# 第三章　田間管理作業

## 第二節　國蘭種苗繁殖

張正[1]　陳威臣[2]

[1]國立中興大學園藝學系　[2]農業試驗所生物技術組

現行生產國蘭種苗的繁殖方法以分株法為主，將叢生株以假球莖為單位剝離後栽植，可在來年開花出售。種子繁殖法則可使用在育種之品種改良、也可做為繁殖幼苗的方法。莖頂培養繁殖法可固定品種性狀，為產業界所殷殷期盼。本章節介紹國蘭的分株繁殖及組織培養。

### 一、分株繁殖

國蘭屬複莖軸類的蘭花，產業上通常以4-6吋盆種植，具有發達的假球莖，每年由假球莖的側芽長出新芽，發育成叢生狀的植株，而生長旺盛的根系，栽培1-2年後會將盆子擠滿，而影響到水份的吸收與栽培介質通氣，因而需要將盆植株分株。以2-3個假球莖為單位將叢生株分株後再栽培。

國蘭以分株繁殖為經濟栽培的主要繁殖方法，由於具2-3個假球莖的分株子代，可以在來年開花，培育期遠短於組織培養苗的3-6年，栽培週轉率高。且分株繁殖的母株多為自行栽培留種，少了外購組培苗的種苗成本，種苗成本較低。因此在國蘭的經濟栽培上，分株法為多數栽培業者所樂意使用的方法。

分株時的芽數及芽的大小要適當，若芽體太小，假球莖不夠成熟，分出單芽成活率及來年開花率會降低，3年以上的老的假球芽的萌芽能力也會降低。



分株的時期除夏天高溫期及冬天寒流來襲的低溫期時不適合外，全年可行分株。但以報歲蘭來說，花後的春天，一年生的充實假球莖帶有新芽，並處於生長勢強的生長季節，為合適進行分株的時節。分株後，宜放置在光度較低處，並注意水份管理，以使根部發育恢復，即可行正常蘭株栽培管理。

## 二、組織培養

### (一)蕙蘭種子的特徵

蕙蘭種子微小，種皮輪廓為紡錘狀或絲狀，具縱向或橫向條紋(圖1及表1)。種子內部有球形胚，但胚乳退化，種皮與球形胚間充滿空氣，稱之氣室 (圖2)。蕙蘭的種子依品種而有不同，金稜邊蘭的種子長度較短，約0.6公釐。鳳蘭與濕地蘭的種子長度居中，約0.8公釐，紋瓣蘭種子長度為1公釐，四季蘭最長，種子長度達到1.3公釐，詳見表1。

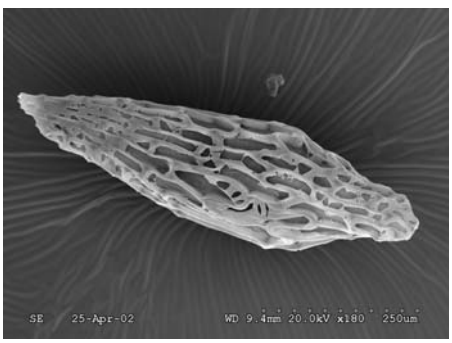



圖1.金稜邊種子的外觀形態

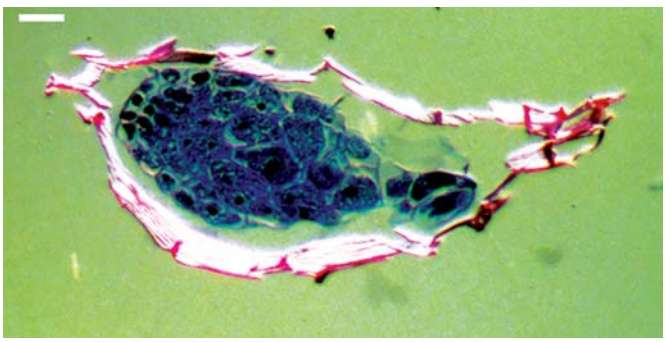


圖2.金稜邊子的內部解剖圖

表1.蕙蘭屬之五個原生種植物種子外觀形態

| 蕙蘭原種 | 種　子 | | | 種皮細胞表面條紋 |
|---|---|---|---|---|
| | 形狀 | 長度(μm) | 種子縱軸之細胞數 | |
| 紋瓣蘭 | 紡錘形 | 1000 | 6.5 | 縱向 |
| 鳳蘭 | 紡錘形 | 800 | 6.5 | 縱向 |
| 金稜邊蘭 | 紡錘形 | 600 | 3.5 | 縱向 |
| 濕地蘭 | 紡錘形 | 800 | 6.5 | 縱向 |
| 四季蘭 | 線形 | 1300 | 8.5 | 橫向 |

蕙蘭的種子具有數量多、體積小、內容物少及發育階段處於較原始的球形胚等特點，故不容易在盆土上播種發芽，需要使用無菌操台，經滅菌後將種子播種在培養基上，才可順利發芽成苗。

## (二)蕙蘭的無菌播種

蕙蘭無菌播種常使用未開裂的蒴果，各種蕙蘭蒴果合適進行無菌播種的成熟度，可用授粉後發育天數來估算，如報歲蘭的蒴果在授粉後150-180天為合適播種期，四季蘭則為190-220天，鳳蘭與金稜邊需經12個月的發育。若無確實的資訊也可以採用果實轉成淡黃綠色，果柄微軟時為依據，採收後播種。

蕙蘭的蒴果清洗乾淨，以70%酒精擦拭表面，以濃度2%的次氯酸鈉浸泡二十分鐘，在無菌操作台內以無菌水漂洗三次，切開蒴果，將種子播種在培養基內，地生習性的蕙蘭可以播種在培養基一，附生習性的蕙蘭可播種在培養基二，培養基成份詳見表2。

表2.蕙蘭無菌播種的培養基成份

| 成　分 | 培養基一<br>(地生性蕙蘭) | 培養基二<br>(附生性蕙蘭) |
|---|---|---|
| MS* | 1/10 | 1/4 |
| $NaH_2PO_4$ | - | 170 mg/l |
| Inositol | 100 mg/l | 100 mg/l |
| Sucrose | 20 g/l | 20 g/l |
| Coconut milk | 150 ml/l | 150 ml/l |
| Potato pulp | - | 30 g/l |
| Activated charcoal | 1 g/l | 1 g/l |
| Peptone | 1 g/l | 1 g/l |
| Agar | 8 g/l | 8 g/l |
| pH | 5.2 | 5.2 |

*MS包含鹽類、維生素與氨基酸，組成份為Murashige及Skoog, 在西元1962所發表之配方

蕙蘭的種子發芽後先形成原球體(protocorm)，之後有二種不同的形式，其中一型如鳳蘭，可由原球體的頂端形成鞘葉後，直接形成真葉，形態如圖3所示。鳳蘭的種子可在一個月內發芽，胚突破種皮形成原球體，在播種後二到三個月時原球體會伸長，並很快的頂芽發育，長出莖葉，在播種後四個月形成長度一公分的幼苗，再經一次的培養，即可以長成大苗，在播種後八到十個月內移植出瓶栽植。

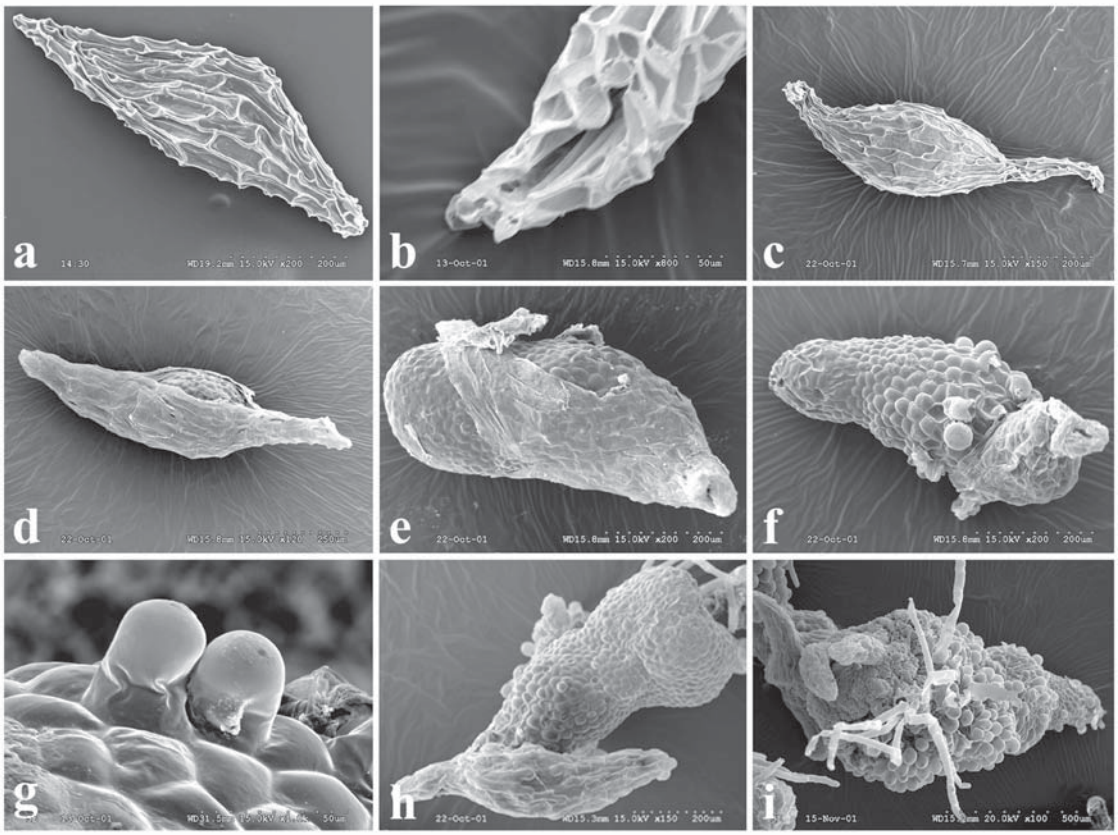



圖3.鳳蘭種子發芽的形態，本圖節錄自張等(2004)的著作。a.種子形態. b.種子尾端. c.播種後膨大的種子. d.種皮破裂，可形成球形胚發育為原球體. e.原球體發育伸長. f.及g.在下位形成單細胞的吸收毛. h.及i.在頂端形成鞘葉.

第二型的蕙蘭種子發芽後先形成原球體，再發育形成根莖，再由根莖發育幼苗，這種發育形式常發生在地生性蕙蘭，如報歲蘭、四季蘭、寒蘭、九華蘭、春蘭及竹柏蘭。

圖4即是以四季蘭為例子來說明種子播種後的發育形態及一個世代所需的時間，四季蘭的果實發育日約需190天，成熟的種子播種後，二個月到一年間會陸續發芽，發芽時先形成原球體，並很快的發育形成根莖，根莖再經一次以上的繼代培養，發育成熟後，可誘導產生芽體，芽體發根後移植出瓶，經二到三年的栽培可以開花。

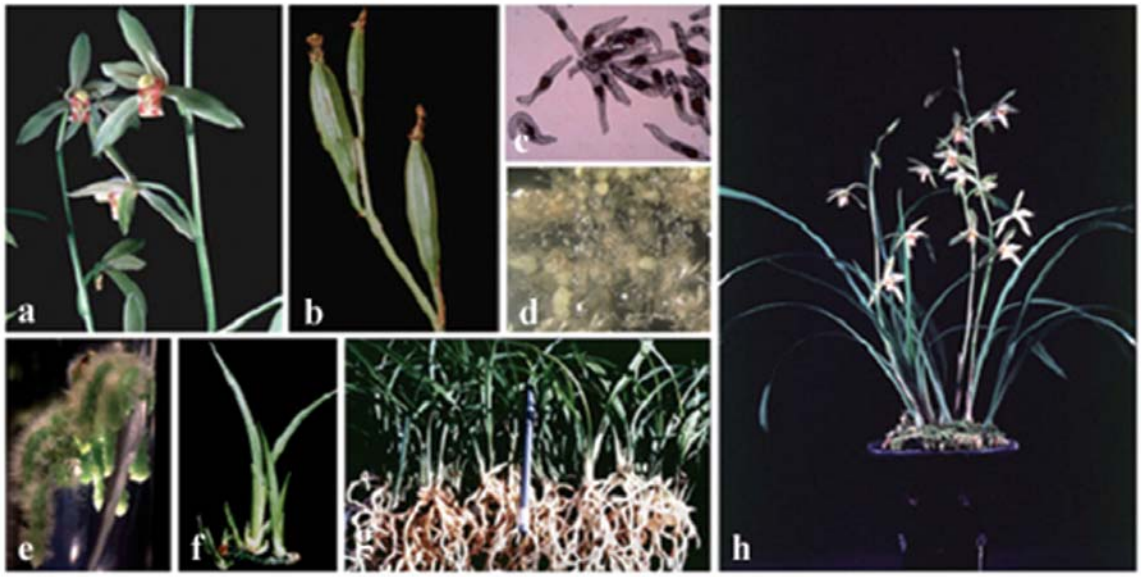



圖4.四季蘭種子發育的過程及一個世代的培育。a.四季蘭. b.四季蘭的蒴果. c.四季蘭的種子. d.種子發芽後形成的原球體. e.根莖. f.根莖誘導產生的芽體. g.移植出瓶栽培半年的幼苗. h.栽培二年半的種子苗

## (三)莖頂培養

蕙蘭的莖頂培養始於法國科學家Morel，Morel於西元1960年將其研究成果發表於美國蘭藝協會(American Orchid Society)，他所使用的蕙蘭有四個原生種及三個栽培種:即獨占春、西藏虎頭蘭、碧玉蘭、美花蘭及三個蕙蘭的雜交種*Cymbidium* Talma、*C.* Doris、*C.* Candeur。Morel切取蕙蘭的莖頂為培植體，在試管內生成類原球體(Protocorm-like body, PLB)，類原球體可以增殖形成更多類原球體，也可以發育成小植株，這些再生小苗移植出試管後，可以栽培存活。很可惜的Morel在這篇文章中並未提及所使用的培養基的配方。



王博仁博士於西元1981年發表的文獻中，提及大型蕙蘭(應指虎頭蘭)的莖頂培養較容易成功，但小型蕙蘭(應指國蘭)則十分困難，並提及觀音素心蘭、報歲蘭、玉華四季蘭、金華山報歲蘭及四季蘭莖頂培養的方法如下。

1.培養基：以Knudson C為主，另加LS培養基的微量元素及天然抽取物、1 mg/l NAA、0.1 mg/l kinetin、pH 5.5、agar 8 g/l。

2.培養條件：取長度10公分之新芽之頂芽或腋芽，切取帶二片葉原體之生長點，先在液體培養基迴旋培養一個月後(轉速為1 rpm)，移到固體培養基中培養，光強度為 1000 lux，每日日長為12小時，溫度為25℃恆溫。

王博士並提到本方法的成功率如下:觀音素心蘭3/24 (分母為培養個數，分子為成功長出地下莖的數目)，報歲5/105，四季蘭為4/120，玉花四季蘭為1/25，金華山報歲蘭為1/25。除了金華山報歲蘭發育成芽球(類原球體)，其餘皆長成地下莖(根莖; rhizome)。

美國蘭學者Arditti在1993所著的Micropropagation of Orchids一書中提及蕙蘭莖頂培養方法。

1.培養基：Knudson C或 Vacin-Went培養基。

2.取5-7.5公分長度的新芽，經消毒後，剝除外葉，切取2-3 mm的莖頂(約帶一到二片的葉原體)行液體培養四週後，再移到固體培養二週，可形成類原球體，待類原球體長到2-3 mm時，可切成四份再進行繼代培養，每十天繼代培養一次，發育成熟的類原球體可發育形成小蘭苗。

## (四)蕙蘭花莖培養

取長度約5 cm的春蘭(*C. goeringii*)花莖進行培養，切取花莖頂芽2 mm接種於 MS 培養基添加0.1 mg/L BA及10 mg/L NAA的培養基中，誘導根莖分化。

## (五)根莖培養

由地生性蕙蘭種子發芽、莖頂生長點或花序營養芽進行培養，皆可誘導根莖(rhizome)形成，再經由根莖長根莖方式進行增殖。故根莖培養在地生性蕙蘭的組織培養佔有重要之地位。

地生性蕙蘭在試管內的根莖形態構造如圖5所示。根莖為變態莖，根莖頂端有鞘葉包覆(圖5a)，鞘葉內部有生長點(圖5b; 圖5c)，根莖具有莖節與節芽(圖5d)，根莖頂芽水平或向地下生長，在培養基表面呈現綠色，在培養基內則呈現白色或淡綠色，根莖表皮密佈吸收毛(圖5e; 圖5f)及散生皮孔 (圖5g)。根莖屬貯存性器官，內部累積澱粉粒(圖5h; 圖5i)。

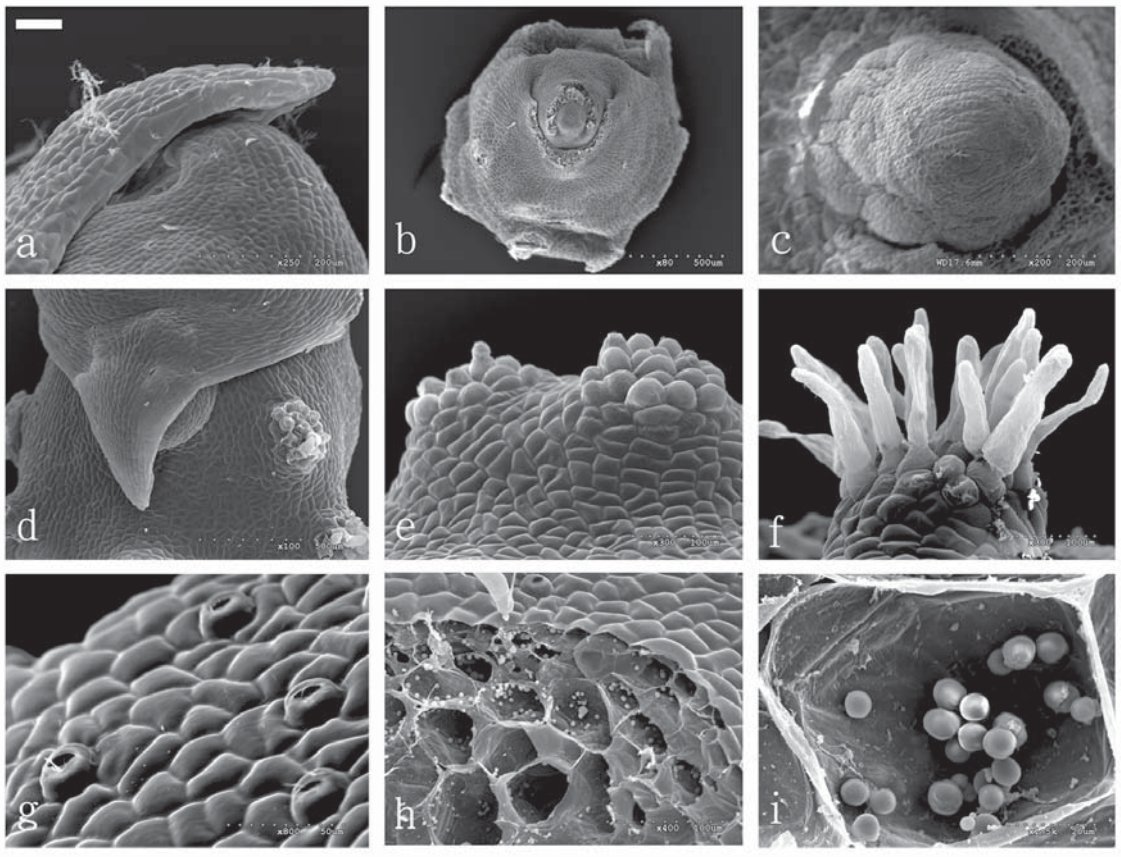



圖5.觀音素心蘭的根莖構造.a.根莖頂芽; b & c. 根莖莖頂; d.根莖側芽; e & f.根莖表皮吸收毛; g.根莖表皮的皮孔; h.根莖橫切面; i.根莖內部的貯藏性澱粉



培養根莖可自然的增生更多的根莖，所以根莖增殖的倍數大，雖然生長慢，但在培養上較少出現問題。成熟的根莖自然抽芽成苗，但不會太整齊，但自然抽芽的苗通常較健壯，移植成活率高。若要芽體發育整齊，需要催芽，促進根莖的頂芽或側芽發育成為莖葉。主要的影響因子如下：1.生長調節劑：培養基添加生長素NAA會刺激根莖的生長，並增加鮮重。添加BA後根莖發育較細，減少鮮重，減少根莖分支數量。根莖在光照下培養，BA 會誘導莖葉的形成。2.活性碳：培養基添加活性碳會降低根莖鮮重累積的速率，卻有利於幼芽誘導，並增加其分支的數量。活性碳具有強的吸附能力吸附培植體與培養基釋放出的物質。若不添加生長素，而添加了活性碳，也有助於新芽及根的發育。3.醣類：最常用的糖類種類為蔗糖與果糖，但在芽體發生及後續幼苗的發育會因濃度和種類不同而有所差異。5% 蔗糖有助於根莖誘導新芽。4.營養元素：培養蕙蘭根莖，無機鹽類的作用尚未經系統性研究。但高濃度氨離子會抑制芽的誘導與發育。

## (六)組培苗移植

國蘭的組培苗發育到具有2片以上葉片，株高至少要高於5公分，並具有二條以上的幼根，根尖具有活力而不黑化，並具有肉眼可見的假球莖可行移植出瓶(圖6)。國蘭瓶苗於栽培區先行馴化後，可用水苔或碎石混細蛇木屑進行移植栽培。待見新芽萌發後，即可視為移植成功。



圖6.蕙蘭組培苗的馴化與出瓶栽培

## (七)玉華四季蘭的組織培養

### 1.無菌培植體建立

無菌播種係利用玉華四季蘭人工授粉約5-6個月後之未開裂蒴果，進行未熟胚(immature embryo)無菌播種。蒴果先以清水充分洗

淨，將一些污垢、塵土擦拭乾淨後，再利用70%酒精棉擦拭蒴果表面。若蒴果尚未裂開，可將蒴果以0.5%次氯酸鈉(sodium hypochlorite, NaOCl)除菌液充分搖盪15分鐘，再於無菌操作台內以無菌水沖洗後即可播種。播種時將除菌過的蒴果以解剖刀切開，利用無菌播種勺刮取種子播於培養基上，約經過3-4個月的培養後，可獲得多數無菌根莖(rhizome)(圖7)；而後將根莖繼代培養於根莖生長培養基，待根莖直徑達2-3 mm後再進行後續試驗。芽體無菌化之流程與上述無菌播種類似，將長約10 cm 新生芽體以70%酒精棉擦拭表面，於乾淨桌面以解剖刀剝除外部葉片，於無菌操作台內利用0.5% NaOCl 溶液除菌15 min，再經無菌水清洗3-4 次，利用無菌解剖刀剝除其餘葉片，而後切取假球莖基部腋芽培養於芽體誘導培養基，經培養約4-6 週後，腋芽逐漸萌發生長，可建立玉華四季蘭瓶苗無菌培養(圖8)。

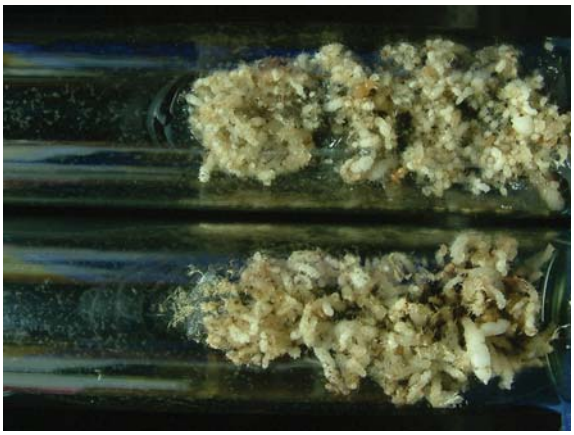


圖7.未熟胚播種於適當培養基，可獲得大量無菌根莖。

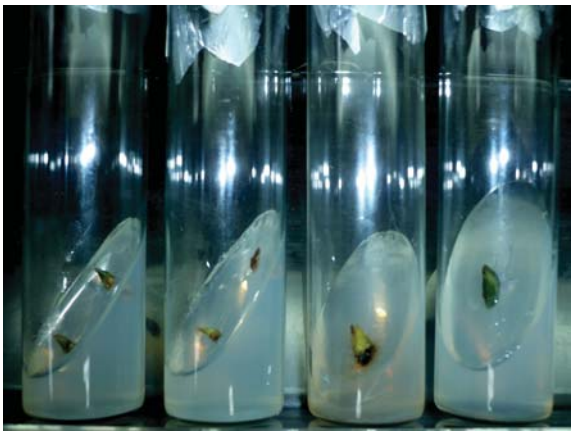


圖8.腋芽培養於適當培養基，可以建立芽體無菌培養。



圖9.根莖培養於適當培養基，可以大量繁殖生長良好粗狀根莖。

## 2.根莖的生長及增殖

切取長約1.5-2 cm 之根莖培養於含有適量NAA 及Peptone 組

合的固態培養基，接種後將材料置於25±1℃之恆溫、黑暗環境下培養。結果顯示，可大量繁殖生長良好之粗狀根莖(圖9)。

### 3.芽體誘導

將長約1.5-2 cm 之粗壯根莖(直徑約2-3 mm)培養於含有適量BA、NAA 與椰子汁組合之MS 花寶固態或液態培養基，接種後將材料分別置於25±1 ℃之恆溫、照光(固態培養約2000 Lux；液態培養約600 Lux)下培養。結果顯示，液態培養(圖10)較固態培養(圖11)具有較佳的芽體誘導效果，平均每段根莖可得約4.6個芽體，固態培養僅約3.2個芽體，且液態培養所得芽體亦較為粗壯。



圖10.根莖培養於液態培養基，具有較佳的芽體誘導效果。

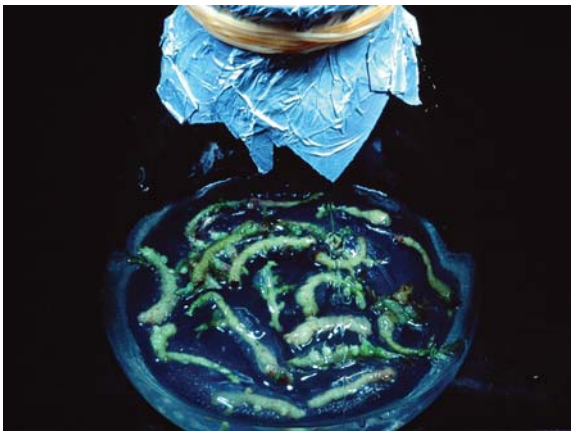


圖11.根莖培養於固態培養基，芽體誘導形成之情形。

### 4.小苗、生長與增殖

將已形成芽體(約3-5 mm)根莖培植體繼代培養於含有適量BA、NAA與香蕉泥組合之MS花寶固態培養基，結果顯示上述根莖培植體培養於適當培養基後，培植體上之小芽體可持續生長，形成大量小苗(圖12)。此外，取苗長約2-3 cm小苗繼代培養於含有適量BA、NAA與香蕉泥組合之MS花寶固態培養基，可以促使小苗生長，而後在小苗基部萌發小芽體，可形成芽長芽的大量繁殖模式(圖13)。



圖12.經芽體誘導處理後之根莖培植體培養於適當培養基，其小苗大量形成之情形。



圖13.小苗培養於適當培養基，其生長與芽長芽增殖之情形。

## 5.小苗發根與馴化

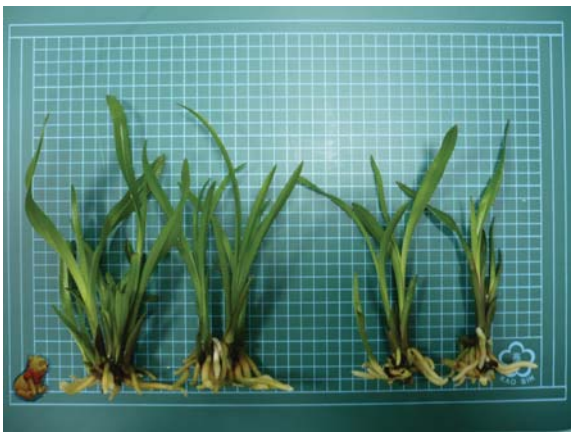


圖14.小苗培養於適當培養基，促使小苗長出健壯根系之情形。

取苗長約2-3 cm 小苗繼代培養於含有適量BA、NAA 與香蕉泥組合之花寶固態培養基，培養4-5 個月後可促使小苗生長健壯，並且約有70%小苗長出約2-4條長約3 公分的健壯根(圖14)。馴化處理係將上述已發根之玉華四季蘭瓶苗(高約7-10 cm)出瓶，用水洗淨根部附著之培養基，移植於內含濕潤水苔之塑膠軟盆(直徑9 cm)，在防雨遮陰網室環境進行馴化處理，馴化初期應注意保濕以避免組培幼苗枯死，但在適當時間(約2個月)需要更換至碎石與蛇木屑之混合介質栽培，爾後則可依一般栽培管理方式進行(圖15、圖16)。

使用國蘭的組織培養苗做為國蘭經濟栽培的種苗，具有整齊、不帶有病原菌的優點，可使長期栽培的品種恢復活力，做為定期更新之用種原之用，但效果如何，尚待實例驗證。



圖15.健壯發根苗移植於防雨遮陰網室環境馴化6 個月之情形。

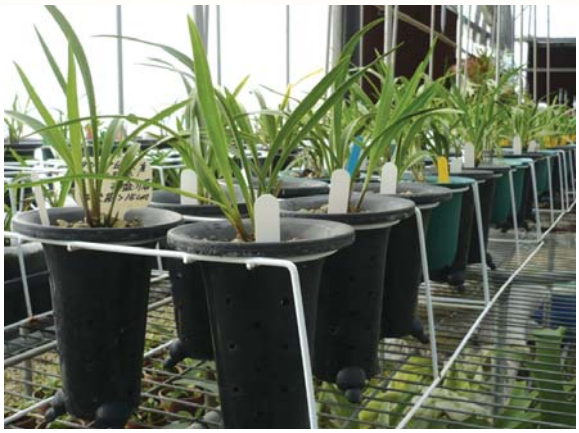


圖16.組培苗於防雨遮陰網室環境栽培1年之情形。

## 三、深入閱讀文獻


1.王博仁 1981 蕙蘭屬的無菌播種與器官分化 中央研究院植物研究所專刊第四號：植物組織培養與細胞培養(張唯勤 編), pp22-30, 中央研究院植物研究所, 台北。

2.Arditti, J. and R. Ernst, 1993. Mircopropagation of orchid. John Wiley & Sons, New York, 665p.

3.Chang, C. and W. C. Chang, 2000a. Effects of thidiazuron on bud development of Cymbidium sinense Willd in vitro. Plant Growth Regul. 30(2):171-175.

4.Chang, C. and C. Chang, 2000b. Micropropagation of Cymbidium ensifolium var. misericors through callus-derived rhizomes. In Vitro Cell Dev. Bio. Plant 36:517-520.

5.Choi, S. O., Chung, J. D. and J. H. Lee, 1996. Effect of culture media on rhizome formation and its subsequent growth from shoot-tip culture of temperature Cymbidium species. Korean J. Plant Tissue Culture 23:167-172.

6.Du Puy, D. J. and P. Cribb. 1988. The Genus Cymbidium. Timber Press, Portland pp:236.

7.Morel, G. M. 1960. Producing virus free cymbidiums. Amer Orchid Soc. Bull. 29:495-497.
8.Shimasaki, K. and S. Uemoto, 1990. Micropropagation of a terrestrial Cymbidium species using rhizomes developed from seeds and pseudobulb. Plant Cell Tissue and Organ Culture 22:237-244.
9.Su, H. J. 2000. Cymibidium. In T. C. Husng. (ed) Flora of Taiwan, Second edition, V5, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei.