接近成熟階段，第 32 週之種子為成熟的種子。

表一、玉花四季蘭在授粉後不同周數之種子及胚發育

Table 1. Seed and embryo development of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' after pollination

Parameter	Weeks after pollination(WAP)				
	16	20	24	28	32
Water content (%)	92.5± 0.9 a ^z	91.9± 0.4 a	87.7± 1.2 a	77.8± 3.0 b	64.2± 3.7 c
Embryo present (%)	- ^y	-	87.0± 4.0 b	92.0± 2.0 ab	93.2± 1.2 a
Length of seed (µm)	496.0±76.4 d	912.2±29.6 c	1174.2±63.9 b	1221.9±17.3 ab	1274.7±24.7 a
Width of seed (µm)	114.7± 5.8 c	128.2± 3.4 bc	132.4± 9.4 b	142.9± 9.1 ab	150.6± 9.2 a
Length of embryo (µm)	-	-	184.5±19.3 b	223.1± 3.8 a	231.3± 4.8 a
Width of embryo (µm)	-	-	107.1± 2.3 a	106.5± 2.8 a	114.4± 9.4 a

^z Data was analyzed by Duncan's Multiple Test, the same letters were not significantly different at $P < 0.05$.

^y Embryos were not present and can't be measured.

二、種子發芽

以不同授粉後週數的種子進行播種試驗。播種後胚突破種皮即視為發芽。若以自花授粉 14 週後的蒴果進行無菌播種，於播種後第 12 週即有種子發芽，以授粉後 22 週之種子的發芽率較高，培養 28 週時的發芽率為 4.2%，其次為授粉後 26 週之種子，發芽率為 3.7%。結果顯示授粉 22 週後之發育成熟度愈高則發芽率愈低，授粉第 38 週後的種子發芽率皆不高於 2% (表二)。

表二、授粉周數對玉花四季蘭無菌播種發芽率的影響

Table 2. Effects of the capsule maturity on seed germination *in vitro* of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa'

After pollination (wks)	Seed germination (%)			
	4 wks ^z	12 wks	20 wks	28 wks
14	0 ± 0 c ^y	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 e
18	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 e
22	0.2 ± 0.0 a	1.6 ± 0.4 a	3.1 ± 0.8 a	4.2 ± 0.8 a
26	0.1 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.1 b	2.4 ± 0.4 b	3.7 ± 0.5 ab
30	0 ± 0 c	0.9 ± 0.3 bc	1.9 ± 0.4 bc	3.1 ± 0.6 bc
34	0.1 ± 0.1 bc	1.1 ± 0.4 c	1.9 ± 0.4 bc	2.8 ± 0.5 c
38	0.1 ± 0.1 b	0.6 ± 0.2 c	1.3 ± 0.2 c	2.0 ± 0.4 d
42	0.1 ± 0.1 b	0.8 ± 0.1 bc	1.3 ± 0.2 c	1.7 ± 0.1 d
46	0.1 ± 0.0 bc	0.8 ± 0.2 bc	1.6 ± 0.2 c	2.0 ± 0.2 d

^z The number is mean the duration of weeks after sown.

^y Data was analyzed by Duncan's Multiple Test, the same letters were not significantly different at $P < 0.05$.

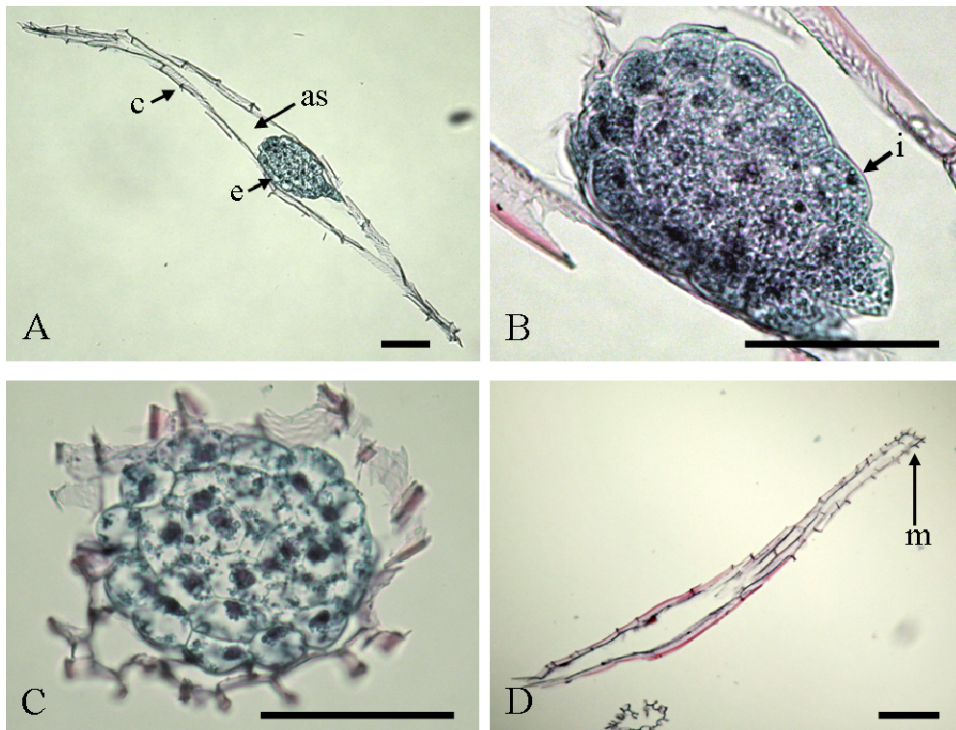
三、種子構造與解剖

種子切片可清楚觀察種子構造，種皮與胚之間有氣室構造產生(圖一 A)，切片經染色處理後，可觀察單層的外種皮(outer integument)構造(圖一 B、C)，經染色後呈現紅色，表示外種皮係由木質素所構成，而胚細胞之細胞質呈現藍綠色，而細胞核則呈現深紫色(圖一 A-C)，種子的基端具有一個開口，為珠孔端(圖一 D)。觀察玉花四季蘭之胚的外層部位為內種皮(inner integument)構造(圖二 A)，另以尼羅紅(Nile Red)染劑進行染色，隨後利用螢光顯微鏡進行觀察，玉花四季蘭的胚外層呈現螢光表現，此區域累積角質。(圖二 2B)

四、種子活力檢測

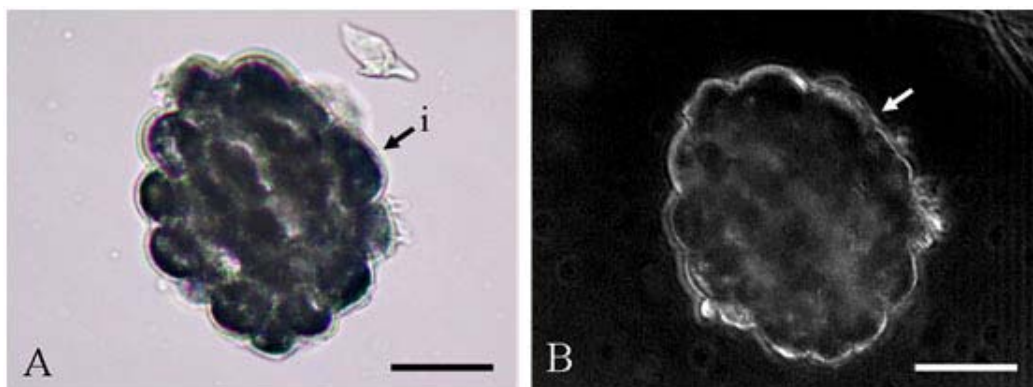
將成熟種子進行不同之處理後以 0.5% TTC 染色，胚具有活力者會進行呼吸作用，藉由呼吸作用所產生的琥珀酸脫氫酶還原氧化態的 TTC，因此，胚呈現粉紅或紅色即視為具有活力。未處理之種子以 TTC 染色有 15.6 % 呈現活力(表三)，以超音波震盪 10 分鐘之處理，TTC 染色呈色為 41.3 %，與以人工方式切除部分種皮之染色呈色相近，推測超音波震盪處理 10 分鐘僅

影響種皮構造。種子以 0.5%次氯酸鈉溶液手搖處理 20 分鐘對種皮的影響較處理 10 分鐘大，因此，胚體染色呈色率為其的 1.5 倍。以 0.5%次氯酸鈉溶液超音波震盪處理 10 分鐘，TTC 染色呈色率為 70.9 %，較以無菌水超音波震盪 10 分鐘或 0.5 %次氯酸鈉溶液手搖 10 分鐘之染色呈色率高。以超音波震盪處理 30 分鐘，75.9 %胚具活力，當中 44.3 %的比例為胚呈現紅色，超音波震盪處理時間愈長則種皮的被破壞程度愈高，因而胚的分離率上升，未使用超音波震盪處理者皆無胚分離的現象(表三)。



圖一、切片觀察玉花四季蘭種子之構造。(A)完整種子；(B)胚之縱切面及外披內種皮；(C)胚之橫切面及單層細胞種皮；(D)種子末端具有一個珠孔構造
E：胚；as：氣室；c：種皮；m：珠孔；i：內珠被。Scale bar = 100 μm.

Fig. 1. The morphology, seeds paraffin section of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa'. (A) The seed was 252 days after pollination. (B) The inner integument cover the embryo. (C) A layer of seed coat. (D) The micropyle in the end of seed. e: embryo. as: air space. c: seed coat. m: micropyle. i: inner integument. Scale bar = 100 μm.



圖二、玉花四季蘭種子以尼羅紅染劑染色。(A)染色前的胚切面；(B) Nile red 染色後呈現螢光的角質區域(arrow) i：內珠被

Fig. 2. Embryo staining of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' tested by Nile red. (A) The embryo was 252 days after pollination. (B) The fluorescence was cutinized layer cover the embryo (arrow). i: inner integument. Scale bar = 50 μ m.

表三、種子處理對玉花四季蘭種子被 2,3,5-tetrazolium triphenyl chloride 染色^z之影響

Table 3. Effects of seed treatments on embryo staining of seeds of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' tested by 0.5 % 2,3,5-tetrazolium triphenyl chloride

Seed treatment	Embryo staining (%)		Isolated embryos ^y (%)
	Pink color ^y	Red color ^y	
Non-treatment	8.6	6.4	0.0 C
Cut the seed coat	23.8	23.0	0.0 C
NaOCl 10 mins	23.6	9.2	0.0 C
NaOCl 20 mins	28.9	19.7	0.0 C
NaOCl + Ultrasonic wave 10 mins	33.7	36.5	9.8 B
H ₂ O + Ultrasonic 10 mins	23.7	17.1	11.4 B
H ₂ O + Ultrasonic 20 mins	26.2	28.9	16.5 A
H ₂ O + Ultrasonic 30 mins	31.6	44.3	21.8 A

^z The embryos staining are pink or red color.

^y Data was analyzed by Duncan's Multiple Test ($P \leq 0.05$).

五、種子處理

玉花四季蘭的成熟種子以 0.5 %次氯酸鈉溶液手搖、超音波震盪處理，或以無菌水進行超音波震盪處理，處理後播種培養 28 週，以有超音波震盪處理之種子的發芽率較高，當中以超音波震盪 30 分鐘之處理的發芽率高達 22.2 %，0.5 %次氯酸鈉溶液比以水溶液進行超音波震盪處理之發芽率較高，但無顯著差異性。0.5 %次氯酸鈉溶液手搖處理 10 及 20 分鐘之結果有顯著差異，處理 20 分鐘之發芽率為處理 10 分鐘的 4.2 倍(表四)。未處理之種子的種皮結構完整，種子以 0.5 %次氯酸鈉溶液手搖處理 10 分鐘會造成種皮氧化，但以超音波震盪處理 10 分鐘即可有明顯的裂縫形成，隨著處理時間愈長則種皮的完整性愈低(圖三)。

討 論

蕭(1978)研究指出素心蘭於授粉後第 16 週形成合子，第 20-24 週為原胚期((proembryo stage)，素心蘭與玉花四季蘭在分類上為同一物種的不同品種，以二者相互對照比較，玉花四季蘭於授粉後第 14 週的種子經無菌播種已有部份可以發芽，顯示形成合子的時間早於素心蘭。玉花四季蘭授粉後 28 週之種子的含水量明顯下降，胚的長度與寬度大小已固定，表示此時期的胚已接近發育形態最大化，達球形胚階段(表一)。

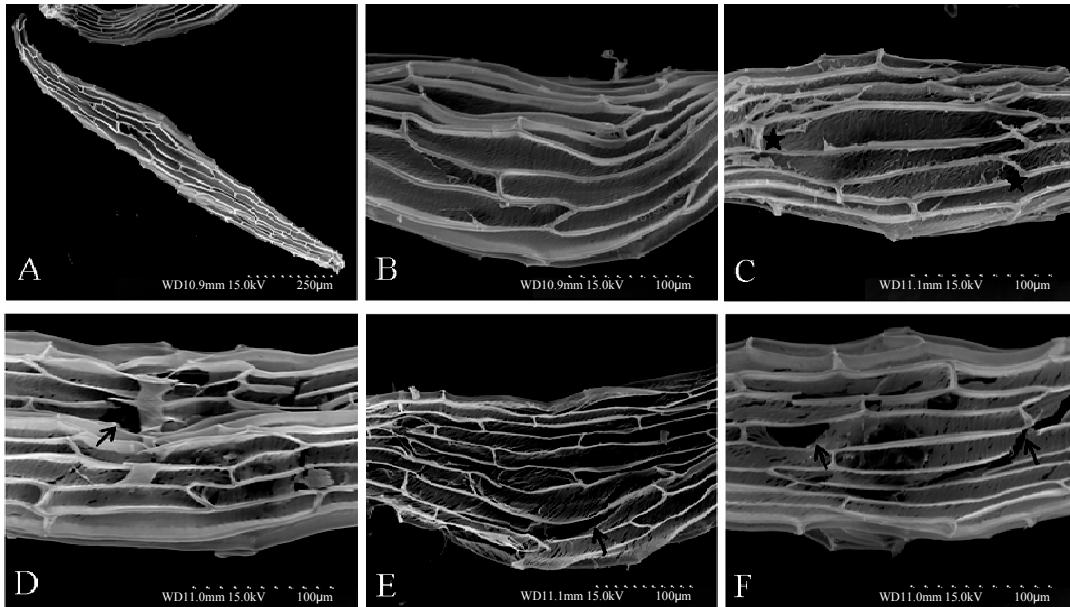
表四、種子處理對玉花四季蘭種子發芽之影響

Table 4. Effects of seed treatments on seed germination of *in vitro* of *Cymbidiumensifolium* 'Yuh Hwa'

Seed treatments	Seed Germination (%)			
	4 wks ^z	12 wks	20 wks	28 wks
NaOCl 10 mins	0.2 ± 0.1 c ^y	0.8 ± 0.1 c	1.6 ± 0.4 e	2.3 ± 0.2 d
NaOCl 20 mins	0.3 ± 0.1 c	3.4 ± 0.5 c	6.2 ± 0.5 d	9.7 ± 1.1 c
NaOCl-Ultrasonic 10 mins	0.6 ± 0.2 c	4.0 ± 0.7 c	7.6 ± 0.8 cd	12.1 ± 1.2 c
H ₂ O+Ultrasonic 10 mins	1.2 ± 0.3 bc	4.0 ± 0.4 c	8.5 ± 0.7 c	10.8 ± 0.8 c
H ₂ O+Ultrasonic 20 mins	1.7 ± 0.9 b	9.6 ± 1.2 b	14.6 ± 1.8 b	18.4 ± 2.4 b
H ₂ O+Ultrasonic 30 mins	5.0 ± 1.0 a	12.7 ± 0.9 a	17.6 ± 1.2 a	22.2 ± 1.4 a

^z The number is mean the duration of weeks after sown.

^y Data was analyzed by Duncan's Multiple Test, the same letters were not significantly different at $P < 0.05$.



圖三、超音波震盪及次氯酸鈉溶液處理對玉花四季蘭種皮之影響。(A)&(B)未經處理之種子；(C) 0.5 % 次氯酸鈉溶液手搖處理 10 分鐘；(D)水中超音波震盪處理 10 分鐘；(E)水中超音波震盪處理 30 分鐘；(F)0.5 % 次氯酸鈉溶液中超音波震盪處理 10 分鐘。箭頭標示種皮破損處

Fig. 3. Seed coat after ultrasonic wave and sodium hypochlorite solution treatment of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa'. (A)&(B) Non-treatment of the seed. (C) The seed in order to deal with 0.5 % NaOCl solution for 10 minutes. (D) The seed in ultrasonic wave with water for 10 minutes. (E) The seed in ultrasonic wave with water for 30 minutes. (F) The seed in ultrasonic wave with 0.5 % NaOCl solution for 10 minutes. arrow: cracks. star: the seed coat is degraded.

從無菌播種的調查顯示，玉花四季蘭於授粉後第 14 週(98 天)之種子即具有發芽能力，且胚僅發育於原胚至球形胚期的階段，胚細胞數目少，發芽不易，故發芽率相當低，玉花四季蘭在授粉後 22 週(154 天)之胚細胞仍在發育(表一)，之後發芽率隨著種子的成熟度增加而下降(表二)。

以授粉後 36 週(252 天)的種子進行 TTC 染色處理的結果顯示，未經處理的種子只有 13%比例的胚可以染成紅色，而剪除種皮的胚則可以有 46.8%的胚染成紅色，顯示玉花四季蘭的種皮會阻礙染劑通透進入種子及胚。使用次氯酸鈉處理 20 分鐘，有 48.6%的種子的胚可以染成紅色，效果類似剪除種皮，由電子顯微鏡觀

察的結果顯示，可造成種皮產生破裂，有利於水分的通透並進入種子內部。

超音波的處理可以造成種子與胚分離，以解除種皮障礙，但胚染出紅色的比例也隨著處理的時間增加而增加，可高達 75.9%種子可以染出紅色(表三)，顯示超音波的處理可以解除胚體外層存在的不透水角質層的障礙，使染劑可以進入胚內部而染色。

以上的結果顯示玉花四季蘭種子發芽存在著種皮障礙及胚體外層的角質層障礙，若以種子處理的方法確實可以解除部份障礙，而提高種子發芽率近十倍(由 2.3%提高到 22.2%)(表四)。

玉花四季蘭的種子發芽低的原因除了種皮及胚體外層角質層之外，應尚有影響力更大的因子存在，因為 TTC 染色有 77.5%種子有活力，而經處理的發芽率雖提高 10 倍，但也僅有 22.2%種子發芽，這個影響玉花四季蘭種子發芽能力的因子未明，尚待更進一步的研究。

參考文獻

- 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: 161-169。
- 李志仁。1991。報歲蘭與素心蘭之開花與種子無菌發芽之研究。國立台灣大學園藝研究所碩士論文。台北。
- 金花、樸炫春、廉美蘭、潘虹虹。2007a。玉花蘭組培根狀莖的增殖因素研究。林業應用技術 4: 8-9。
- 金花、樸炫春、廉美蘭、楊金鳳、樸美英。2007b。玉花蘭綠芽分化及生根的組織培養條件研究。安徽農業科學 35: 376-377, 379。
- 林淑婷。2009。玉花四玉蘭無菌播種與根莖繁殖。國立中興大學園藝學研究所碩士論文。台中。
- 洪惠娟、郭珮琪、魏芳明。2010。臺灣國蘭產業及外銷作業調查。臺中區農業改良場研究彙報 109: 29-40。
- 張正、陳威臣。2010。國蘭種苗繁殖。p.42-54。刊於：洪惠娟等編著。國蘭生產作業手冊。台中區農業改良場編印。彰化。135p。
- 陳慈華。2011。臺灣原生蕙蘭屬植物之種子外觀形態及無菌發芽。國立中興大學

- 園藝學系學士論文。台中。
- 蔡淑華。1975。植物組織切片技術綱要。茂昌圖書有限公司。台北。
- 蕭揚區。1978。觀音素心蘭子房發育與種子形成之研究。國立台灣大學植物研究所碩士論文。台北。
- Chang, C., Y. C. Chen, and H. F. Yen. 2005. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. Bot. Bull. of Acad. Sinica, 46: 71-74.
- Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. The classification of *Cymbidium*. p.263-276. In The genus *Cymbidium*. Timber Press, Oregon.
- Kano, K. 1968. Acceleration of the germination of so-called "hard to germinate" orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 37: 690-698.
- Lu, I. L., E. Sutter, and D. Burger. 2001. Relationships between benzyladenine uptake, endogenous free IAA levels and peroxidase activities during upright shoot induction of *Cymbidium ensifolium* cv. Yuh Hwa rhizomes *in vitro*. Plant Growth Regul. 35: 161-170.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor* in asymbiotic culture. Sci. Hort. 35: 127-130.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain.
- 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.
- Vujanovic, V., M. St-Arnaud, D. Barabe, and G. Thibeault. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. Ann. Bot. 86: 79-86.

The Causes of Low Germination Rate of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' *in vitro*

Shu-Ting Lin¹⁾、Chen Chang²⁾

¹⁾ Former Graduate Student in Master Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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

TEL: 886-4-22840340#803

FAX: 886-4-22860574

E-mail: chenchang@dragon.nchu.edu.tw

Summary: The handed self-pollination capsules of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' were used for germination *in vitro* and discussed the reasons about low germination percentage. The seeds of *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa' did not get the germination ability until 14 weeks after handed self-pollination. The seeds had the highest germination percentage at 22 weeks after pollination (WAP) of 4.2 %. The embryos of those seeds were developed until 28 WAP. At 36 WAP, the seeds had lignification of the outer integument. The use of sodium hypochlorite solution or ultrasonic wave treatment could structural damage outer integument, and then obtain the highest germination percentage. Seeds germination was restricted by lignified outer integument. Through the test of 2,3,5-tetrazolium triphenyl chloride (TTC), there were 75.9% seeds with vigor embryo, but through aseptic sowing and pre-treatment, only 22.2% seed germinated. Based on the foregoing, some unknown factors effect on the germination will be explored in the future study.

Key words: *Cymbidium ensifolium* 'Yuh Hwa', seed germination, integument, cuticle

