

培養基鹽類配方、活性碳與蔬果添加物對台灣白及無菌播種之影響¹

曹進義² 陳威臣² 夏奇鈺^{2,3}

摘 要

曹進義、陳威臣、夏奇鈺。2010。培養基鹽類配方、活性碳與蔬果添加物對台灣白及無菌播種之影響。台灣農業研究 60:77-88。

本研究藉由 5 種不同鹽類配方 Kundson (Knudson 1946)、VW (Vacin & Went 1949)、全量及半量之 MS (Murashige & Skoog 1962) 以及花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19) 皆添加 0.8% Bacto agar 與 3% 蔗糖為基礎培養基，配合 0.1% 活性碳，以及不同含量之香蕉或馬鈴薯的添加，共 4 種試驗進行台灣白及黃熟果莢無菌播種，測試上述因子對台灣白及種子發芽與促進芽體生長發育之影響。試驗結果顯示取自黃熟果莢之種子在無菌播種，培養於 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 環境 8 天後即可發芽，培養 50 天後顯示出在 5 種不同鹽類配方與含有 0.1% 活性碳、香蕉或馬鈴薯蔬果添加物 (2.5、5.0、7.5、10%) 之培養基中，對種子發芽影響不顯著 ($P > 0.05$)，小苗單株鮮重於 1/2 MS 添加 0.1% 活性碳培養基中可達 20.0 mg，於 MS 添加 0.1% 活性碳培養基為 20.8 mg，而於 VW 添加 0.1% 活性碳培養基僅 7.4 mg，以 1/2 MS 配方培養基對小苗發育之促進效果最顯著；添加活性碳有助於小苗發育；添加香蕉或馬鈴薯皆可促進小苗鮮重的增加，而以馬鈴薯較香蕉為佳，其添加之最適濃度為 7.5%。因此，以 1/2 MS 鹽類，配合 0.1% 活性碳與 7.5% 馬鈴薯的添加為最佳台灣白及無菌播種與培養之培養基。

關鍵詞：台灣白及、種子發芽、小苗發育、瓶內培養。

前 言

台灣白及 [*Bletilla formosana* (Hayata) Schltr.] 為台灣特有種之蘭科植物，分布於台灣全境之平地與高山地區，與中藥材所用之白及 [*B. striata* (Thunb) Reichb. f.] 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 (Na *et al.* 1978)。白及主要以分株法繁殖，繁殖速率緩慢，無法滿足規模化種植的需求 (Lin *et al.* 1994; Yang *et al.* 2002)，且以無性分株方式繁殖，種苗易受病毒感染，並有種性退化之缺點 (Yang *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005)；此外因為白及原生地的減少與遭受破壞，使得台灣白及與中國大陸白及之野生族群

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2502 號。接受日期：100 年 3 月 31 日。

2. 本所生物技術組聘用助理研究員、助理研究員及副研究員。台灣 台中市。

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

正在快速減少中 (Lin *et al.* 1994; Zhu & Wang 1999; Fu *et al.* 2006)，中國已將白及列為珍稀瀕危的保護植物 (Peng *et al.* 2004)，並開始以組織培養方式進行繁殖研究，成效相當良好 (Peng *et al.* 2004; Yang *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005)。台灣白及在無菌播種方面早期有少量之研究，Lin *et al.* (1994) 指出台灣白及以胚發育期至魚雷前期 (torpedo) 之種子萌芽率最佳，並可利用雙氧水進行種子預措處理，達到提早發芽之效果。Yeh *et al.* (1995) 的研究則指出，MS (Musashiage & Skoog 1962) 基本鹽類及蔗糖為提供台灣白及原球體發育必要之營養成分，且經由 peptone、NAA 的添加以及配合光照處理可促進小苗之發育。台灣白及為台灣本土原生植物，可作為藥材及園藝觀賞之用，考量其野生族群正逐漸減少，值得吾人在種原保存及種苗繁殖方面加強研究開發。本研究以不同鹽類配方培養基配合活性碳、香蕉與馬鈴薯等蔬果有機物的添加，篩選出對於台灣白及無菌播種及瓶苗生長最佳之培養基組成，建立台灣白及組織培養大量繁殖體系。

材料與方法

試驗材料與消毒

本研究所使用之台灣白及採自宜蘭蘇花公路，由花蓮改良場蘭陽分場所提供。植株開花後以人工自花授粉，經 120 天後取尚未開裂之黃熟果莢作為無菌播種之用。果莢先以 70% 酒精進行表面消毒，再放入添加 Tween 20 展著劑之 0.6% 次氯酸鈉溶液中，以超音波震盪 1 分鐘，再以手搖震盪消毒 15 分鐘，其後以無菌水清洗 3 次，消毒後之果莢以解剖刀剖開後取出種子進行播種，並進行不同基本鹽類、添加 0.1% 活性碳之不同基本鹽類、香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳、馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響等共 4 種試驗。

基本鹽類配方培養基之影響試驗設計

無菌播種所使用之培養基其基本鹽類配方分別為 Kundson (Knudson 1946)、VW (Vacin & Went 1949)、全量及半量 MS (Murashige & Skoog 1962) 以及花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19, USA) 共 5 種，為單因子試驗，各處理 5 重複，以探討不同基本鹽類對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響，其中 VW 及 MS 為粉末商品 (Duchefa, Netherlands)。所有配方培養基皆添加 3% (30 g·L⁻¹) 蔗糖及 0.8% (8 g·L⁻¹) Bacto agar (Difco, USA)。

0.1% 活性碳添加之影響試驗設計

以上述培養基添加單一 0.1% (g·L⁻¹) 活性碳，採每一處理各 5 重複的單因子試驗，以探討活性碳的添加對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

不同濃度之香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之影響試驗設計

該二因子試驗是以上述 1/2 MS 鹽類配方培養基分別添加 2.5% (25 g·L⁻¹)、5.0% (50 g·L⁻¹)、7.5% (75 g·L⁻¹)、10% (100 g·L⁻¹) 之香蕉，並配合添加或不添加 0.1% 活性碳，每一處理組合各 5 重複，以探討培養基中不同濃度之香蕉添加物與 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

不同濃度之馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之影響試驗設計

該二因子試驗是以上述 1/2 MS 鹽類配方培養基分別添加 2.5%、5.0%、7.5%、10% 之馬鈴薯，並配合添加或不添加 0.1% 活性碳，每一處理組合各 5 重複，以探討培養基中不同濃度之馬鈴薯添加物與 0.1% 活性碳對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響。

台灣白及種子接種與培養環境

上述之培養基配製完成後將之 pH 皆調整至 5.6，再以 121°C 滅菌 20 分鐘。培養之試管

(25 mm × 150 mm) 每管置 10 mL 培養基，在消毒後擺成斜面冷卻備用。無菌播種以接種環沾取種子後，將種子平均散置於培養基表面，每支試管內大約接種 200–250 個種子。接種後置於 (25 ± 1)°C 恆溫、光照強度 38 μmol·m⁻²·s⁻¹ 及 14 小時光週期環境中培養。

台灣白及小苗發育時期區分與性狀調查

為評估上述各試驗的不同培養基處理對種子發芽與小苗發育之影響，調查時將小苗發育時期區分成 1 (原球體)、2 (第一片葉長出)、3 (第一片葉成熟長出第二片葉)、4 (第二片葉長大於 0.5 cm)、5 (第三片葉長大於 0.5 cm) 共 5 個時期，如圖 1 所示，於播種後 50 天進行發芽率、小苗發育時期與小苗鮮重等性狀調查。發芽率為每支試管中原球體 (含) 以上發育時期之總苗數除以播種種子數，單株鮮重為個別發育時期之小苗總重除以株數得到之平均鮮重。

統計分析

上述 4 種試驗所得資料均經 SAS 9.1.3 統計分析套裝軟體 (SAS Institute Inc. 2002) 進行變方分析 (ANOVA) 後，若處理間差異顯著，則再利用 least significant difference (LSD) 測驗比較各處理平均值間之個別差異性。

結 果

基本鹽類配方培養基之效果

自花授粉 120 天後之台灣白及果莢已呈黃熟狀態，在果莢消毒後將種子接種於不同鹽類配方培養基中，培養 8 天後即可觀察到種子發芽；播種後 20 天，不同配方培養基上之種子發芽率可達 100%，此時種子苗之第一片葉已長出；在培養 50 天後可見第三片葉長出，並伴隨著根長出。在 5 種鹽類配方培養基中，以 1/2 MS 培養基對促進小苗的發育效果最佳，小苗發育階段至第 4 和第 5 時期的合併比例共達 39.1%



圖 1. 台灣白及種子苗之不同發育時期。(A) 時期 1，原球體；(B) 時期 2，長出第一片葉；(C) 時期 3，第一片葉成熟長出第二片葉；(D) 時期 4，第二片葉大於 0.5 cm；(E) 時期 5，第二片葉成熟第三片葉大於 0.5 cm (Bar = 5 mm)。

Fig. 1. Stages of seedling developmental of *Bletilla formosana* in *in vitro* culture. (A) Stage 1, protocorm; (B) Stage 2, protocorm with 1st leaf; (C) Stage 3, formation of 2nd leaf < 0.5 cm in length; (D) Stage 4, formation of 2nd leaf > 0.5 cm in length; (E) Stage 5, formation of 3rd leaf > 0.5 cm in length. (Bar = 5 mm)

(表 1)，與其他處理呈顯著差異，而以 VW 培養基最差。比較種子苗之單株鮮重，各配方培養基中則以 MS 培養基最佳，其第 4 及第 5 發育期之單株鮮重分別為 12.2 mg 與 20.2 mg，其次為 1/2 MS 培養基之 10.7 mg 與 12.7 mg。

0.1% 活性碳添加對台灣白及發芽及苗期之效果

於不同鹽類配方之培養基中添加 0.1% 活性碳，在培養 50 天後各配方培養基中之種子發

芽率皆達 100%，顯示適量活性碳的添加不會影響種子的發芽。小苗的發育同樣以 1/2 MS 培養基為最佳，第 4 和第 5 發育時期的小苗合併比例為 46.2%；MS 鹽類培養基其次，合併比例亦達 38.6% (表 2)。以單株鮮重來看，1/2 MS 培養基與 MS 培養基中，第 5 發育時期之小苗單株鮮重分別為 20.0 mg 及 20.8 mg 同列最高，而以 VW 培養基之 7.4 mg 最差。與未添加活性碳之相同配方培養基相比 (表 1)，雖然發

表 1. 不同鹽類配方培養基對台灣白及無菌播種種子發芽與小苗發育之影響

Table 1. Effect of different basal salt media on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Basal salt formula ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
		1 + 2	3	4 + 5	2	3	4	5
HYPONeX	100 a ^w	66.5 ± 2.21 b	16.3 ± 1.87 b	17.2 ± 0.63 b	3.3 ± 0.14 bc	5.5 ± 0.32 b	7.8 ± 0.43 cd	10.5 ± 0.56 c
Kundson	98 a	67.4 ± 2.70 b	9.2 ± 0.96 c	21.4 ± 1.85 b	2.7 ± 0.13 cd	4.3 ± 0.28 c	8.5 ± 0.42 c	10.2 ± 0.83 c
VW	99 a	90.4 ± 0.72 a	1.8 ± 0.10 d	6.8 ± 0.69 c	4.3 ± 0.30 a	4.8 ± 0.40 bc	7.0 ± 0.48 d	10.2 ± 0.45 c
1/2 MS	100 a	38.1 ± 1.57 c	22.9 ± 2.51 a	39.1 ± 3.60 a	3.7 ± 0.24 ab	7.7 ± 0.42 a	10.7 ± 0.51 b	12.7 ± 0.46 b
MS	100 a	72.0 ± 4.84 b	12.5 ± 2.67 bc	15.5 ± 2.24 b	2.4 ± 0.17 d	7.0 ± 0.30 a	12.2 ± 0.28 a	20.2 ± 0.38 a

^z Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare basal salt media, using the formula of HYPONeX 7-6-19 (HYPONEX, USA), Kundson (Duchefa, Netherlands), VW (Duchefa, Netherlands), 1/2 MS (Duchefa, Netherlands), or MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w Means ± standard error (n = 5). Means within each column followed by with the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 含有 0.1% 活性碳之不同鹽類配方培養基對無菌播種之台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 2. Effect of basal salt media amended with 0.1% charcoal on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Basal salt formula ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
		1 + 2	3	4 + 5	2	3	4	5
HYPONeX	100 a ^w	69.7 ± 3.65 b	0.7 ± 0.27 b	29.6 ± 3.69 c	1.8 ± 0.14 c	3.6 ± 0.26 c	7.4 ± 0.43 c	14.7 ± 0.45 b
Kundson	100 a	61.2 ± 3.04 b	20.3 ± 1.95 a	18.5 ± 1.31 d	3.4 ± 0.17 b	7.1 ± 0.27 b	11.4 ± 0.43 a	13.8 ± 0.52 b
VW	100 a	79.7 ± 2.08 a	4.1 ± 0.60 b	16.2 ± 1.64 d	2.8 ± 0.14 b	3.4 ± 0.19 c	3.8 ± 0.26 d	7.4 ± 0.20 c
1/2 MS	100 a	29.9 ± 3.98 c	23.9 ± 1.67 a	46.2 ± 2.33 a	5.9 ± 0.46 a	6.8 ± 0.35 b	9.9 ± 0.31 b	20.0 ± 0.72 a
MS	100 a	38.9 ± 1.25 c	22.3 ± 2.10 a	38.6 ± 1.23 b	5.8 ± 0.33 a	9.2 ± 0.51 a	10.5 ± 0.56ab	20.8 ± 0.51 a

^z Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare basal salt media, using the formula of HYPONeX 7-6-19 (HYPONEX, USA), Kundson (Duchefa, Netherlands), VW (Duchefa, Netherlands), 1/2 MS (Duchefa, Netherlands), or MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w Means ± standard error (n = 5). Means within each column followed by with the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

芽率相似，但添加活性碳有助於小苗之分化，於第 4 及第 5 發育期之小苗有較高的比例。在鮮重方面，以第 5 發育期來看，除 VW 及 MS 培養基外，各鹽類配方在添加 0.1% 活性碳後之單株鮮重皆有增加。

不同濃度之香蕉有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之效果

由於 1/2 MS 鹽類培養基對台灣白及小苗發育之促進效果較其他鹽類配方為佳 (表 1)，因此以 1/2 MS 鹽類配方為基本培養基，除添加 2.5–10% 之 4 種不同含量的香蕉外，並同時比較 0.1% 活性碳添加對種子發芽及發育之影響。結果如表 3 所示，在培養基中添加香蕉並不會影響種子發芽，種子發芽率仍可達 100%。香蕉含量與活性碳之添加對小苗的發育存在極顯著交感作用，但無論添加或未添加活性碳皆以含 2.5% 香蕉之培養基於第 4 及第 5 發育期具有較高比例之小苗 (28.3%) (表 3)，但與未添加

香蕉之 1/2 MS 培養基相較 (表 1、2)，添加香蕉後對小苗發育之表現較差 (表 3)。而培養基隨著香蕉含量的增加，對小苗發育有不良影響，含 10% 高濃度香蕉之培養基若未添加 0.1% 的活性碳，小苗發育大多停於第 1 及 2 發育時期 (表 3)，且大部分已發芽之種子無法長成完整之植株 (圖 2)。香蕉含量與活性碳添加除第 3 發育時期外，其他發育時期對小苗鮮重皆存在極顯著交感作用，培養基中添加香蕉雖然對小苗的鮮重有增加的作用，但除 2.5% 香蕉外，提高香蕉濃度之增重效果必須配合活性碳的添加 (表 3)。

不同濃度之馬鈴薯有機添加物配合添加或不添加 0.1% 活性碳之效果

將上述試驗以馬鈴薯代替香蕉添加於播種培養基中，結果顯示馬鈴薯的添加不會影響種子發芽，種子發芽率皆可達 100%。不同濃度馬鈴薯與添加活性碳對台灣白及種子發芽與小

表 3. 1/2 MS 基本鹽類培養基添加 0.1% 活性碳與不同含量香蕉泥對無菌播種之台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 3. Effect of charcoal and banana homogenates in 1/2 MS medium on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Charcoal (%) ^z	Banana homogenate (%) ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
			1+2	3	4+5	2	3	4	5
0.0	2.5	100 a	36.9 ± 1.93 d	37.7 ± 1.69 b	25.4 ± 1.05 a	6.2 ± 0.40 a	7.3 ± 0.45 b	11.7 ± 0.22 cd	25.0 ± 0.25 c
0.1	2.5	100 a	40.7 ± 1.17 d	31.0 ± 2.60 c	28.3 ± 1.98 a	5.9 ± 0.47 a	9.2 ± 0.36 a	10.8 ± 0.56 d	21.1 ± 0.45 d
0.0	5.0	100 a	35.0 ± 1.64 d	45.7 ± 1.41 a	19.3 ± 1.66 b	2.7 ± 0.17 de	3.3 ± 0.18 e	7.8 ± 0.30 e	14.5 ± 0.36 e
0.1	5.0	100 a	58.6 ± 3.09 c	23.7 ± 1.73 d	17.7 ± 1.72 b	4.7 ± 0.23 b	7.6 ± 0.38 b	12.8 ± 0.40 c	24.9 ± 0.41 c
0.0	7.5	100 a	70.4 ± 2.87 b	14.7 ± 1.48 e	14.9 ± 1.65 b	2.4 ± 0.17 e	4.3 ± 0.23 d	6.2 ± 0.30 f	13.6 ± 0.26 e
0.1	7.5	100 a	74.5 ± 0.95 b	6.4 ± 0.56 f	19.1 ± 1.42 b	3.4 ± 0.22 cd	9.1 ± 0.32 a	17.3 ± 0.50 a	26.0 ± 0.31 b
0.0	10.0	98 a	92.1 ± 0.94 a	5.9 ± 0.74 f	0.0 ± 0.00 c	4.6 ± 0.21 b	5.5 ± 0.29 c	— ^w	—
0.1	10.0	100 a	74.2 ± 1.83 b	11.2 ± 0.81 e	14.6 ± 1.12 b	4.2 ± 0.17 bc	8.9 ± 0.37 a	15.4 ± 0.44 b	28.6 ± 0.53 a
Significance									
Charcoal (C)		NS ^v	**	**	NS	NS	**	**	**
Banana (B)		NS	**	**	**	**	**	NS	NS
C × B		NS	**	**	**	**	NS	**	*

^z Charcoal and banana homogenates were added to the medium containing 0.8% bacto agar, 3% sucrose and 1/2 MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w No seedling.

^v NS = Non-significant; * = significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

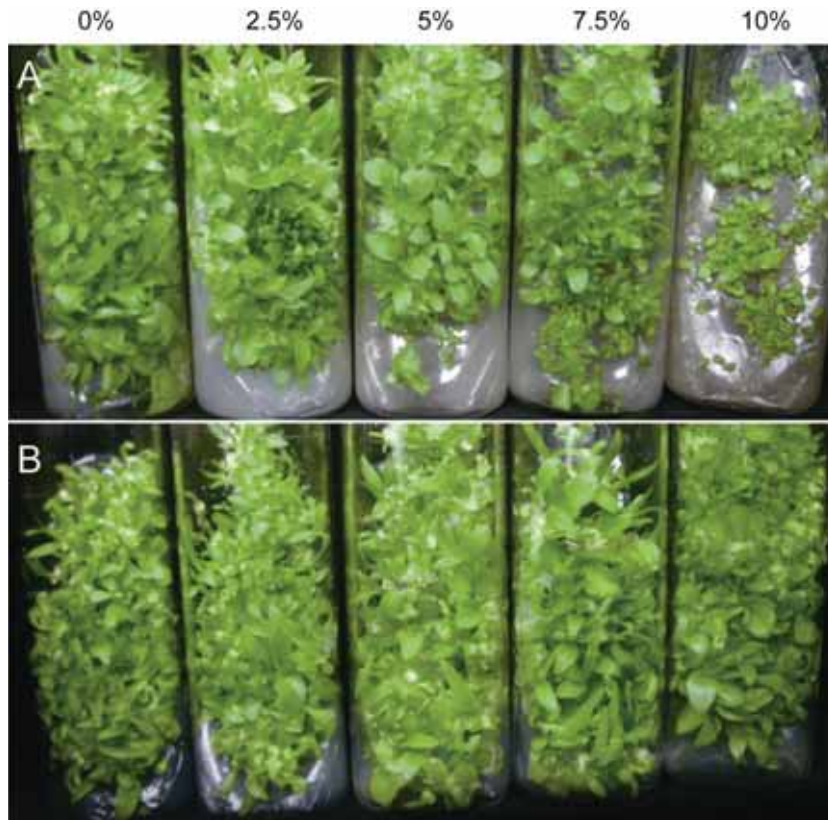


圖 2. 台灣白及於不同含量香蕉之 1/2 MS 基本鹽類培養基 (A) 未添加或 (B) 添加 0.1% 活性碳，培養 50 天之種子發芽與小苗發育情形。圖中試管由左至右香蕉之含量分別為 0%、2.5%、5.0%、7.5% 及 10.0%。小苗於 (B) 添加與 (A) 未添加 0.1% 活性碳培養基中顏色有所差異。

Fig. 2. Seedlings of *Bletilla formosana* in 1/2 MS basal salt medium containing banana homogenates without (A) or with (B) 0.1% charcoal for 50 days. Left to right: Concentrations of banana homogenates in the medium, 0% (left tube), 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10% (right tube). Note differences in color of seedlings between the treatments of 0.1% charcoal (B) and the treatments without charcoal (A).

苗發育皆存在極顯著交感作用 (表 4)，其中以含有 7.5% 馬鈴薯與 0.1% 活性碳組合的培養基為最佳，於第 4 及第 5 發育時期的小苗比例達 67.2%，第 5 發育時期的小苗之平均單株鮮重可達 26 mg；但若僅以鮮重來看，則以 5.0% 馬鈴薯並添加 0.1% 活性碳之培養基的 30.7 mg 為最高。各濃度之馬鈴薯配合活性碳添加對小苗發育及重量均有促進效果，但相對於不含馬鈴薯及活性碳之培養基 (表 1)，高濃度馬鈴薯

(7.5%、10%) 培養基之小苗生長不受抑制，皆可長成完整植株 (圖 3)。

討 論

蘭科植物之種子非常小，胚分化只達圓球胚階段 (globular embryo stage)，不含胚乳，沒有子葉、胚根、胚芽等養分儲藏器官，需經由外在之環境供應充足的養分 (蘭菌共生或無菌播種培養基) 方能順利萌發長大 (Arditti 1967;

Lee 1990)。蘭科植物種子成熟度亦影響其種子的萌芽能力，不同蘭屬間其最佳果莢採收時間有所差異，在蝴蝶蘭白花雜交種的研究顯示，授粉後 110 天採收之果莢在播種後 10 天即可發芽，若延至果莢黃熟甚至開裂才行播種，亦不影響種子萌芽能力及原球體發育 (Tu & Lee 1987)；但在萬代蘭 (Mathews & Rao 1980)、喜普鞋蘭 *Cypripedium* (Harvais 1980)、台灣白及 (Lin *et al.* 1994) 等蘭屬的研究則顯示，於黃熟期採收之果莢播種後，種子不發芽或發芽率不佳，甚至影響小苗之生長，可能原因為種子成熟後抑制物質之形成，進而影響種子發芽與生長。在白及屬的研究顯示，其種子在胚接近成熟時播種發芽率最高 (Nagashima 1982)；Lin *et al.* (1994) 則認為台灣白及以發育至魚雷期之種子萌芽率與小苗生長為最佳，而黃熟果莢之種子則無法發芽。在本試驗中採用授粉 120 天尚未開裂之黃熟台灣白及果莢播種，在各種不同配方基本鹽類之培養基中，其發芽率皆可達

100%，且小苗順利發育與生長，另以已開裂之果莢進行播種，亦有良好之發芽率 (資料未顯示)，此結果較相似於 Nagashima (1982) 之研究，而與 Lin *et al.* (1994) 的結果有所差異。在種子成熟度的影響方面，在 Lin *et al.* (1994) 的研究中指出黃熟尚未開裂之台灣白及種子無法萌芽，本試驗使用黃熟尚未開裂之台灣白及果莢於不同鹽類之培養基進行無菌播種，於播種後 8 天即可見種子發芽，20 天後萌芽率達 100%，種子萌芽與小苗生長速度較 Lin *et al.* (1994) 與 Yeh *et al.* (1995) 之觀察快速，可能與材料來源與無菌播種過程不同而有所差異，因此，在本試驗中，推測授粉後 120 天之台灣白及果莢成熟度應該適合於無菌播種之用。此外，我們利用室溫下已開裂 2 週果莢之種子進行無菌播種，發現其種子仍具有良好之發芽能力 (資料未顯示)，推測一個具有良好結實率之台灣白及果莢其發芽適期應有相當的時間範圍，在不同的發芽培養基中亦有相當的適應性。

表 4. 1/2 MS 基本鹽類培養基添加 0.1% 活性碳與不同含量馬鈴薯泥對台灣白及種子發芽與小苗發育之影響

Table 4. Effect of charcoal and potato homogenates in 1/2 MS medium on *in vitro* seed germination and seedling development of *Bletilla formosana*

Charcoal (%) ^z	Potato homogenate (%) ^z	Seed germination (%) ^y	% of seedling at various developmental stages ^x			Fresh weight of seedling at various developmental stages (mg/seedling)			
			1+2	3	4+5	2	3	4	5
0.0	2.5	100 a	22.2 ± 1.18 c	35.6 ± 1.59 ab	42.2 ± 1.21 e	5.1 ± 0.23 b	4.2 ± 0.33 d	6.2 ± 0.31 e	11.0 ± 0.30 e
0.1	2.5	100 a	26.0 ± 1.36 c	20.4 ± 0.77 d	53.7 ± 2.01 c	5.8 ± 0.17 a	11.5 ± 0.25 a	12.8 ± 0.36 c	24.7 ± 0.85 b
0.0	5.0	100 a	13.8 ± 1.00 d	26.0 ± 1.44 d	60.2 ± 2.40 b	6.3 ± 0.23 a	6.6 ± 0.43 c	10.1 ± 0.51 d	15.1 ± 0.29 d
0.1	5.0	100 a	10.1 ± 1.11 d	39.6 ± 2.47 a	50.3 ± 2.39 cd	4.1 ± 0.34 c	7.1 ± 0.45 c	15.1 ± 0.67 b	30.7 ± 0.56 a
0.0	7.5	100 a	61.1 ± 0.54 a	11.4 ± 0.59 e	27.5 ± 0.70 f	2.7 ± 0.09 d	4.3 ± 0.33 d	6.9 ± 0.37 e	14.9 ± 0.36 d
0.1	7.5	100 a	0.0 ± 0.00 e	32.8 ± 2.13 c	67.2 ± 2.13 a	- ^w	10.3 ± 0.52 b	16.3 ± 0.33 a	26.1 ± 0.63 b
0.0	10.0	100 a	57.6 ± 2.82 a	18.9 ± 1.19 d	23.5 ± 2.76 f	2.5 ± 0.17 d	4.5 ± 0.21 d	9.5 ± 0.29 d	17.5 ± 0.24 c
0.1	10.0	100 a	44.1 ± 1.87 b	12.0 ± 0.71 e	43.9 ± 2.44 de	4.0 ± 0.34 c	6.7 ± 0.41 c	13.1 ± 0.42 c	25.5 ± 0.34 b
Significance									
Charcoal (C)		NS ^v	**	**	**	**	**	**	**
Potato (P)		NS	**	**	**	**	**	**	**
C × P		NS	**	**	**	**	**	**	**

^z Charcoal and potato homogenates were added to the medium containing 0.8% bacto agar, 3% sucrose and 1/2 MS (Duchefa, Netherlands).

^y Seed germination was recorded at 50 days after sowing.

^x Refer to Figure 1 for development stages of plants.

^w No seedling.

^v NS = Non-significant; *, ** = significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

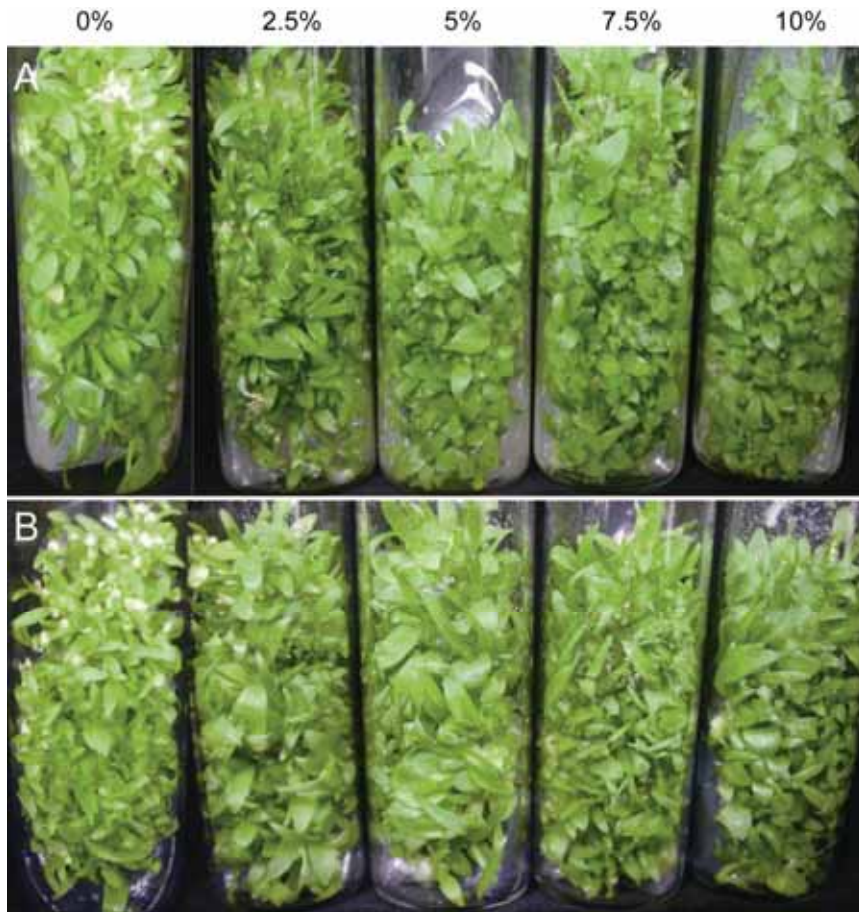


圖 3. 台灣白及於不同含量馬鈴薯之 1/2 MS 基本鹽類培養基 (A) 未添加或 (B) 添加 0.1% 活性碳培養 50 天之種子發芽與小苗發育情形。圖中試管由左至右馬鈴薯之含量分別為 2.5%、5.0%、7.5% 及 10.0%。小苗於 (B) 添加與 (A) 未添加 0.1% 活性碳培養基中顏色有所差異。

Fig. 3. Seedlings of *Bletilla formosana* in 1/2 MS basal salt medium containing potato homogenates without (A) or with (B) 0.1% charcoal for 50 days. Left to right: Concentrations of potato homogenates in the medium, 0% (left tube), 2.5%, 5.0%, 7.5% and 10% (right tube). Note differences in color of seedlings between the treatments of 0.1% charcoal (B) and the treatments without charcoal (A).

MS 培養基配方之總離子濃度為 93.8 mM，1/2 MS 培養基之總離子濃度為 46.9 mM (Tu & Lee 1988)，Kundson (Knudson 1946) 與 VW (Vacin & Went 1949) 配方總離子濃度約為 30 mM (Lo *et al.* 2008)，花寶 1 號 (HYPONeX 7-6-19) 為商業生產之複合肥料，其總 N% 較上述鹽類培養基均低 (Tu & Lee 1988)。Lin *et al.*

(1994) 的研究指出，MS 基本鹽類及蔗糖是台灣白及原球體發育成小苗之必要營養成分，2 倍量之 MS 基本鹽類則會產生傷害 (總離子濃度達 187.6 mM)，使小苗表皮皺縮變形且抑制生長。根據 Ichihashi (1979) 的研究顯示，認為總離子濃度在 60 mM 時較有利於白及地上部生長。在本研究中台灣白及於 MS、1/2 MS、

Kundson、VW 及花寶 1 號鹽類配方培養基中，種子發芽率皆可達 100%，且小苗可順利發育，五種鹽類配方培養基中以 1/2 MS 小苗發育為最佳 (表 1)，因此，在白及屬相較於其他蘭科植物，種子發芽與小苗發育對鹽類濃度之適應較廣，降低鹽類濃度應有利於種子發芽與小苗生長 (Arditti 1967; Ichihashi 1979; Tu & Lee 1988; Lu & Lee 1990; Wu & Lee 1991)。

在蘭科植物的無菌播種及離體培養中常添加活性碳，因其具有吸附酚類化合物、抑制過氧化酵素活性、降低褐化率、促進芽、根與植株生長、型態發生等複雜之功效 (Tisserate 1979; Patel & Thorpe 1984; Pan & Staden 1998)，在本試驗中，於不同鹽類配方培養基中添加 0.1% 的活性碳，對種子的發芽沒有並無不良之影響，且活性碳的添加可促進小苗發育與生長 (表 2-4 及圖 2)。Ernst (1975) 的研究亦顯示，活性碳的添加對蘭科植物沒有不良影響，但 Van (1987) 對於倒距蘭屬 *Anacamptis pyramidalis* 等 18 種歐洲蘭科植物的研究卻顯示，活性碳的添加會降低其種子發芽率與抑制小苗發育，而 Lin *et al.* (1994) 的研究指出 0.1-0.3% 之活性碳適合台灣白及種子發芽與生長，但 0.5% 以上活性碳的添加則降低種子發芽率與抑制小苗生長與發育。在本試驗中，以 0.1% 活性碳添加於不同鹽類配方培養基中，結果顯示小苗生長較為快速，單株鮮重亦有增加，對台灣白及無菌播種小苗之生長發育具有促進之效果，但受有機物影響，這一點在香蕉、馬鈴薯添加試驗中，活性碳與這二種有機添加物間均有顯著之交感效應可以印證。

在蘭花的組織培養中，培養基除了基本的鹽類之外，常另行添加蔬果汁促進小苗之發育 (Arditti 1967)，其中香蕉與馬鈴薯為較常用之蔬果添加物，在幾種蘭科植物的研究顯示，於培養基中添加適量的香蕉 (6-10%) 或馬鈴薯 (2-4%)，對於小苗發育、生長與鮮重的提升都

具有良好效果 (Lo *et al.* 2004; Shiau *et al.* 2005; Yan *et al.* 2006)；在台灣一葉蘭的研究亦顯示，培養基中香蕉含量達 150 g·L⁻¹ 時，種子發芽率降低 (Juang & Lee 1986)。在本試驗中使用 2.5-10% 香蕉 (表 3) 與馬鈴薯 (表 4) 的添加並不會影響台灣白及種子的發芽，但香蕉的含量顯著影響小苗之生長與發育 (表 3)，使用量達 10% 時，對小苗生長會產生抑制作用。但馬鈴薯的添加對小苗的生長與發育則有促進之效果 (表 4)，其中以含有 7.5% 馬鈴薯與 0.1% 活性碳之培養基對台灣白及之小苗生長促進效果最佳，在培養 50 天後，第 4 及第 5 發育期小苗率達 67.2%，發育 5 期之小苗平均鮮重達到 26.1 mg。於 Lin *et al.* (1994) 與 Yeh *et al.* (1995) 對台灣白及無菌播種的研究中除了進行不同 MS 鹽類、蔗糖、活性碳濃度、果莢成熟度之處理外，並未進行蔬果添加物對台灣白及種子發芽與小苗生長發育影響之探討，本研究中台灣白及種子發芽與小苗生長皆較上述學者研究結果 (培養 135 天) 的快速，除與種子之成熟度有關外，應與播種培養基的鹽類濃度以及適當之有機添加物促進小苗發育有關。

本研究藉由已知培養基配方的篩選，配合適當濃度之蔬果添加物及活性碳添加，利用於台灣白及之無菌播種，不但種子之發芽率高，且能加速小苗之發育與提高瓶苗之品質，提升了台灣白及無菌播種繁殖體系之效率，此繁殖系統可提供大量優良之台灣白及種苗作為生產藥材或為園藝資源之所需。

引用文獻 (Literature cited)

- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- Duan, J. X. and S. Yazawa. 1995. Floral induction and development in *Phalaenopsis* in vitro. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 43:71-74.
- Ernst, R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchid. *Amer. Orchid Soc. Cult.* 44:12-18.
- 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)
- Harvais, G. 1980. Scientific notes on a *Cypripedium regina* of northwestern Ontario, Canada. Amer. Orchid Soc. Bull. 49:237–244.
- Ichihashi, S. 1979. Study on the media for orchid seed germination. III. The effect of total ionic concentration, cation/anion ratio, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio, and minor elements on the growth of *Bletilla striata*. New Phytol. 83:121–128.
- Juang, J. H. and N. Lee. 1986. Effect of niacin, coconut milk and banana homogenate on seed germination and seedling growth of *Pleione formosana*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 32:132–138. (in Chinese with English abstract)
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. Amer. Orchid Soc. Bull. 15:214–217.
- Lee. 1990. Embryo culture of orchids. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 36:223–244. (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)
- Lo, S. F., S. M. Nalawade, C. L. Kuo, C. L. Chen, and H. S. Tsay. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino-A medicinally important orchid. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:528–535.
- Lo, S. F., C. L. Kuo, C. L. Chen, and H. S. Tsay. 2008. *In vitro* seed germination and mass propagation of *Dendrobium moniliforme*, a native species in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 57:295–304. (in Chinese with English abstract)
- Lu, I. L. and N. Lee. 1990. *In vitro* germination of *Cymbidium Dayanum*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 36:198–209. (in Chinese with English abstract)
- Mathews, V. H. and P. S. Rao. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissue culture technique. Plant Sci. Lett. 17:383–389.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–491.
- Na, C., W. S. Kan, N. Y. Chiu, and R. J. Yang. 1978. Pharmacognostical researches on *Bletillae* tuber Pai-Chi. China Med. Coll. Annu. Bull. 9:454–467. (in Chinese with English abstract)
- Nagashima, T. 1982. Studies on the seed germination and embryogenesis in the *Bletilla striata* Rchb. f. and *Calanthe discolor* Lindl. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 51:82–93. (in Chinese with English abstract)
- Pan, M. J. and J. V. Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture-A review. *Plant Growth Regul.* 26:155–163.
- Patel, K. R. and T. A. Thorpe. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 3:131–142.
- Peng, L., X. D. Liu, H. Liu, and X. W. Liu. 2004. Tissue culture and rapid propagation of *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. Chinese Wild Plant Resources 23:65. (in Chinese with English abstract)
- Shiau, Y. J., S. R. Yang, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. Effect of Vegetable and fruit homogenates on seedling development of *Dendrobium moniliforme* (L.) sweet culture *in vitro*. J. Agric. Res. China 54:23–31. (in Chinese with English abstract)
- Tisserat, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J. Exp. Bot. 30:1275–1283.
- Tu, M. C. and N. Lee. 1987. Effect of pollination time and capsule maturity on seed germination in *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 33:190–200. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110:605–613.
- Van, W. J. 1987. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European orchid. Acta Hort. 212:131–138.
- Wu, S. C. and N. Lee. 1991. *In vitro* seed germination of *Phaius tankervilleae*. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 37:183–188. (in Chinese with English abstract)
- Yan, N., H. Hu, J. L. Huang, K. Xu, H. Wang, and Z. K. Zhou. 2006. Micropropagation of *Cypripedium flavum* through multiple shoots of seedlings

- derived from mature seeds. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 84:113–117.
- Yang, J. H., Q. J. Meng, J. D. Li, and H. T. Wu. 2002. Rapid propagation of *Bletilla striata* Reich b. f. by tissue culture. *Shandong Sci.* 15:13–16. (in Chinese with English abstract)
- Yeh, F. T., Y. C. Lin, C. C. Chen, N. Y. Chiu, and H. S. Tsay. 1995. Tissue culture of *Bletilla formosana* II. The influence of medium components on immature seed germination and seeding development. *J. Agric. Res. China* 5:353–363. (in Chinese with English abstract)
- 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)
- Zhang, J. X., Z. H. Fu, H. L. Li, and B. Yang. 2005. Relationship between embryo growth and seeds sprouting of *Bletilla striata*. *Subtrop. Plant Sci.* 34:32–35. (in Chinese with English abstract)

Effect of Basal Salts, Active Charcoal, and Vegetable/Fruit Homogenates on Seed Germination and Seedling Development *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *In Vitro* Culture¹

Chin-Yi Tsao², Uei-Chern Chen², and Chi-Ni Hsia^{2,3}

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, and C. N. Hsia. 2010. 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.

This study was conducted to determine effect to basal salts, active charcoal and vegetable/fruit homogenates on seed germination and seedling development of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr in *in vitro* culture. Bacto agar (0.8%) and sucrose (3%) were used to prepare the five culture media, using reported basal formulations of Knudson (Knudson 1946), VW (Vacin & Went 1949), MS (Murashige & Skoog 1962), 1/2 MS, or HYPONeX 7-6-19. Results showed that seeds of *B. formosana* were all germinated on these basal salt media after incubation at ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 8 days. Among the five basal salt media tested, the medium containing 1/2 MS was the best treatment for development and growth of seedling of *B. formosana*. Adding 0.1% active charcoal to each of the five basal salt media had no significant ($P > 0.05$) effects on seed germination as all the seeds germinated on each medium after incubation at ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 50 days. Fresh weight of 50-day-old seedling was 20.0 mg/plant for the treatment of 1/2 MS + active carbon and 20.8 mg/plant for MS + active charcoal but it was only 7.4 mg/plant for the treatment of VW + active charcoal. Adding banana or potato homogenates (at 2.5, 5.0, 7.5, 10%) to the medium containing 1/2 MS, with or without 0.1% active charcoal, had no negative effect on seed germination. Although both banana and potato substrates in the medium caused an increase in fresh weight of seedlings, the potato substrate was superior to the banana substrate for seedling development. This study suggests that the medium containing 1/2 MS salts, 0.1% active charcoal and 7.5% potato substrate is the best for seed germination and seedling development of *B. formosana* under aseptic conditions.

Key words: *Bletilla formosana*, Seed germination, Seedling development, *In vitro* culture.

-
1. Contribution No. 2502 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: March 31, 2011.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Biotechnology Division, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Corresponding author, e-mail: hsia@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.