

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學系

碩士論文

Department of Horticulture
College of Bioresources and Agriculture
National Taiwan University

Master Thesis

乙烯抑制劑對報歲蘭根莖抽梢之影響及臺灣原生豆蘭
屬相關種之無菌播種

Effects of Ethylene Inhibitors on Shooting of *Cymbidium*
sinense Rhizomes and Asymbiotic Germination of
Bulbophyllum Related Species Native in Taiwan

馬若婷

Ruo-Ting Ma

指導教授：張耀乾 博士

Advisor : Dr. Yao-Chien Alex Chang

中華民國九十九年一月

January, 2010

致謝

本論文承蒙恩師 張耀乾博士於修業期間的諄諄教誨與鼓勵，始我在學業研究與處事態度上受益良多。文稿初成，複蒙許圳塗教授及沈再木教授於百忙之際，仍不吝撥冗對本論文費心斧正，提供寶貴意見，特誌卷首謹誌最深之謝忱。

感謝林維明先生對試驗的大力支持及提供豆蘭試驗材料，如果沒有您的幫助真不知道如何完成這本論文。感謝我的組織培養啟蒙老師張正老師，謝謝老師帶領我進入組培這個很棒的領域，也謝謝老師在我畢業後仍不斷給予建議與指導。感謝鄭穹翔老師協助樹脂切片製作，因為老師的幫助我才可以得到不錯的豆蘭種子切片使論文更臻完善。感謝林瑞松老師給予鼓勵，雖然老師很忙還是會開朗的跟我聊天，一直在麻煩老師，特此深表謝意。

首先謝謝花卉館龐大助理群之首的韶好學姊，投稿 JASHS 僅 33 天就被接受的救世主 PiliJ，國文真的很好的佳盛學長，東西交給你就對了的翊婷，教我小數點對齊的子瑄，一起共享組培室的文秋學姊、怡嘉學姊和很錐的紫維學姊，感謝你們在我有困難時給予幫助。謝謝阿潘學姊不厭其煩的解答我的問題，謝謝跟我歷經組培室大小災難的黑圖學姊，妳高超的零污染組培技術和幽默的個性，我還有得學呢。謝謝小范學姊分享 GC 先生和八卦，以及謝謝一表人才的王進學學長總是被我拿來當水電工。謝謝小么學姊和欣怡學姊的幫助和照顧。大力感謝有著淵博的知識和廣大的心胸讓我佩服的五體投地的偽教授 pipi，有當業務潛力的亞勛，笑點低笑聲很爽朗的兔兔，很顧家孝順的好男人江豪，超級貼心和真的很優秀的文茹，為了一起走一小段路回家總是互等很久的小頤，一心二公子的小黑，媽媽個性但是少女心的小天使維倩，有著開朗笑容的建佑，學會騎腳踏車的佳姝和很愛種蔬菜的碧霜，因為有你們的陪伴讓我碩士生活無比愉快。感謝小寶、毓真、怡景、聿純、阿秉、魚蛋、大毛、蕙心、笑笑、思佑、丁禎、雁子、TYA、慈柔等學弟妹的關心與鼓勵，接下來就換你們畢業了。謝謝白暄的可愛插畫和貼心的小禮物，讓我大感動。

感謝大學時的好朋友丸子、小咪、曾顯皓 索羅比利王李廉、OA、小恬恬、Lemon、JO、毛、欣穎、恆睿、哇哈哈、修合和阿秀的加油打氣，讓我在失落的時候又有在站起來的力量。感謝中興女排和臺大女排讓我有強壯的體魄，余育蘋老師和隊友們的鼓勵真是倍感溫馨。

感謝我的豆蘭與報歲蘭小孩，因為你們的壯烈犧牲，我才可以得到寶貴的 data，還要感謝強大的肝先生，讓我撐過無數次爆肝式熬夜趕報告。也要感謝進順的陪伴，總是同甘共苦，還要承擔我暴走時的怒吼。最後要感謝我的家人，感謝爸媽的照顧讓我在求學生涯中無後顧之憂，還每天煮超好吃的飯菜給我吃，謝謝姊姊容忍我的賴皮和懶惰，謝謝同為研究生的哥哥一直以來的鼓勵。謹以此論文獻給我最摯愛的家人和關心我的好朋友們。

摘要 (Abstract)

本論文分為兩部分，第一部分探討乙烯抑制劑對報歲蘭根莖抽梢之影響，而第二部分研究臺灣原生豆蘭屬相關種之無菌播種。

於根莖繁殖培養基中施用不同濃度之 aminooxyacetic acid (AOA)、 AgNO_3 、1-methylcyclopropene (1-MCP)，以抑制乙烯生合成或作用，間接探討乙烯對報歲蘭根莖器官分化的影響。另於報歲蘭根莖培養時期燻蒸乙烯，以瞭解乙烯對於報歲蘭器官生長分化之直接影響。

報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於添加 AgNO_3 之液體根莖繁殖培養基中皆有芽體及根部分化，而培養於未添加 AgNO_3 之根莖繁殖培養基中有最多之根莖分化數目。兩次重複試驗中，液體培養基添加 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組誘導較多芽體，培植體於培養 10 天後觀察到鞘葉 (sheath leaf) 的形成，代表此時頂端分生組織已趨向芽體分化。於培養基添加 AgNO_3 處理者之瓶內乙烯濃度均較未添加 AgNO_3 者高。

報歲蘭根莖培養於添加 AOA 以及未添加乙烯相關藥劑之固體根莖繁殖培養基無芽體和根部形成，但培養於添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 者則有芽體和根系分化之情形，故乙烯作用抑制劑較乙烯生合成抑制劑能促進報歲蘭分化芽體。

另於不同培養期間對液體培養基添加 AgNO_3 ，探討不同長度之新生報歲蘭根莖其芽體分化受影響之情形。結果不同時期添加 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 者其培植體均有芽體發生，培養於未添加 AgNO_3 培養基者無芽體分化。

於培養時期燻蒸 1 及 $10 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 無法有效誘導報歲蘭根莖分化芽體，而培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理有芽體分化，但培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 且燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之處理並未有芽體形成。故乙烯會抑制報歲蘭根莖分化芽體。

造成蘭科種子不易發芽之因素，包括胚發育不完全、缺乏胚乳、發芽抑制物質之累積及種皮不滲水性等。本論文第二部分針對可能影響豆蘭屬 (*Bulbophyllum*) 植物種子發芽之因素設計試驗，研究培養方式、種子前處理、果莢成熟度及不同濃度 fluridone (ABA 生合成抑制劑) 處理對豆蘭屬種子無菌發芽之影響且調查不

同種豆蘭成熟種子的發芽率。

紋星蘭 (*Bulb. affine*) 與烏來捲瓣蘭 (*Bulb. macraei*) 種子無菌播種發芽率皆以 1/2 MS 固體培養基較液體培養者高。固體培養者其原球體發育較液體培養者快，且液體培養者之原球體於培養後期均有玻璃質化現象。

使用次氯酸鈉、氫氧化鈉與氯化氫三種化學藥劑及超音波震盪於無菌播種前處理小豆蘭種子一段時間，以未經前處理者發芽率最高 (59.3%)，各前處理組均無法有效提高發芽率，且小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 種子發芽率隨超音波震盪或浸泡1%次氯酸鈉處理時間增加而下降。

取自然授粉之果莢進行無菌播種，果莢開裂當天播種者之發芽率最低 (27.9%)，而果莢開裂前 85 天播種者之發芽率最高 (50.4%)。另取人工授粉後 120、150、180 及 270 天之果莢進行無菌播種，其中以人工授粉後 270 天者有最高的發芽率 (72.6%)，其果莢之成熟度相當於開裂前 90 天。

於授粉後 130 天對黃萼捲瓣蘭果莢處理不同濃度之 fluridone 不會影響採收果莢之大小及鮮重，處理 50 及 100 μM fluridone 皆可有效提高種子發芽率，其中以 50 μM fluridone 處理者之發芽率最高，為 33.4%，而未施用者僅 15.6%。

六種臺灣原生豆蘭屬植物皆有一部分種子發芽但種間的發芽階段有些許差異，而發芽率由高往低排序分別為狹萼捲瓣蘭、阿里山豆蘭、白毛捲瓣蘭、臺灣捲瓣蘭、小豆蘭，最低者為烏來捲瓣蘭。

Abstract

The thesis is consistent of two chapters. The first chapter describes the effects of ethylene inhibitors on shooting of *Cymbidium sinense* rhizomes. The second chapter elucidates asymbiotic germination of *Bulbophyllum* related species native in Taiwan.

Aminooxyacetic acid (AOA), silver nitrate (AgNO_3), and 1-methylcyclopropene (1-MCP) were applied to indirectly clarify the ethylene effect on shoot growth and differentiation of *Cym. sinense*. Additionally, ethylene was supplied during culture to investigate its direct effect on organ differentiation of *Cym. sinense*.

Cymbidium sinense 'Rui-Bao' \times *Cym. sinense* 'Guang-Hua-Die' rhizomes cultured in liquid rhizome propagating medium supplied with AgNO_3 all developed shoots and roots. Rhizomes cultured in AgNO_3 -free medium (control) had more newly formed rhizomes. Liquid medium supplied with 50 μM AgNO_3 had more differentiated shoots in both replicated experiments. Sheath leaf formation was observed at 10 days after culture, indicating the differentiation of shoot from rhizome. Ethylene concentrations in cultural vessels were higher in AgNO_3 -supplied treatments than in AgNO_3 -free controls.

Cymbidium sinense rhizomes cultured in solid rhizome propagating medium supplied with AOA or ethylene-inhibitor-free control did not form shoots and roots, but did differentiate some in medium supplied with 100 μM AgNO_3 . Thereby, ethylene perception inhibitors rather than ethylene synthesis inhibitors were more effective for *Cymbidium* shoot inducing.

AgNO_3 was added to cultural medium at different times after subculture to test the effect of rhizome lengths on subsequent organ differentiation. When 50 μM AgNO_3 were supplied in liquid rhizome propagating medium at different times after subculture, all rhizomes formed shoots compared with that no shoot formation was found in

AgNO₃-free controls. More shoot formation was recorded when 50 µM AgNO₃ was supplied at two weeks after subculture.

Shoot differentiation of *Cym. sinense* rhizomes were not induced by the fumigation of 1-MCP at 1 and 10 µL·L⁻¹, but were induced by supplement of 100 µM AgNO₃ in medium. However, combination of 1 µL·L⁻¹ ethylene and 100 µM AgNO₃ treatments did not induced the shoot differentiation of *Cym. sinense* rhizomes. These results indicated that ethylene inhibited shoot differentiation of *Cym. sinense* rhizomes.

Factors contributing to low germination of Orchidaceous plants include incompletely developed embryos, lack of endosperm, accumulation of germination-inhibiting metabolites, and seed coat impermeability. The second chapter focuses to overcome the possible difficulties in *Bulbophyllum* seed asymbiotic germination, so that cultural medium types, seed pretreatments, capsule maturities, fluridone (an ABA synthetic inhibitor) treatments were tested. Also, germination rates of mature seeds in different species were determined.

Seed germination of *Bulb. affine* and *Bulb. macraei* were higher in solid 1/2 MS medium than in liquid medium. Protocorm growth were also faster in solid medium; protocorms cultured in liquid medium turned vitrified consequently.

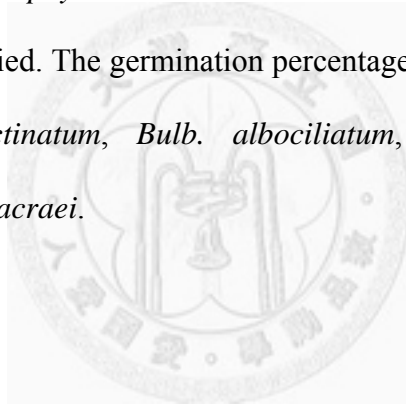
Seeds of *Bulb. aureolabellum* were pretreated with sodium hyperchloride (NaOCl), sodium hydroxide (NaOH), hydrogen chloride (HCl), and ultrasonic vibration for various durations. Highest germination was recorded in control (59.3%), and treatments tested in this study did not improve germination. Moreover, germination decreased with increasing NaOCl concentration and ultrasonic vibration duration.

The lowest germination percentage (27.9%) was observed when sowing seeds on

the day of *Bulb. retusiusculum* capsule splitting, and the highest (50.4%) was obtained by sowing seeds 85 days before capsule splitting. In another experiment, *Bulb. retusiusculum* capsules were harvested at 120, 150, 180, and 270 days after artificial pollination (DAP) for *in vitro* germination.

Fluridone application at 130 DAP did not affect the sizes and fresh weights of capsules at harvest; capsules treated with 50 and 100 μM fluridone had higher subsequent germination rates. The highest germination percentage was recorded in capsules treated with 50 μM fluridone, which was 33.4%, compared with that of 15.6% in controls.

All six species of *Bulbophyllum* studied had some seeds germinated, but rate in protocorm development varied. The germination percentage from high to low were *Bulb. drymoglossum*, *Bulb. pectinatum*, *Bulb. albociliatum*, *Bulb. taiwanense*, *Bulb. aureolabellum*, and *Bulb. macraei*.



目錄

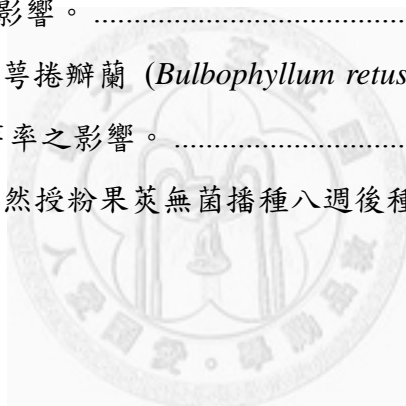
| | |
|---|-----|
| 致謝..... | i |
| 中文摘要..... | ii |
| 英文摘要..... | iv |
| 目錄..... | vii |
| 表目錄..... | ix |
| 圖目錄..... | xi |
| 第一章 乙烯抑制劑對報歲蘭根莖抽梢之影響..... | 1 |
| 一、前言 (Introduction)..... | 1 |
| 二、前人研究 (Literature review) | 3 |
| (一) 報歲蘭簡介..... | 3 |
| (二) 蕙蘭屬根莖分化之芽體型態解剖..... | 3 |
| (三) 乙烯之生合成途徑..... | 4 |
| (四) 影響組培容器瓶內乙烯濃度之因子..... | 4 |
| (五) 乙烯對培植體器官分化與發育之影響..... | 8 |
| 三、材料與方法 (Materials and Methods)..... | 11 |
| 四、結果 (Results)..... | 19 |
| 試驗一：AgNO ₃ 對報歲蘭根莖生長分化之影響..... | 19 |
| 試驗二：乙烯生合成及作用抑制劑對報歲蘭根莖生長分化之影響..... | 21 |
| 試驗三：不同時期添加 AgNO ₃ 對報歲蘭根莖生長分化之影響..... | 23 |
| 試驗四：燻蒸不同濃度乙烯對瓶內氣體之影響..... | 24 |
| 試驗五：以綠豆芽乙烯三相反應檢測燻蒸 1-methylcyclopropene 之有效 性..... | 25 |
| 試驗六：燻蒸 1-methylcyclopropene (1-MCP) 及乙烯對報歲蘭根莖生長分 化之影響..... | 25 |
| 五、討論 (Discussion)..... | 53 |
| 第二章 臺灣原生豆蘭屬相關種之無菌播種..... | 61 |
| 一、前言 (Introduction)..... | 61 |
| 二、前人研究 (Literature review)..... | 63 |

| | |
|---|-----|
| (一) 臺灣原生豆蘭屬之簡介..... | 63 |
| (二) 蘭胚發生..... | 64 |
| (三) 影響蘭科植物發芽之因素..... | 67 |
| 三、材料與方法 (Materials and Methods)..... | 74 |
| 四、結果 (Results)..... | 80 |
| 試驗一：液體及固體培養對臺灣原生豆蘭屬果莢無菌播種發芽之影響..... | 80 |
| 試驗二：種子前處理對小豆蘭 (<i>Bulb. aureolabellum</i>) 果莢無菌播種發芽之影響..... | 81 |
| 試驗三：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulb. retusiusculum</i>) 自然授粉果莢無菌播種發芽之影響..... | 81 |
| 試驗四：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭人工授粉果莢無菌播種發芽之影響..... | 82 |
| 試驗五：Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭人工授粉果莢無菌播種發芽之影響..... | 83 |
| 試驗六：不同種臺灣原生豆蘭無菌播種之種子發芽及發育..... | 84 |
| 五、討論 (Discussion)..... | 100 |
| 參考文獻 (Reference)..... | 107 |

表目錄

| | |
|--|----|
| 表 1.1. AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體芽體生長分化之影響。..... | 27 |
| 表 1.2. AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。..... | 28 |
| 表 1.3. AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根莖生長分化之影響。..... | 29 |
| 表 1.4. AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。..... | 30 |
| 表 1.5. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體芽體生長分化之影響。..... | 31 |
| 表 1.6. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。..... | 31 |
| 表 1.7. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根莖生長分化之影響。..... | 32 |
| 表 1.8. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO ₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。..... | 32 |
| 表 1.9. 不同時期添加 50 μM AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’培植體芽體生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。..... | 33 |
| 表 1.10. 不同時期添加 50 μM AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’培植體根莖前端芽體生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。..... | 33 |
| 表 1.11. 不同時期添加 50 μM AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’培植體根莖生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。..... | 34 |
| 表 1.12. 不同時期添加 50 μM AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。..... | 34 |
| 表 1.13. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) 與乙烯處理對綠豆芽下胚軸長度、直徑及主根長度之影響。..... | 35 |
| 表 1.14. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體芽體生長分化之影響。..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 表 1.15. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養 13 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。..... | 36 |
| 表 1.16. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根莖生長分化之影響。..... | 37 |
| 表 1.17. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。..... | 37 |
| 表 2.1. 果莢成熟度 (果莢開裂前天數) 對黃萼捲瓣蘭種子無菌播種 70 天後發芽率之影響。..... | 85 |
| 表 2.2. 授粉後天數對黃萼捲瓣蘭種子無菌播種 70 天後發芽率之影響。..... | 85 |
| 表 2.3. Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 人工授粉果莢長度、寬度及鮮重之影響。..... | 86 |
| 表 2.4. Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 人工授粉果莢無菌播種 70 天後發芽率之影響。..... | 86 |
| 表 2.5. 六種豆蘭屬植物自然授粉果莢無菌播種八週後種子發育階段及發芽率。..... | 87 |



圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖 1.1. 報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於添加不同濃度 AgNO_3 之液體對根莖繁殖培養基 9 週後，培植體生長分化之情形。 | 38 |
| 圖 1.2. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 0、7、10 天根莖分生組織解剖形態之特性。 | 39 |
| 圖 1.3. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 14、17、21 天根莖分生組織解剖形態之特性。 | 40 |
| 圖 1.4. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 24、28、35 天根莖分生組織解剖形態之特性。 | 41 |
| 圖 1.5. AgNO_3 處理之液體培養基配製後一週（未放置培植體）瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度。 | 42 |
| 圖 1.6. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養期間瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度之影響。 | 43 |
| 圖 1.7. 報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於添加不同濃度 aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO_3 之固體根莖繁殖培養基 13 週後培植體生長分化之影響。 | 44 |
| 圖 1.8. Aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO_3 處理之固體培養基配製後一週（未放置培植體）瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度。 | 45 |
| 圖 1.9. Aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養期間瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度之影響。 | 46 |
| 圖 1.10. 不同培養時期添加 AgNO_3 (50 μM) 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於液體根莖繁殖培養基 9 週後培植體生長分化之影響。 | 47 |
| 圖 1.11. 培養期間添加 AgNO_3 (50 μM) 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於液體根莖繁殖培養基 9 週後的培植體側芽生長分化之情形。 | 47 |
| 圖 1.12. 不同時期添加 AgNO_3 (50 μM) 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於根莖繁殖液體培養基 9 週後，芽體(A)、根莖(B)及根部(C) ACC oxidase 活性之影響。 | 48 |
| 圖 1.13. 燻蒸乙烯濃度與瓶內乙烯濃度之關係。 | 49 |
| 圖 1.14. 燻蒸不同濃度乙烯 24 小時對瓶內 CO_2 濃度之影響。 | 49 |
| 圖 1.15. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、 AgNO_3 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於根莖繁殖液體培養基 9 週後培植體生長分化之影響。 | 50 |

| | |
|--|----|
| 圖 1.16. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO ₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養第 0、1、2、3、5、7、9、11 及 13 週瓶內二氧化碳(A)及乙烯(B)濃度之影響。..... | 51 |
| 圖 1.17. 燻蒸 1 μL·L ⁻¹ 乙烯 24 小時後，報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養瓶內乙烯濃度隨時間變化之情形。..... | 52 |
| 圖 2.1. 參試之紋星蘭果莢外觀。..... | 88 |
| 圖 2.2. 參試之烏來捲瓣蘭果莢外觀。..... | 88 |
| 圖 2.3. 紋星蘭 (<i>Bulbophyllum affine</i>) 無菌播種於液體和固體培養基後種子發育之階段變化。..... | 89 |
| 圖 2.4. 液體與固體培養對紋星蘭種子發芽與小苗生長之影響。..... | 90 |
| 圖 2.5. 烏來捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum macraei</i>) 無菌播種於液體和固體培養基後種子發育之變化。..... | 91 |
| 圖 2.6. 液體與固體培養對烏來捲瓣蘭種子發芽與小苗生長之影響。..... | 92 |
| 圖 2.7. (A)紋星蘭與(B)烏來捲瓣蘭種子之縱切面。..... | 93 |
| 圖 2.8. 參試之小豆蘭果莢外觀。..... | 93 |
| 圖 2.9. 前處理對小豆蘭種子無菌播種 6 週後發芽率之影響。..... | 94 |
| 圖 2.10. 黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 果莢開裂前，果莢大小及重量之變化情形。..... | 95 |
| 圖 2.11. 開裂前天數之黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 果莢外觀。..... | 96 |
| 圖 2.12. 黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 人工授粉後，果莢大小及重量之變化情形。..... | 97 |
| 圖 2.13. 授粉後天數之黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 人工授粉果莢外觀。..... | 98 |
| 圖 2.14. 不同授粉天數後，黃萼捲瓣蘭 (<i>Bulbophyllum retusiusculum</i>) 胚發育與種子形成之情形。(A) 授粉後 120 天，(B,C) 150 天，(D) 180 天，(E) 270 天。..... | 99 |

第一章 乙烯抑制劑對報歲蘭根莖抽梢之影響

Chapter 1. Effects of Ethylene Inhibitors on Shooting of *Cymbidium sinense* Rhizomes

一、前言 (Introduction)

報歲蘭 (*Cymbidium sinense* Willd) 為原生於臺灣的蘭科 (Orchidaceae) 蕙蘭屬 (Cymbidieae) 植物。由於近年來報歲蘭價位較為普及化，無論國內外的需求量皆日益增多。傳統繁殖以分株法為主，此法繁殖速率緩慢，不足以供應市場需求，所以快速且大量繁殖報歲蘭之方法是迫切需要的。

組織培養為許多作物大量繁殖的重要方法，通常使用不同auxin與cytokinin比例之培養基來誘導器官分化。報歲蘭依種子發芽後器官分化情形歸類為溫帶性蕙蘭，此類種子發芽不易，發芽後先形成根莖 (rhizome)，再由根莖分化出芽體。要較快速且大量繁殖報歲蘭可先利用無菌播種 (李, 1991)、頂芽培養 (Hasegawa and Goi, 1987)、花芽培養 (Shimasaki and Uemoto, 1990) 等方法培養出根莖，然後以根莖做培植體培養於高auxin/cytokinin比例之培養基促進根莖延長、再生，進而得到大量的根莖，再將根莖培養於低auxin/cytokinin比例之培養基誘導分化芽體 (潘, 2007; Peak and Kozai, 1998)，進而產生大量小植株 (plantlets)。

目前報歲蘭的組織培養有培植體生長緩慢、芽體分化不一致、後續芽體生長緩慢等問題，影響報歲蘭組織培養期間器官分化之因子除上述生長調節劑外，乙烯可能亦為影響因素之一。乙烯為氣體的植物荷爾蒙，在組織培養期間乙烯會累積在瓶內而影響培植體器官分化 (Biddington, 1992)。因為組織培養的過程中，為了避免微生物的污染及延緩植物與培養基失水，常將植物培養於高密閉性的環境下，造成氣體與外界環境交換減緩而累積於瓶內，而使乙烯於組織培養時反應較劇烈。

潘 (2007) 以報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’ (*Cym. sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’) 根莖培養於添加1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)之抽芽培養基中，芽體及根部的生長明顯受到抑制，而培養於添加AgNO₃抽芽培養

基者有促進芽體生長效果，推測乙烯會抑制報歲蘭芽體生長。為瞭解乙烯對報歲蘭根莖生長及分化的影響，潘 (2007) 將報歲蘭根莖培養於添加 ACC、aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 之根莖繁殖培養基中，其中培養基添加 ACC 會促進根莖生長，而添加 AgNO₃ 則會抑制根莖的生長，但是會促進芽體分化及生長。

本研究著重於探討乙烯抑制劑對報歲蘭根莖分化芽體能力之影響，故需將報歲蘭根莖培養於不會促進芽體分化的培養基中進行試驗。已知報歲蘭根莖培養於 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) 的低氮肥濃度培養基中會有部分根莖直接分化成芽體 (Huang and Okubo, 2005; Ogura-Tsujita and Okubo, 2006a)，可將報歲蘭根莖培養於添加 1 mg·L⁻¹ NAA 及 0.1 mg·L⁻¹ BA 之培養基中，在此高 auxin/cytokinin 比例之培養基中其器官發生僅有根莖之增殖，無芽體及根部分化 (潘，2007)，而得以不被其他因素干擾乙烯之效果。

本研究欲探討乙烯對報歲蘭根莖器官生長與分化之影響，於根莖繁殖培養基中施用不同濃度之 AOA、AgNO₃ 及 1-methylcyclopropene，使用負向調控方式抑制乙烯生合成或作用，以得知報歲蘭根莖於缺乏乙烯生合成或作用時其器官分化的情形，且於報歲蘭根莖培養時期燻蒸乙烯，以瞭解乙烯對於報歲蘭器官生長分化之影響。並於不同培養期間在培養液添加 AgNO₃，探討不同長度之新生報歲蘭根莖其分化芽體之情形。

二、前人研究 (Literature review)

(一) 報歲蘭簡介

報歲蘭 (*Cymbidium sinense* Willd) 屬於蘭科 (Orchidaceae)、萬代亞科 (Vandoideae)、蕙蘭族 (Cymbidieae)、Cyrtopodiinae 亞族之下的蕙蘭屬 (*Cymbidium* spp.) 植物。Peidgeon (1992) 將蕙蘭屬植物依生長地區分為三類，分別為大花種、小花地生種及小花熱帶種。而報歲蘭為小花地生型蕙蘭，亦稱東洋蘭或國蘭，其花莖直立，上有一至數朵小花，花色素雅，多具有幽香，為目前臺灣地區經濟栽種的主要蘭花之一。報歲蘭葉姿挺拔獨特，花香高雅芳香，素有王者之香的雅號，是極具發展潛力之經濟作物。由於近年來國蘭價位較為普及化，無論國內外的需求量皆日益增多，但傳統繁殖以分株法為主，此法繁殖速率緩慢，不足以供應市場需求 (陳和張，2004)。

通常報歲蘭每年春天由假球莖基部節位上方分化長出營養芽，營養芽經7-8個月的生長漸趨成熟，當營養芽葉片伸長達最大時，假球莖才快速肥大。於農曆春節盛花，日溫20 °C夜溫15 °C最有利於花梗抽長及花序發育 (李，1991)。

報歲蘭依發芽後器官之分化分類為溫帶性蕙蘭，此類種子發芽不易，發芽後先形成根莖 (rhizome)，待根莖發育至某一程度後開始分化莖葉。根莖上具有節，節上之鱗片葉下覆有腋芽，根莖前端有一大一小鱗片葉覆蓋，隨根莖伸長不斷有新的鱗片葉產生，鱗片葉下的生長點可能形成芽體或根莖 (張，1994)。

(二) 蕙蘭屬根莖分化之芽體解剖型態

溫帶性蕙蘭，其種子發芽不易，而種子發芽後先形成根莖，再由根莖分化出芽體。以掃描式電子顯微鏡觀察玉華蘭 (*Cym. ensifolium* cv. Yuh Hwa) 根莖分化芽體之變化，根莖具有鱗片葉 (cataphyll)，其尖端狹窄部分只佔以分生組織為中心的30 °，而葉基部只佔180 °。培養於低auxin/cytokinin比例之培養基三日後，葉片略變大且所佔角度增加；十日後，其葉片基部佔以分生組織為中心的360 °範圍，為

單子葉植物葉原體發生之特有構造 (邱和王, 1985; 楊, 1982)。

而張 (1994) 以石蠟切片法觀察素心蘭 (*Cym. ensifolium* var. *misericors*) 根莖自然分化芽體之變化, 當根莖開始分化成芽體其莖頂分生組織會成尖狀, 且鱗片葉距莖頂分生組織較遠, 而第一片鞘葉會包住莖頂分生組織, 但並非完全封閉, 會留有一小空隙, 第二片鞘葉葉基以 360° 圍繞莖頂分生組織, 有別於鱗片葉葉基之 180° 。

(三) 乙烯之生合成途徑

乙烯為碳氫化合物, 具有不飽和鍵, 是一種氣體植物荷爾蒙, 只要極微量的濃度, 即可使植物產生生理反應, 調節並影響許多植物生長、發育及逆境生理變化 (Abeles et al., 1992)。乙烯生合成路徑為: methionine (MET) 首先經酵素作用與 adenosine triphosphate (ATP) 結合形成活化狀態的S-adenosylmethionine (SAM), 然後經由ACC合成酶 (ACC synthase) 作用, 將SAM轉變成ACC, 再經由ACC氧化酶 (ACC oxidase) 分解產生乙烯、二氧化碳及氰酸 (Kende, 1993; Yang, 1985; Yang and Hoffman, 1984)。而SAM轉變成ACC之步驟在乙烯合成路徑中為速率限制步驟 (rate-limiting step), 若能控制此步驟, 即能調節乙烯之合成 (Yang and Hoffman, 1984)。

(四) 影響組培容器瓶內乙烯濃度之因子

1. 生物性因子

植株乙烯生合成量及對乙烯的敏感性受物種及品種特性影響。乙烯的產生量會依生長時期不同而異, 細胞快速分裂時會伴隨大量乙烯產生, 細胞增大時期乙烯產生量會下降, 當進入成熟老化階段、組織受到逆境或受傷時乙烯生成量會再次提升 (Abeles et al., 1992)。

在組織培養的過程中, 也會因培植體的種類差異使得乙烯的生成量不同, 如

癒合組織及懸浮培養時因培植體生長快速，乙烯的生合成量也較高，因此乙烯的產生與累積可能與培植體的生長和發育階段具有密切的關係 (Biddington, 1992)。在初代及繼代培養過程中通常需將一部分的組織切除而造成植株傷害，此時受傷的組織會產生創傷乙烯 (wound ethylene) (Yu and Yang, 1980)。

2. 非生物性因子

(1) 乙烯抑制劑

i. 乙烯生合成抑制劑

乙烯生合成抑制劑主要作用目標即是乙烯生合成中的酵素，藉由抑制酵素活性而減少乙烯生合成。2-aminoethoxyvinylglycine (AVG) 及 aminoxyacetic acid (AOA) 等化學藥劑抑制 ACC synthase 活性，造成 ACC 生成減少 (Serek et al., 2006)，其有效性局限於 SAM 轉換成 ACC 之步驟，但對 ACC oxidase 的活性並沒有抑制效果 (Yang and Hoffman, 1984)。而 AVG 也會抑制 SAM 生成，因其化學結構與乙烯前驅物 MET 的化學結構很類似，會與 MET 競爭合成酵素的同一部位，造成 SAM 生成量減少 (Yang and Hoffman, 1984)。CoCl₂ 及 α -aminoisobutyric acid (AIB) 等會抑制 ACC oxidase 活性，減少乙烯生成，其中 AIB 為一種 ACC 的類似物 (Yang and Hoffman, 1984)。

ii. 乙烯作用抑制劑

乙烯作用抑制劑可與乙烯受體結合，阻礙乙烯與乙烯受體結合，進而達到抑制乙烯反應之效果。目前已有一些乙烯作用抑制劑，如 AgNO₃、硫代硫酸銀 (silver thiosulfate; STS)、1-甲基環丙烯 (1-methylcyclopropene; 1-MCP) 及二環庚二烯 (2,5-norbornadiene; 2,5-NBD)。Kofranek 和 Paul (1975) 首先提出 AgNO₃ 可以抑制乙烯作用，但陸續也有許多報告指出，Ag⁺ 會造成重金屬污染及毒害，甚至促進乙烯生合成 (Aharoni and Lieberman, 1979; Atta-Aly et al., 1987)。而 STS 為一種 Ag⁺ 的錯合物，也具有抑制乙烯作用之功能 (Veen and van de Geijn, 1978)。

在90年代中期，美國科學家發現了一系列能夠抑制乙烯作用的化學物質，包括1-MCP、3,3-二甲基環丙烯(3,3-dimethylcyclopropene; 3,3-DMCP)、環丙烯(cyclopropene; CP)等。其中，1-MCP是一種效果良好的乙烯作用抑制劑(Sisler and Serek, 1997)，在美國已經獲得專利，並得到美國環保局的使用許可，其商品名為EthylBloc[®]及SmartFresh[™]。1-MCP為第一個無毒的乙烯作用抑制劑(Sisler and Blankenship, 1996)，而其與乙烯受體結合力較乙烯高十倍以上，當1-MCP與乙烯受體結合後，佔據乙烯受體的結合位置，此時不論是內生或外施乙烯都無法再與乙烯受體結合，進而達到抑制乙烯反應之效果(Serek et al., 2006)。1-MCP於常溫時為一種氣體分子，商業上常將此氣體分子吸收固定在粉末中，使用時只需根據所處理的園藝產品種類和密閉容器的體積，把一定量的粉末溶解於緩衝溶液或水中，1-MCP氣體就會立即釋放出來。因此施用後應立即封閉該容器，以防止內部的1-MCP氣體洩漏(Serek et al., 2006)。

(2) 二氧化碳

提高二氧化碳和降低氧氣濃度可抑制或延緩乙烯作用(Yang, 1985)。園產品包裝及貯藏技術中之氣變(modified atmosphere)及氣調(controlled atmosphere)就以此原則延長園產品壽命。改變氣體組成而能延長園藝作物壽命的可能原因為作物呼吸作用(Mathooko, 1996)及乙烯作用(John, 1997; Lelièvre et al., 1997)受影響，但其作用機制尚未明確。雖Burg和Burg(1967)提出二氧化碳和乙烯可能競爭相同的結合位點，當濃度到達一定水平時可抑制乙烯作用，作為乙烯作用抑制劑。但此推論已被推翻，De Wild等人(1999)證實二氧化碳不能與乙烯競爭受體位置，而二氧化碳抑制乙烯作用可能為抑制ACC synthase活性。

二氧化碳對乙烯之促進或抑制作用受濃度所影響。在低乙烯濃度環境下二氧化碳能有效抑制或延緩乙烯作用，而當乙烯濃度高於 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，二氧化碳即喪失抑制效果會喪失(Yang, 1985)。Kumar等人(1987)指出二氧化碳在瓶內扮演的角色為培養初期促進乙烯之生合成，培養後期則為乙烯作用抑制劑。

但二氧化碳也可能促進或不影響乙烯作用。可可 (*Theobroma cacao* L.) 腋芽培養於450、2000及16000 ppm二氧化碳環境下，瓶內乙烯濃度會隨二氧化碳濃度增加而增加 (Figueira and Janick, 1994)。琴葉榕 (*Ficus lyrata*) 葉片延展會受乙烯所抑制，於培養基中使用KOH除去二氧化碳並不會增加乙烯對培植體的影響，二氧化碳抑制乙烯的效果較不明顯 (Jackson et al., 1991)。

(3) 多元胺

多元胺 (polyamines; PAs) 中的Spermidine (Spd)、Spermine (Spm) 與其前驅物Putrescine (Put) 普遍存在植物體中，與逆境反應、細胞分化、根形態發生、花芽創始與發育、花粉萌發、果實發育及葉片老化有關，在組織培養時內生PAs於器官與體胚發生中扮演重要角色 (Evans and Malmberg, 1989)。乙烯與PAs具有一個共同前驅物SAM (S-adenosylmethionine)，因此與乙烯相關的植物細胞分化與PAs的生合成具有交互關係 (Evans and Malmberg, 1989)。

菊苣 (*Cichorium intybus*) 培養於添加40 μM AgNO_3 培養基中，芽體數目及長度明顯增加及花芽產生，且有較高之瓶內乙烯濃度，培植體的Spd、Spm與Put含量均較對照組高，推論 AgNO_3 促進培植體器官分化可能原因為 Ag^+ 降低乙烯受體與乙烯結合能力，以及增加PAs生合成 (Bais et al., 2000)。獼猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 頂芽培養於添加ACC的培養基中會抑制器官發生，且葉片中多元胺含量會明顯降低，這是由於乙烯大量產生而抑制SAMDC (S-adenosylmethionine decarboxylase) 活性，而轉向乙烯生合成路徑，且乙烯生合成增加也會抑制ADC (arginine decarboxylase)，降低內生Put含量；若培養於添加AVG的培養基中則會增加芽體數目及多元胺含量，由於AVG抑制ACC synthase，使SAM往合成Spd與Spm路徑進行，進而造成芽體發生 (Arigita et al., 2004)。

(4) 其他

培養時的光線、溫度、培養容器與洋菜膠的種類及硬度等因子都會影響瓶內乙烯的累積量 (Buddendorf-Joosten and Woltering, 1994)。生長調節劑的添加亦會影

響瓶內乙烯的產生，如auxin會促進乙烯的生合成，且auxin會間接促進乙烯對培植體的影響 (Yang and Hoffman, 1984)。

(五) 乙烯對培植體器官分化與發育之影響

組織培養的過程中，為了避免微生物的污染及延緩植物與培養基失水，常將植物培養於密閉性高的環境下，造成氣體無法流通而累積於瓶內。而乙烯的產生量會依生長時期不同而異，細胞快速分裂會生合成大量乙烯，細胞增大時期乙烯生合成量會下降，當組織進入成熟老化階段、遭受逆境或機械傷害時，乙烯生成量會再次提升 (Abeles et al., 1992; Kumar et al., 1998)。

乙烯雖為老化相關之植物荷爾蒙，但乙烯累積對培植體生長的影響並非全然為負面影響。乙烯濃度的改變會影響培植體器官生長及分化 (Biddington, 1992)。由於乙烯較難以施用於組織培養環境中，在研究上常以乙烯相關藥劑來瞭解乙烯對培植體器官生長及分化之影響，例如使用乙烯前驅物ACC及益收生長素使培植環境的乙烯濃度增加，或以負向調控方式抑制乙烯生合成或作用，使培植體乙烯生合成量減少或使乙烯受體不能感知乙烯，而推斷乙烯對培植體器官生長及分化之影響 (Serek et al., 2006)。常用之乙烯生合成抑制劑有抑制ACC synthase的aminoethoxyvinylglycine (AVG)、aminoxyacetic acid (AOA) 及抑制ACC oxidase的 CoCl_2 ，而乙烯作用抑制劑為 AgNO_3 和1-methylcyclopropene (1-MCP)，乙烯吸收劑則有 KMnO_4 等 (Serek et al., 2006)。

1. 芽體生長及分化

桃砧木 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) 瓶內累積的乙烯會促進芽體形成及抽長，且瓶內乙烯濃度與芽體增殖數目具有線性關係 ($R=0.974$)，與芽體長度具有指數關係 ($R=0.975$)，在0-1.2 ppm乙烯範圍內，隨乙烯濃度的增加，莖長度和數目也隨之增加 (Dimasi-Theriou and Economou, 1995)。矮牽牛 (*Petunia* × *hybrida* Hort. Vilm.-Andr.) 培養於添加 KMnO_4 、 CoCl_2 及 AgNO_3 之培養基中皆會降低芽體形成，而添加0.01-10 ppm乙烯則可增加芽體數目，除了 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 處理者外，其餘

處理皆不影響芽體長度及重量 (Dimasi-Theriou et al., 1993)。

有些物種的枝梢再生受乙烯抑制，可使用乙烯作用抑制劑促進芽體分化。報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’ (*Cym. sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’) 培養於添加ACC之根莖繁殖培養基會促進根莖生長、分枝，而添加AgNO₃者則抑制根莖生長，但可促進芽體分化生長 (潘，2007)。獼猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 培養於添加ACC之培養基會抑制芽體生長，施用乙烯作用抑制劑1-MCP於瓶中，則增加芽體數目及株高，而共同處理ACC與1-MCP兩藥劑，其結果與只施用1-MCP之效果相似，有促進地上部生長效果 (Arigita et al., 2003)。

而乙烯作用抑制劑AgNO₃廣泛應用於促進芽體分化。以黃瓜 (*Cucumis sativus* L.) 之子葉及胚軸基部為培植體，培養於添加AgNO₃之芽體再生培養基中，五個參試之黃瓜品種再生芽體數目皆顯著增加 (Mohiuddin et al., 1997)。香莢蘭 (*Vanilla planifolia*) 莖頂培養時，於培養基中添加AgNO₃可促進芽體增殖、根形成及生長 (Giridhar et al., 2001)。花生 (*Arachis hypogaea* L.) 莖頂培養於無添加生長調節劑之培養基中培植體完全無發育，而添加AgNO₃雖可誘導培植體再生及促進腋芽萌發，但效果並不強，如以23.54 μM AgNO₃搭配33 μM 6-benzyladenine及5.3 μM NAA則有較高之側芽數；AgNO₃亦減少莖頂癒傷組織形成 (Ozudogru et al., 2005)。草莓 (*Fragaria ×ananassa* Duch. ‘Toyonoka’) 培養於添加0.5-1 mg·L⁻¹ AgNO₃之芽體再生培養基，會提高培植體不定芽再生能力，但濃度過高則會毒害培植體，且亦無法促進不定芽形成，反而使培植體褐化 (Qin and Zhang, 2005)。處理AgNO₃可促進器官分化可能的原因為增加S-adenosylmethionine (SAM) 含量，而SAM增加內生多元胺含量，進而影響器官發生 (Bais et al., 2000)。

2. 不定根生長及分化

矮牽牛於10 ppm乙烯環境中培養可增加培植體根數及根部鮮重，但對根長度無影響 (Dimasi-Theriou et al., 1993)。單獨施用ACC及益收生長素無法促進向日葵 (*Helianthus annuus* L. var. Dahlgren 131) 發根，而使用indole-3-acetic acid (IAA) 雖可促進向日葵發根，但以IAA搭配10 mmol·m⁻³ ACC或69 mmol·m⁻³ 益收生長素之處

理組發根數目增多，故乙烯可增加培植體對auxin的敏感度而促進發根，促進發根的主要因素為IAA的添加，而ACC及益收生長素則為輔因子 (Liu and Reid., 1992)。

草莓培養於添加 $0.5-1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AgNO_3 之培養基可提高培植體發根率、根長、根乾重及根活性 (Qin and Zhang, 2005)。而蘋果 (*Malus ×domestica* Borkh.) 枝條培養於發根培養基，添加ACC者會延緩發根時間、降低根數，而培養於添加 AgNO_3 、AVG及 CoCl_2 者皆可促進根部發育 (Ma et al., 1998)。然而前述三種乙烯抑制劑促進蘋果發根的效果不太一致，可能是抑制乙烯的效能不同： AgNO_3 的銀離子主要降低乙烯與受體結合的能力，而AVG 和 CoCl_2 為乙烯生合成抑制劑，AVG主要抑制ACC合成酶， CoCl_2 主要抑制ACC氧化酶活性，而SAM轉變成ACC步驟為乙烯生合成路徑中的速率限制步驟，所以AVG在抑制乙烯生合成上比 CoCl_2 更有效，因此AVG對蘋果發根有較大的影響可能是因抑制乙烯的效能較 AgNO_3 和 CoCl_2 高所致 (Ma et al., 1998)。



三、材料與方法 (Materials and Methods)

(一) 植物材料

本試驗所使用之植物材料為報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’(*Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’) 根莖。報歲蘭根莖為種子無菌播種經繼代培養而來。

(二) 基本培養基及培養方式

因本研究為瞭解乙烯抑制劑對報歲蘭根莖分化芽體能力之影響，所以將報歲蘭根莖培養於不會促使芽體分化的培養基中進行試驗。然而報歲蘭根莖培養於 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) 此低氮肥濃度之培養基中會有部分根莖分化成芽體 (Huang and Okubo, 2005; Ogura-Tsujita and Okubo, 2006a)，故將報歲蘭根莖培養於添加 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 及 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 之液體培養基中，在此高 auxin/cytokinin 比例之培養基中其器官發生僅有根莖之增殖，無芽體及根部分化 (潘，2007)。

根莖繁殖培養基為 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962) 巨量元素、全量 MS 微量元素、Nitsch 維生素 (Ringe and Nitsch, 1968)、 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ myo-inositol (Sigma, St. Louis, MO, USA)、 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ trypton (Sigma)、 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose (Sigma)、 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal (Sigma)、 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (Sigma)、 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA (Sigma)。

試驗一及三使用之培養基為液體培養基，而試驗二、四及五為固體培養基，除上述根莖繁殖培養基配方外另添加 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)。

培養基以 pH meter (BOX398, Loveland, CO, USA) 測量 pH 值，以 NaOH 和 HCl 將 pH 值調整為 5.2。培養基分裝於培養容器後置於壓力 $1.3 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 之滅菌釜滅菌 20 分鐘。

試驗材料均為切除頂端生長點之 1 cm 長的根莖。培養環境為以日光燈 (旭光

牌省電型晝光色日光燈，FL20D/18，臺灣日光燈股份有限公司，新竹縣) 提供 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF)，光照日長為 12 小時，溫度為 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 。

(三) 試驗設計

試驗一：AgNO₃ 對報歲蘭根莖生長分化之影響

液體培養基中養分及水分均勻分佈，培養液與培植體直接接觸且接觸面積大，因此培植體對培養基所添加之養分及藥劑反應較迅速且劇烈 (Arditti, 1967; Singh and Prakash, 1985)。故本試驗使用液體培養之培養方式欲了解不同濃度 AgNO₃ 對報歲蘭根莖分化芽體能力之影響。

培養容器為 125 mL 三角玻璃瓶，每瓶添加 15 mL 培養基並以 8 號白色矽膠塞封口。以未添加 agar 之根莖培養基為基本培養基，分別添加 0、12.5、25、50、100 μM AgNO₃，共五處理，其中 AgNO₃ 是以 0.22 μm 之無菌過濾膜 (Millex-GS Filter Unit, Millipore, Billerica, MA, USA) 過濾，加入已滅菌之培養基中，再加入無菌水使各處理最終培養基體積為 16 mL。每瓶放入 6 個培植體，震盪器轉速為 60 rpm。

本試驗進行兩次，均於培養第 9 週時調查芽體、根莖前端芽體 (shoot differentiated from rhizome tip; R→S)、根莖和根之個數、長、寬及鮮重，並調查褐化率。每處理 20 重複。第一次試驗中另取 8 重複進行石蠟切片取樣，於培養第 0、7、10、14、17、21、24、28 及 35 天時，每處理各取 5 條根莖，對根莖分生組織進行連續切片，以觀察 AgNO₃ 對根莖生長分化之影響。第二次試驗中 8 重複進行氣體取樣，氣體取樣於培養基配置完成後 1 週、培養第 1 週以及爾後每 2 週於上午 11 點測量瓶內乙烯濃度及二氧化碳濃度，共 6 次。

試驗二：乙烯生合成及作用抑制劑對報歲蘭根莖生長分化之影響

本試驗處理不同濃度之乙烯生合成及作用抑制劑，欲了解乙烯對報歲蘭根莖生長分化之影響。

培養容器為 150 mL 廣口玻璃瓶，每瓶添加 30 mL 培養基並以 13 號黑色橡膠塞封口。以根莖培養基為基本培養基，處理包含 10、100、1000 μM aminooxyacetic acid (AOA) 及 100 μM AgNO_3 ，未經乙烯相關藥劑處理者為對照組。在試驗一中，報歲蘭根莖培養於添加 50 μM AgNO_3 之液體培養基，每個培植體可分化之芽體數目為處理中最多的；然而，本試驗培養基為固體培養基，培植體對在固體培養基中所添加之養分及藥劑反應較在液體培養中差，所以固體培養基添加的 AgNO_3 濃度選用 100 μM 。而 AOA 及 AgNO_3 以 0.22 μm 之無菌過濾膜 (Millex-GS Filter Unit) 過濾，加入已滅菌尚未凝固之培養基中，再加入無菌水使各處理最終培養基體積為 31 mL。每瓶放入 6 個培植體，每處理 20 重複，其中 6 重複進行氣體取樣。

氣體取樣於培養基配製完成後 1 週、培養第 1 週以及爾後每隔 4 週於上午 11 點測量瓶內乙烯濃度及二氧化碳濃度。於培養第 13 週時調查芽體、根莖前端芽體 (R→S)、根莖和根之個數、長、寬及鮮重，並調查褐化率。

試驗三：不同時期添加 AgNO_3 對報歲蘭根莖生長分化之影響

本試驗在不同時期於培養基添加 AgNO_3 以瞭解不同長度之新生報歲蘭根莖受 AgNO_3 影響其芽體分化之情形。

培養容器為 125 mL 三角玻璃瓶，每瓶添加 15 mL 培養基並以 8 號白色矽膠塞封口。以未添加 agar 之根莖培養基為基本培養基，分別於培養 0、2、4、6 週添加 1 mL 之 800 μM AgNO_3 (最終之培養基 AgNO_3 為 50 μM) 及未添加 AgNO_3 之對照組共五處理，其中 AgNO_3 以 0.22 μm 之無菌過濾膜 (Millex-GS Filter Unit) 過濾，加入已滅菌之培養基中，其餘處理添加等量之無菌水，使各處理最終培養基體積為 16 mL。每瓶放入 6 個培植體，震盪器轉速為 60 rpm。每處理 15 重複。

於培養 0、2、4、6 週時調查培植體新生根莖長度並拍照。於培養第 9 週調查芽體、根莖前端芽體 (R→S)、根莖和根之個數、長、寬及鮮重，並調查褐化率以及各部位之 ACC oxidase 組織活性。

試驗四：燻蒸不同濃度乙烯對瓶內氣體之影響

為瞭解外施乙烯與瓶內實際乙烯濃度之相關性，本試驗給予不同乙烯濃度以瞭解兩者相關性。由於瓶內與瓶外氣體交換經由瓶塞中的棉花，而其密度會影響氣體交換率，故本試驗固定棉花乾重及密度，使氣體交換速率一致。

培養容器為 150 mL 廣口玻璃瓶，以 13 號黑色橡膠塞封口，每瓶添加 30 mL 固體根莖繁殖培養基，置於壓力 $1.3 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 121°C 之滅菌釜滅菌 20 分鐘。瓶塞填充 $200\pm 5 \text{ mg}$ 乾燥棉花，使棉花密度固定為 $340\pm 8 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ 。將廣口瓶置入燻蒸箱 ($90 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$)，以 0、2、4、6、8、10 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 燻蒸乙烯後調查之瓶內乙烯及二氧化碳濃度，燻蒸時間為 24 小時，每處理 4 重複。

試驗五：以綠豆芽乙烯三相反應檢測燻蒸 1-methylcyclopropene 之有效性

本研究以燻蒸箱燻蒸 1-methylcyclopropene (1-MCP) 之方式，希冀 1-MCP 可擴散入瓶內，已達到抑制瓶內作物乙烯作用。為確定此方式 1-MCP 確實擴散入瓶內，本研究以綠豆芽進行生物檢測。綠豆芽遭受乙烯逆境會產生三相反應，即植株高度變矮、莖直徑增加以及主根生長受抑制之現象。如瓶內含 1-MCP 氣體，與綠豆芽乙烯受體結合後再燻蒸乙烯，則綠豆芽不會有三相反應，而如未有或過少 1-MCP 氣體擴散入瓶內，則綠豆芽可觀查到三相反應之現象。

先將綠豆 (*Vicia radiatus* L) 種子浸水 36 小時，待下胚軸長度至 5 mm 去除種皮，每培養容器放入五顆綠豆芽。培養容器為 150 mL 廣口玻璃瓶，以 13 號黑色橡膠塞封口，每瓶添加 10 mL 蒸餾水並放入 1/4 張濾紙。瓶塞填充 $200\pm 5 \text{ mg}$ 乾燥棉花，使棉花密度固定為 $340\pm 8 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ 。

將廣口瓶置入燻蒸箱 ($90 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$)，1-MCP 處理者於以 $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 燻蒸，對照組與乙烯處理者則於燻蒸箱內置入等量之二次水，燻蒸 24 小時後，開箱使燻蒸箱空氣流通。1-MCP 與乙烯處理組再以 $2 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯燻蒸，對照組

則於燻蒸箱內打入等量之空氣，燻蒸 48 小時後調查綠豆芽下胚軸長度、直徑與主根長度。每處理 5 重複。

試驗六：燻蒸 1-methylcyclopropene (1-MCP) 及乙烯對報歲蘭根莖生長分化之影響

本試驗於培養過程中燻蒸乙烯作用抑制劑 (1-MCP) 及乙烯，欲釐清報歲蘭根莖直接分化芽體為抑制乙烯之效果，抑或是 AgNO_3 之作用。

培養容器為 150 mL 廣口玻璃瓶，每瓶添加 30 mL 培養基並以 13 號黑色橡膠塞封口。為防止無菌操作時產生乙烯，置入培植體時將瓶塞更換為已滅菌且填充 200 ± 5 mg 乾燥棉花之瓶塞，瓶塞不經過火動作。以根莖培養基為基本培養基，分別進行下列六種處理。

| 處理 | 培養基添加物 | 燻蒸藥劑/時間 |
|---|----------------------------|---|
| 對照組 | 1 mL dH_2O | 無 |
| $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP | 1 mL dH_2O | $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP/每週 |
| $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP | 1 mL dH_2O | $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP/每週 |
| $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 | 1 mL dH_2O | $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 /前三週 |
| $100 \mu\text{M AgNO}_3 + 1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 | $100 \mu\text{M AgNO}_3$ | $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 /前三週 |
| $100 \mu\text{M AgNO}_3$ | $100 \mu\text{M AgNO}_3$ | 無 |

AgNO_3 以 0.22 μm 之無菌過濾膜 (Millex-GS Filter Unit) 過濾，加入已滅菌尚未凝固之培養基中，其餘處理添加 1 mL 之無菌水，使各處理最終培養基體積為 31 mL。1-MCP 處理者於試驗第一天進行第一次燻蒸，而後每週燻蒸以防止新生成之乙烯受體 (receptor) 與乙烯結合，非 1-MCP 處理者則每週於燻蒸箱內置入等量之二次水。乙烯處理組於試驗第一天進行第一次燻蒸，試驗前三週每週燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯，共四次。1-MCP 與乙烯每次燻蒸時間均為 24 小時，溫度為 25 °C。每瓶放入 6 個培植體，每處理 20 重複，其中 8 重複進行氣體取樣。

氣體取樣於培養基配製完成後 1 週、培養第 1 天、培養第 1 週及而後每 2 週

於燻蒸完當天上午 11 點測量瓶內乙烯濃度及二氧化碳濃度。於培養 13 週時調查芽體、根莖前端芽體 (R→S)、根莖和根之個數、長、寬及鮮重，並調查褐化率。

(四) 乙烯及二氧化碳分析

氣體取樣時，將試驗材料置於無菌操作臺內，以 1 mL 之無菌針筒取樣後，分別以氣相色層分析儀 GC-8A (Shimadzu, Tokyo, Japan) 及 GC-14A (Shimadzu, Tokyo, Japan) 分析二氧化碳及乙烯濃度。

1. 二氧化碳濃度分析

使用氣相層析儀 GC-8A 進行分析。GC-8A 分為注射器 (injector)、析離管 (column)、偵測器 (detector) 及記錄器 (recorder)。析離管為長度 2.5 公尺的不鏽鋼管，內部填充 Porapak 80/100 mesh。偵測器為熱傳導式偵測器 (TCD; Thermal conductivity detector)，以氫氣為載流氣體 (carrier gas)，而偵測器測得之訊息則傳送到記錄器。偵測器及注射孔溫度設定為 130 °C，析離管溫度設定為 110 °C，電流強度 (current) 設定在 90 mA。每次測量時以 1052.5 及 9940 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 二氧化碳標準氣體進行校正。

2. 乙烯濃度分析

以氣相層析儀 GC-14A 進行分析。GC-14A 分為注射器、析離管、偵測器及記錄器。析離管為長度 3 公尺的不鏽鋼管，內部填充 Porapak 80/100 mesh。偵測器為火焰離子化偵測器 (FID; Flame ionization detector)，以氫氣為載流氣體，而偵測器測得之訊息則傳送到記錄器。偵測器及注射孔溫度設定為 110 °C，析離管溫度設定為 70 °C。每次測量時以 0.109 及 1.046 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯標準氣體進行校正。

(五) ACC oxidase 組織活性之測定

植物組織 ACC oxidase 活性係以切離組織轉化外加 ACC 成為乙烯的能力來表

示。給予組織乙烯前驅物 ACC 並加入含必要輔因子之反應液，使組織內的 ACC oxidase 於最佳條件下進行反應。先以解剖刀切取報歲蘭各器官之組織，取鮮重約 0.5 g 後置於試管中，加入反應液，其成分為 0.1 M Tris 緩衝液 (pH 7.5, 30 °C)、0.4 M mannitol、30 mM sodium ascorbate、20 mM NaHCO₃、0.1 mM FeSO₄ 與 1 mM ACC。用反折式血清塞密封後，置於 30 °C 下，以 50 rpm 震盪反應 1.5 小時後，以 1 mL 塑膠針筒抽取管內氣體，以 GC-14A 測量乙烯生成量，再帶入公式推算 ACC oxidase 組織活性。

ACC oxidase 活性 (nmole·g⁻¹·hr⁻¹)

$$= \frac{\text{瓶內乙烯濃度 (ppm)} \times \text{瓶內氣體體積 (mL)}}{\text{組織鮮重 (g)} \times \text{作用時間 (hr)} \times 24.5 \text{ nL} \cdot \text{nmole}^{-1}}$$

(六) 石蠟切片之製備

石蠟切片法之樣品固定、抽氣、脫水、滲蠟方法依蔡 (1978) 之步驟。將所取之材料以 FAA (36% 福馬林：100% 醋酸：50% 酒精 = 5 mL：5 mL：90 mL) 固定液固定 24 小時，並以抽氣法排除組織中氣體。而後每十分鐘換一次 50% 酒精，共 4 次。再以不同濃度 2-methyl-2-propanol (TBA) 序列脫水，20%、35%、55%、75% TBA 每六小時換一次，100% TBA 換三次，每次 12 小時，第二次浸泡添加 Safranin-O 之 100% TBA 將組織染色以方便後續操作。之後將材料放至 65 °C 烘箱以小蠟粒進行滲蠟，每隔 4 小時添加小蠟粒，共三次。於第三次滲蠟兩小時後將固定瓶瓶蓋打開使 TBA 揮發。包埋時將材料置於小鐵盒製作成小蠟塊固定於木塊上，再以轉動式切片機切成約 10 μm 厚度之蠟帶，排列於玻片烘乾 1 天。將有樣品之玻片依序浸泡 100% xylene 10 分鐘、含 100% xylene 與 100% 酒精各半之溶液、100%、95%、85%、70%、50% 酒精各 3 分鐘、添加 1% Safranin-O 之 50% 酒精 6 小時、50%、70%、85% 酒精各 3 分鐘、含 0.5% Fast green 之 95% 酒精 5 秒、95%、100%、100% 酒精、含 100% xylene 與 100% 酒精各半之溶液各 3 分鐘、100% xylene 10 分鐘。脫蠟脫水染色完之玻片置於光學顯微鏡 (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan) 下觀察。

(七) 統計分析

試驗皆採完全逢機試驗設計。統計軟體為CoStat 6.1 (CoHort Software, Monterey, CA, USA)，以最小顯著差異 (LSD；Least significant difference) 分析各處理間有無顯著性差異 ($P \leq 0.05$)；此外繪圖程式採用SigmaPlot 8.0 (Systat Software INC., CA, USA)。生長參數為扣除褐化之根莖培植體後所得之數值，而新生器官的長、寬、鮮重為扣除未分化之根莖培植體後所得之數值。試驗數據為百分比時，將數據先開根號再取 \sin^{-1} 換算後 (Steel et al., 1997)，以上述方法進行統計分析。



四、結果 (Results)

試驗一：AgNO₃ 對報歲蘭根莖生長分化之影響

報歲蘭根莖培養於添加AgNO₃之液體培養基中，兩次試驗結果均可以有效的誘導報歲蘭根莖芽體的形成，而未添加AgNO₃之處理組未觀察到有芽體形成 (表1.1)。第一次試驗以添加50 μM AgNO₃者之誘導芽體數為最多，平均每個報歲蘭根莖可誘導出1.2個芽體，而報歲蘭根莖培養於添加12.5-100 μM AgNO₃液體培養基中，芽長度、直徑及鮮重在各處理間無顯著差異 (表1.1)。第二次試驗中，報歲蘭根莖之芽體形成數目及長度在12.5-100 μM AgNO₃處理組間沒有顯著差異，而在芽體的直徑及鮮重方面，以100 μM AgNO₃之處理低於其他有添加AgNO₃之處理組 (表1.1)。

第一次試驗中，在培養於未添加AgNO₃液體培養基之報歲蘭根莖前端芽體 (R→S) 生長上觀察到，平均有0.7個根莖頂端分生組織分化成芽體，R→S根莖長度為7.3 mm、芽長度為6.6 mm、芽體鮮重為42 mg (表1.2)。而第二次試驗中，各處理間R→S數目、根莖長度、芽體長度、芽體直徑及芽體鮮重均無顯著差異 (表1.2)。

在根莖形成方面，第一次試驗以培養於未添加AgNO₃液體培養基之報歲蘭根莖有最高的根莖形成數目、長度、直徑及鮮重，分別為2.2個、8 mm、2.1 mm及124 mg；報歲蘭根莖培養於添加12.5-100 μM AgNO₃液體培養基中，根莖生長數目、長度及鮮重在各處理間沒有顯著差異，而液體培養基添加100 μM AgNO₃之處理有最小之根莖直徑 (表1.3)。側根莖數目以未添加AgNO₃之液體培養基為最多 (表1.3)。第二次試驗亦以培養於未添加AgNO₃之處理者有最高之根莖形成數目，平均一個報歲蘭根莖可分化出2.7個根莖，而在根莖的直徑及鮮重方面，以未添加AgNO₃和添加12.5 μM AgNO₃之處理為最高，而各處理間根莖生長之長度無顯著差異 (表1.3)。側根莖形成數目上，以未添加AgNO₃之處理為最高 (表1.3)。

在根的生長數目上，第一次試驗以添加100 μM AgNO₃之處理者為最多，根的生長數目依AgNO₃濃度降低而遞減，未添加AgNO₃液體培養基有最少的根生長數

目；然而，根部之長度和寬度在各處理間無差異 (表1.4)。在根的重量上，以添加 100 μM AgNO_3 之處理者為最重，添加 25 μM AgNO_3 之處理者為最輕 (表1.4)。報歲蘭根莖培養9週後，報歲蘭根莖之新器官總鮮重在各處理間無顯著差異 (表1.4)。在這個試驗中，報歲蘭根莖之褐化率以添加 50 μM AgNO_3 處理者為高，以添加 25 μM AgNO_3 處理者為低 (表1.4)。第二次試驗以 12.5-100 μM AgNO_3 處理之根莖，其根數皆多於未添加 AgNO_3 處理者，而根部長度、直徑及鮮重皆以添加 12.5 μM AgNO_3 之處理為最高 (表1.4)。報歲蘭根莖之新器官總鮮重以添加 12.5 μM AgNO_3 處理者為最重 (表1.4)。未添加 AgNO_3 者褐化率最高，添加 25 μM AgNO_3 者褐化率最低 (表1.4)。

整體而言，將報歲蘭根莖培養於添加 AgNO_3 之液體培養基有較高的芽體和根部之數目、長度、直徑與鮮重，而培養於未添加 AgNO_3 之液體培養基有較高根莖之數目、長度、直徑與鮮重 (表1.1、表1.3、表1.4、圖1.1)。

報歲蘭根莖培養初期無法以肉眼判斷頂端分生組織是否分化為芽體，故於培養初期進行石蠟切片觀察。培養7天後，各處理僅能觀察到鱗片葉 (cataphyll) 分化，尚未觀察到芽體形成 (圖1.2B-F)。報歲蘭根莖培養於添加 50 μM AgNO_3 液體培養基10天後，可觀察到報歲蘭根莖頂端分生組織有鞘葉 (sheath leaf) 的形成，且第一片鞘葉緊包住頂端分生組織，而其他處理在該時期僅能觀察到鱗片葉 (cataphyll) (圖1.2G-K)。培養第14天時，亦僅有培養基添加 50 μM AgNO_3 之處理可觀察到鞘葉形成 (圖1.3D)。培養第17天，除 50 μM AgNO_3 之處理外，培養基添加 25 μM AgNO_3 與 100 μM AgNO_3 兩處理亦有鞘葉的形成 (圖1.3H-J)。培養21天後，有添加 AgNO_3 之處理組均觀察到第一片鞘葉形成，而對照組仍只能觀察到鱗片葉 (圖1.3K-O)。而添加 AgNO_3 之處理組均可於培養第35天時觀察到第二片鞘葉形成 (圖1.4L-O)。

試驗用的液體培養基於配製完成 1 週後，尚未置入報歲蘭根莖前，調查各處理間瓶內氣體濃度。各處理之瓶內 CO_2 濃度及乙烯濃度並無顯著差異 (圖 1.5)。

置入報歲蘭根莖開始培養的 1、3、5 週後，各處理的瓶內 CO_2 濃度均無顯著

差異，但隨著報歲蘭根莖之生長分化，各處理的瓶內 CO_2 濃度皆有上升之現象 (圖 1.6A)。在培養 7 週之後，各處理間瓶內 CO_2 濃度開始出現差異；未添加 AgNO_3 之處理組其瓶內 CO_2 濃度最高 ($6910 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)，而添加 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組瓶內 CO_2 濃度最低，僅達未添加 AgNO_3 者的一半 ($3466 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖 1.6A)。培養 9 週後，未添加 AgNO_3 之處理組 CO_2 濃度仍是最高，為 $9238 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組 CO_2 濃度仍是最低，且不到未添加 AgNO_3 者的一半濃度 ($4013 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖 1.6A)。

而在瓶內乙烯濃度部分，報歲蘭根莖培養 1 週後，添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組有較高的瓶內乙烯濃度 ($40 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，而添加 $25 \mu\text{M AgNO}_3$ 處理組之瓶內乙烯濃度是各處理中最低 ($14 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，但各處理間無顯著差異 (圖 1.6B)。經培養 3 週後，各處理間瓶內乙烯濃度開始出現差異，以添加 $12.5 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組有最高瓶內乙烯濃度 ($156 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，未添加 AgNO_3 之處理者為最低 ($15 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖 1.6B)。經培養 5 週後，最高瓶內乙烯濃度為添加 $25 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組 ($270 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，而未添加 AgNO_3 之處理者為最低 ($121 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖 1.6B)。經培養 7 週後，有添加 AgNO_3 處理組之瓶內乙烯濃度均高於未添加 AgNO_3 者，其中以 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理為最高 ($203 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，未添加 AgNO_3 之處理組為最低 ($11 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，但有添加 AgNO_3 之處理組間無顯著差異 (圖 1.6B)。培養 9 週後，瓶內乙烯濃度最高者為添加 $12.5 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組 ($245 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$)，而仍以未添加 AgNO_3 之處理組為最低 ($113 \text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖 1.6B)。

試驗二：乙烯生合成及作用抑制劑對報歲蘭根莖生長分化之影響

報歲蘭根莖培養於添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之固體培養基中可以有效的誘導芽體的形成。平均每個報歲蘭根莖約可誘導出 0.2 個芽體，其芽體平均長為 25.4 mm、寬為 2.5 mm、重達 88 mg，而培養於對照組 (未添加乙烯相關藥劑) 以及添加各濃度 AOA 之處理組均未觀察到芽體形成 (表 1.5)。

在根莖前端芽體 (R→S) 生長方面，對照組與培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理有較高的數目， $100 \mu\text{M}$ 及 $1000 \mu\text{M AOA}$ 之處理組未觀察到有 R→S 形成，而 R→S

根莖長度以10 μM AOA處理者最長，芽體長度為100 μM AgNO_3 處理者最長，芽體直徑為10 μM AOA處理者最寬，芽體鮮重為對照組最重 (表1.6)。

在根莖形成方面，各處理間之根莖生長數目無顯著差異，平均一個報歲蘭根莖可以分化出2.3-2.6個根莖，長度則以未添加乙烯相關藥劑之對照組及添加10 μM AOA之處理者最長，添加1000 μM AOA之處理者為最短 (表1.7)。報歲蘭新生成根莖之直徑以添加100 μM AgNO_3 之處理者為最寬 (2.5 mm)，而在根莖鮮重上，以對照組、添加10 μM AOA及添加100 μM AgNO_3 之處理者最高，添加1000 μM AOA之處理者為最低 (表1.7)。在側根莖生長數目上，以對照組和添加100 μM AgNO_3 之處理者為最高 (表1.7)。

在各處理間僅添加100 μM AgNO_3 之處理組有根分化的現象，其所分化出的根數目、長度、直徑及鮮重分別為1.9個、6.5 mm、1.2 mm及33 mg (表1.8)。在報歲蘭根莖之新器官總鮮重上，以添加100 μM AgNO_3 之處理組為最重，1000 μM AOA之處理組為最低 (表1.8)。此試驗中，報歲蘭根莖之褐化率以添加1000 μM AOA處理組為最高，達88.2%，最低的處理為添加100 μM AOA和100 μM AgNO_3 之處理組，然而所有處理組的褐化率均高於20% (表1.8)。

整體而言，報歲蘭根莖培養於添加100 μM AgNO_3 之培養基中，培植體有最高芽體和根系之數目、長度、直徑與鮮重，而培養於添加各濃度的AOA以及未添加乙烯相關藥劑之根莖繁殖培養基則無芽體和根部形成，且根莖數目無顯著差異 (表1.5、表1.7、表1.8、圖1.7)。

為了瞭解固體培養基添加乙烯生合成抑制劑AOA是否會影響瓶內氣體濃度，於培養基配製後一週，尚未置入報歲蘭根莖時，調查各處理間瓶內氣體濃度。各處理間瓶內 CO_2 濃度及乙烯濃度皆無顯著差異，乙烯濃度介於5-13 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ (圖1.8)。

瓶內 CO_2 濃度變化方面，報歲蘭根莖培養於添加不同濃度乙烯相關藥劑之固體培養基中，經培養1週後各處理間以添加100 μM AgNO_3 之處理組的瓶內 CO_2 濃度最高 (1007 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)，而對照組的瓶內 CO_2 濃度為最低 (778 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) (圖1.9A)。培養5

週，各處理間之瓶內CO₂濃度無顯著差異，而培養9週後，各處理間瓶內CO₂濃度出現差異，以添加100 μM AgNO₃之處理組瓶內CO₂濃度為最高 (1737 μL·L⁻¹)，而1000 μM AOA處理組之瓶內CO₂濃度為最低 (957 μL·L⁻¹) (圖1.9A)。培養13週後，添加100 μM AgNO₃之瓶內CO₂濃度持續升高 (2114 μL·L⁻¹)，而1000 μM AOA處理之瓶內CO₂濃度依然為最低 (843 μL·L⁻¹) (圖1.9A)。

瓶內乙烯濃度方面，報歲蘭根莖經培養 1 週後，對照組之瓶內乙烯濃度為處理間最高 (163 nL·L⁻¹)，濃度最低者為添加 100 μM AOA 之處理組 (130 nL·L⁻¹)，但各處理間無顯著差異。經培養 5 週後，各處理間瓶內乙烯濃度有顯著差異，以添加 100 μM AgNO₃ 處理組為最高 (25 nL·L⁻¹)，1000 μM AOA 處理者為最低 (無偵測到乙烯)。經培養 9 週後，以 100 μM AgNO₃ 處理之乙烯濃度為最高 (37 nL·L⁻¹)，對照組為最低 (4 nL·L⁻¹)。報歲蘭根莖經培養 13 週後，以添加 100 μM AgNO₃ 處理組為最高 (18 nL·L⁻¹) (圖 1.9B)。

試驗三：不同時期添加AgNO₃對報歲蘭根莖生長分化之影響

報歲蘭根莖以液體培養基培養，在培養0週、2週、4週和6週後添加50 μM AgNO₃均可有效誘導芽體形成，其中以培養0週添加AgNO₃之處理有最多之芽體生成數，平均每個培植體可誘導出約0.5個芽體，而芽長度以培養0週及培養6週時添加AgNO₃者為最長 (表1.9)。培養4週後添加AgNO₃之處理者，其芽體直徑為最寬 (4.0 mm)，而芽體鮮重在不同時期添加AgNO₃之處理組間無顯著差異 (表1.9、圖1.10)。培養2週添加AgNO₃之處理有最多之總芽體數，未添加或培養0週添加AgNO₃之處理組為最少，而總芽體數為每培植體誘導的芽體數與根莖前端芽體數總和 (表1.9)。

在培植體根莖前端芽體 (R→S) 形成方面，以培養0週添加AgNO₃之處理的頂端分生組織分化成芽體數目最少，根莖長度為8.5 mm，且分化出的芽體長度最短 (表1.10)。在根莖前端芽體 (R→S) 之芽體直徑及鮮重上，以培養2週後添加AgNO₃之處理較高；另外，在培養2、4及6週後添加AgNO₃之處理者於新生的根莖上，除了頂端有芽體發生外，亦有觀察到側芽體的發生 (表1.10、圖1.11)。

在根莖生成數目上，以培養4週後添加AgNO₃之處理最少，平均一個培植體僅分化出1.2條根莖。根莖直徑以對照組及培養2週後添加AgNO₃之處理最寬，在培植體培養0週及6週後添加AgNO₃者最窄，而分化出的根莖長度及鮮重於各處理間並無顯著差異。在側根莖數目部分，以培養6週後添加AgNO₃之處理最多，而培養0週後添加AgNO₃之處理最少（表1.11）。

報歲蘭根莖經培養2週後添加AgNO₃之處理者有最多之根數及根鮮重，分別為1.2個及120 mg，而根長和根寬在各處理間無顯著差異。在報歲蘭根莖之新生器官總鮮重方面，以培養2週後添加AgNO₃之處理者最重，對照組及培養4週後添加AgNO₃之處理最輕（表1.12）。報歲蘭根莖褐化率部分，以培養6週後添加AgNO₃之處理最高，培養0週後添加AgNO₃之處理最低，但各處理間的褐化率均未超過20%（表1.12）。

測量各處理新生成器官之ACC oxidase活性，各處理間之芽體ACC oxidase活性無顯著差異（圖1.12A）。而根莖之ACC oxidase活性以培養6週後添加AgNO₃之處理最高（0.089 nmole·g⁻¹·hr⁻¹），培養4週後添加AgNO₃者次之（0.045 nmole·g⁻¹·hr⁻¹），對照組（0.004 nmole·g⁻¹·hr⁻¹）、培養0週（0.009 nmole·g⁻¹·hr⁻¹）及培養2週後（0.017 nmole·g⁻¹·hr⁻¹）添加AgNO₃之處理的ACC oxidase活性較低（圖1.12B）。由於報歲蘭根莖所誘導之根鮮重較低，合併15重複之培植體新生根部後，總鮮重均低於0.5 g，僅能進行一次測量（測量組織ACC oxidase活性之樣本鮮重需達0.5 g），因此無法進行統計分析。然而，在數值上以培養0週、4週及6週後添加AgNO₃之處理者有較高之根部ACC oxidase活性（圖1.12C）。

試驗四：燻蒸不同濃度乙烯對瓶內氣體之影響

燻蒸不同濃度乙烯 24 小時後，瓶內與燻蒸箱乙烯濃度呈正相關（ $r=0.90$ ），兩者之換算公式為瓶內乙烯濃度是燻蒸箱乙烯濃度的 0.83 倍再減去 103.5（圖 1.13）。在高乙烯濃度之燻蒸環境下，如燻蒸 8 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 10 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯，瓶內 CO₂ 濃度有降低現象（圖 1.14）。

試驗五：以綠豆芽乙烯三相反應檢測燻蒸 1-methylcyclopropene 之有效性

2 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯處理者有最短的下胚軸長度、最寬的下胚軸直徑與最短的主根長度 (表 1.13)。而前處理 5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 24 小時後處理 2 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 者與對照組有較長的下胚軸長度、較窄的下胚軸直徑與較長的主根長度，其中前處理 5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 24 小時後處理 2 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 者之下胚軸直徑最窄 (表 1.13)。整體而言，乙烯處理者有三相反應 (triple response)，即植株高度變矮、莖直徑增加以及主根生長受抑制之現象，而前處理 1-MCP 後處理 C_2H_4 者未有三相反應之現象，故本研究以燻蒸箱燻蒸 1-MCP 之方式確可使 1-MCP 進入瓶內且可抑制乙烯作用。

試驗六：燻蒸 1-Methylcyclopropene 及乙烯對報歲蘭根莖生長分化之影響

報歲蘭根莖培養於添加 100 μM AgNO_3 之固體培養基中，可有效的誘導芽體的形成，平均每個報歲蘭根莖約可誘導出 0.2 個芽體，其芽體平均長為 9.9 mm、寬為 2.6 mm、重達 56 mg；而燻蒸 5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 之處理組中僅有一個培植體分化出芽體，其長為 21.1 mm、寬為 2.5 mm、重達 91 mg (表 1.14)。

在根莖前端芽體 (R→S) 生長方面，各處理間的 R→S 數目、芽長與芽鮮重無顯著差異，而 R→S 根莖長度以 5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 處理者最長、培養基添加 100 μM AgNO_3 且培養前三週燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 之處理組最短，芽體直徑以燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 處理者最寬、培養基添加 100 μM AgNO_3 處理者最窄 (表 1.15)。

在根莖形成方面，根莖生長數目以培養基添加 100 μM AgNO_3 且培養前三週燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 之處理最多、培養基添加 100 μM AgNO_3 之處理最少，根莖長度則以 100 μM AgNO_3 之處理者最長，燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 之處理者最短 (表 1.16)。報歲蘭根莖之直徑以添加 100 μM AgNO_3 之處理為最寬、燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 之處理最窄，而在根莖鮮重上，各處理組間無顯著差異 (表 1.16)。在側根莖生長數目上，以對照組為最高，培養基添加 100 μM AgNO_3 且培養前三週燻蒸 1 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C_2H_4 之處理最少 (表 1.16)。

在各處理間根數目無顯著差異，而根長度、直徑及鮮重均以燻蒸 $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP之處理有最高的數值 (表1.17)。在報歲蘭根莖之新生器官總鮮重上，各處理間無顯著差異 (表1.17)。此試驗中，各處理的報歲蘭根莖褐化率無顯著差異，均高於50% (表1.17、圖1.15)。

培養報歲蘭根莖時經燻蒸 1-MCP 及乙烯的各處理在培養 0 週時之瓶內 CO_2 濃度有顯著差異，以培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 並燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之處理者有最高的 CO_2 濃度 ($1238 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)，而以對照組之 CO_2 濃度為最低 ($772 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)。處理後經培養 1 週，各處理間瓶內 CO_2 濃度無顯著差異；培養 2 週後，以培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 並燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之瓶內 CO_2 濃度最高，達 $895 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 者最低，僅 $698 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 。經培養 3 週，各處理間瓶內 CO_2 濃度無顯著差異。培養第 5 週時，以燻蒸 $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之處理的瓶內 CO_2 濃度最高，達 $1225 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 並燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之 CO_2 濃度最低，僅 $817 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培養第 7 週後，以燻蒸 $5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯者之瓶內 CO_2 濃度最高，達 $1363 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 者最低，僅 $774.0 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 。經培養 9 週、11 週及 13 週後，各處理間瓶內 CO_2 濃度無顯著差異 (圖 1.16A)。

燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯之處理及培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 並燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯處理，於培養前 3 週均有燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯，瓶內乙烯濃度介於 $832\text{-}1026 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而其他處理皆低於 $70 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ，且無顯著差異。培養 5 週和 7 週，各處理之瓶內乙烯濃度皆無顯著差異。培養 9 週時，燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP 處理組之乙烯濃度最高，達 $94 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ，而培養基添加 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 並燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯處理者之乙烯濃度最低，僅 $17 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培養 11 週及 13 週後，各處理間瓶內乙烯濃度無顯著差異 (圖 1.16B)。

調查燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯 24 小時後報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養瓶內乙烯濃度的變化。移出燻蒸箱立即測量瓶內之乙烯濃度為 $1026 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ；燻蒸後 3 小時，瓶內乙烯濃度即下降至 $586 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ；燻蒸後 6 及 9 小時，瓶內乙烯濃度持續下降，分別為 304 及 $215 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ；燻蒸後 12 至 48 小時，瓶內乙烯濃度呈緩慢下降，由 $98 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 $2 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ，但統計上無顯著差異 (圖 1.17)。

表 1.1. AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體芽體生長分化之影響。

Table 1.1. Effects of AgNO₃ on shoot differentiation and growth of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO ₃ concn (μM) | No. of shoot /explant | Shoot length ^z (mm) | Shoot diam ^z (mm) | Shoot F.W. / explant ^z (mg) |
|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| Expt. 1 | | | | |
| 0 | 0.0 d ^y | 0.0 b | 0.0 b | 0 b |
| 12.5 | 0.9 bc | 11.3 a | 2.5 a | 95 a |
| 25 | 0.8 c | 11.4 a | 2.4 a | 113 a |
| 50 | 1.2 a | 9.5 a | 2.3 a | 109 a |
| 100 | 1.1 ab | 11.3 a | 2.4 a | 114 a |
| Expt. 2 | | | | |
| 0 | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 c | 0 c |
| 12.5 | 0.5 a | 12.3 a | 3.2 a | 75 a |
| 25 | 0.7 a | 10.6 a | 3.1 a | 70 a |
| 50 | 0.5 a | 10.4 a | 3.0 a | 70 a |
| 100 | 0.5 a | 10.3 a | 2.5 b | 47 b |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column within a experiment followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 20).

表 1.2. AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。

Table 1.2. Effects of AgNO₃ on shoot growth and differentiation from rhizome tip of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO ₃ concn (μM) | No. of R→S ^z /explant | R→S rhizome length ^y (mm) | R→S shoot length ^y (mm) | R→S shoot diam ^y (mm) | R→S shoot F.W. /explant ^y (mg) |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Expt. 1 | | | | | |
| 0 | 0.7 a ^x | 7.3 a | 6.6 a | 2.1 a | 42 a |
| 12.5 | 0.2 bc | 5.2 ab | 4.0 b | 2.0 a | 23 b |
| 25 | 0.3 b | 5.4 ab | 6.0 ab | 1.9 a | 21 b |
| 50 | 0.1 c | 3.8 b | 4.8 ab | 2.7 a | 20 b |
| 100 | 0.1 bc | 4.8 ab | 6.3 ab | 1.9 a | 21 b |
| Expt. 2 | | | | | |
| 0 | 0.1 a | 5.9 a | 9.9 a | 2.8 a | 27 a |
| 12.5 | 0.1 a | 9.2 a | 6.2 a | 2.6 a | 13 a |
| 25 | 0.0 a | 8.4 a | 8.6 a | 2.5 a | 20 a |
| 50 | 0.0 a | 5.9 a | 6.2 a | 2.2 a | 16 a |
| 100 | 0.0 a | 10.5 a | 7.1 a | 2.3 a | 15 a |

^zR→S: shoot differentiated from rhizome tip.

^y Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^x Means in the same column within a experiment followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 20).

表 1.3. AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根莖生長分化之影響。

Table 1.3. Effects of AgNO₃ on rhizome growth and differentiation of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO ₃ concn (μM) | No. of rhizome /explant | Rhizome length ^z (mm) | Rhizome diam ^z (mm) | Rhizome F.W. /explant ^z (mg) | No. of lateral rhizome /explant |
|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Expt. 1 | | | | | |
| 0 | 2.2 a ^y | 8.0 a | 2.1 a | 124 a | 0.8 a |
| 12.5 | 1.7 b | 4.3 b | 2.0 ab | 94 ab | 0.2 bc |
| 25 | 1.7 b | 5.1 b | 2.0 bc | 65 b | 0.4 b |
| 50 | 1.3 b | 5.2 b | 1.9 cd | 70 b | 0.2 bc |
| 100 | 1.6 b | 4.8 b | 1.8 d | 65 b | 0.1 c |
| Expt. 2 | | | | | |
| 0 | 2.7 a | 5.4 a | 2.5 a | 55 a | 0.4 a |
| 12.5 | 2.5 ab | 6.0 a | 2.5 a | 57 a | 0.1 b |
| 25 | 1.8 b | 6.0 a | 2.3 ab | 44 ab | 0.1 b |
| 50 | 1.9 b | 6.3 a | 2.2 bc | 46 ab | 0.1 b |
| 100 | 2.0 b | 5.3 a | 2.0 c | 40 b | 0.1 b |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column within a experiment followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 20).

表 1.4. AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養 9 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。

Table 1.4. Effects of AgNO₃ on root differentiation and growth, total fresh weight, and browning of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO ₃ concn (μM) | No. of root /explant | Root length ^z (mm) | Root diam ^z (mm) | Root F.W. /explant ^z (mg) | Total F.W. /explant ^z (mg) | Browning (%) |
|------------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Expt. 1 | | | | | | |
| 0 | 0.4 c ^y | 3.0 a | 1.3 a | 35 ab | 108 a | 9.1 ab |
| 12.5 | 0.9 bc | 3.4 a | 1.2 a | 32 ab | 104 a | 10.3 ab |
| 25 | 0.8 bc | 3.4 a | 1.2 a | 27 b | 102 a | 5.0 b |
| 50 | 1.1 ab | 4.4 a | 1.2 a | 40 a | 104 a | 15.0 a |
| 100 | 1.4 a | 3.9 a | 1.1 a | 42 a | 112 a | 11.7 ab |
| Expt. 2 | | | | | | |
| 0 | 0.0 b | 6.0 ab | 2.2 ab | 32 ab | 56 b | 4.5 a |
| 12.5 | 0.5 a | 7.5 a | 2.2 a | 39 a | 79 a | 3.0 ab |
| 25 | 0.4 a | 5.3 b | 2.0 ab | 23 b | 66 ab | 0.6 b |
| 50 | 0.3 a | 5.6 b | 1.9 b | 21 b | 59 b | 1.9 ab |
| 100 | 0.2 a | 6.2 ab | 1.6 b | 18 b | 52 b | 1.4 ab |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column within a experiment followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 20).

表 1.5. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體芽體生長分化之影響。

Table 1.5. Effects of aminoxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on shoot differentiation and growth of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of shoot /explant | Shoot length ^z (mm) | Shoot diam ^z (mm) | Shoot F.W. / explant ^z (mg) |
|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| Control | 0.0 b ^y | 0.0 b | 0.0 b | 0 b |
| 10 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b |
| 100 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b |
| 1000 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b |
| 100 μM AgNO ₃ | 0.2 a | 25.4 a | 2.5 a | 88 a |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表 1.6. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。

Table 1.6. Effects of aminoxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on shoot growth and differentiation from rhizome tip of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of R→S ^z /explant | R→S rhizome length ^y (mm) | R→S shoot length ^y (mm) | R→S shoot diam ^y (mm) | R→S shoot F.W. /explant ^y (mg) |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Control | 0.1 a ^x | 14.6 a | 3.1 b | 2.7 a | 32 a |
| 10 μM AOA | 0.0 ab | 16.5 a | 3.5 ab | 3.0 a | 19 ab |
| 100 μM AOA | 0.0 b | 0.0 c | 0.0 b | 0.0 c | 0 b |
| 1000 μM AOA | 0.0 b | 0.0 c | 0.0 b | 0.0 c | 0 b |
| 100 μM AgNO ₃ | 0.1 a | 10.8 b | 7.2 a | 2.2 b | 22 a |

^z R→S: shoot differentiated from rhizome tip.

^y Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^x Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表1.7. Aminoxyacetic acid (AOA) 及AgNO₃處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養13週後培植體根莖生長分化之影響。

Table 1.7. Effects of aminoxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on rhizome growth and differentiation of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of rhizome /explant | Rhizome length ^z (mm) | Rhizome diam ^z (mm) | Rhizome F.W. /explant ^z (mg) | No. of lateral rhizome /explant |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Control | 2.3 a ^y | 8.6 a | 2.4 ab | 102 a | 0.4 a |
| 10 μM AOA | 2.4 a | 8.3 a | 2.4 ab | 88 a | 0.3 ab |
| 100 μM AOA | 2.6 a | 3.8 b | 2.2 b | 74 ab | 0.2 ab |
| 1000 μM AOA | 2.6 a | 1.5 c | 1.5 c | 26 b | 0.0 b |
| 100 μM AgNO ₃ | 2.5 a | 4.8 b | 2.5 a | 98 a | 0.5 a |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表 1.8. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。

Table 1.8. Effects of aminoxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on root differentiation and growth, total fresh weight, and browning of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of root /explant | Root length ^z (mm) | Root diam ^z (mm) | Root F.W. /explant ^z (mg) | Total F.W. /explant ^z (mg) | Browning (%) |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Control | 0.0 b ^y | 0.0 b | 0.0 b | 0 b | 103 ab | 39.5 b |
| 10 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b | 90 b | 32.1 bc |
| 100 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b | 74 bc | 21.3 bc |
| 1000 μM AOA | 0.0 b | 0.0 b | 0.0 b | 0 b | 26 c | 88.2 a |
| 100 μM AgNO ₃ | 1.9 a | 6.5 a | 1.2 a | 33 a | 143 a | 20.4 c |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表 1.9. 不同時期添加 50 μM AgNO_3 對報歲蘭‘瑞寶’ \times ‘光華蝶’ 培植體芽體生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。

Table 1.9. Effects of AgNO_3 (50 μM) addition time on shoot differentiation and growth of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ \times *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO_3 addition time (weeks after culture) | No. of shoot /explant | Shoot length ^z (mm) | Shoot diam ^z (mm) | Shoot F.W. / explant ^z (mg) | Total no. of shoot ^y /explant |
|---|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--|--|
| Control | 0.0 c ^x | 0.0 c | 0.0 d | 0 b | 0.7 b |
| 0 | 0.5 a | 11.4 a | 3.1 c | 104 a | 0.8 b |
| 2 | 0.2 bc | 8.4 ab | 3.7 ab | 105 a | 1.3 a |
| 4 | 0.3 ab | 8.1 b | 4.0 a | 124 a | 1.3 ab |
| 6 | 0.2 bc | 12.2 a | 3.4 bc | 137 a | 1.1 ab |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Total number of shoot and shoot differentiated from rhizome tip.

^x Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 15).

表 1.10. 不同時期添加 50 μM AgNO_3 對報歲蘭‘瑞寶’ \times ‘光華蝶’ 培植體根莖前端芽體生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。

Table 1.10. Effects of AgNO_3 (50 μM) addition time on shoot growth and differentiation from rhizome tip of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ \times *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO_3 addition time (weeks after culture) | No. of R \rightarrow S ^z /explant | R \rightarrow S rhizome length ^y (mm) | R \rightarrow S shoot length ^y (mm) | R \rightarrow S shoot diam ^y (mm) | R \rightarrow S shoot F.W. /explant ^y (mg) | No. of lateral shoot /explant |
|---|--|--|--|--|---|-------------------------------|
| Control | 0.7 ab ^x | 6.5 b | 9.1 ab | 2.6 b | 36 b | 0.0 b |
| 0 | 0.2 c | 8.5 a | 7.2 b | 2.7 ab | 29 b | 0.0 b |
| 2 | 1.1 a | 5.7 b | 10.3 a | 2.9 a | 64 a | 0.2 a |
| 4 | 1.0 ab | 5.8 b | 9.9 a | 2.5 b | 44 ab | 0.2 a |
| 6 | 0.7 b | 6.9 b | 9.7 a | 2.5 b | 47 ab | 0.1 ab |

^z R \rightarrow S: shoot differentiated from rhizome tip.

^y Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^x Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 15).

表 1.11. 不同時期添加 50 μM AgNO_3 對報歲蘭‘瑞寶’ \times ‘光華蝶’培植體根莖生長分化之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。

Table 1.11. Effects of AgNO_3 (50 μM) addition time on rhizome growth and differentiation of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ \times *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO_3 addition time (weeks after culture) | No. of rhizome /explant | Rhizome length ^z (mm) | Rhizome diam ^z (mm) | Rhizome F.W. /explant ^z (mg) | No. of lateral rhizome /explant |
|---|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Control | 2.1 a ^y | 6.2 a | 2.7 a | 73 a | 0.3 ab |
| 0 | 1.9 a | 6.9 a | 2.3 b | 72 a | 0.2 b |
| 2 | 1.5 ab | 6.5 a | 2.6 a | 67 a | 0.4 ab |
| 4 | 1.2 b | 6.0 a | 2.6 ab | 65 a | 0.2 ab |
| 6 | 1.6 ab | 6.7 a | 2.3 b | 82 a | 0.6 a |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 15).

表 1.12. 不同時期添加 50 μM AgNO_3 對報歲蘭‘瑞寶’ \times ‘光華蝶’培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響，於根莖液體培養 9 週後取樣調查。

Table 1.12. Effects of AgNO_3 (50 μM) addition time on root differentiation and growth, total fresh weight, and browning of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ \times *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks.

| AgNO_3 addition time (weeks after culture) | No. of root /explant | Root length ^z (mm) | Root diam ^z (mm) | Root F.W. /explant ^z (mg) | Total F.W. /explant ^z (mg) | Browning (%) |
|---|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Control | 0.2 b ^y | 6.8 a | 2.3 a | 60 ab | 75 b | 17.8 ab |
| 0 | 0.8 ab | 6.3 a | 2.0 a | 41 ab | 97 ab | 3.3 b |
| 2 | 1.2 a | 7.4 a | 2.1 a | 61 a | 120 a | 11.9 ab |
| 4 | 0.6 ab | 5.8 a | 1.8 a | 28 b | 85 b | 10.7 ab |
| 6 | 0.4 b | 5.9 a | 1.9 a | 32 ab | 98 ab | 20.0 a |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 15).

表 1.13. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) 與乙烯處理對綠豆芽下胚軸長度、直徑及主根長度之影響。

Table 1.13. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene on hypocotyl length, hypocotyl diameter, and root length of mung bean sprout.

| Treatment | Hypocotyl length (mm) | Hypocotyl diam (mm) | Root length (mm) |
|---|-----------------------|---------------------|------------------|
| Control | 49.1 a ^z | 27.2 b | 51.7 a |
| 5 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 1-MCP | | | |
| + 2 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C ₂ H ₄ | 46.2 a | 22.4 c | 49.7 a |
| 2 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ C ₂ H ₄ | 32.1 b | 31.5 a | 32.1 b |

^zMeans in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 5).

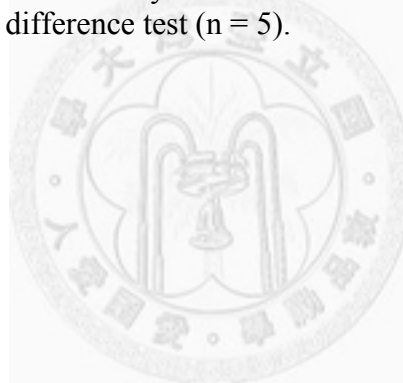


表1.14. 處理1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養13週後培植體芽體生長分化之影響。

Table 1.14. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ on shoot differentiation and growth of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of shoot /explant | Shoot length ^z (mm) | Shoot diam ^z (mm) | Shoot F.W. / explant ^z (mg) |
|--|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| Control | 0.0 b ^y | 0.0 c | 0.0 c | 0 c |
| 1 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.0 b | 0.0 c | 0.0 c | 0 c |
| 5 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.0 b ^x | 21.1 a | 2.5 b | 91 a |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ | 0.0 b | 0.0 c | 0.0 c | 0 c |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ + 100 μM AgNO ₃ | 0.0 b | 0.0 c | 0.0 c | 0 c |
| 100 μM AgNO ₃ | 0.2 a | 9.9 b | 2.6 a | 56 b |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

^z The accurate value was 0.038.

表 1.15. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養 13 週後培植體根莖前端芽體生長分化之影響。

Table 1.15. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ on shoot growth and differentiation from rhizome tip of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of R→S ^z /explant | R→S rhizome length ^y (mm) | R→S shoot length ^y (mm) | R→S shoot diam ^y (mm) | R→S shoot F.W. /explant ^y (mg) |
|--|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|
| Control | 0.1 a ^x | 8.1 ab | 7.8 a | 2.6 ab | 7 a |
| 1 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.1 a | 6.0 ab | 5.9 a | 3.2 a | 23 a |
| 5 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.1 a | 20.2 a | 6.4 a | 2.0 b | 11 a |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ | 0.1 a | 12.0 ab | 9.5 a | 2.7 a | 51 a |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ + 100 μM AgNO ₃ | 0.0 a | 5.0 b | 6.5 a | 2.1 ab | 14 a |
| 100 μM AgNO ₃ | 0.0 a | 12.0 ab | 6.4 a | 1.7 b | 13 a |

^z R→S: shoot differentiated from rhizome tip.

^y Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^x Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表1.16. 處理1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養13週後培植體根莖生長分化之影響。

Table 1.16. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ on rhizome growth and differentiation of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of rhizome /explant | Rhizome length ^z (mm) | Rhizome diam ^z (mm) | Rhizome F.W. /explant ^z (mg) | No. of lateral rhizome /explant |
|--|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Control | 2.8 ab ^y | 5.9 ab | 2.1 a | 76 a | 1.2 a |
| 1 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 2.5 ab | 5.1 b | 1.9 b | 53 a | 0.5 ab |
| 5 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 2.6 ab | 6.4 ab | 2.1 ab | 61 a | 0.8 ab |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ | 2.7 ab | 5.7 ab | 2.0 ab | 54 a | 1.0 ab |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ + 100 μM AgNO ₃ | 3.1 a | 5.5 b | 1.9 ab | 56 a | 0.4 b |
| 100 μM AgNO ₃ | 2.0 b | 7.3 a | 1.8 b | 46 a | 1.0 ab |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

表 1.17. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養 13 週後培植體根部生長分化、總鮮重及褐化率之影響。

Table 1.17. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ on root differentiation and growth, total fresh weight, and browning of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks.

| Treatment | No. of root /explant | Root length ^z (mm) | Root diam ^z (mm) | Root F.W. /explant ^z (mg) | Total F.W. /explant ^z (mg) | Browning (%) |
|--|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| Control | 0.0 a ^y | 0.0 c | 0.0 d | 0 d | 76 a | 53.6 a |
| 1 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.0 a | 0.0 c | 0.0 d | 0 d | 52 a | 46.3 a |
| 5 μL·L ⁻¹ 1-MCP | 0.1 a | 12.4 a | 1.8 a | 69 a | 68 a | 56.4 a |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ | 0.2 a | 5.5 b | 1.5 b | 26 b | 57 a | 55.8 a |
| 1 μL·L ⁻¹ C ₂ H ₄ + 100 μM AgNO ₃ | 0.0 a | 0.0 c | 0.0 d | 0 d | 56 a | 43.6 a |
| 100 μM AgNO ₃ | 0.1 a | 6.5 b | 1.3 c | 15 c | 55 a | 55.6 a |

^z Each value in the column was the mean of new differentiated organs from explants.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 16).

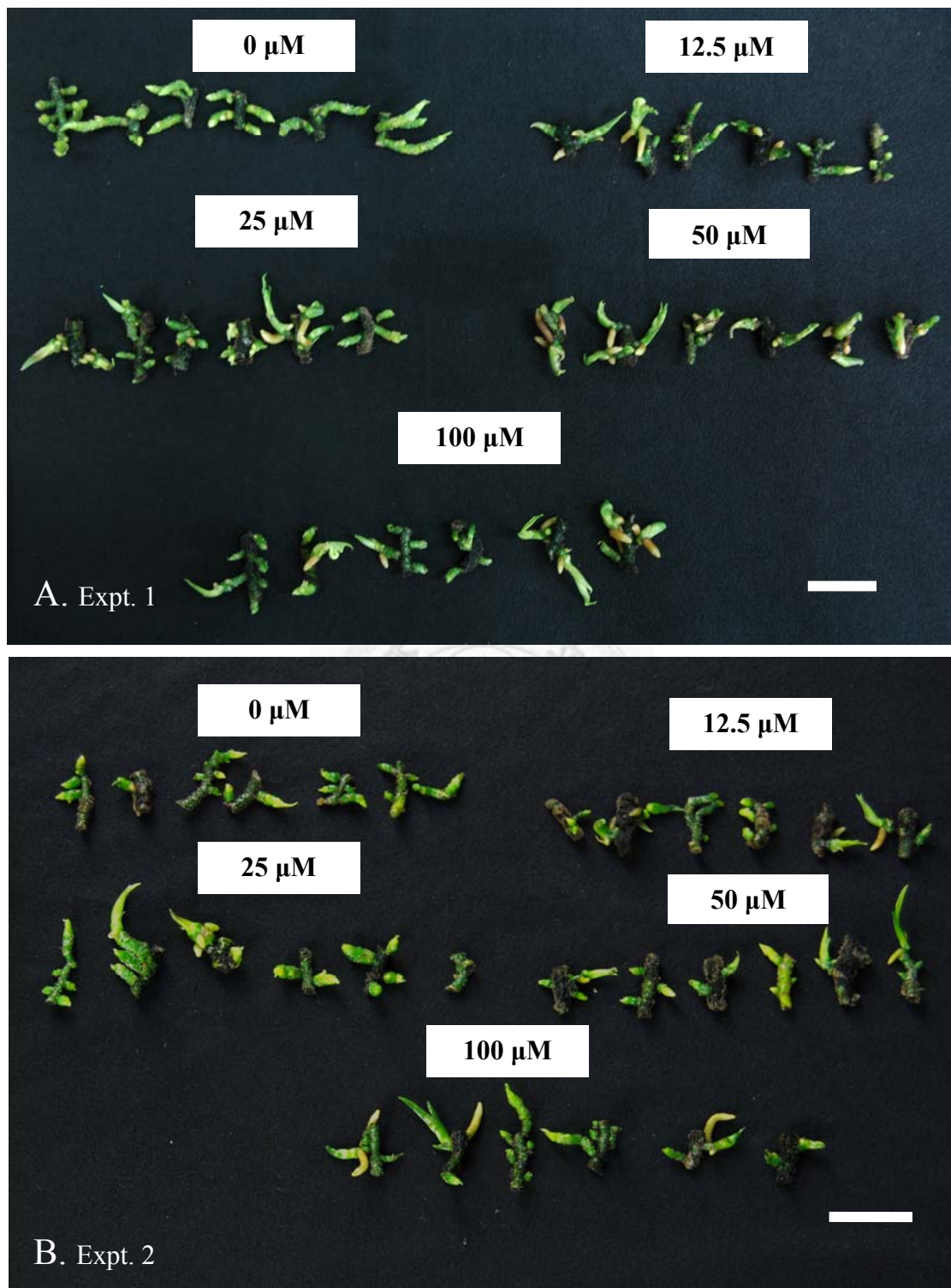


圖 1.1. 報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於添加不同濃度 AgNO_3 之液體對根莖繁殖培養基 9 週後，培植體生長分化之情形 (bar=2 cm)。

Fig. 1.1. Effects of AgNO_3 concentration on explant growth and differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks, Experiment 1 (A) and Experiment 2 (B) (bar=2 cm).

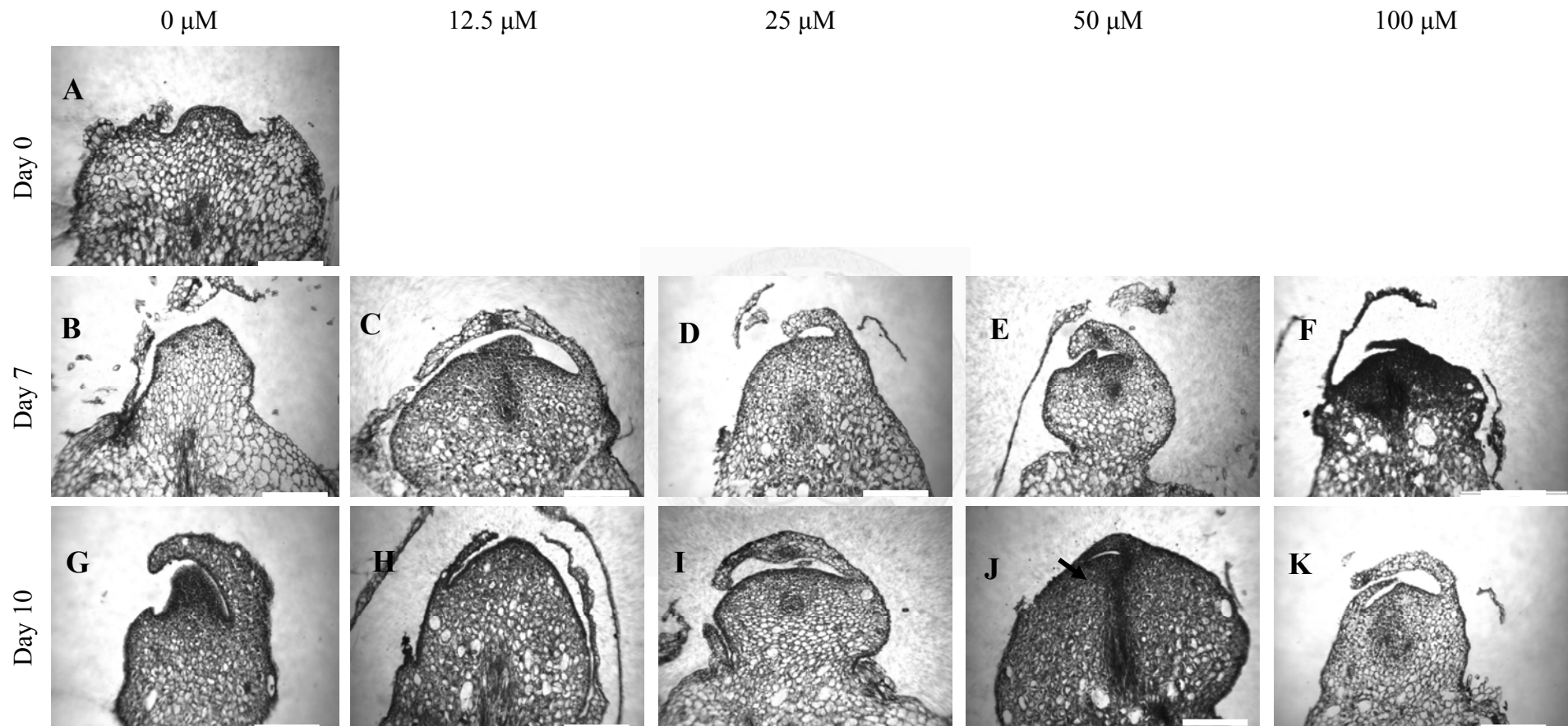


圖 1.2. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 0、7、10 天根莖分生組織解剖形態之特性。

Fig. 1.2. Effects of AgNO_3 concentration on rhizome apical meristem differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 0 (A), 7 (B-F), and 10 (G-K) days (bar=0.2 mm). Arrow indicates sheath leaf.

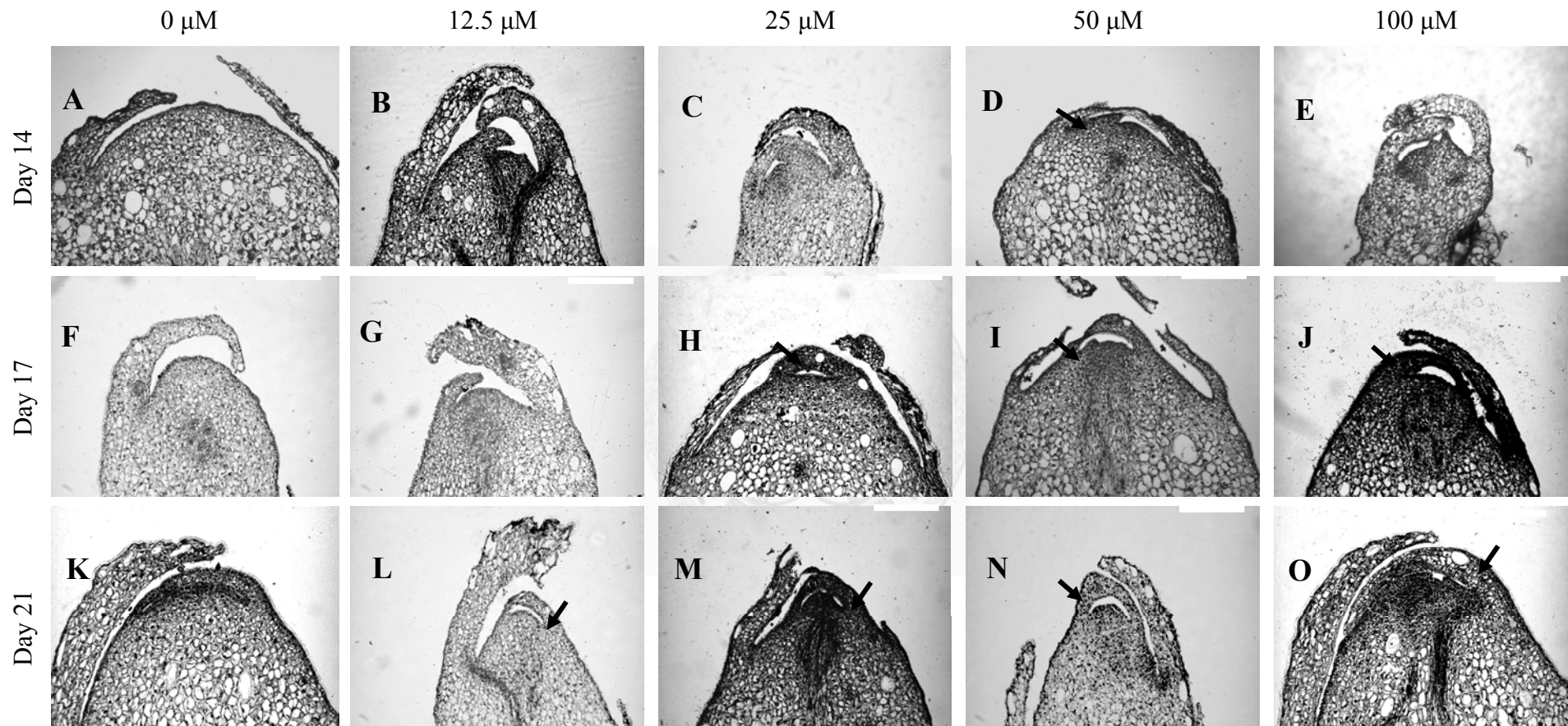


圖 1.3. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 14、17、21 天根莖分生組織解剖形態之特性。

Fig. 1.3. Effects of AgNO_3 concentration on rhizome apical meristem differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 14 (A-E), 17 (F-J), and 21 (K-O) days (bar=0.2 mm). Arrow indicates sheath leaf.

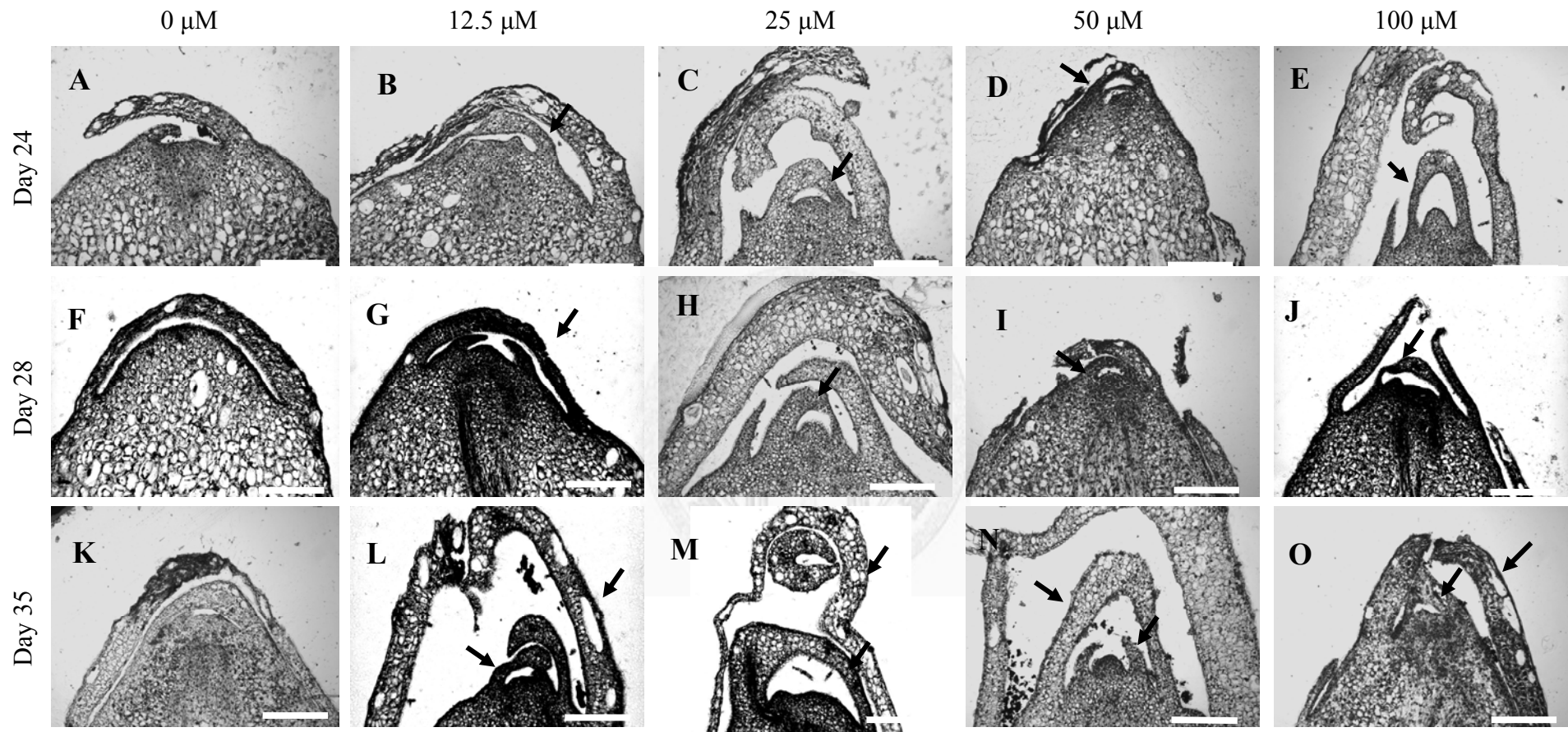


圖 1.4. AgNO_3 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖液體培養第 24、28、35 天根莖分生組織解剖形態之特性。
 Fig. 1.4. Effects of AgNO_3 concentration on rhizome apical meristem differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 24 (A-E), 28 (F-J), and 35 (K-O) days (bar=0.2 mm). Arrow indicates sheath leaf.

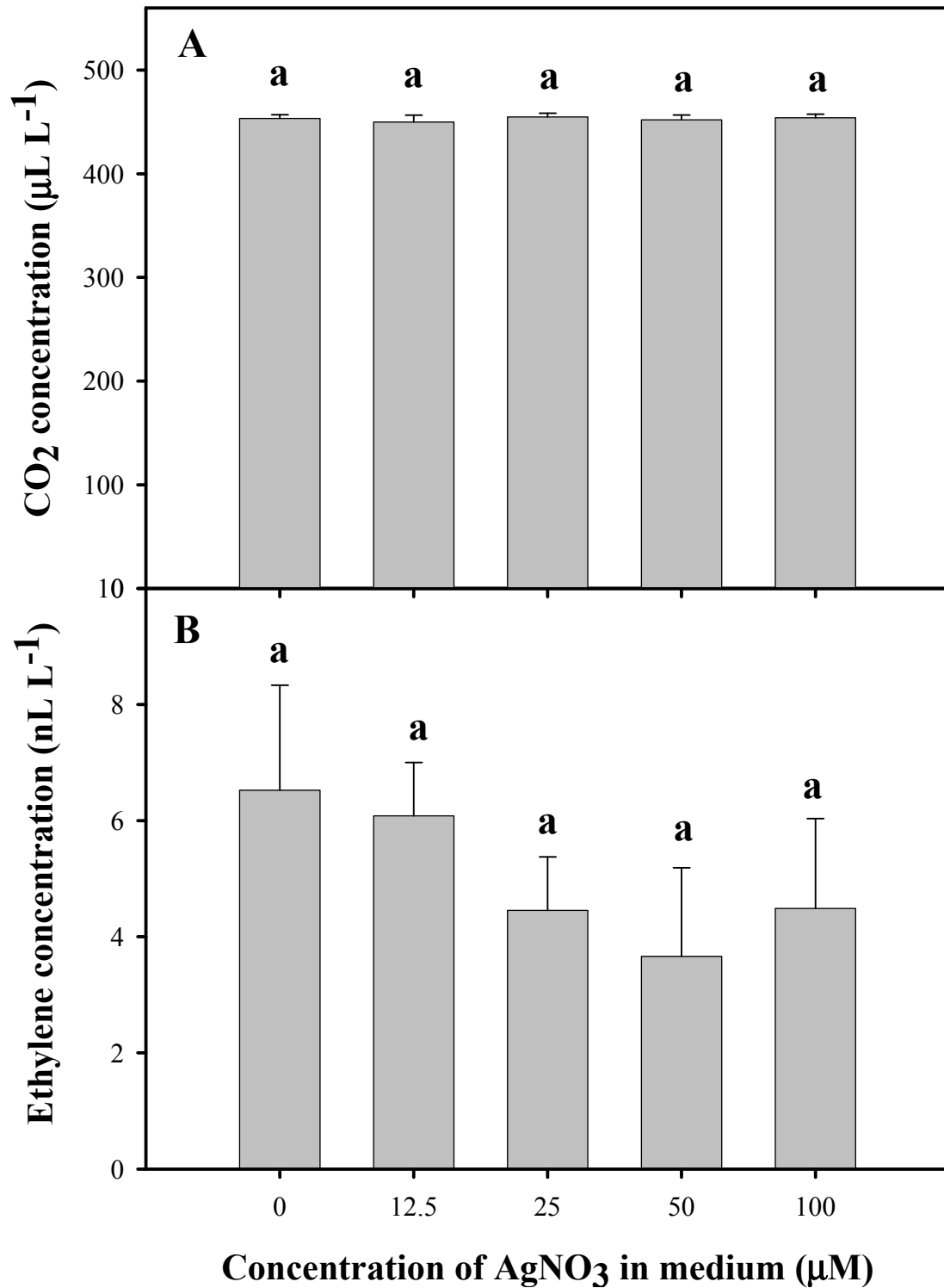


圖 1.5. AgNO₃ 處理之液體培養基配製後一週 (未放置培植體) 瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度(n=8)。

Fig. 1.5. Concentrations of in vitro carbon dioxide (A) and ethylene (B) in AgNO₃ containing liquid rhizome propagation medium (without explants), 1 weeks after autoclave sterilization (n=8) .

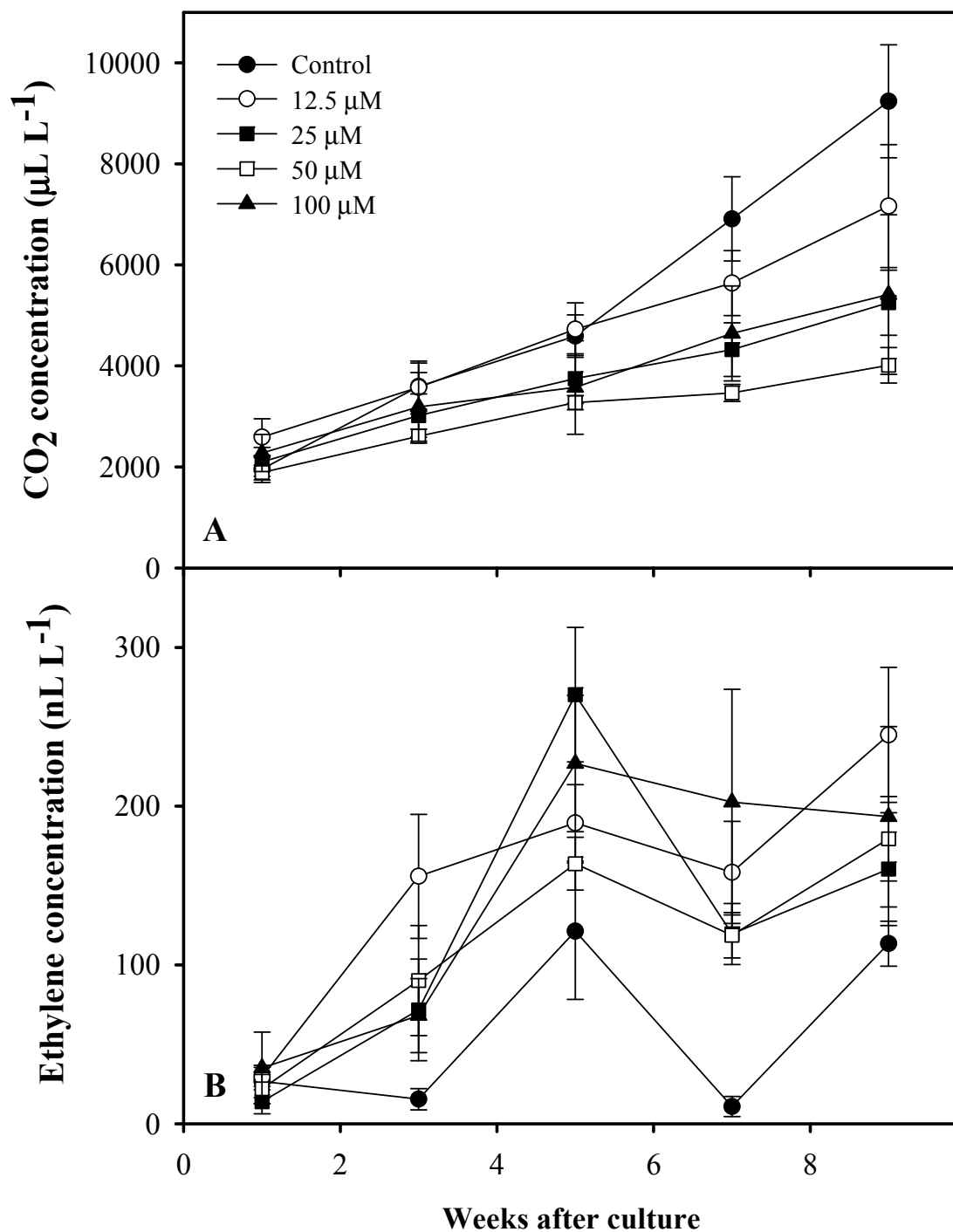


圖 1.6. AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’ × ‘光華蝶’根莖液體培養期間瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度之影響 (n=8)。

Fig. 1.6. Effects of AgNO₃ on in vitro carbon dioxide (A) and ethylene (B) concentrations in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ after culturing rhizome in liquid rhizome propagation medium (n=8).

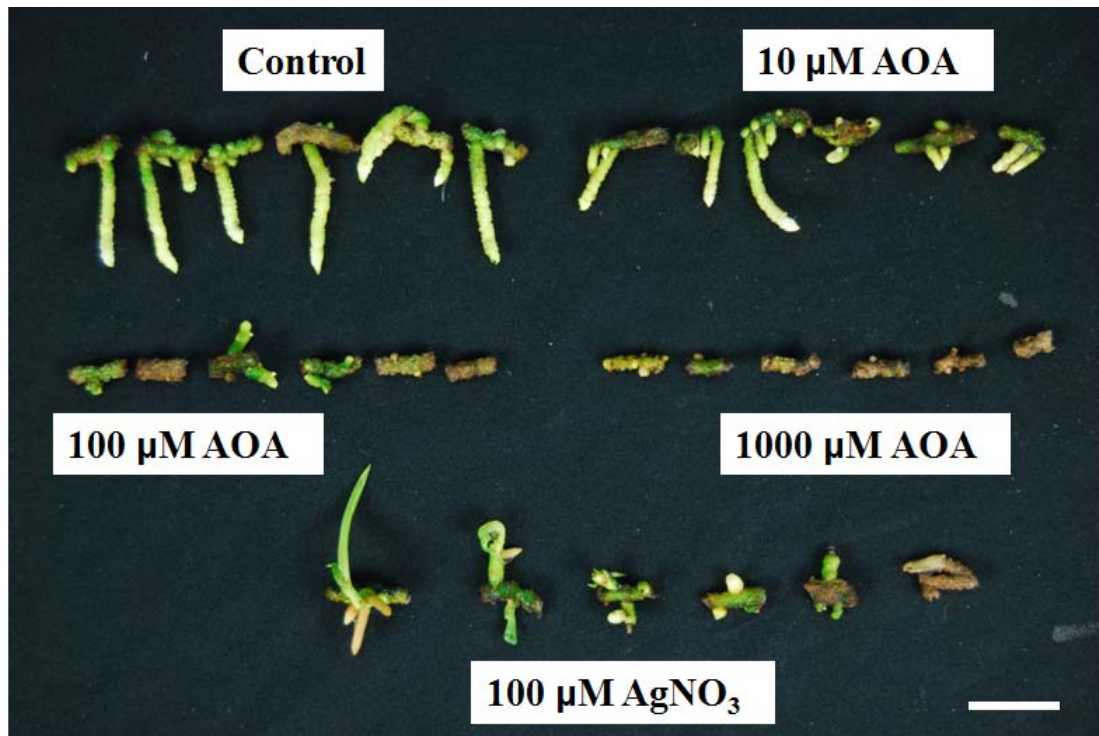


圖 1.7. 報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於添加不同濃度 aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO_3 之固體根莖繁殖培養基 13 週後培植體生長分化之影響 (bar=2 cm)。

Fig. 1.7. Effects of aminooxyacetic acid (AOA) and AgNO_3 on explant growth and differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in solid rhizome propagation medium for 13 weeks (bar=2 cm).

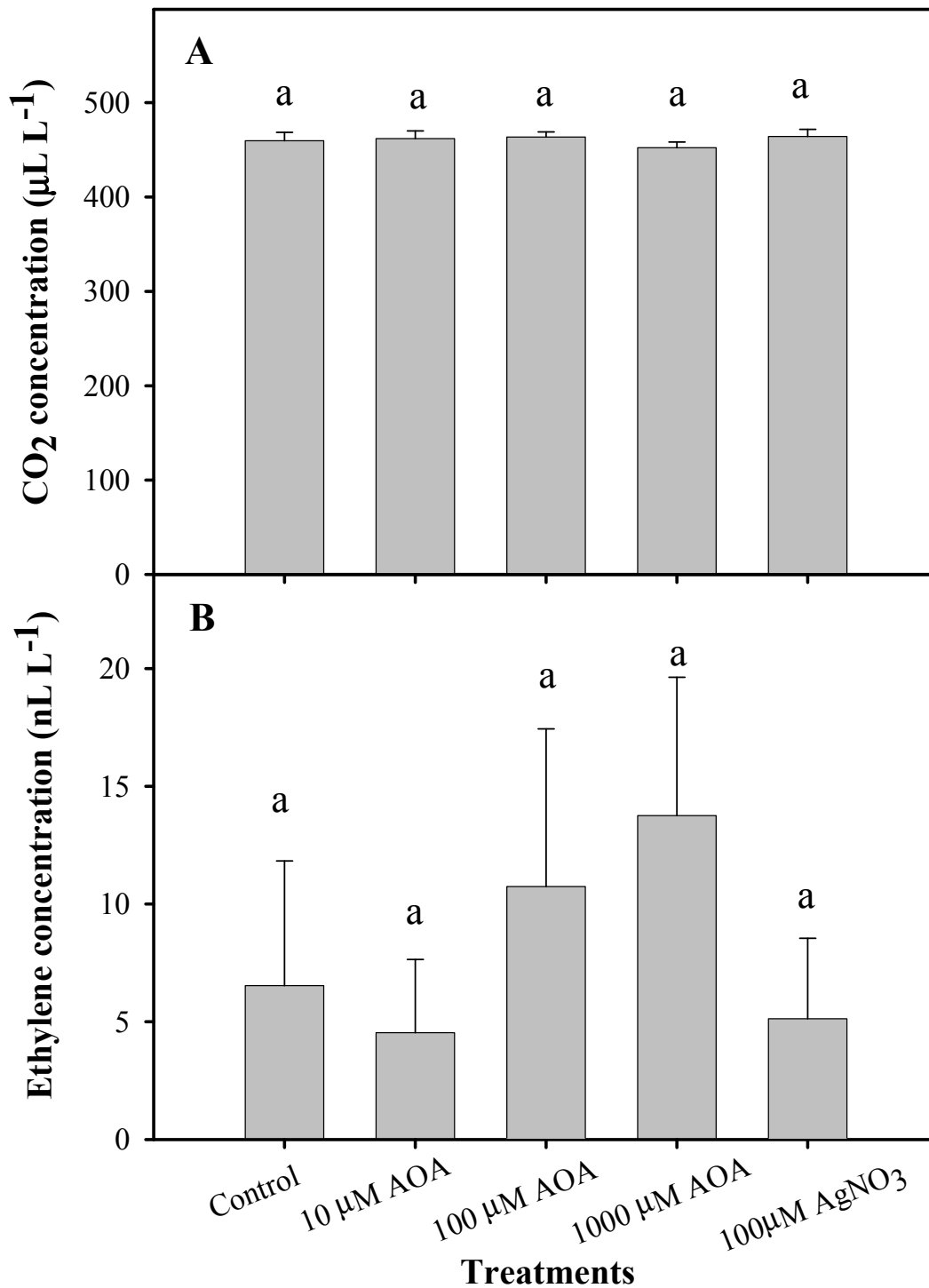


圖 1.8. Aminooxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 處理之固體培養基配製後一週 (未放置培植體) 瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度 (n=6)。

Fig. 1.8. Concentrations of in vitro carbon dioxide (A) and ethylene (B) in aminooxyacetic acid (AOA) or AgNO₃ containing solid rhizome propagation medium (without explants), 1 weeks after autoclave sterilization (n=6).

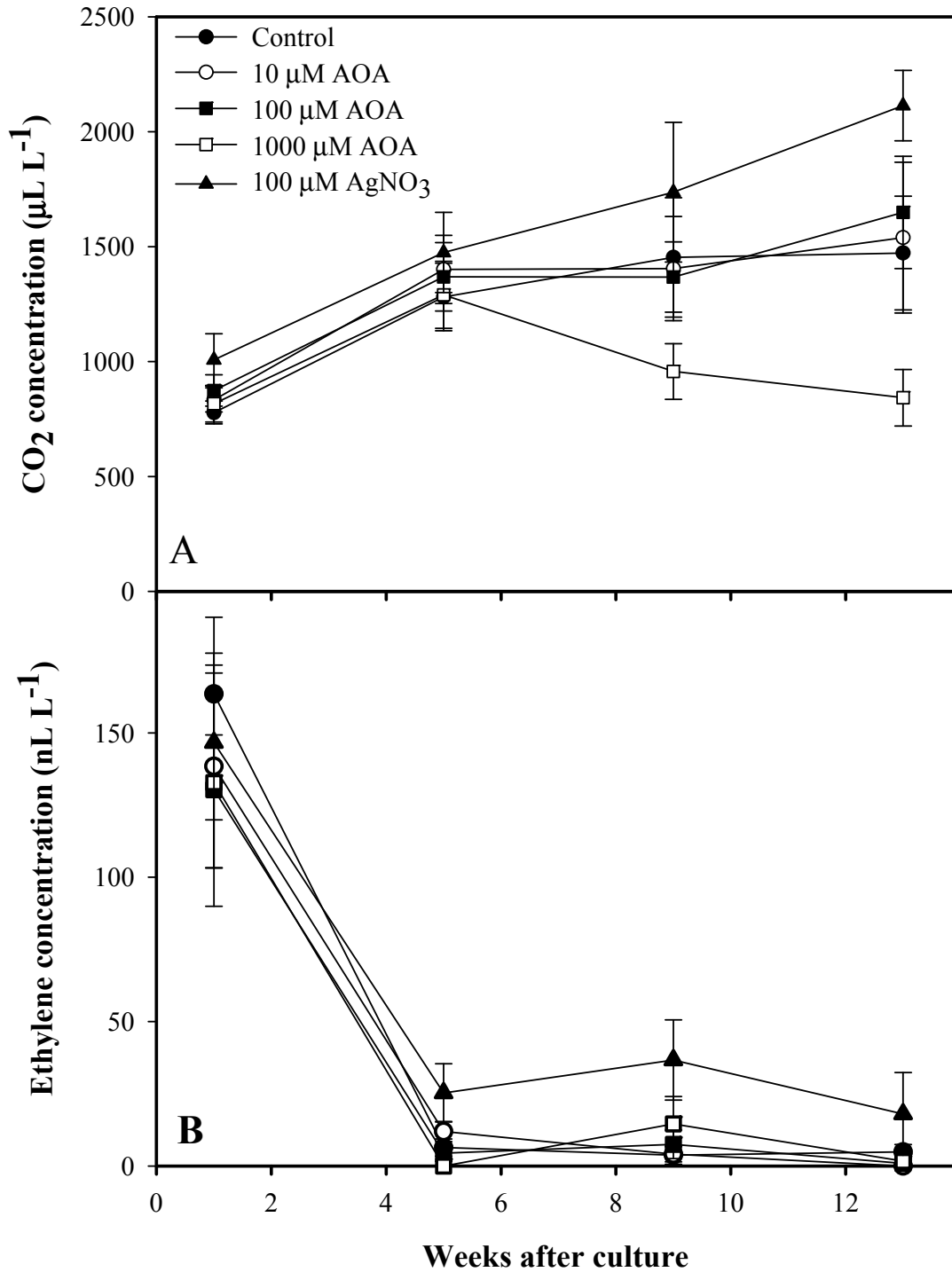


圖 1.9. Aminoxyacetic acid (AOA) 及 AgNO₃ 處理對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖固體培養期間瓶內二氧化碳 (A) 及乙烯 (B) 濃度之影響 (n=6)。

Fig. 1.9. Effects of aminoxyacetic acid (AOA) and AgNO₃ on in vitro carbon dioxide (A) and ethylene (B) concentrations in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ after culturing rhizome in solid rhizome propagation medium (n=6).

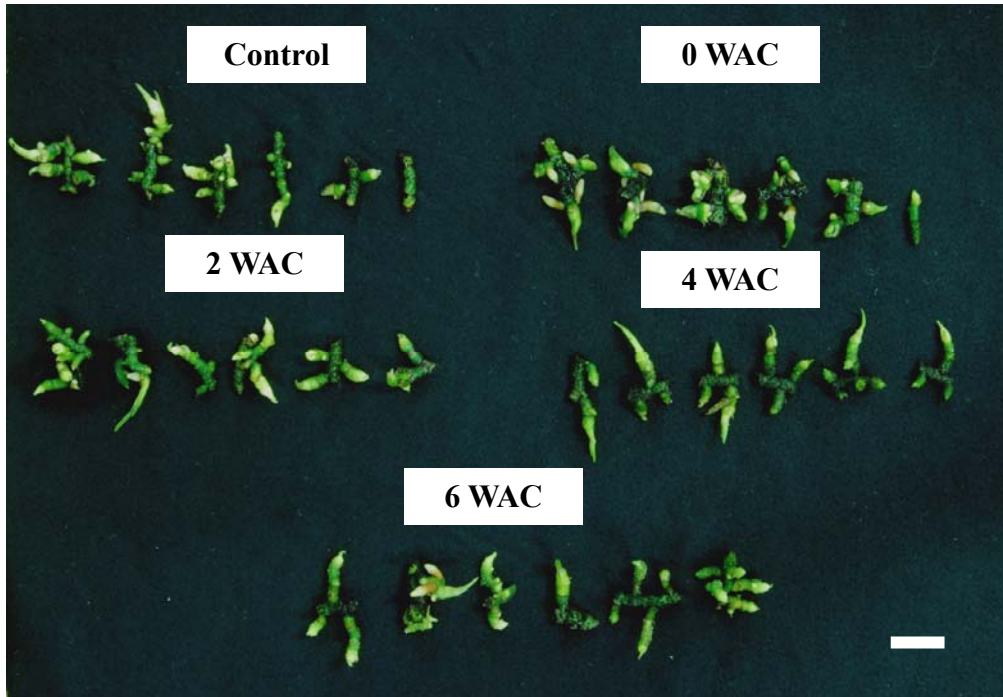


圖 1.10. 不同培養時期添加 AgNO_3 ($50 \mu\text{M}$) 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於液體根莖繁殖培養基 9 週後培植體生長分化之影響 (bar=2 cm)。

Fig. 1.10. Effects of AgNO_3 ($50 \mu\text{M}$) addition time on explant growth and differentiation in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks (bar=2 cm). AgNO_3 was added 0, 2, 4, and 6 weeks after culture (WAC).



圖 1.11. 培養期間添加 AgNO_3 ($50 \mu\text{M}$) 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於液體根莖繁殖培養基 9 週後的培植體側芽生長分化之情形 (bar=2 mm)。

Fig. 1.11. Lateral shoot differentiation and growth after AgNO_3 ($50 \mu\text{M}$) addition in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks (bar=2 mm).

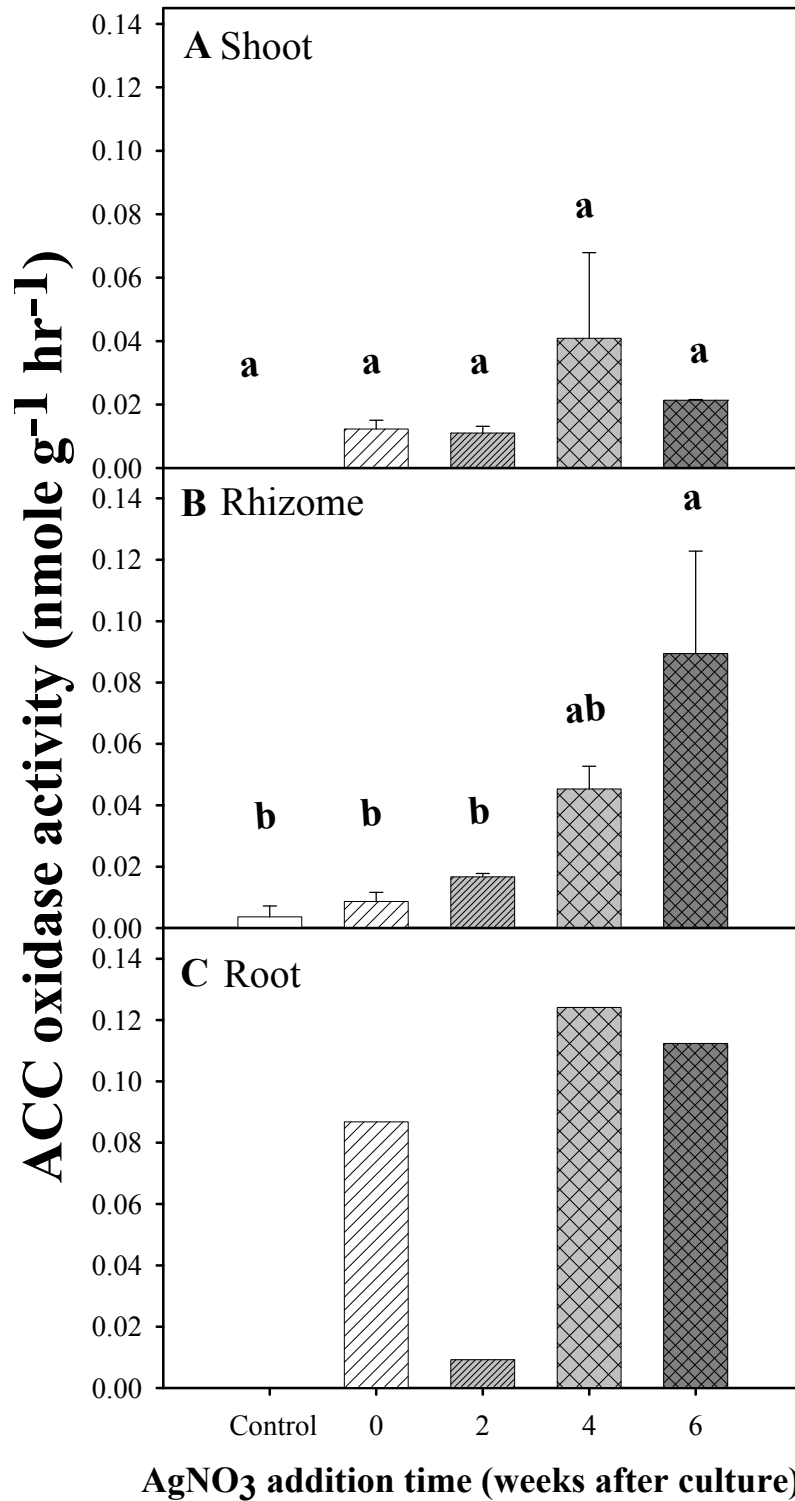


圖 1.12. 不同時期添加 AgNO_3 ($50 \mu\text{M}$) 對報歲蘭‘瑞寶’ \times ‘光華蝶’根莖培養於根莖繁殖液體培養基 9 週後，芽體(A)、根莖(B)及根部(C) ACC oxidase 活性之影響 ($n=4$)。

Fig. 1.12. Effects of $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 addition time on ACC oxidase activity of shoot (A), rhizome (B), and root (C) in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ \times *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizomes cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks ($n=4$).

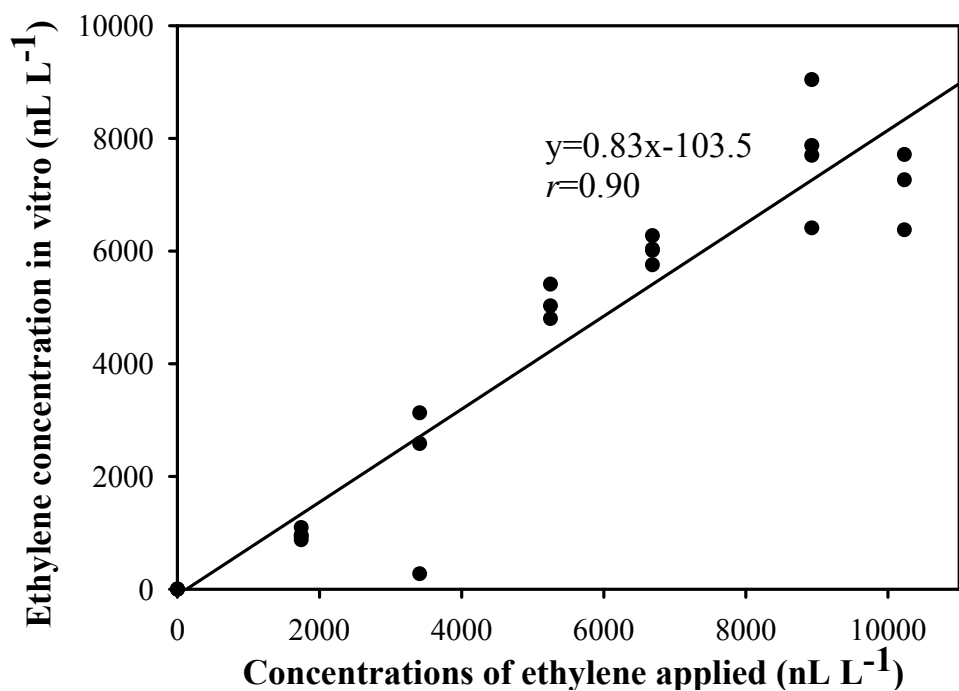


圖 1.13. 燻蒸乙烯濃度與瓶內乙烯濃度之關係 (n=4)。

Fig. 1.13. Correlation between applied ethylene concentration (for 24 hours) and ethylene concentration in vitro (n=4).

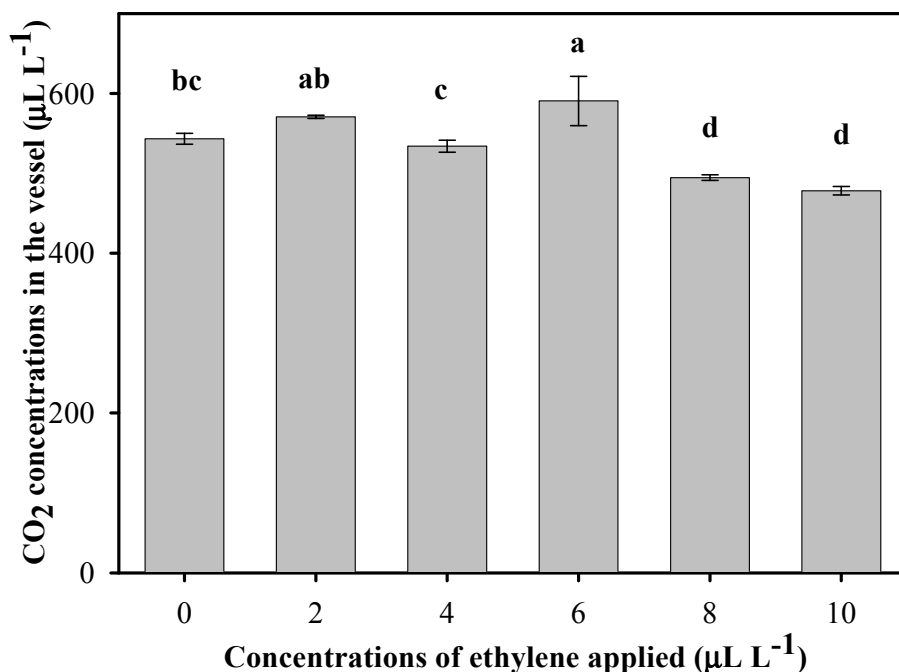


圖 1.14. 燻蒸不同濃度乙烯 24 小時對瓶內 CO₂ 濃度之影響 (n=4)。

Fig. 1.14. Effects of applied ethylene concentration (for 24 hours) on carbon dioxide concentration in vitro (n=4).

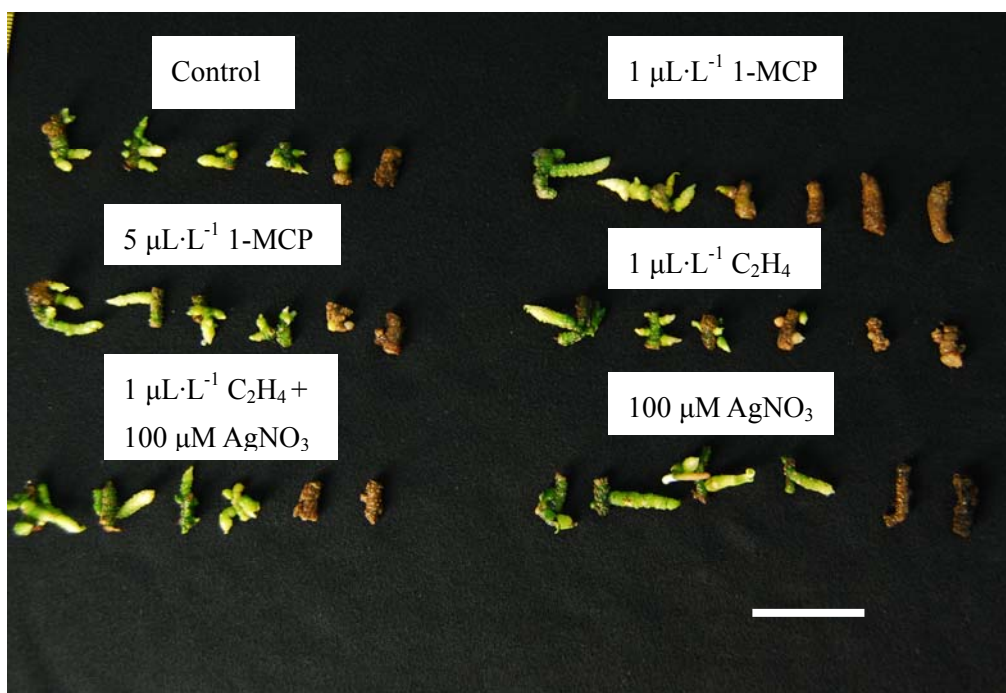


圖 1.15. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養於根莖繁殖液體培養基 9 週後培植體生長分化之影響 (bar=2 cm)。
 Fig. 1.15. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ on explant growth and differentiation of *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizome cultured in liquid rhizome propagation medium for 9 weeks (bar=2 cm).

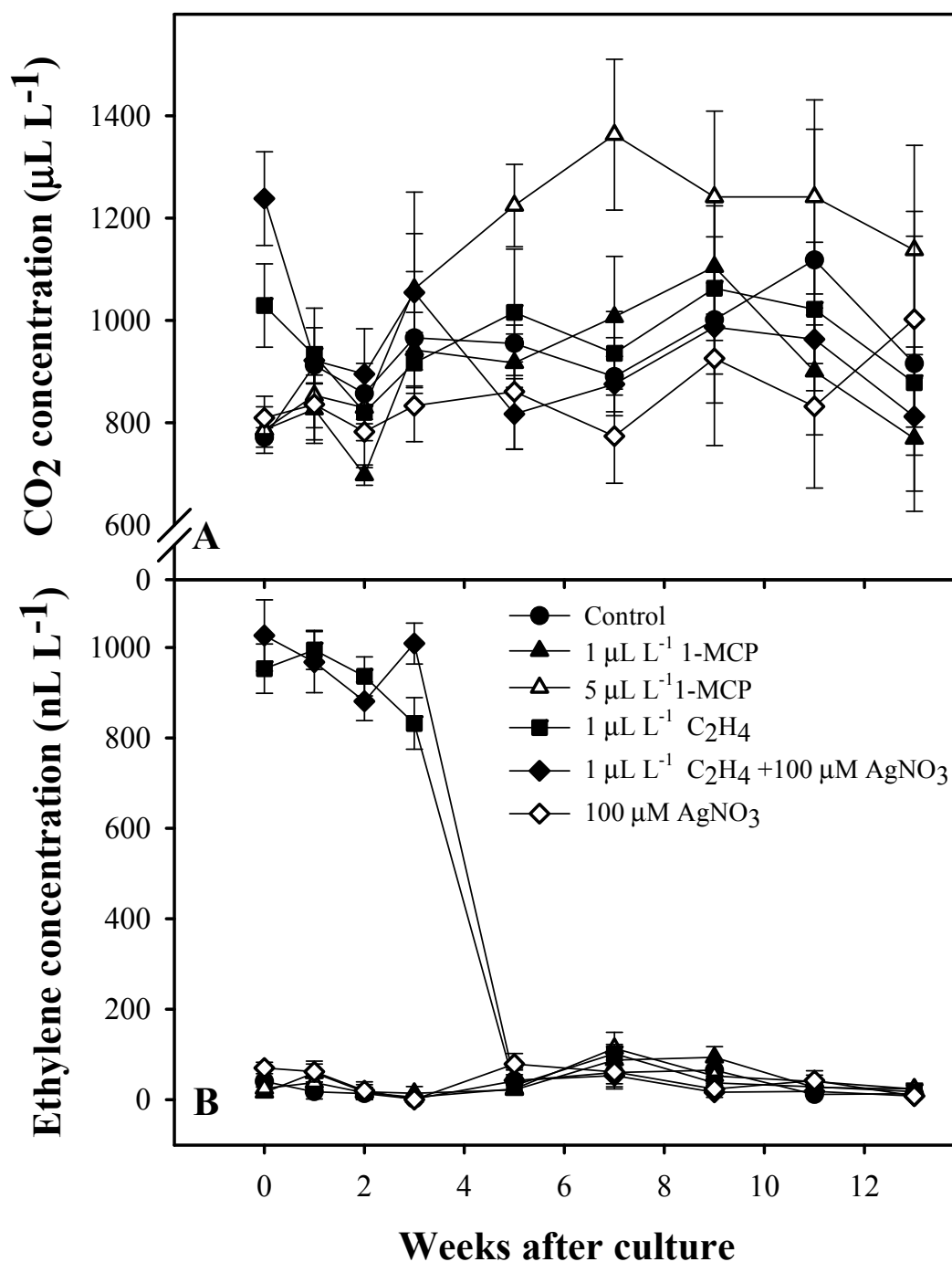


圖 1.16. 處理 1-methylcyclopropene (1-MCP)、乙烯、AgNO₃ 對報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養第 0、1、2、3、5、7、9、11 及 13 週瓶內二氧化碳(A)及乙烯(B)濃度之影響 (n=6)。

Fig. 1.16. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP), ethylene, and AgNO₃ treatments on in vitro carbon dioxide (A) and ethylene (B) concentrations in *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 weeks after culturing rhizome in liquid rhizome propagation medium (n=6). Ethylene was applied at week 0, 1, 2, and 3.

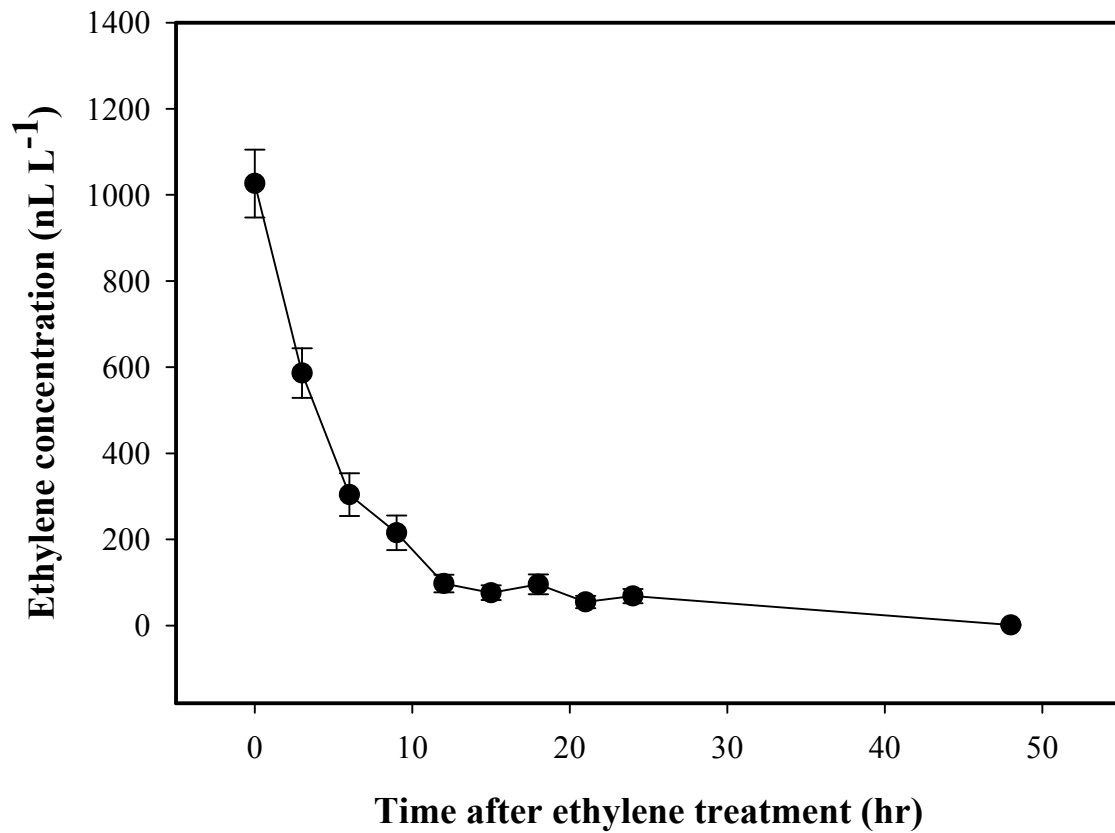


圖 1.17. 燻蒸 $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙烯 24 小時後，報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’根莖培養瓶內乙烯濃度隨時間變化之情形 (n=8)。

Fig. 1.17. Changes of in vitro ethylene concentration after fumigating the culture vessel containing *Cymbidium sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’ rhizomes with $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ethylene for 24 hours (n=8).

五、討論 (Discussion)

(一) AgNO₃ 對報歲蘭根莖生長分化之影響

於組織培養的過程中，為了避免微生物的污染及延緩植物與培養基失水，常將植物培養於高密閉性的環境下，造成氣體與外界環境交換減緩而累積於瓶內 (Jackson et al., 1994)。乙烯是一種氣體植物荷爾蒙，只要極微量的濃度，即可使植物產生生理反應，調節並影響許多植物生長、發育及逆境生理變化 (Abeles et al., 1992)。在組織培養期間乙烯會累積在瓶內而影響培植體器官分化 (Biddington, 1992)。乙烯可促進桃砧木 (Dimasi-Theriou and Economou, 1995) 及矮牽牛 (Dimasi-Theriou et al., 1993) 芽體分化及生長，但會抑制獼猴桃 (Arigita et al., 2003) 及草莓 (Qin and Zhang, 2005) 芽體分化。乙烯可提高植物對auxin的敏感度而促進向日葵發根 (Liu and Reid., 1992)，亦提高矮牽牛不定根數目及鮮重 (Dimasi-Theriou et al., 1993)，但降低蘋果不定根數目 (Ma et al., 1998) 及降低草莓發根率、根長、根乾重和根活性 (Qin and Zhang, 2005)。綜合而言，乙烯對培植體器官生長及分化之影響依物種而異。

報歲蘭根莖培養於添加AgNO₃之根莖繁殖培養基中皆有芽體及根部分化 (表1.1、表1.4)，根莖之數目皆較未添加AgNO₃處理組低 (表1.3)。而報歲蘭根莖培養於未添加AgNO₃之根莖繁殖培養基中有最多之根莖分化數目 (表1.3)，但並無芽體分化之情形 (表1.1)。然而，部分新生根莖前端芽體 (R→S) 會分化出根部 (表1.2、表1.4)。培養基添加AgNO₃會抑制報歲蘭根莖的分化、促進芽體及根部分化與生長之現象，與前人研究相似。潘 (2007) 以報歲蘭‘瑞寶’×‘光華蝶’ (*Cym. sinense* ‘Rui Bao’ × *Cym. sinense* ‘Guang Hua Die’) 根莖培養在添加ACC之抽芽培養基中，芽體及根部的生長明顯受到抑制，而培養於抽芽培養基添加AgNO₃之處理組有促進芽體生長效果，推測乙烯會抑制報歲蘭芽體生長。此外為瞭解乙烯對報歲蘭根莖生長及分化的影響，將報歲蘭根莖培養於添加不同乙烯相

關藥劑之根莖繁殖培養基中，培養基添加ACC之處理組會促進根莖生長、分支，而培養於添加AgNO₃之處理組會抑制根莖的生長，但是會促進芽體分化及生長(潘，2007)。

其他蕙蘭屬植物根莖培養於添加 AgNO₃ 之培養基中亦有相似結果，例如：Shimazaki (1992) 將寒蘭 (*Cym. kanran* Makino) 根莖培養於添加 STS 之 MS 培養基中，結果顯示添加 STS 會促進寒蘭芽體與根部之分化，其中以添加 0.1 μM STS 者有最高之芽體與根部形成率 (約有 73.3%芽體形成率與 66.7%根部形成率)。Ogura-Tsujita 與 Okubo (2006a) 亦觀察到寒蘭根莖培養於添加 0.1 mg·L⁻¹ AgNO₃ 之 MS 培養基中三個月後，可有效提升芽體形成率至 30%。除此之外，將 *Cym. Sleeping Beauty* × *Cym. sinense* 培養於添加 0.1 mg·L⁻¹ AgNO₃ 之 MS 培養基中亦可使其擬原球體 (protocrom-like body) 芽體分化率提高至 77% (Ogura-Tsujita and Okubo, 2006b)。

AgNO₃的作用是否有濃度效應或是只要超過臨界濃度後即可誘導芽體分化？在兩次試驗中，促進報歲蘭根莖分化芽體的最有效AgNO₃濃度與芽體數目卻有些許不同：在第一次試驗中，報歲蘭根莖培養於添加50 μM AgNO₃之培養基中，平均每個培植體可分化1.2個芽體，而在第二次試驗中，12.5-100 μM AgNO₃之處理組每個培植體皆可分化0.5-0.7個芽體，而且第一次試驗中各處理組較第二次試驗各處理組皆多出50 mg以上的新生器官總鮮重 (表1.1、表1.4)。前人指出根莖組織中富含澱粉體，當根莖內澱粉體越多所誘導出的芽體也越多且強壯(張，1994；廖，1995)。比較兩試驗之結果，第一次試驗使用高濃度AgNO₃可分化出較多芽體且總生長量較高，其原因可能為第一次試驗所使用的培植體年齡較大，其體內蓄積之養分較多，而得到較多的芽體與較高的總生長量。

為了進一步瞭解不同濃度 AgNO₃ 對報歲蘭根莖分化芽體時間的影響，於是

在不同培養時期對各處理組進行培植體頂端分生組織之石蠟切片。本研究判斷頂端分生組織是分化成芽體或根莖之指標，係參考張 (1994) 觀察素心蘭 (*Cymbensifolium* var. *misericors*) 根莖自然分化芽體之結果：當根莖開始分化成芽體其莖頂分生組織會成尖狀，且鱗片葉距莖頂分生組織較遠，第一片鞘葉會包住莖頂分生組織並留有一小空隙，而第二片鞘葉葉基以 360° 圍繞莖頂分生組織，有別於鱗片葉葉基之 180° 。由鞘葉的形成來判斷各濃度 AgNO_3 處理誘導芽體所需的時間， $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理需培養 10 天，25 及 $100 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理需培養 17 天， $12.5 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理需培養 21 天，而對照組於培養 35 天時僅觀察到鱗片葉 (cataphyll) 而尚未有鞘葉形成 (圖 1.2、圖 1.3、圖 1.4)。上述結果指出 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 之處理組在培養 10 天時，頂端分生組織已趨向分化芽體，而 $50 \mu\text{M AgNO}_3$ 處理組之芽體分化數目較其他處理組多 (表 1.1)，可能為培植體於培養後較早趨向分化芽體。

為瞭解培養基添加 AgNO_3 是否會影響瓶內氣體濃度，於培養基配製後一週尚未置入培植體時，調查各處理間瓶內 CO_2 和乙烯濃度，各處理之瓶內 CO_2 濃度均接近 $450 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 且處理間無顯著差異 (圖 1.5A)，且瓶內乙烯濃度亦無顯著差異 (圖 1.5B)。因此，培養基在未置入培植體前，添加 AgNO_3 並不會影響瓶內氣體濃度。

於培養 1 至 5 週間，瓶內 CO_2 濃度隨著培植體生長分化有累積的現象，但各處理間之瓶內 CO_2 濃度均無顯著差異 (圖 1.6A)，可能是因為培植體在培養初期有較高的暗呼吸作用速率及較低的光合作用速率，而釋放大量二氧化碳累積於瓶內 (Ogasawara et al., 1995)。而潘 (2007) 調查報歲蘭根莖於根莖繁殖培養基中各時期之瓶內 CO_2 濃度日變化，於培養第 26 週及 28 週時瓶內二氧化碳濃度才開始有暗期上升、光期下降之 C_3 植物碳固定日變化，顯示芽體發育後期光合能力增強，具有明顯光自營性。由植株大小及培養時間推斷本試驗調查階段期間，報歲蘭根莖

或芽體為異營，瓶內CO₂濃度主要受培植體呼吸作用影響。培養7週與9週時，瓶內CO₂濃度以未添加AgNO₃之處理最高，而以50 μM AgNO₃之處理最低（圖1.6A）。如果各處理間呼吸作用速率相同時，則根莖重量較多者其瓶內CO₂濃度應較高。但本試驗中未添加AgNO₃與50 μM AgNO₃兩處理之總鮮重均較少（表1.4），可能為呼吸作用速率不同所致。

在培養第3週開始至試驗結束之後，添加AgNO₃之各處理其瓶內乙烯濃度較未添加AgNO₃者高（圖1.6B）。相同的現象亦曾在Shimazaki (1992) 之寒蘭根莖培養於添加1-10 μM STS之MS培養基試驗中觀察到，以添加AgNO₃之處理組相較於未添加者有較高之瓶內乙烯濃度；菊苣 (*Cichorium intybus*) 培養於添加40 μM AgNO₃培養基中，有較高之瓶內乙烯濃度 (Bais et al., 2000)；辣椒 (*Capsicum chinese* Jacq.) 芽體培養中，AgNO₃亦會促進其瓶內乙烯之產生。雖然AgNO₃為乙烯作用抑制劑，可防止乙烯對植株造成影響 (Santana-Buzzy et al., 2006)，但是AgNO₃促進乙烯生合成之機制至今仍未釐清。Atta-Aly等人 (1987) 曾觀察到重金屬會促進ACC之生合成及ACC轉換為乙烯，因此推測此試驗結果可能是使用AgNO₃時，銀離子而促進培植體乙烯生合成，而有較高的瓶內乙烯濃度。

（二）乙烯生合成及作用抑制劑對報歲蘭根莖生長分化之影響

S-adenosylmethionine (SAM) 轉變成1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) 之步驟在乙烯合成路徑中為速率限制步驟 (rate-limiting step)，若能控制此步驟，即能調節乙烯之合成 (Yang and Hoffman, 1984)。而aminooxyacetic acid (AOA) 主要作用部位即是乙烯生合成中的酵素，藉由抑制酵素活性而減少乙烯生合成，可抑制ACC synthase活性，造成ACC生成減少 (Serek et al., 2006)。

於液體培養添加AgNO₃對報歲蘭根莖生長分化影響之試驗中，報歲蘭根莖培養於添加AgNO₃的培養基中會促進芽體及根部分化與生長，這現象可能為AgNO₃抑制了乙烯的作用，進而促進報歲蘭根莖分化為芽體。而本試驗使用不同濃度的

AOA欲抑制報歲蘭根莖乙烯生合成，以瞭解乙烯生合成與報歲蘭芽體分化是否有關連。培養基添加10-1000 μM AOA並未能誘導報歲蘭根莖分成芽體 (表1.5)，且瓶內乙烯濃度與對照組無顯著差異，顯示AOA未能有效減少培植體乙烯生合成 (圖1.9)。而報歲蘭根莖培養於添加AOA之培養基，所誘導的根莖長度、根莖鮮重及總鮮重，均隨培養基添加AOA濃度的提升而下降。潘 (2007) 將報歲蘭培養於添加100 μM AOA之根莖繁殖培養基中也有相同的情形，新生根莖數目、長度、寬度及鮮重亦有降低的現象。由此可以推論，報歲蘭根莖培養於添加高濃度AOA之培養基會導致芽體及根部無法被誘導分化。AOA雖為ACC synthase活性抑制劑，當AOA濃度高至0.005及0.02 mM時會促進蝴蝶蘭根部ACC合成，未抑制ACC synthase活性且造成毒害 (徐，2004)。而本研究培養基含1000 μM AOA者，褐化率高達88.2% (表1.8)，顯示培植體可能受高濃度AOA之毒害。

乙烯為植物賀爾蒙之一，其作用所需時間短暫且作用所需濃度低，約0.01 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 之乙烯濃度即可影響植物生長、分化及老化 (Reid, 1995)。培養一週時各處理瓶內乙烯濃度皆大於0.13 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ，已達影響培植體分化的濃度 (圖1.9B)。前人指出瓶塞經由高壓滅菌或過火甚至在一般組織培養環境下，皆會產生乙烯而使瓶內乙烯濃度增加 (潘，2007; Jacobsen and McGlasson, 1970; Mensuali-Sodi et al., 1992)。推測本試驗培養初期的高濃度乙烯可能是由於無菌操作過程而產生，而此高濃度乙烯會顯著抑制培植體分化芽體，使得本試驗所用的各濃度AOA均無法有效降低培植體乙烯生合成及促進芽體分化。

寒蘭根莖培養時添加0.01-1 μM AVG於MS培養基中，皆可促進芽體與根部分化，其中以添加1 μM AVG者有最高之芽體與根部形成率，約有60%芽體形成率與46.7%根部形成率 (Shimazaki, 1992)。AVG與AOA皆為乙烯生合成抑制劑，AVG可有效促進寒蘭根莖分化芽體 (Shimazaki, 1992)，但本試驗所使用之AOA無法誘導報歲蘭根莖分化芽體及根部，且過高濃度AOA會提升報歲蘭根莖褐化率 (表1.5、表1.8)。可能為培植體於培養初期已遭受乙烯作用，或是AOA濃度過

高而使報歲蘭根莖無法分化成芽體。因此，對於報歲蘭根莖培養而言，抑制乙烯作用比抑制乙烯生合成較能促進報歲蘭根莖分化成芽體。

(三) 不同時期添加AgNO₃對報歲蘭根莖生長分化之影響

要使根莖分化較多之芽體且使芽體生長良好，培植體內的養分蓄積為重要因素之一。菸草癒傷組織之細胞內若累積大量澱粉，則其產生之芽原體較多，而位產生芽原體的細胞則沒有澱粉的累積。可能是澱粉為提供細胞分化芽原體所需之能量來源，或可促進cytokinin的產生 (Thorpe and Meier, 1974)。根莖組織中皮層細胞 (cortex cell) 佔大部分的體積，而皮層細胞內富含澱粉體 (amyloplast)，澱粉體為植物組織中貯藏性物質之一；通常生長良好的根莖，其累積的能量相對較多且誘導出的芽體也較多而強壯 (張，1994；廖，1995)。

推測先培養根莖一段時間待蓄積較多養分後，再誘導根莖分化芽體，可誘導出較多的芽體且較佳生長，並且由試驗一和試驗二可知使用 AgNO₃ 可有效促進報歲蘭根莖分化芽體 (表 1.1、表 1.5)，故本試驗於不同時期添加 AgNO₃ 以瞭解不同長度之新生報歲蘭根莖受 AgNO₃ 影響其分化芽體之情形。

培植期間於液體培養基中添加50 μM AgNO₃者其培植體均有芽體發生，而未添加AgNO₃者則無芽體分化 (表1.9)。在培養第2、4、6週於培養基添加AgNO₃者雖芽體分化數目較當週添加AgNO₃者少，但產生較多根莖前端芽體且有側芽體的形成，而總芽體數以培養第2週添加AgNO₃者為最多 (表1.9)。根莖前端芽體長度方面，以培養第2、4、6週添加AgNO₃者均比當週添加AgNO₃者長 (表1.10)。故培養根莖一段時間後待養分蓄積足夠後，再誘導根莖分化芽體，則可誘導較多之芽體數目以及較長之芽體長度。

在培養第2、4及6週後添加AgNO₃之處理者，除了於新生的根莖之頂端有芽體發生外，亦可觀察到側芽體的發生（表1.10、圖1.11）。一般而言，新生的根莖長度隨著培養時間的增加而增長，而越長的根莖所含的分生組織與蓄積的養分亦較多，受AgNO₃作用而分化的芽體數應較多，但本試驗芽體和側芽體數目並未隨著培養時間的增加而增加，反而是有下降的趨勢（表1.10）。將九華蘭根莖培養於含BA的培養基也得到相似的結果，以較長的根莖進行誘導所分化出的芽體生長勢較弱，可能是可被誘導的分生組織隨根莖生長而增加，而分生組織間互相競爭養分所致（Hasegawa et al., 1985）。本試驗以培養兩週後添加AgNO₃之處理所得的總芽體數為最多（表1.9），此時的新生根莖長度約為2 mm，而Hasegawa等人（1985）使用長度為2-3 mm的九華蘭根莖進行培養所得的芽體數及生長較佳。

於培養第9週時測量各處理之新生成器官的ACC oxidase活性，其中根莖之ACC oxidase活性會隨著AgNO₃添加時期的延後而有增加的趨勢（圖1.12B），可能添加AgNO₃會使根莖ACC oxidase活性提高，但隨時間的增加又逐漸下降。而根莖培養於添加AgNO₃的培養基中其瓶內乙烯濃度會增加（圖1.6B、圖1.9B），應為AgNO₃促使根莖的ACC oxidase活性提高而致。

（四）燻蒸 1-Methylcyclopropene 及乙烯對報歲蘭根莖生長分化之影響

報歲蘭根莖培養於添加100 μM AgNO₃之固體培養基中，可有效地誘導芽體形成；而燻蒸5 μL·L⁻¹ 1-MCP之處理組中僅有一培植體分化出芽體（表1.14），顯示燻蒸1-MCP無法有效誘導報歲蘭根莖分化芽體。但施用1-MCP卻可使獼猴桃（*Actinidia deliciosa*）分化芽體，這也是第一個於組織培養環境中施用1-MCP的試驗；將獼猴桃培養於施用乙烯作用抑制劑1-MCP的瓶中會增加芽體數目及株高，而培養於添加ACC之培養基則會抑制芽體生長，也就是說1-MCP可於組織培養環境中有效抑制乙烯作用（Arigita et al., 2003）。玫瑰（*Rosa hybrida* L. cv. Alba）芽體培養時，施用10及100 μL·L⁻¹ 1-MCP也會有效減少發根所需時間且可增加發根

數，但會抑制根生長 (Kępczyński et al., 2006)。

本論文中使用抑制乙烯的藥劑有AgNO₃、AOA與1-MCP，而僅有AgNO₃處理能誘導報歲蘭根莖分化芽體，乙烯與報歲蘭芽體分化的相關性嫌少，依現有的結果僅只能顯示AgNO₃為報歲蘭芽體分化的重要角色之一。但值得注意的是培養基添加100 μM AgNO₃且培養前三週燻蒸1 μL·L⁻¹ 乙烯之處理並未有芽體形成(表1.14)，若報歲蘭芽體分化僅與AgNO₃相關而與乙烯無關，則在該處理中根莖應受AgNO₃影響而分化芽體，但試驗結果並未有芽體形成，因此可推斷乙烯會抑制報歲蘭芽體分化。

本試驗於根莖培養當天即給予乙烯燻蒸處理，推測當時根莖的乙烯受體部分或尚未受AgNO₃影響就開始受乙烯作用，因此根莖未受AgNO₃誘導分化芽體而是分化出更多的根莖(表1.14、表1.16)。而獼猴桃共同處理ACC與1-MCP兩藥劑，其結果與只施用1-MCP之效果相似，有促進地上部生長效果，推測是因為乙烯受體在培養當天已與1-MCP結合，就算ACC合成乙烯也無法對培植體產生作用(Arigit et al., 2003)。

在寒蘭根莖培養中，培養於含BA的培養基中除了根莖的生長外尚有芽體的形成，而於含前述培養基中添加10 μM 益收生長素會減少細胞分裂素所誘導的芽體數且增加新生根莖數(Shimazaki, 1995)。

目前為止，添加1-MCP與瓶內乙烯濃度的關係尚未釐清。玫瑰芽體培養誘導發根時，施用10及100 μL·L⁻¹ 1-MCP可降低瓶內乙烯濃度(Kępczyński et al., 2006)，但在獼猴桃葉片培養時，施用0.3及1 μL·L⁻¹ 1-MCP會增加ACC synthase活性(Arigit et al., 2003)，而1-MCP對於報歲蘭根莖培養時之瓶內乙烯濃度沒有影響(圖1.16B)。

第二章 臺灣原生豆蘭屬相關種之無菌播種

Chapter 2. Asymbiotic Germination of *Bulbophyllum* Related Species Native in Taiwan

一、前言 (Introduction)

豆蘭屬 (*Bulbophyllum*) 是蘭科 (Orchidaceae) 植物中種數最多的一屬，其觀賞價值高，多次於國際蘭展中獲獎，且臺灣種原繁多，有 27 個原生種，有進行育種之潛力。但隨著山林開發及蘭花產業的繁榮，許多野生蘭被嚴重採集，數量日漸稀少，有必要進行保存、復育及大量繁殖相關研究。

關於豆蘭屬植物之研究近年亦有不少文獻發表，其內容大多是針對新物種的發現，尤其是臺灣原生豆蘭屬之植物 (Chung and Hsu, 2006; Hsu and Chung, 2008; Lin and Huang, 2005; Lin et al., 2006)。此外亦有文獻指出豆蘭屬植物之酚類化合物與其他化學物質具有治療疾病之療效，可作為藥用植物 (Majumder et al., 1999; Yi et al., 2005)。而一些豆蘭物種會散發特殊氣味吸引果蠅而達到授粉目的，亦有部分文獻研究授粉機制及所散發氣體之化學成分 (Da Silva et al., 1999; Tan et al., 2002)。但極少有文獻對豆蘭屬植物繁殖方式進行研究，尤其是無菌播種部分，雖有文獻使用 *Bulb. auricomum* (Than et al., 2009) 及 *Bulb. lilacinum* (Bhadra et al., 2004) 進行無菌播種，但未有無菌播種發芽率之相關數據於文獻中呈現。

蘭科植物之種子不具有胚乳和子葉等養分貯藏器官，但其胚本體具貯藏養分之功用。蘭科種子在適宜環境下，雖可吸水發芽，但無法形成原球體 (protocorm)，需與蘭菌共生才可繼續生長，導致人工大量繁殖不易。自 1922 年，Knudson 成功以蘭花種子進行無菌播種，建立其大量增殖系統，但至今有多種原生蘭利用此法仍不易發芽 (李，1990)。造成發芽率低的原因可能為種皮的不滲

透性與發芽抑制物質的累積 (陳, 1996; Stewart and Kane, 2006)。

本論文針對可能影響豆蘭屬植物發芽之因素設計試驗, 先以固體培養與液體培養兩方式, 探討不同培養基含水量是否會影響種子發芽。另使用 NaOCl、NaOH 與 HCl 三種化學藥劑及超音波震盪於無菌播種前處理種子, 使種皮受損, 希冀改善透水性, 抑或可能會減少發芽抑制物質含量, 而改善發芽率。果莢成熟度亦會影響蘭花種子無菌播種之發芽, 過於年輕的果莢其胚尚未發育健全, 過度成熟的果莢則累積較多發芽抑制物質, 均造成無菌播種發芽率偏低, 故需瞭解何種成熟程度之果莢進行無菌播種可得較高發芽率。蘭花種子於發育後期可能累積 ABA, 而有發芽率低落之情形, 故於果莢發育期及播種時處理不同濃度之 fluridone, 以瞭解 abscisic acid 生合成抑制劑 fluridone 可否改善臺灣原生豆蘭屬植物無菌播種發芽率, 其中果莢發育期處理為直接對果莢塗抹含不同濃度之 fluridone 液體, 而播種時處理為無菌播種於含不同濃度 fluridone 之培養基中。最後使用六種臺灣原生豆蘭屬植物成熟的種子進行無菌播種, 以瞭解種間的發芽及發育特性。

二、前人研究(Literature review)

(一) 臺灣原生豆蘭屬之簡介

豆蘭屬 (*Bulbophyllum*) 是蘭科 (Orchidaceae) 植物中種數最多的一屬，約包含 2000 種，廣泛分布於亞洲，少部分在非洲及澳洲。屬名由 *bulbos* (球) 及 *phyllon* (葉) 二字所組合，意指本屬植物具有肥厚的葉片。本屬多附生，具匍匐根莖及假球莖，假球莖頂端大多僅具一葉，少數具有二至多片葉。部分物種為藥用植物，主要用於治療肺部疾病 (Yi et al., 2005)。

臺灣有 27 個豆蘭屬原生種及 1 變種，其中 7 種為特有種 (楊等, 2001; Boufford et al., 2003; Chung and Hsu, 2006; Hsu and Chung, 2008; Lin and Huang, 2005; Lin et al., 2006; Su, 2000)。以下列出已發表之臺灣原生豆蘭屬物種名及學名：

1. 紋星蘭 *Bulb. affine* Lindl.
2. 白毛捲瓣蘭 *Bulb. albociliatum* (Liu & Su) Nackejima
3. 小豆蘭 *Bulb. aureolabellum* T. P. Lin
4. 短梗豆蘭 *Bulb. brevipedunculatum* T. C. Hsu & S.W. Chung
5. 溪頭豆蘭 *Bulb. chitouense* Ying
6. 毛緣萼豆蘭 *Bulb. ciliisepalum* T. C. Hsu & S.W. Chung
7. 狹萼豆蘭 *Bulb. drymoglossum* Maxim. ex Okubo
8. 長軸捲瓣蘭 *Bulb. electrinum* Seidenf.
9. 流蘇豆蘭 *Bulb. fimbriperianthium* Lin, Huang & Lin
10. 花蓮捲瓣蘭 *Bulb. hirundinis* (Gagnep.) Seidenf.
11. 穗花捲瓣蘭 *Bulb. insulsum* (Gagnep.) Seidenf.
12. 日本捲瓣蘭 *Bulb. japonicum* (Makino) Makino

13. 觀霧豆蘭 *Bulb. kwanwuensis* S.W. Chung & T.C. Hsu
14. 烏來捲瓣蘭 *Bulb. macraei* (Lindl) Reichb. f.
15. 紫紋捲瓣蘭 *Bulb. melanoglossum* Hayata
16. 毛藥捲瓣蘭 *Bulb. omerandrum* Hayata
17. 黃花捲瓣蘭 *Bulb. pectenvenaris* (Gagnep.) Seidenf.
18. 阿里山豆蘭 *Bulb. pectinatum* Finet
19. 屏東豆蘭 *Bulb. pingtungense* S.S. Ying
20. 黃萼捲瓣蘭 *Bulb. retusiusculum* Reichb. f.
21. 白花豆蘭 *Bulb. riyanum* Fukuy
22. 紅心豆蘭 *Bulb. rubrolabellum* T. P. Lin
23. 鶴冠蘭 *Bulb. setaceum* T. P. Lin
24. 臺灣捲瓣蘭 *Bulb. taiwanense* (Fukuy.) Nackejima
25. 小葉豆蘭 *Bulb. tokioi* Fukuyama
26. 繖花捲瓣蘭 *Bulb. umbellatum* Lindl.
27. 大花豆蘭 *Bulb. wightii* Reichb. f.
28. 維明豆蘭 *Bulb. albociliatum* (Liu & Su) Nackejima var. *weiminianum*

(二) 蘭胚發生

1. 授粉與受精

多數蘭科植物在花粉成熟及受精時，子房僅有三條胎座脊 (placental ridge)，胚珠尚未形成 (Swamy, 1949)。胚珠的發育與胚囊的形成始於授粉後。授粉後，胎座脊細胞受到花粉管所分泌的 indole-3-acetic acid (IAA) 刺激而開始細胞分裂，形成絲狀體 (filaments)，絲狀體的頂端細胞即為孢原細胞 (archespores)，而後孢原細

胞膨大直接形成大孢子母細胞 (megaspore mother cell)。之後，進行減數分裂形成大孢子 (megaspore)，再發育為胚囊 (embryo sac)。此種授粉後胚珠才開始發育的方式，據推測可避免不必要的細胞分裂及能量消耗 (Arditti, 1992)。

如同一般被子植物，蘭科植物亦具有雙重受精現象 (Swamy, 1949)。由於授粉後大孢子和胚囊才開始形成和發育，所以授粉至受精需經過一段時間。短者約 4 天，如 *Gastrodia elata*；長者近 10 個月，如 *Vanda suavis* (Arditti, 1992)。而蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 授粉後 11 週才受精 (O'Neill, 1997)，舌唇蘭 (*Platanthera bifolia*) 授粉後 14 天左右完成受精 (Fredrikson, 1991)。

2. 胚發育與種子形成

蘭科種子不具胚乳，在雙重受精後，精核和兩極核所形成的三倍體細胞或胚乳核隨後即退化，可能為精核和極核未完全融合所致 (Arditti, 1992)。精核和卵融合形成結合子。結合子首次分裂形成橫向隔壁，靠近合點 (chalaza) 的為頂端細胞 (terminal cell)，靠近珠孔端的為基細胞 (basal cell)。接著基細胞再次橫向分裂形成中細胞 (middle cell) 以及近珠孔端的胚柄始源細胞 (suspensor initial cell) (Swamy, 1949)。Swamy (1949) 將蘭胚發育情形分為三群，第一群為所有細胞 (包含 terminal、middle 與 suspensor) 均參與胚的形成，大部分的胚由頂端細胞形成且缺乏胚柄，稱為 Asterad type；第二群的胚本體主要由頂端細胞發育而來，胚柄始源細胞則產生胚柄，稱 Onagrad type；第三群為頂端細胞和基細胞之細胞分裂為不規則分裂且有胚柄，稱 Cymbidium type。

胚柄是暫存性的構造，通常在胚發育成圓球胚，胚柄充分發育且即將退化或已略退化，之後隨胚之生長而退化甚至完全看不見。胚柄的發育的方式和形態可

作為蘭科植物分類的良好依據 (Swamy, 1949)。蘭花胚柄分為五大類：

- I. 胚柄始源細胞不分裂，延長形成圓錐形或管形。
- II. 胚柄始源細胞分裂形成 5 至 10 個細胞的絲狀體，延長伸出珠孔。頂端部分埋入胎座組織並形成吸器。
- III. 胚柄始源細胞先行多次橫向分裂，再行斜角和縱向分裂，胚柄細胞膨大形成似葡萄的構造。
- IV. 胚柄始源細胞三次垂直分裂產生 8 個細胞，之後向合點方向包圍住胚體。
- V. 結合子進行細胞分裂產生 6 至 8 個細胞組成的不規則細胞團，近珠孔端的 3 至 8 個細胞則延長形成胚管擔任胚柄的功能，細胞內累積油粒且細胞核腫大 (Swamy, 1949)。

2. 種子成熟

蘭科種子成熟與否視胚之成熟度而定 (李，1990)。蘭胚在果莢成熟時，大多只發育到圓球胚 (globular embryo) 即停止，仍未有完整的維管束組織，需經播種發芽後形成原球體才分化出生長點 (李，1990)，故胚發育不全是限制無菌播種發芽的一大要因。造成蘭胚不易發芽之因素除了胚發育不完全及缺乏胚乳外，發芽抑制物質之累積及種皮不滲水性可能也是重要因素 (李，1990; Lee et al., 2007b; Yamazaki and Miyoshi, 2006)。三板根節蘭 (*Calanthe tricarinata*) 在授粉後 60 天，由雙重受精產生胚及胚乳複合物；授粉後 90 天，發育至球形胚階段，且此時內外珠被及胚柄細胞形成，細胞內澱粉粒多累積於近細胞核處；授粉後 150 天，胚體積達到最大，且內外珠被因失水而壓縮成一層；授粉後 180 天，脂質體和蛋白質體充斥在球狀胚中，而胚柄退化只剩殘留物。在授粉後 120 天以 Nile red 染色可以觀察到外珠被和 surface wall 有明顯的顯色，表示這兩個組織含有較多的木質素和角質素，而胚柄並無顯色；授粉後 180 天以 Nile red 染色則可觀察到胚外層木質素

和角質素含量增多 (Lee et al., 2007a)。

而文心蘭 *Oncidium* Gower Ramsey 'Volcano Queen' 與 *Onc.* Golden Shower 授粉後 45 天內外珠被已形成；授粉後 60 天胚囊形成；授粉後 90 天，此時受精成功，形成八個細胞大小的胚；授粉後 120 天達到球狀胚階段；授粉後 150 天球狀胚逐漸變大，且胚乳核退化；授粉後 158 天胚形成大小細胞區，小細胞區隨後會分化為頂端分生組織 (易等，2005)。

(三) 影響蘭科植物發芽之因素

1. 培養方式

Yoder 等人 (2000) 指出附生性及地生性蘭花種子於蘭菌共生環境下生長，其種子含水量較無菌播種於固體培養者高，且發芽率較高，推測無菌固體培養發芽較慢的原因可能為種子無法快速獲得養分。蘭花組織培養除一般固體培養方式外，也可使用液體培養。液體懸浮培養所需無菌播種發芽時間較固體培養少，其發芽率也較固體培養高，歸因如下：(1) 增加通氣性，(2) 增加種子吸收養分之表面積，(3) 促進養液分布均勻，(4) 稀釋有毒代謝物質 (Arditti, 1967; Singh and Prakash, 1985)。

液體懸浮培養較有利於蕙蘭 (*Cymbidium* spp.) 原球體的增殖 (Wimber, 1963)。Hegarty (1955) 以拖鞋蘭 (*Paphiopedilum* spp.) 和香莢蘭 (*Vanilla planifolia*) 為材料進行無菌播種，結果均以液體培養者有較佳的發芽率。王 (1985) 觀察到素心蘭 (*Cymbidium ensifolium*) 種子採用液體培養其發芽率高於固體培養者。Singh 與 Prakash (1985) 指出 *Epidendrum radicans* 種子在液體培養基中比在固體培養基

中提早發芽，播種於液體培養基者九天後已發芽成為原球體，而固體培養者尚未發芽，且以液體培養可縮短第一片及第二片葉產生時間。Chu 與 Mudge (1994) 亦認為液體培養較固體培養可縮短喜普鞋蘭 (*Cypripedium calceolus* var. *pubescens*) 種子發芽時間，使原球體的發育較一致。李 (1998) 以四個拖鞋蘭原生種種子進行液體培養及固體培養，均以液體培養有較高的發芽率，且發芽較快亦較整齊。蔡 (2004) 以靜置式液體培養基並以兩層石蠟膜封口，降低水分蒸發，使培養液的水分緩慢下降避免朵麗蝶蘭 [(*Doritaenopsis* Tinny Antique × *Dtps.* Sinica Peeress) × *Dtps.* Sogo Beach] 原球體玻璃質化，且小苗生長勢亦較固體培養好。

Thompson 等人 (2006) 歸納影響 *Disa* 屬植物無菌播種發芽率之因素，其中提高培養基含水量可提高種子發芽率，而提高培養基含水量方法之一即為利用液體培養。以液體培養 *Disa* 屬植物種子，其發芽率雖均較固體培養者高，但無法使各物種發芽率均高於 30% 以上 (Thompson et al., 2007)。故 Thompson 等人 (2007) 結合液體培養和固體培養製成雙層培養基培養 *Disa* 屬植物，多數物種之發芽率高於培養在純為固體或液體的培養基。

但並非所有材料均適合於液體培養，原產於溫帶的小花型蕙蘭屬植物，如寒蘭 (*Cymbidium kanran*)、九華蘭 (*Cymbidium faberi*) 等，在液體培養時會出現芽體死亡或不正常的肥腫根莖形成 (Hasegawa et al., 1985)。此外，朱 (1988) 觀察到臺灣一葉蘭 (*Pleione formosana* Hayata) 種子以液體懸浮培養所形成的原球體較肥大且植株較矮胖，可能是由於內生乙烯不易擴散所致。

2. 種子前處理

隨果莢的成熟，種皮逐漸累積木質素，而形成較不透水的構造，因此成熟種

子發芽率通常較低，如欲提高成熟種子發芽率可在播種前進行種子前處理 (Lee et al., 2007a)。種子前處理的主要目的為增加種皮透水性或減少發芽抑制物質含量，以改善蘭科種子不易發芽之現象，其效果隨物種和處理時間不同而異 (李, 1998; Lee et al., 2007a)。種子前處理方式分為化學藥劑處理及機械傷害處理等方式，而蘭科植物種子較小無法以人工方式刻傷種皮，所以通常以超音波震盪處理種子而破壞種皮，使得胚自種皮內脫離出來 (Miyoshi and Mii, 1988)。

以NaOCl處理*Orchis purpurella* 種子15與120分鐘進行無菌播種，培養前期之發芽率以處理120分鐘者為高，但於培養24週後，兩處理間無顯著差異，發芽率均可達85% (Harvais and Hadley, 1967)。以1% NaOCl前處理根節蘭 (*Calanthe discolor* Lindl.) 種子7分鐘後，50%的種子經2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色後顯色 (代表種子有活性)，而對照組僅有3%種子有顯色；於播種後280天調查種子發芽率，1% NaOCl處理組其發芽率為31%，其中12.4%已發育出原球體，而對照組之發芽率為9.1%，其中僅4.1%為原球體 (Miyoshi and Mii, 1995)。喜普鞋蘭 (*Cypripedium macranthum*) 成熟種子進行無菌播種其發芽率低於5%，若種子播種前處理5-7小時的3.2% Ca(ClO)₂、60分鐘的0.5% NaOCl或15-30分鐘的1% NaOCl均可使發芽率提升為60%以上，其中NaOCl配製較容易且處理時間較短，故該研究推薦以NaOCl進行種子前處理 (Miyoshi and Mii, 1998)。

以三板根節蘭 (*Calanthe tricarinata* Lindl.) 種子為例，使用超音波震盪、浸泡1% NaOCl或1 N NaOH搭配四種時間，結果顯示以處理1% NaOCl 60分鐘之處理組具有最高的種子發芽率，達39.3%，且其胚中abscisic acid (ABA) 濃度和未經處理之對照組相比降低78%，可能為發芽率提高之原因。超音波震盪超過45分鐘或浸泡1 N NaOH超過30分鐘，雖然ABA濃度下降但發芽率也下降，推斷種子可能已受到傷害 (Lee et al., 2007a)。前處理超音波震盪、浸泡1% NaOCl或1 N NaOH可提升發

芽率的原因為破壞種皮，提高滲水率，且NaOCl會導致葉肉或表皮細胞細胞質偏鹼性，可能使弱酸性的ABA從原生質滲出，使得胚的ABA濃度下降；1 N NaOH會使pH值變高，或也能促進ABA從種子流到浸泡液中 (Lee et al., 2007a)。Lucke和Beßler (1997) 亦指出三種不易發芽的蘭科種子經過0.3% NaOCl 處理15分鐘後，種子內的ABA含量明顯少於未經前處理組。

以超音波震盪處理根節蘭 (*Calanthe discolor* Lindl.) 種子4-16分鐘皆可有效增加無菌播種發芽率，其發芽率皆在50%-60%，而對照組的發芽率僅10% (Miyoshi and Mii, 1988)。以七種不同超音波震盪時間處理四個原生種拖鞋蘭種子，處理時間介於30至90分鐘效果最佳，發芽率明顯高於未經超音波震盪之對照組，但處理時間過久其發芽率會下降，推測胚可能受到傷害 (李，1998)。隨著超音波震盪處理時間增加，根節蘭的胚自種皮內脫離之比率增加，但胚死亡率亦增加 (Miyoshi and Mii, 1988)。

3. 果莢成熟度

蘭花果莢的適合採收成熟度因物種而異 (李，1990)。多數蘭科適合播種的成熟度為果莢即將轉色，但尚未開裂前，此時發芽率最高 (呂和李，1990)。以未開裂果莢進行播種有以下優點：提早播種時間、避免種子累積較多發芽抑制物質、發芽率通常較成熟時播種高、較容易消毒，僅需進行果莢表面消毒，不需對果莢內部消毒，亦可減少消毒液對種子的危害 (易等，2005; Sauleda, 1976)。

三板根節蘭不同成熟度果莢進行無菌播種，以授粉後 150 天之果莢發芽率最高，達 30%，此時胚已成熟且種子 ABA 濃度低 (Lee et al., 2007a)。取文心蘭 (*Oncidium* Gower Ramsey 'Volcano Queen' × *Onc.* Golden Shower) 不同成熟度雜交

果莢進行無菌播種，以授粉後 158 天之果莢搭配添加活性碳之 Hyponex 1 培養基發芽率最高，達 99.0%；在果莢未開裂前種子發芽率隨果莢及種子成熟度增加而增加 (易等, 2005)。彩葉蘭 (*Haemaria discolor* (Ker) Lindl. var. *dawsoniana*) 種子隨著授粉後時間的增加，其顏色由白色轉淡褐色，於授粉後 30 天種子轉成黃褐色，而發芽率亦隨著授粉後時間的增加而提高，以授粉後 25-30 天之果莢發芽率最高，達 43.2%-44.5% (Shiau et al., 2005)。

將金蘭 (*Cephalanthera falcata*) 授粉後 50-120 天之果莢進行無菌播種及處理 TTC 檢測種子活性，以授粉後 70 天之果莢有最高發芽率，為 39.8%，而後隨授粉後天數的增加發芽率逐漸下降，最低發芽率為授粉後 100-120 天之果莢，均少於 2% (Yamazaki and Miyoshi, 2006)。而種子活性檢測部分，授粉後 50-60 天之種子活性均低於 3%，而授粉後 70-100 天之種子活性可高達 84.3% 以上，授粉後 110 天之種子因種皮已成暗褐色不易辨別種子活性 (Yamazaki and Miyoshi, 2006)。

4. 種子內生 ABA 含量

ABA 為調節種子胚成熟、休眠及發芽的重要角色 (Koornneef et al., 1989)。種子發育時，ABA 含量會逐漸增加，於種子成熟前達最大值，而當種子進入脫水成熟期時，ABA 含量則急速減少，於發芽前降至最低 (Le Page-Degivry et al., 1990; Prevost and Le Page-Degivry, 1985; Steinbach et al., 1997)。

三板根節蘭種子 ABA 含量隨授粉後天數增加而增加，而發芽率於授粉後 150 天最高，之後隨時間增加而下降至趨近於 0%，因為 ABA 累積所致 (Lee et al., 2007a)。臺灣喜普鞋蘭 (*Cypripedium formosanum*) 種子發育前期內生 ABA 大多分布於胚之細胞質內，種子成熟後 ABA 則大多分布於種皮等非原生質體處，而內生

ABA 含量隨授粉後天數增加而增加，內生 ABA 可能抑制種子發芽 (李，2003)。將種子播種於添加不同濃度 ABA 之培養基中，隨 ABA 濃度的上升，臺灣喜普鞋蘭發芽率下降， $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 即可使原本發芽率為 50% 的種子發芽率降為 0 (李，2003)。

Fluridone (1-methyl-3-phenyl-5-[3-(trifluoromethyl) phenyl]- 4(1*H*)-pyridinone) 可抑制 ABA 前驅物類胡蘿蔔素 (carotenoid) 的生合成作用。目前已知，fluridone 的作用位置主要在 phytoene 合成 phytofluene 時，可抑制 phytoene desaturase 的酵素活性，而阻斷 β -carotene 的合成，使後續化合物無法生合成 (Bartels and Watson, 1978; Fong and Schiff, 1979)。因為類胡蘿蔔素是植物體內 ABA 生合成的前驅物 (Quatrano et al., 1997)，因此 fluridone 具有抑制 ABA 生合成的效果。

玉米 (*Zea mays*) 胚培養於含 10^{-4} M ABA 之培養基中，胚內 ABA 含量為 $56.0\pm 4.5 \text{ ng}\cdot\text{g FW}^{-1}$ ，而培養於添加 10^{-4} M ABA 與 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluridone 培養基中，胚內 ABA 內含量則為 $4.7\pm 0.7 \text{ ng}\cdot\text{g FW}^{-1}$ ，且有母體發芽 (viviparous) 現象，顯示 fluridone 抑制 ABA 合成 (Hole et al., 1989)，fluridone 處理卻能使玉米種子早熟發芽 (Oishi and Bewley, 1990)。在向日葵 (*Helianthus annuus*) 胚內生 ABA 含量增加之前施用 fluridone，可同時抑制 ABA 的累積及胚休眠，顯示 fluridone 與內生 ABA 的合成和胚休眠的誘發及維持等有密切關係 (Le Page-Degivry and Garello, 1992)。

利用 fluridone 處理來抑制 ABA 生合成時，也使得光合作用膜系統受到破壞，因此當植株由黑暗移到正常光線下生長時，容易發生光漂白 (photo bleaching) 的植株白化現象 (Harvey et al., 1994)。所以利用 fluridone 進行試驗研究較不適用於自營生長的植物材料，而利用組織培養時的異營生長條件，便適合利用 fluridone 來研究 ABA 的生理影響 (Suttle and Hultstrand, 1994)。而以 $0.01\text{-}10 \text{ }\mu\text{M}$ fluridone

培養的材料，經過一次繼代於不含 fluridone 之培養基後，培植體類胡蘿蔔素及葉綠素之合成即可恢復正常，顯示 fluridone 的反應是可逆的，並未對葉綠素及類胡蘿蔔素的合成機制造成永久損害 (Ragolsky and Thorpe, 1989)。

三、材料與方法 (Materials and Methods)

(一) 植物材料

試驗一至三使用之材料為於野外採集的自然授粉果莢。採集時，將整株植株連同果莢一併採集，而後種植於國立臺灣大學園藝系荷蘭威諾型玻璃溫室，待試驗當天採下果莢進行試驗。試驗三結束後，植株持續種植於玻璃溫室中，於 2008 年 10 月 24 日及同月 30 日進行人工自交授粉，其所得果莢分別做為試驗四及試驗五的材料。材料於無菌播種前均記錄果莢長、寬及重量。

(二) 一般播種操作

固體培養基本鹽類濃度為 1/4 MS (Murashige and Skoog, 1962) 巨量元素與全量 MS 微量元素，並添加 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ tryptone (Sigma, St. Louis, MO, USA)、 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose (Sigma)、 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ myo-inositol (Sigma)、 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gelrite (Sigma)。培養基以滅菌釜於壓力 $1.3 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下滅菌 15 分鐘，在培養基尚未凝固前於無菌環境下分裝至無菌塑膠培養皿 ($90 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$)，每培養皿 15 mL，並以兩層石蠟膜封口。

果莢自植株取下後，於當日進行無菌播種。將未開裂果莢以 95% 酒精擦拭後，以 4% NaOCl 及 0.3% Tween 20 展著劑 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 之溶液進行表面消毒 25 分鐘，在無菌環境下以無菌水沖洗三次，再將果莢剖開取出種子。每物種之種子添加 30 ml 液體培養基，製成種子懸浮母液。而液體培養基鹽類濃度同固體培養基，但無添加 gelrite。

在無菌環境下，取 1 mL 種子懸浮母液加入含 15 mL 培養基之無菌培養皿中，並以兩層石蠟膜封口。培養環境之溫度為 25 °C，以螢光燈管 (旭光牌省電型晝光色日光燈，FL20D/18，臺灣日光燈股份有限公司，新竹縣) 提供 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF，日長設定為 16 小時 (0600 HR-2200 HR)。

調查時各培養皿取一有代表性的區域 ($7.3\times 5.5 \text{ mm}^2$) 以解剖顯微鏡觀察種子發芽情形。種子發芽及原球體發育參考 Stewart 與 Zettler (2002) 分為 5 個階段：可見胚但尚未膨大的種子為 stage 0；胚吸水膨大者視為發芽前期為 stage 1；胚突破種皮即種子發芽為 stage 2；出現原始分生組織為 stage 3；出現第一片葉為 stage 4。並計算各發育階段佔整體之百分比。

(三) 試驗設計

試驗一、液體及固體培養對臺灣原生豆蘭屬無菌播種發芽之影響

參試材料為紋星蘭 (*Bulb. affine*) 與烏來捲瓣蘭 (*Bulb. macraei*) 之果莢。紋星蘭之兩個果莢於 2007 年 12 月 4 日自野外採集而來，並於當年 12 月 11 日取下果莢進行無菌播種；烏來捲瓣蘭之三個果莢於 2007 年 12 月 11 日自野外採集而來，並於當年 12 月 27 日取下果莢進行無菌播種。以上兩物種之果莢均為自然授粉，待果莢成熟但尚未開裂時進行無菌播種。果莢進行表面消毒後，分別播種於液體培養基及固體培養基，其中液體培養基為未添加 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gelrite 之基本培養基，固體培養基則為基本培養基。無菌播種操作同一般播種流程。每處理 5 重複。

試驗二：種子前處理對小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 無菌播種發芽之影響

參試材料為小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 之果莢。參試的十個小豆蘭果莢經

表面消毒後，於無菌環境下將果莢剖開取出種子。種子添加 30 mL 液體培養基製成種子懸浮母液，每處理取 3 mL 種子懸浮母液進行試驗。於無菌播種前進行種子前處理，分別為超音波震盪 15、30、60 分鐘及浸泡 30 mL 1% NaOCl、1 N NaOH 或 1 N HCl 各 30、60 分鐘，另設有對照組。NaOCl、NaOH 及 HCl 處理者另外添加一滴 Tween 20 展著劑，待達到處理時間後，在無菌環境下以濾紙過濾種子，再以無菌水沖洗三次。而超音波震盪處理者將裝有 3 mL 種子懸浮母液及 30 mL 無菌水之試管以雙層鋁箔紙及兩層石蠟膜封口後，使用超音波震盪機震盪，待達到處理時間後，在無菌環境下以無菌水沖洗三次。將處理過的種子加入 15 mL 液體培養基，製成種子懸浮母液後進行無菌播種。無菌播種操作同一般播種流程。每處理 10 重複。於播種後 6 週調查其發芽率。

試驗三：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*) 自然授粉果莢無菌播種發芽之影響

參試材料為黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*)。本試驗使用之果莢係自然授粉，試驗期間種植於臺灣大學荷蘭式威諾型具水牆降溫系統之玻璃溫室。通常果莢成熟度以授粉後天數訂定，但試驗材料為野外自然授粉之果莢，無法得知其授粉後天數。故本試驗每隔固定天數取樣進行無菌播種，待果莢開裂後往回推算開裂前天數，以找到無菌播種最適當之果莢成熟度。

於 2008 年 7 月 10 日 (開裂前 85 天)、8 月 9 日 (開裂前 55 天)、8 月 25 日 (開裂前 39 天)、9 月 8 日 (開裂前 25 天)、10 月 3 日 (部分果莢開裂) 各取樣三個果莢進行無菌播種直至果莢開裂方結束取樣。10 月 3 日，黃萼捲瓣蘭族群中一部分果莢開裂，視為果莢開裂第一天，取未開裂果莢進行無菌播種。無菌播種操作同一般播種流程。每處理 10 重複。於播種後 70 天調查其發芽率。

試驗四：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭人工授粉果莢無菌播種發芽之影響

參試材料為黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*)。本試驗使用之果莢為 2008 年 10 月 24 日進行人工自交授粉而得，試驗期間種植於臺灣大學荷蘭式威諾型具水牆降溫系統之玻璃溫室內。於授粉後 30、60、90、120、150、180 及 270 天各取樣三個果莢進行無菌播種並進行種子樹脂切片觀察。無菌播種操作同一般播種流程。每處理 10 重複。於播種後 70 天調查其發芽率。

試驗五：Fluridone 處理對人工授粉的黃萼捲瓣蘭果莢無菌播種發芽之影響

參試材料為黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*)。本試驗使用之果莢為 2008 年 10 月 30 日進行人工自交授粉所得。試驗分為果莢發育期處理及播種時處理。果莢發育期處理為果莢於授粉後 130 天 (130 DAP, days after pollination) 處理 0、25、50、100 及 200 μM fluridone (sigma)，每處理使用 3 個果莢。各處理之溶液均添加 0.3% Tween 20 展著劑，以水彩筆沾取溶液後均勻塗抹於果莢表面。0 μM fluridone 處理者為蒸餾水添加 0.3% Tween 20 展著劑後，再塗抹於果莢，此為對照組。果莢於 190 DAP 採收進行無菌播種。播種時處理組係使用未經 fluridone 處理的果莢，播種於含 50 及 100 μM fluridone 之培養基中，其中 fluridone 係以 0.22 μm 之無菌過濾膜 (Millex-GS Filter Unit, Millipore, Billerica, MA, USA) 過濾後，加入經滅菌但尚未凝固之培養基中，再加入無菌水使各處理最終固體培養基體積為 16 mL。每處理 20 重複，每重複為一培養皿。於播種後 70 天調查其發芽率。

試驗六：不同種臺灣原生豆蘭無菌播種之種子發芽及發育

參試材料為白毛捲瓣蘭 (*Bulb. albociliatum*)、小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*)、

狹萼捲瓣蘭 (*Bulb. drymoglossum*)、烏來捲瓣蘭 (*Bulb. macraei*)、阿里山豆蘭 (*Bulb. pectinatum*) 及臺灣捲瓣蘭 (*Bulb. taiwanense*)。果莢採集時已開裂，故種子以 2% NaOCl 加 0.3% Tween 20 展著劑之溶液消毒 20 分鐘，在無菌環境下以濾紙過濾種子，再以無菌水沖洗三次，將消毒過的種子加入 15 mL 液體培養基，製成種子懸浮母液後進行無菌播種。無菌播種操作同一般播種流程。每處理 10 重複。於播種後 8 週調查其發芽率。

(三) 石蠟切片之製備

同第一章材料方法中之石蠟切片製備方式。

(四) 樹脂切片製作

種子以 2.5% glutaraldehyde 固定，並於 4 °C 浸置隔夜後，以 0.2 M / pH 7.3 Phosphate Buffer Solution (PBS) 沖洗三次，每次 15 分鐘。再以 1% osmium-tetroxide 於室溫固定 4 小時，然後以 0.2 M / pH 7.3 PBS 沖洗三次，每次 15 分鐘。完成固定之樣品以低至高濃度的酒精溶液脫水，分別是 35%、35%、50%、60%、70%、85%、90%、95%、100%、100%、100% 共 11 個步驟，每個濃度浸置 10 分鐘，完成脫水後以 Spurr's resin kit (EMS, Washington, PA, USA) 包埋。將聚合完成之樣品利用 Reichert-Jung Ultracut E (Reichert-Jung, Vienna, Austria) 配合玻璃刀切成 1 μm 之切片，切片以 toluidine blue O (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 染色後於光學顯微鏡 (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan) 下觀察。

(五) 統計分析

試驗皆採完全逢機設計。統計軟體為 CoStat 6.1 (CoHort Software, Monterey, CA, USA)，以最小顯著差異(LSD；Least significant difference) 分析各處理間有無顯著性差異 ($P \leq 0.05$)；此外繪圖程式採用 SigmaPlot 8.0 (Systat Software INC., CA, USA)。試驗數據為百分比時，將數據先開根號再取 \sin^{-1} 換算後 (Steel et al., 1997)，以上述方法進行統計分析。

四、結果 (Results)

試驗一：液體及固體培養對臺灣原生豆蘭屬果莢無菌播種發芽之影響

試驗使用之紋星蘭果莢平均長 35 mm、寬 12 mm (圖 2.1)、鮮重 2.0 g；烏來捲瓣蘭平均果莢長 33 mm、寬 8 mm (圖 2.2)、鮮重 1.3 g。

紋星蘭種子無論是液體或固體培養者在無菌播種後2週均尚未發芽。固體培養者培養2週後有4.4%胚膨大 (stage 1)；培養4週後有3.1%胚膨大及3.8%胚突破種皮 (stage 2)；培養5週後有1.8%胚膨大及8.9%胚突破種皮 (stage 2)；培養10週後有10.1%胚突破種皮 (stage 2) 及38.1%分化出原始分生組織(stage 3)；培養14週後有38.3%出現原始分生組織 (stage 3) 及30.3%出現第一片葉 (stage 4) (圖2.3A、圖2.4)。紋星蘭種子液體培養2週後有6.7%胚膨大 (stage 1)；培養4週後有1.5%胚膨大 (stage 1) 及7.4%胚突破種皮 (stage 2)；培養5週後有1.2%的胚膨大 (stage 1) 及8.9%胚突破種皮 (stage 2)；培養10後有36.2%胚突破種皮 (stage 2) ；培養14週後胚出現玻璃質化現象而後褐化 (圖2.3B、圖2.4)。

烏來捲瓣蘭在無菌播種 3 週後固體培養和液體培養者發芽率並無顯著差異。固體培養者培養 3 週後有 32.7%胚膨大 (stage 1)及 18.6%胚突破種皮(stage 2)；培養 8 週後有 87.9%胚突破種皮 (stage 2)且有少數分化出原始分生組織；培養 12 週後有 78.3%出現原始分生組織 (圖 2.5A、圖 2.6)。液體培養者培養 3 週後有 39.2%的胚膨大 (stage 1) 及 15.4%胚突破種皮 (stage 2)；培養 8 週後有 37.8%胚膨大 (stage 1) 及 22.5%胚突破種皮 (stage 2)；培養 12 週後胚出現玻璃質化現象而後褐化 (圖 2.5B、圖 2.6)。

試驗使用的紋星蘭與烏來捲瓣蘭種子皆為圓球胚時期且胚內的細胞數多，未

觀察到胚柄 (圖 2.7)。

試驗二：種子前處理對小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 果莢無菌播種發芽之影響

參試材料為野外採得之小豆蘭果莢，其平均果莢長 6.5 mm、寬 2.8 mm (圖 2.8)、鮮重為 18.2 mg。

小豆蘭種子播種前處理超音波震盪、浸泡 1% NaOCl、1 N NaOH 或 1 N HCl 各 15、30、60 分鐘，均無法使發芽率高於對照組 (59.3%)，處理超音波震盪 15 分鐘及浸泡 1% NaOCl 30 分鐘者其發芽率接近對照組 (圖 2.9)。小豆蘭種子進行超音波震盪或浸泡 1% NaOCl 之處理，隨處理時間增加發芽率隨之下降 (圖 2.9)。小豆蘭種子浸泡 1 N NaOH 及 1 N HCl 溶液 30-60 分鐘均未觀察到發芽現象 (圖 2.9)。

試驗三：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*) 自然授粉果莢無菌播種發芽之影響

本試驗材料為自然授粉之黃萼捲瓣蘭果莢，果莢開裂前 85 天至果莢開裂期間，其果莢長度大致在 15-20 mm 範圍內，果莢寬度為 3-4 mm，而果莢重量於開裂前 85 天至 25 天均在 120 mg 以上，果莢開裂時之果莢果重僅約 96.4 mg (圖 2.10)。開裂前 85 天至 25 天果莢顏色為綠色，而果莢開裂時之果莢為黃綠色 (圖 2.11)。

調查黃萼捲瓣蘭果莢開裂前 85 天至果莢開裂期間之種子無菌播種發芽率，開裂前 85 天之發芽率最高，為 50.4%；開裂前 55 天、39 天、25 天之發芽率漸低，分別為 44.2%、38.1%及 39.4%；而果莢開裂時期發芽率最低，僅為 27.9% (表 2.1)。

結果顯示越接近果莢開裂時期無菌播種發芽率越低。

試驗四：果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭人工授粉果莢無菌播種發芽之影響

本試驗材料為人工授粉之黃萼捲瓣蘭果莢。隨授粉後天數之增加，果莢長度及寬度有緩慢上升之趨勢，而果莢重量於授粉 180 天內，隨授粉後時間的增加而增加，授粉 270 天果莢重量降至 83.1 mg (圖 2.12)。果莢顏色方面，由授粉後之綠色逐漸轉為黃綠色 (圖 2.13)。

授粉後 30、60、90 天之果莢尚未有種子產生，故未進行無菌播種。取授粉後 120、150、180 及 270 天之黃萼捲瓣蘭果莢進行無菌播種，其中授粉後 180 天者於無菌播種後有 13.4% 胚膨大，授粉後 270 天者有 6.6% 胚膨大，而授粉後 120 天與 150 天果莢之種子胚膨大現象最少，僅 0.9% 和 2.6% (表 2.2)。授粉後 270 天之果莢發芽率最高，達 72.6%；授粉後 180 天者次之，為 19.2%；授粉後 120 天及 150 天最少，僅 0% 和 0.3% (表 2.2)。

樹脂切片之觀察結果顯示，黃萼捲瓣蘭於授粉後 120 天可觀察到各有兩層細胞的外珠被 (outer integument; OI) 及內珠被 (inner integument; II)，並可觀察到胚囊內含合點細胞 (chalazal cell; C)、胚乳核 (endosperm nucleus; En)、卵細胞 (egg cell; E) 及兩個輔助細胞 (synergid cell; Sy) (圖 2.14A)。授粉後 150 天，合點細胞已經降解，胚乳核 (En) 正逐漸遠離珠孔端 (圖 2.14B、C)，而結合子正進行細胞分裂，約達 3 個細胞的原胚時期，靠近合點者為頂端細胞 (terminal cell; T)，靠近珠孔端者為胚柄始源細胞 (suspensor initial cell; SI)，二者中間為中細胞 (middle cell; M) (圖 2.14C)，而此時種子內的內珠被 (II) 及外珠被 (OI) 均退化成一層細胞，且細胞核清晰可見 (圖 2.14B、C)。授粉後 180 天，頂端細胞已分裂成 8 個細胞的原

胚 (proembryo; P)，且胚柄始源細胞形成胚柄細胞 (suspensor cell; S)，而內珠被 (II) 及外珠被 (OI) 之細胞核均已退化，此時胚乳細胞核更為遠離珠孔端，且有略為降解之現象 (圖 2.14D)。授粉後 270 天，胚本體 (embryo proper; EP) 呈橢圓形，此為圓球胚階段，此時胚柄已退化而只剩殘留物 (suspensor degenerated; SD) 存在，至於內珠被 (II) 則皺縮且緊貼著外珠被所形成的種皮 (seed coat; SC) (圖 2.14E)。

試驗五：Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭人工授粉果莢無菌播種發芽之影響

黃萼捲瓣蘭果莢於授粉後 130 天時處理 0、25、50、100、200 μM fluridone，此時各處理組之果莢長度與寬度並無差異 (表 2.3)。於授粉後 190 天將所有處理組之果莢取下進行無菌播種，此時多數處理組的果莢長度與寬度相較授粉後 130 天時有增加之現象，但各處理組之果莢長度、寬度與鮮重無顯著差異 (表 2.3)。

本試驗分為果莢發育期處理及播種時處理，果莢發育期處理於授粉後 130 天對果莢處理不同濃度 fluridone，而播種後處理為無菌播種於含不同濃度 fluridone 的培養基中。播種前處理組中，50 及 100 μM fluridone 處理的胚膨大率最高，分別為 30.4% 與 34.0%，25 及 200 μM fluridone 處理次之，均為 26.2%，對照組最低，為 17.9%；播種後處理組中，50 及 100 μM fluridone 處理的胚膨大率顯著高於對照組，分別為 28.8% 與 44.7%，且播種於含 100 μM fluridone 培養基之胚膨大率為各處理組間最高 (表 2.4)。

果莢發育期處理中，50 μM 處理者發芽率最高，達 33.4%；100 μM 處理次之，為 26.0%；25 及 200 μM fluridone 處理者發芽率略高於對照組但無顯著差異，分別為 22.3% 及 17.1%；播種時處理組中，50 及 100 μM fluridone 處理的發芽率均與對照組無顯著差異，分別為 17.3% 與 16.2% (表 2.4)。播種 24 週後各處理組種子發育

情形僅發育至胚突破種皮的階段，尚未發育至原始分生組織階段。

試驗六：不同種臺灣原生豆蘭無菌播種之種子發芽及發育

本試驗使用野外採集的自然開裂果莢進行無菌播種，於播種後 8 週進行種子發育階段調查。參試的六種臺灣原生豆蘭屬植物皆有一部分種子發芽但種間的形態發生有些許差異；播種 8 週後，白毛捲瓣蘭 (*Bulb. albociliatum*) 有 58.1%胚膨大 (stage 1)、14.8%胚突破種皮 (stage 2) 及 0.5%分化出原始分生組織 (stage 3)；小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 有 82.5%胚膨大及 10.0%胚突破種皮，但尚未有原始分生組織分化；狹萼捲瓣蘭 (*Bulb. drymoglossum*) 有 14.8%胚膨大、13.4%胚突破種皮及 33.0%分化出原始分生組織；烏來捲瓣蘭 (*Bulb. macraei*) 有 93.8%胚膨大及 4.8%胚突破種皮，亦尚無原始分生組織分化；阿里山豆蘭 (*Bulb. pectinatum*) 有 67.4%胚膨大及 23.9%胚突破種皮，也無原始分生組織分化；臺灣捲瓣蘭 (*Bulb. taiwanense*) 有 85.4%胚膨大、6.2%胚突破種皮、4.1%分化出原始分生組織及 1.3%第一片葉形成 (stage 4)，為參試物種中發育較快者。而各物種的發芽率由高往低排序分別為狹萼捲瓣蘭、阿里山豆蘭、白毛捲瓣蘭、臺灣捲瓣蘭、小豆蘭，而發芽率最低的為烏來捲瓣蘭 (表 2.5)。

表 2.1. 果莢成熟度 (果莢開裂前天數) 對黃萼捲瓣蘭種子無菌播種 70 天後發芽率之影響。

Table 2.1. Effects of capsule maturity (days before capsule split) on in vitro seed germination in *Bulbophyllum retusiusculum*. Germination percentage was investigated 70 days after sowing.

| Days before capsule split | Germination ^z (%) |
|---------------------------|------------------------------|
| 85 | 50.4 a ^y |
| 55 | 44.2 ab |
| 39 | 38.1 bc |
| 25 | 39.4 abc |
| 0 | 27.9 c |

^z Germination was defined as the emergence of embryo from the testa.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 10).

表 2.2. 授粉後天數對黃萼捲瓣蘭種子無菌播種 70 天後發芽率之影響。

Table 2.2. Effects of capsule maturity (days after pollination) on in vitro seed germination in *Bulbophyllum retusiusculum*. Germination percentage was investigated 70 days after sowing.

| Days after pollination | Swollen embryo (%) | Germination ^z (%) |
|------------------------|--------------------|------------------------------|
| 120 | 0.9 c ^y | 0 c |
| 150 | 2.6 c | 0.3 c |
| 180 | 13.4 a | 19.2 b |
| 270 | 6.6 b | 72.6 a |

^z Germination was defined as the emergence of embryo from the testa.

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 10).

表 2.3. Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 人工授粉果莢長度、寬度及鮮重之影響。

Table 2.3. Effects of fluridone on capsule size and weight in *Bulbophyllum retusiusculum*.

| Fluridone concn (μM) | 0 DAT ^z | | 50 DAT | | |
|----------------------|----------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| | Length (mm) | Diam (mm) | Length (mm) | Diam (mm) | F.W. (mg) |
| 0 | 12.94 a ^y | 4.02 a | 13.36 a | 4.19 a | 123.5 a |
| 25 | 12.61 a | 3.91 a | 12.94 a | 4.15 a | 118.3 a |
| 50 | 12.60 a | 3.73 a | 12.81 a | 3.86 a | 99.9 a |
| 100 | 13.85 a | 4.23 a | 14.27 a | 4.22 a | 132.2 a |
| 200 | 13.84 a | 4.02 a | 13.99 a | 3.98 a | 123.3 a |

^z days after fluridone treatment

^y Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 3).

表 2.4. Fluridone 處理對黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 人工授粉果莢無菌播種 70 天後發芽率之影響。

Table 2.4. Effects of fluridone treatments on in vitro seed germination in *Bulbophyllum retusiusculum*. Data were collected 70 days after sowing.

| Fluridone concn (μM) | Swollen embryo (%) | Germination ^z (%) |
|--------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Capsule treated ^y | | |
| 0 | 17.9 c ^w | 15.6 c |
| 25 | 26.2 bc | 22.3 bc |
| 50 | 30.4 b | 33.4 a |
| 100 | 34.0 b | 26.0 b |
| 200 | 26.2 bc | 17.1 c |
| <i>In vitro</i> treated ^x | | |
| 50 | 28.8 b | 17.3 c |
| 100 | 44.7 a | 16.2 c |

^z Germination was defined as the emergence of embryo from the testa.

^y Capsules treated with fluridone at 130 days after pollination (DAP), and seeds were sown *in vitro* at 190 DAP.

^x Seeds treated with fluridone *in vitro* at 190 DAP.

^w Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 20).

表 2.5. 六種豆蘭屬植物自然授粉果莢無菌播種八週後種子發育階段及發芽率。

Table 2.5. Seedling development stage and percentage of germination of six *Bulbophyllum* species seeds after asymbiotic culture for 8 weeks.

| <i>Bulbophyllum</i> species | Developmental stage ^z (%) | | | | Germination ^y (%) |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------|--------|-------|---------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| <i>Bulb. albociliatum</i> | 58.1 d ^x | 14.8 b | 0.5 c | 0.0 b | 14.3 c |
| <i>Bulb. aureolabellum</i> | 82.5 b | 10.0 cd | 0.0 c | 0.0 b | 10.0 de |
| <i>Bulb. drymoglossum</i> | 14.8 e | 13.4 bc | 33.0 a | 0.0 b | 46.4 a |
| <i>Bulb. macraei</i> | 93.8 a | 4.8 d | 0.0 c | 0.0 b | 4.8 e |
| <i>Bulb. pectinatum</i> | 67.4 c | 23.9 a | 0.0 c | 0.0 b | 23.9 b |
| <i>Bulb. taiwanense</i> | 85.4 b | 6.2 d | 4.1 b | 1.3 a | 11.6 cd |

^z Stage 1: Swollen embryo. Stage 2: Continued embryo enlargement, rupture of testa. Stage 3: Appearance of protomeristem. Stage 4 : Emergence of first leaf.

^y Germination was defined as the emergence of embryo from the testa (\geq stage 2).

^x Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 10).



圖 2.1. 參試之紋星蘭果莢外觀 (bar=1 cm)。

Fig. 2.1. The capsule features of *Bulbophyllum affine* used in the experiment (bar=1 cm) .



圖 2.2. 參試之烏來捲瓣蘭果莢外觀 (bar=1 cm)。

Fig. 2.2. The capsule features of *Bulbophyllum macraei* used in the experiment (bar=1 cm) .

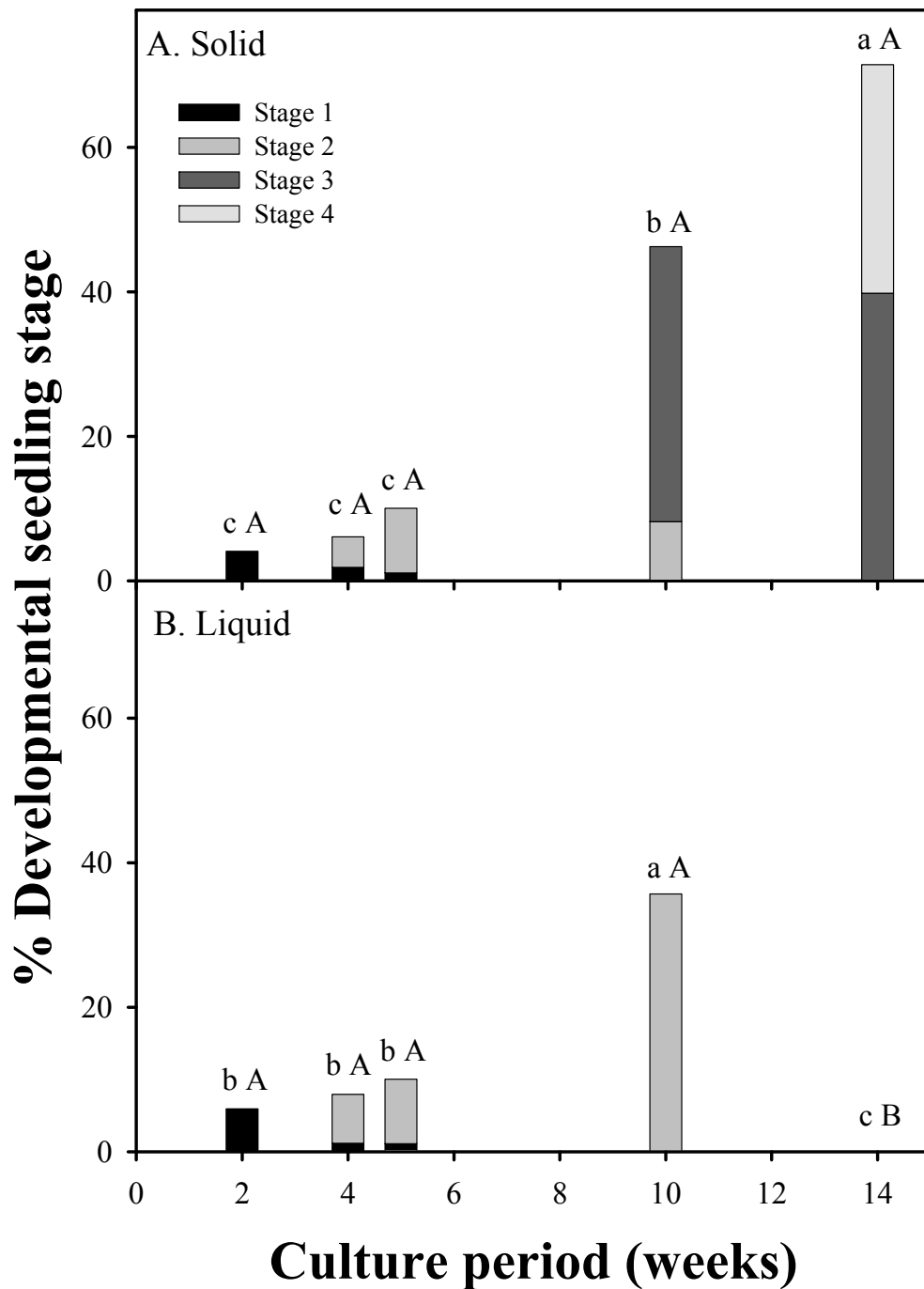


圖 2.3. 紋星蘭 (*Bulbophyllum affine*) 無菌播種於液體和固體培養基後種子發育之階段變化。

Fig. 2.3. Effects of liquid and solid media on in vitro seedling development in *Bulbophyllum macraei* after asymbiotic culture. Stage 1: Swollen embryo. Stage 2: Continued embryo enlargement, rupture of testa. Stage 3: Appearance of protomeristem. Stage 4 : Emergence of first leaf. Histobars within treatments followed by a different lowercase letter and histobars within the same investigation day followed by a different uppercase letter are significantly different at $P < 0.05$ by LSD test ($n = 5$).

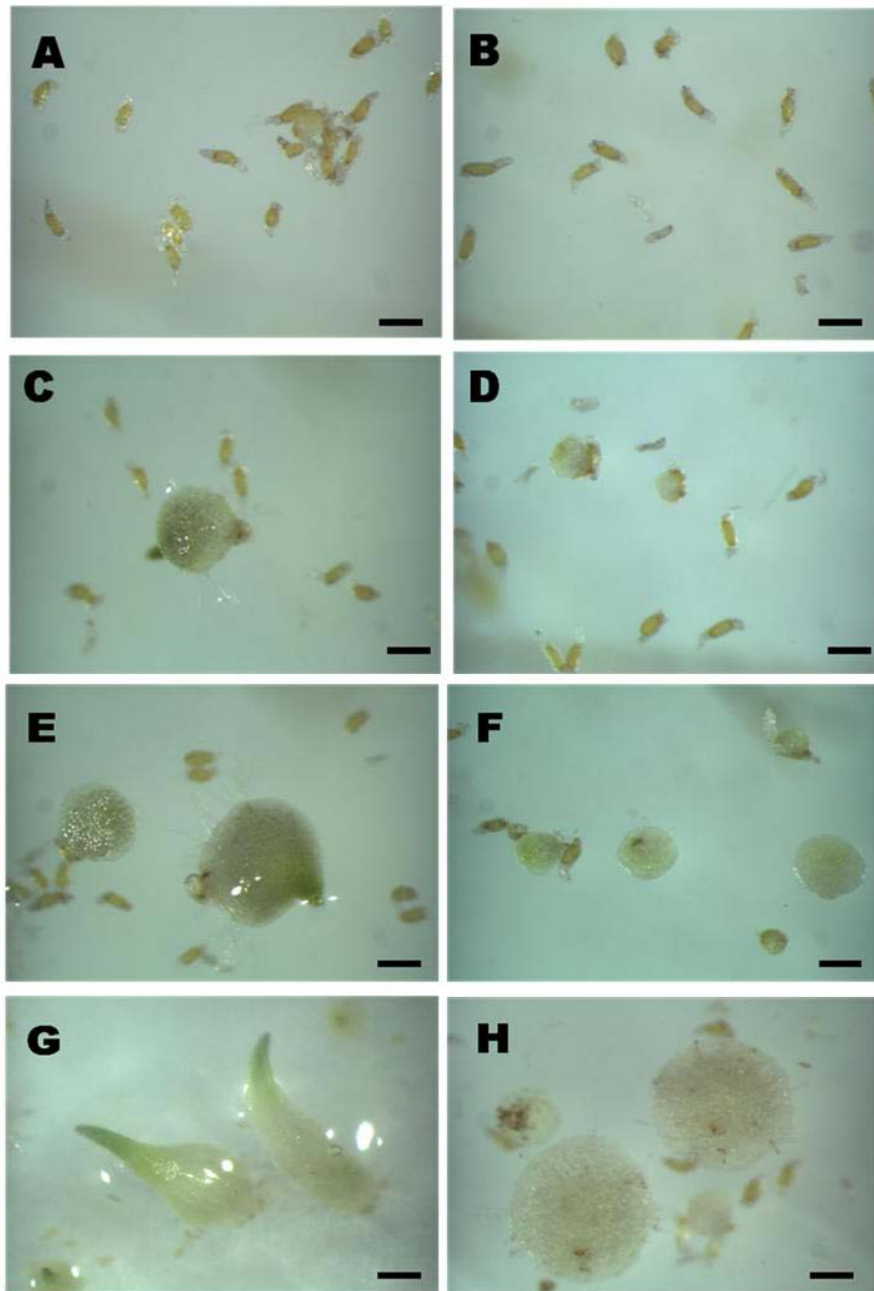


圖 2.4. 液體與固體培養對紋星蘭種子發芽與小苗生長的影响 (bar=1 mm)。

Fig. 2.4. Effects of liquid and solid media on in vitro seedling development in *Bulbophyllum affine* after asymbiotic culture (bar=1 mm).

(A) solid medium, 2 weeks; (B) liquid medium, 2 weeks; (C) solid medium, 5 weeks; (D) liquid medium, 5 weeks; (E) solid medium, 10 weeks; (F) liquid medium, 10 weeks; (G) solid medium, 14 weeks; (H) liquid medium, 14 weeks.

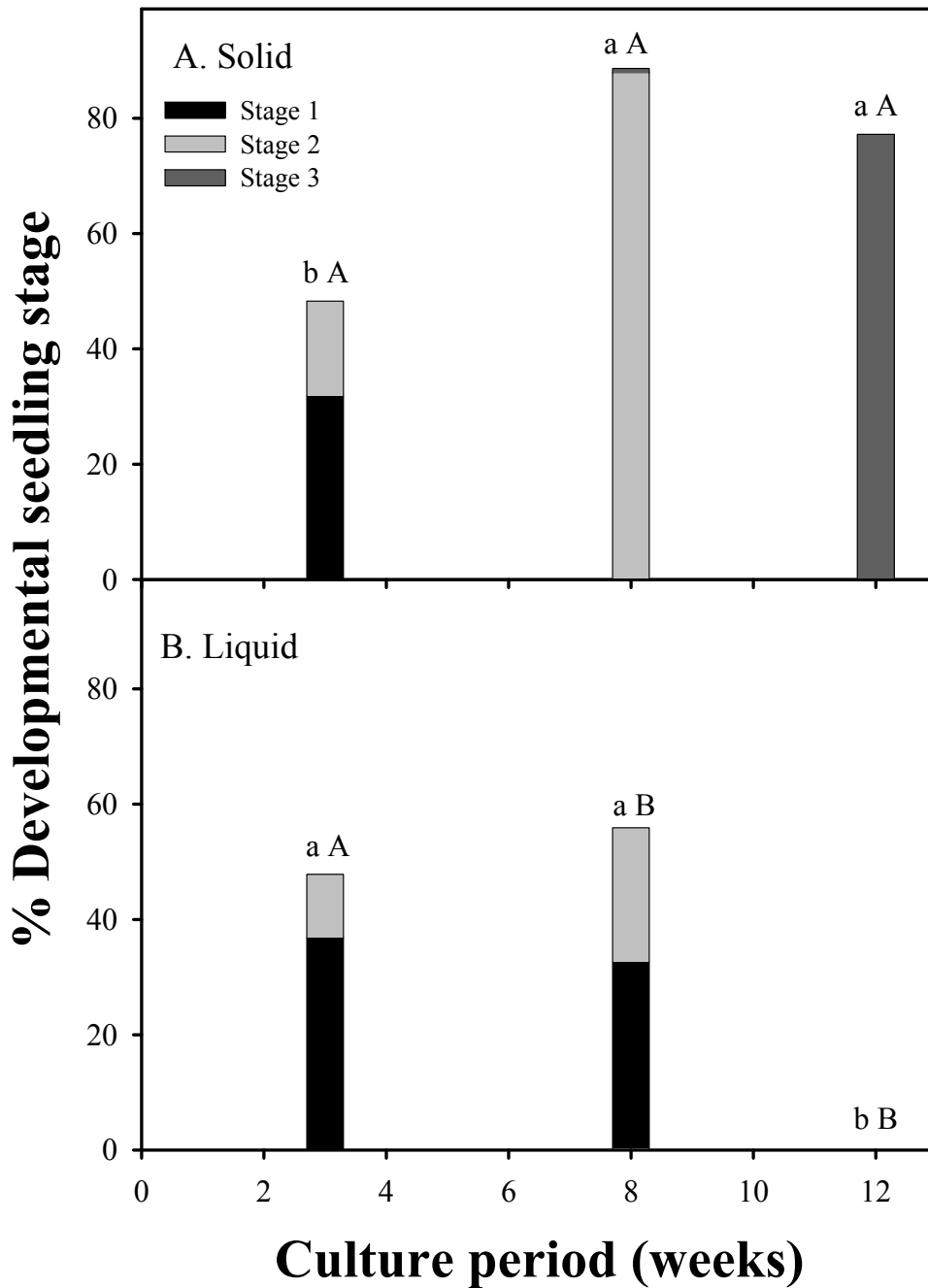


圖 2.5. 烏來捲瓣蘭 (*Bulbophyllum macraei*) 無菌播種於液體和固體培養基後種子發育之變化。

Fig. 2.5. Effects of liquid and solid media on in vitro seedling development in *Bulbophyllum affine* after asymbiotic culture. Stage 1 : Swollen embryo. Stage 2 : Continued embryo enlargement, rupture of testa. Stage 3 : Appearance of protomeristem. Histobars within treatments followed by a different lowercase letter and histobars within the same investigation day followed by a different uppercase letter are significantly different at $P < 0.05$ by LSD test (n = 5).

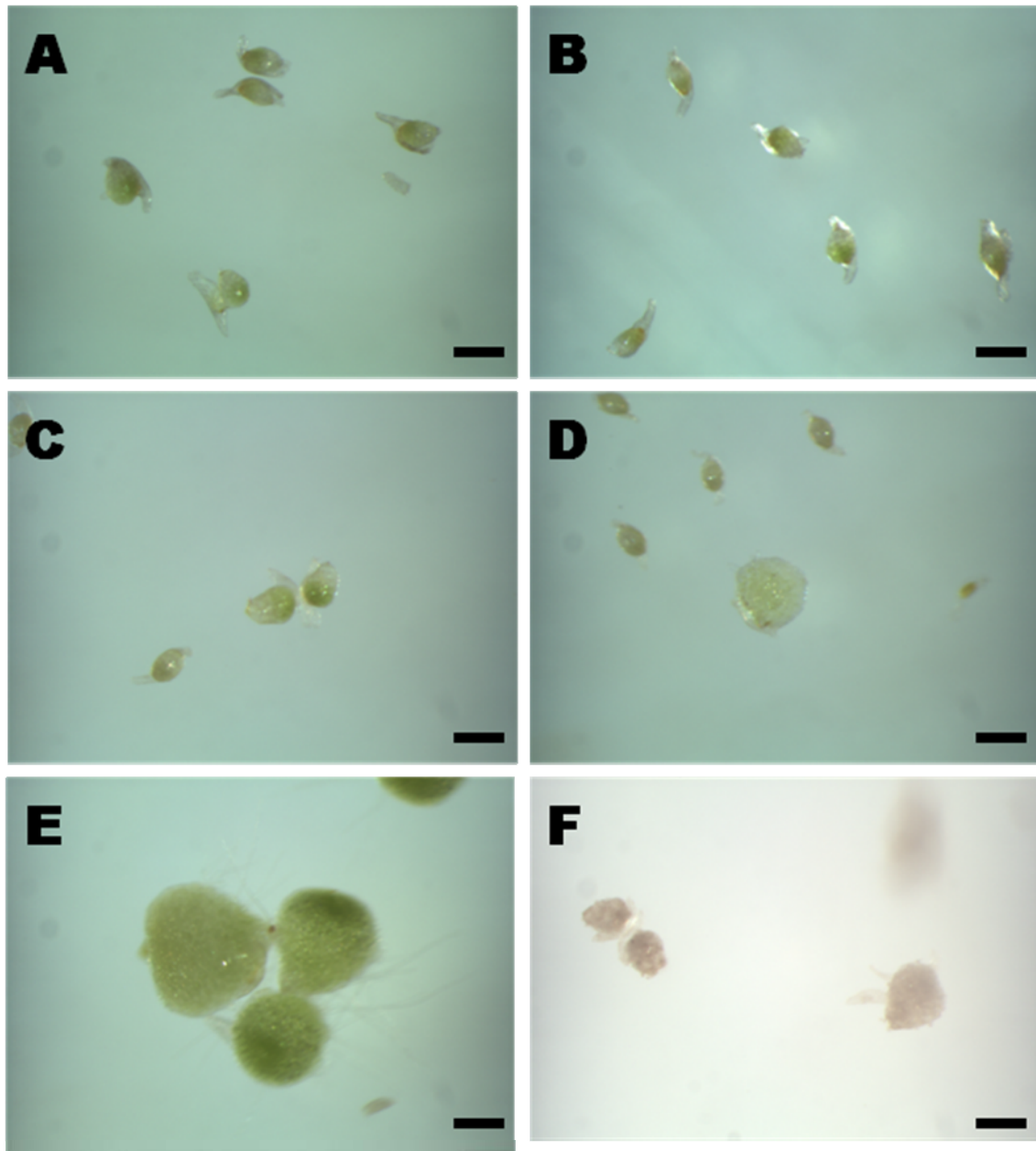


圖 2.6. 液體與固體培養對烏來捲瓣蘭種子發芽與小苗生長的影响 (bar=1 mm)。
 Fig. 2.6. Effects of liquid and solid media on in vitro seedling development in *Bulbophyllum macraei* after asymbiotic culture (bar=1 mm).
 (A) solid medium, 3 weeks; (B) liquid medium, 3 weeks; (C) solid medium, 8 weeks;
 (D) liquid medium, 8 weeks; (E) solid medium, 12 weeks; (F) liquid medium, 12 weeks.

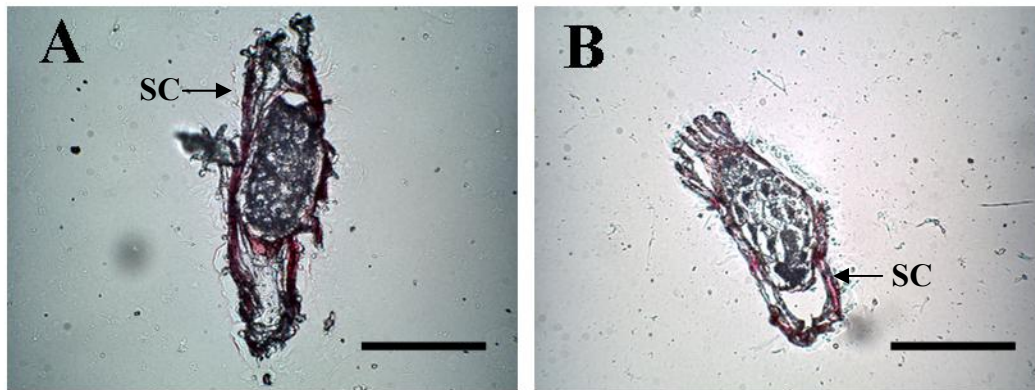


圖 2.7. (A)紋星蘭與(B)烏來捲瓣蘭種子之縱切面。

Fig.2.7. Longitudinal section of seed of *Bulbophyllum affine* (A) and *Bulb. macraei* (B) (bar=50 μ m). SC: seed coat.



圖 2.8. 參試之小豆蘭果莢外觀 (bar=1 cm)。

Fig.2.8. The capsule features of *Bulbophyllum aureloablellum* used in the experiment (bar=1 cm).

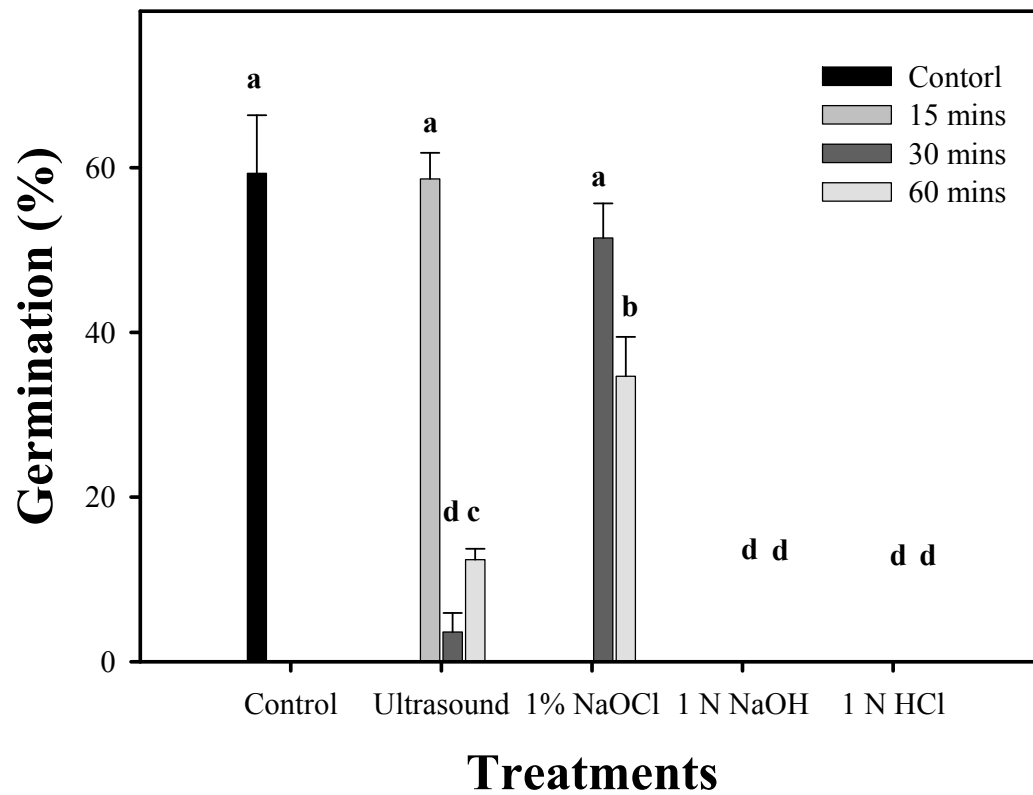


圖 2.9. 前處理對小豆蘭種子無菌播種 6 週後發芽率之影響 (n = 10)。

Fig.2.9. Effects of various seed pretreatments on in vitro seed germination percentage of *Bulbophyllum aureloablellum* for 6 weeks. Means in the same column followed by a different letter are significantly different at $P \leq 0.05$ by least significant difference test (n = 10).

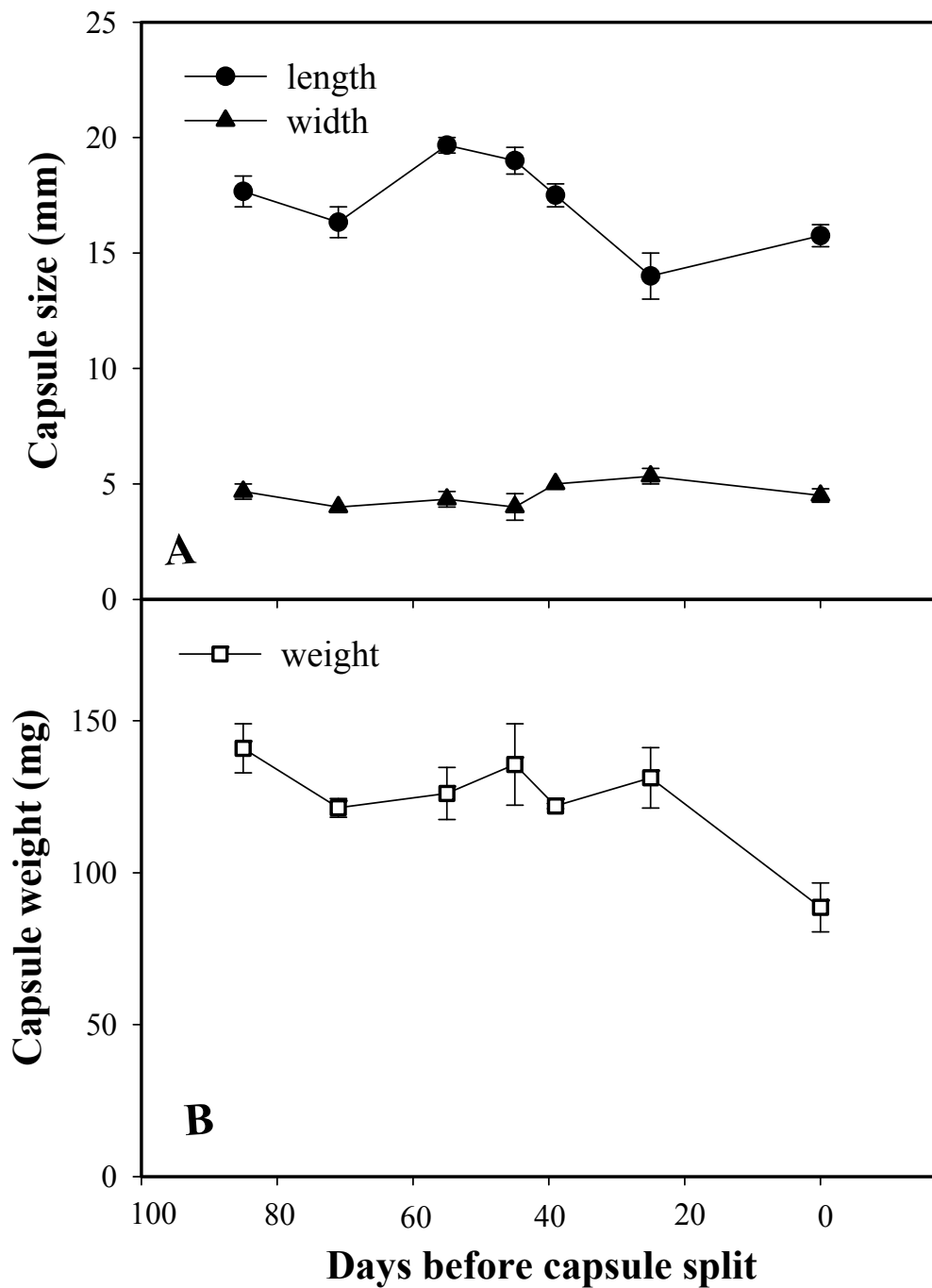


圖 2.10. 黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 果莢開裂前，果莢大小及重量之變化情形 (n=3)。

Fig. 2.10. Changes of capsule size and weights with different capsule maturity (days before capsule split) in *Bulbophyllum retusiusculum* (n=3).

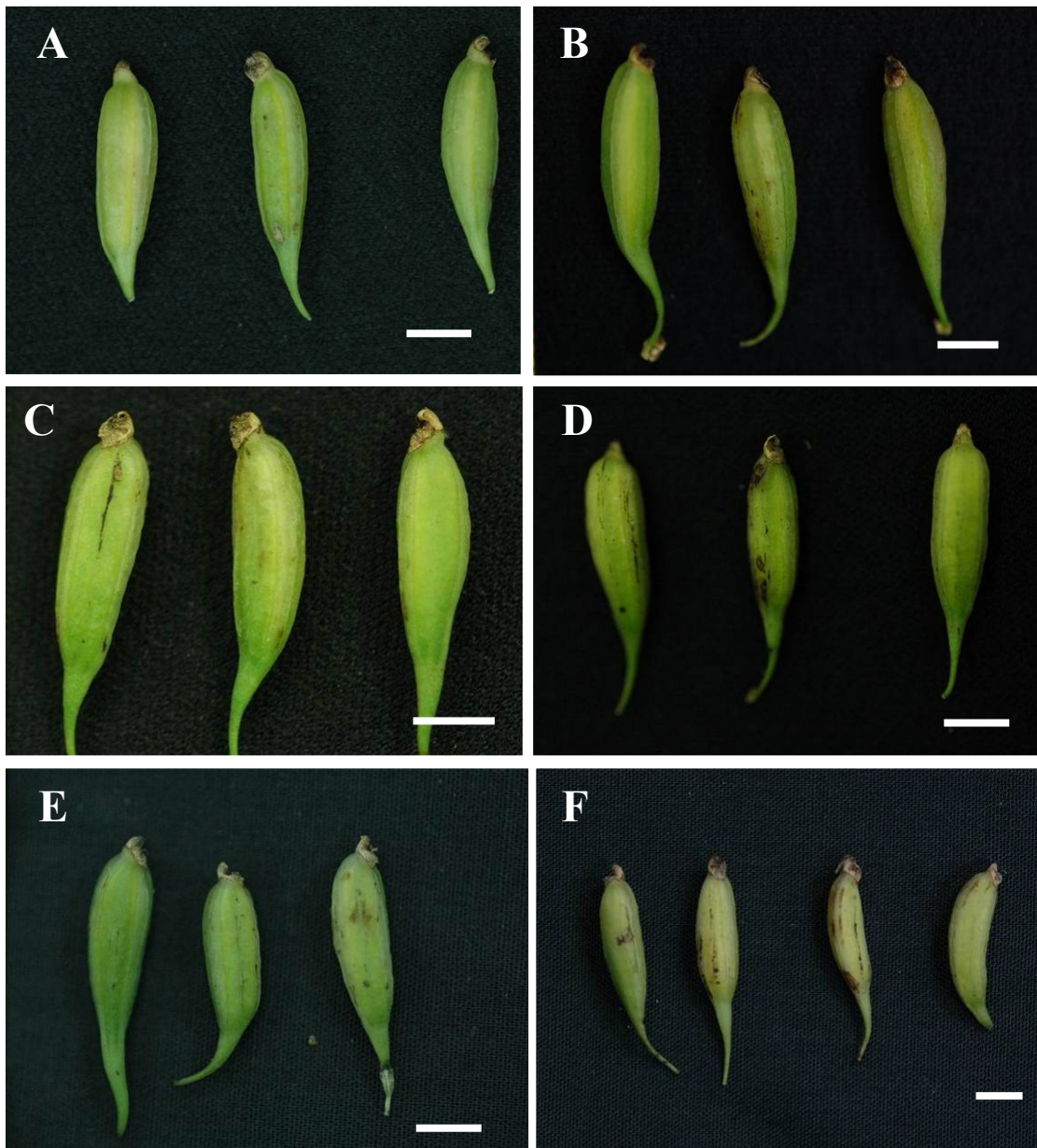


圖 2.11. 開裂前天數之黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 果莢外觀 (bar=5 mm)。

Fig. 2.11. Capsule appearance with different maturity (days before capsule split) of *Bulbophyllum retusiusculum*. (A)85; (B)71; (C) 55; (D)39; (E)25; (F) 0 days before capsule split (bar=5 mm).

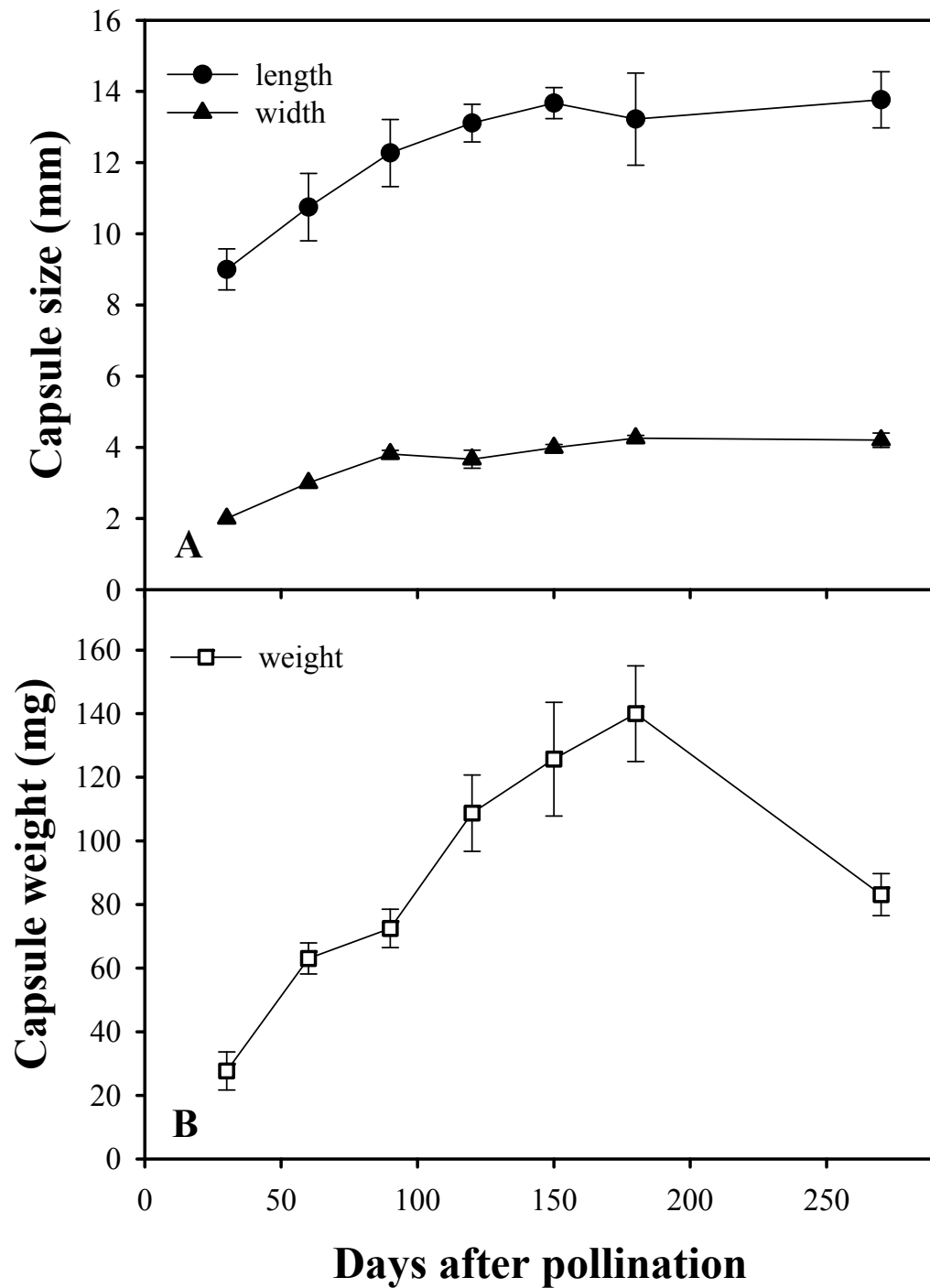


圖 2.12. 黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 人工授粉後，果莢大小及重量之變化情形 (n=3)。

Fig. 2.12. Changes of capsule size and weights with different maturity (days after pollination) in *Bulbophyllum retusiusculum* (n=3).

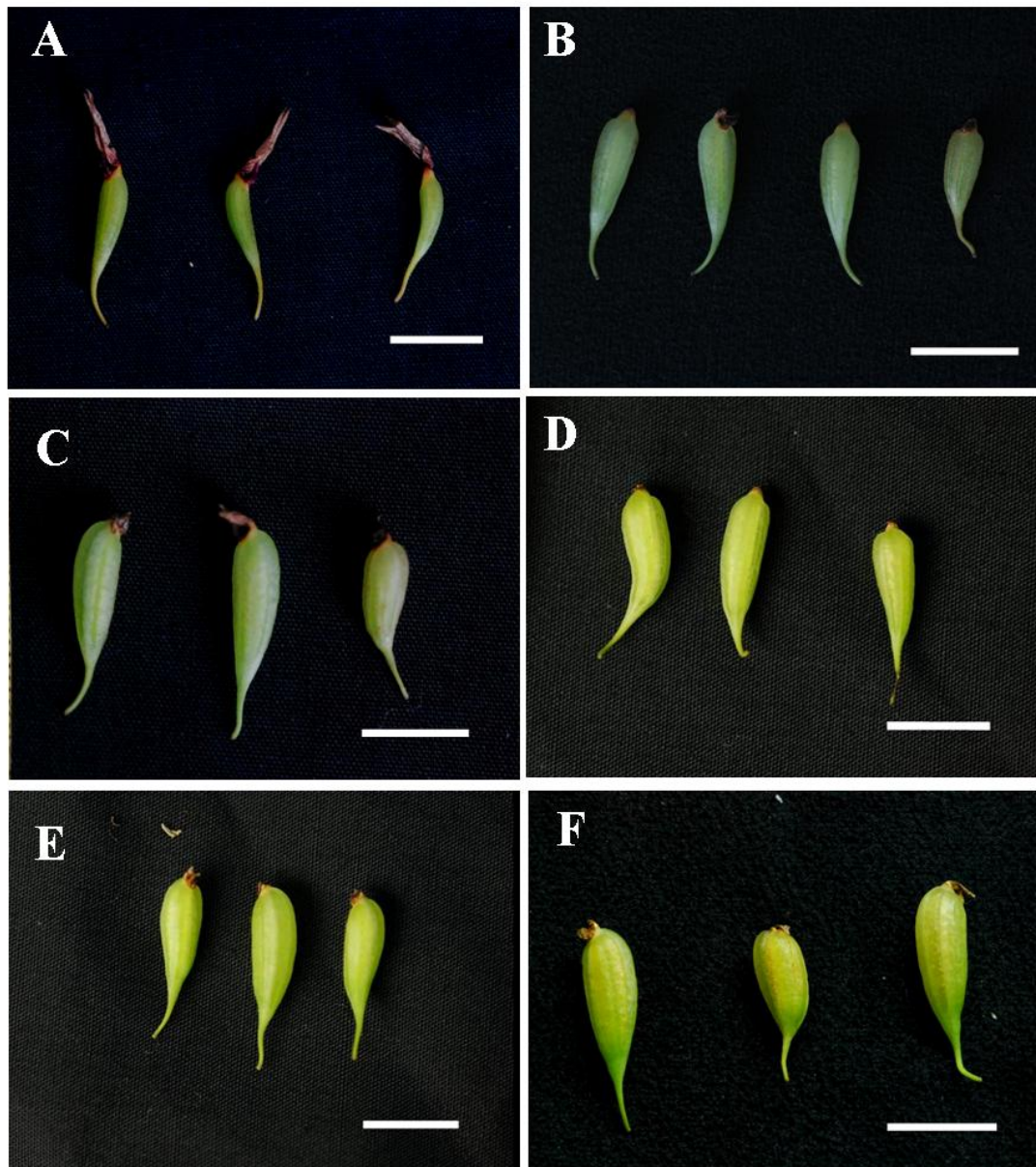


圖 2.13. 授粉後天數之黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 人工授粉果莢外觀 (bar=1 cm)。

Fig. 2.13. Capsule with different maturity (days after pollination) of *Bulbophyllum retusiusculum*. (A) 30; (B) 60; (C) 90 ; (D) 120; (E) 150; (F) 180 days after artificial pollination (bar=1 cm).

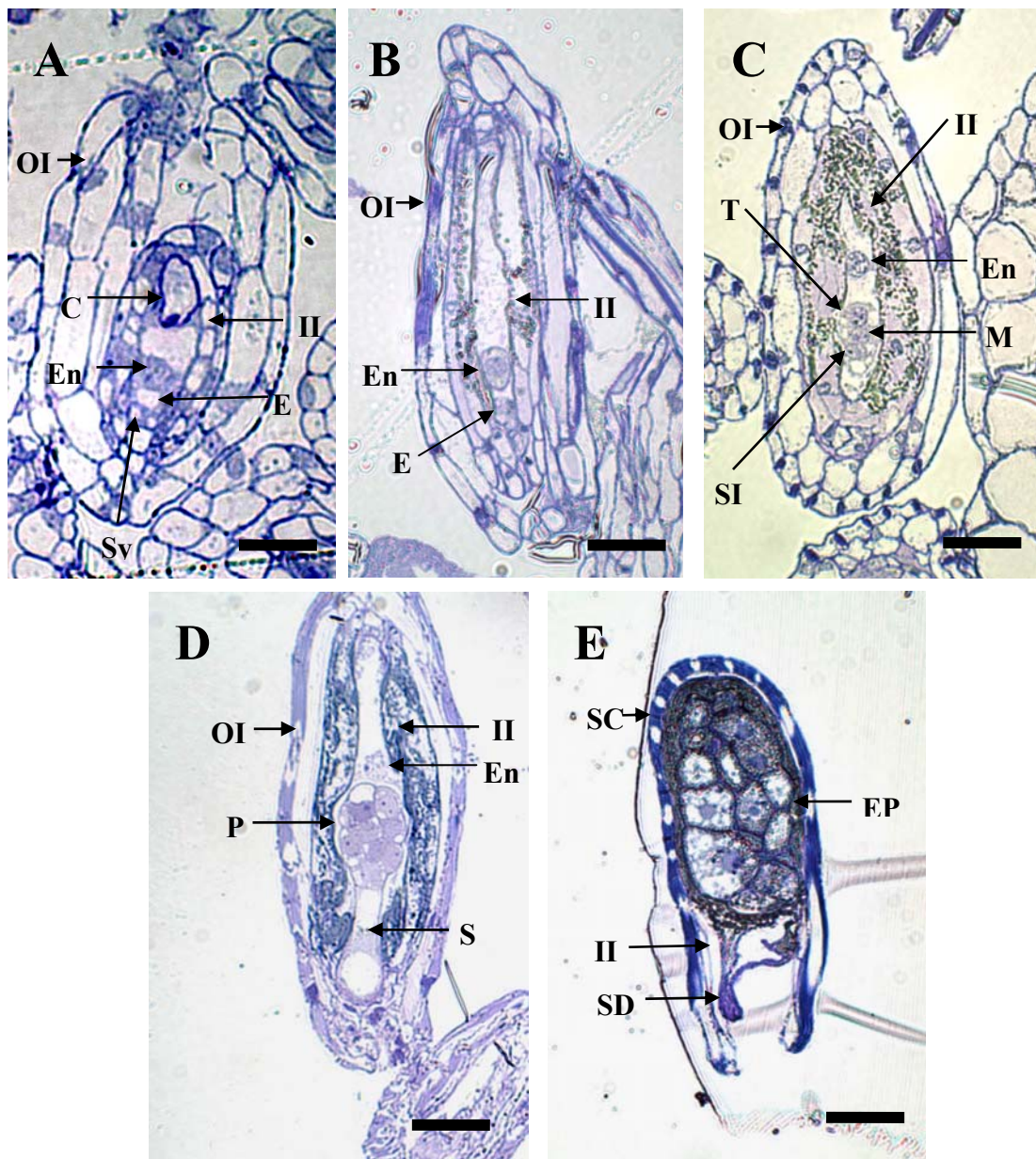


圖 2.14. 不同授粉天數後，黃萼捲瓣蘭 (*Bulbophyllum retusiusculum*) 胚發育與種子形成之情形。(A) 授粉後 120 天，(B,C) 150 天，(D) 180 天，(E) 270 天 (bar=10 μ m)。

Fig. 2.14. Embryo development and seed formation with different capsule maturity in *Bulbophyllum retusiusculum*. (A) 120, (B,C) 150, (D) 180, and (E) 270 days after pollination (bar=10 μ m). OI: outer integument; II: inner integument; C: chalazal cell; En: endosperm nucleus; E: egg cell; Sy: synergid cell; T: terminal cell; M: middle cell; SI: suspensor initial cell; P: proembryo; S: suspensor cell; EP: embryo proper; SD: suspensor degenerated; SC: seed coat.

五、討論 (Discussion)

(一) 液體及固體培養對臺灣原生豆蘭屬果莢無菌播種發芽之影響

紋星蘭與烏來捲瓣蘭種子的胚外圍包覆一層膜狀物，且種皮 (SC) 及此膜狀物以 Safranin O 和 fast green 染色後呈紅色，顯示有木質素累積 (圖 2.7)。三板根節蘭與拖鞋蘭成熟種子的種皮及胚外膜狀物亦有木質素的累積，而木質素的累積會造成胚不易獲得水分與養分，故發芽率偏低 (Lee et al., 2006; Lee et al., 2007a)。Yoder 等人 (2000) 指出無菌播種較蘭菌共生延遲發芽的原因為胚無法快速的獲得水分，而液體培養有增加吸收水分及養分之表面積、促進養液分布均勻及稀釋有毒代謝物質等特性 (Arditti, 1967; Singh and Prakash, 1985)，部分蘭科物種以液體培養較固體培養有較高發芽率，如香莢蘭 (Hegarty, 1955)、素心蘭 (王, 1985)、原生拖鞋蘭 (李, 1998)、*Disa* 屬植物 (Thompson et al., 2006) 等。

但紋星蘭與烏來捲瓣蘭，此兩豆蘭屬物種皆以固體培養者有較高的發芽率及較快速的小苗發育 (圖 2.3、圖 2.5)，且液體培養者於培養後期均出現玻璃質化 (圖 2.4H、圖 2.6 F)。Ziv (1991) 指出，長期培養於液體培養基中會有玻璃質化之問題。玻璃質化現象主要為培養基之水分潛勢提高所引起，當培植體可利用的水分增加會產生快速且不正常的生長，而使培植體缺乏木質素及角質層而成水浸狀、葉綠素含量降低及產生大量乙烯 (Phan and Hafadus, 1986)。寒蘭、九華蘭等，在液體培養時會出現芽體死亡或不正常的肥腫根莖形成 (Hasegawa et al., 1985)。朱 (1988) 觀察到臺灣一葉蘭 (*Pleione formosana* Hayata) 種子以液體懸浮培養所形成的原球體較肥大且植株較矮胖，可能是由於內生乙烯不易擴散所致。本試驗兩物種液體培養者並未有原球體較肥大現象 (圖 2.4、圖 2.6)，推測並非乙烯造成玻璃質化產生。

玻璃質化現象亦可能為植物組織含氧量降低所引起的脂質過氧化作用而產生 (Olmos et al., 1997)。取 1.5 mg 的蝴蝶蘭種子播種於含 20 mL 液體培養基的培養皿中，培養 75 天後每 36 小苗繼代至 20 mL 液體培養基中有較快及一致的小苗生長且無玻璃質化現象產生 (Tsai and Chu, 2008)，顯示液體培養基之不利效應可藉繼代培養克服。本試驗亦使用靜置式液體培養，但由於兩豆蘭物種的原球胚於胚突破種皮後體積尚小，不易以肉眼觀察而不利於進行繼代培養，當持續以相同培養液培養即發生玻璃質化現象 (圖 2.4、圖 2.6)。

(二) 種子前處理對小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*) 果莢無菌播種發芽之影響

種子前處理目的主要為增加種皮透水性或降低發芽抑制物質累積，進而改善蘭科種子不易發芽之現象，其效果隨物種和處理時間不同而異 (李, 1998; Lee et al., 2007a)。 *Orchis purpurella* (Harvais and Hadley, 1967)、根節蘭 (Miyoshi and Mii, 1988, 1995)、喜普鞋蘭 (Miyoshi and Mii, 1998) 種子播種前進行化學藥劑或超音波震盪等前處理，可有效提昇無菌播種發芽率，若處理時間過久其發芽率會下降。

本試驗使用 NaOCl、NaOH 與 HCl 三種化學藥劑及超音波震盪於無菌播種前處理小豆蘭種子，各前處理組均無法有效提高發芽率 (圖 2.9)。試驗使用之處理濃度及時間在多種蘭科植物可有效提高發芽率，但會抑制小豆蘭發芽。種子前處理影響蘭科種子發芽率效果因種而異，可能為種皮滲水性不同而致 (Van Waes and Debergh, 1986)。前處理無法有效提高發芽率可能為小豆蘭種皮滲水性較高，前處理傷害到胚而導致發芽力下降。

(三) 果莢成熟度對黃萼捲瓣蘭 (*Bulb. retusiusculum*) 果莢無菌播種發芽之影響

多數蘭科植物在花粉成熟及授粉時，子房僅有三條胎座脊 (placental ridge)，胚珠尚未形成，而胚珠的發育與胚囊的形成始於授粉後 (Swamy, 1949)。此種授粉後胚珠才開始發育的方式，可能為了避免不必要的細胞分裂及能量消耗 (Arditti, 1992)。由於蘭科植物於授粉後大孢子和胚囊才開始形成與發育，所以授粉至受精需經過一段時間：短者約 4 天，如天麻 (*Gastrodia elata*)；長者近 10 個月，如萬代蘭 (*Vanda suavis*) (Arditti, 1992)。黃萼捲瓣蘭之受精時期約為授粉後 120-150 天 (圖 2.14)，授粉至受精所需時間長於同屬的 *Bulb. bufo* (45 DAP) 和 *Bulb. mysorens* (60 DAP) (Arditti, 1992; Swamy, 1949)，且黃萼捲瓣蘭果莢授粉至成熟開裂所需時間 (360 DAP) 亦遠大於同屬的 *Bulb. bufo* (90 DAP) 和 *Bulb. oreonastes* (90 DAP) (Arditti, 1992)。

蘭胚大多發育至圓球胚 (globular embryo) 即停止，而胚發育不完整造成種子發芽率低下。其種子發芽後先形成原球體，接著才分化出頂端分生組織 (李，1990)。蘭花適合採收的果莢成熟度因物種而異 (李，1990)。多數蘭科植物適合播種的階段為果莢即將轉色，但尚未開裂前，此時發芽率最高 (呂和李，1990)。例如，三板根節蘭之發芽率最高者為授粉後 150 天之果莢 (Lee *et al.*, 2007)；文心蘭 (*Oncidium Gower Ramsey* 'Volcano Queen' × *Onc. Golden Shower*) 則以授粉後 158 天者之種子發芽率最高，可達 99.0% (易等，2005)；彩葉蘭 (*Haemaria discolor*) 則是以授粉後 25-30 天之果莢，所得之發芽率最高，達 43.2%-44.5% (Shiau *et al.*, 2005)；金蘭 (*Cephalanthera falcata*) 則於授粉後 70 天進行無菌播種發芽率最高，為 39.8% (Yamazaki and Miyoshi, 2006)。

本研究進行兩次黃萼捲瓣蘭果莢成熟度試驗，第一次為自然授粉，第二次為人工授粉。自然授粉之果莢因無法得知其授粉日期，故僅能以果莢開裂前天數來定義果莢成熟度。試驗結果以果莢開裂前 85 天播種者發芽率最高 (表 2.1)，而人工授粉者則以授粉後 270 天之果莢發芽率最高 (表 2.2)。人工授粉之果莢約於授粉

後 360 天開裂，故可推知授粉後 270 天約為開裂前 90 天，而自然授粉試驗中以開裂前 85 天的果莢有較高發芽率，顯示此二次試驗中有較佳發芽率的果莢，其成熟期相近，為授粉後 270-275 天。授粉後 270 天果莢內種子的胎座開始脫落，將果莢剖開後輕敲可得到脫離之種子，且前一試驗中開裂前 85 天的果莢亦可得到脫離之種子。李 (1990) 指出素心蘭胚發育至圓球胚時期時，種子含水量降低、脫離胎座而胚停止發育，因此胎座脫落時胚應已成熟。故取種子易從果莢脫落者進行無菌播種應可得較高的發芽率，但若待果莢更成熟，則發芽率降低，此應與種子內發芽抑制物質之累積有關。而若太早採收，胚之發育極不成熟，無菌播種不易成功，因此本研究中，取授粉後 120 天、150 天之種子進行播種，其胚膨大率及發芽率均極低。

自然授粉果莢之無菌播種發芽率以開裂當天最低，僅 27.9% (表 2.1)。三板根節蘭 (Lee *et al.*, 2007)、文心蘭 (易等, 2005) 及金蘭 (Yamazaki and Miyoshi, 2006) 等蘭科植物均於果莢開裂前有一發芽率較高之時期，而後於果莢開裂時降至最低。其中，三板根節蘭果莢開裂時種子發芽率最低，而此時種子內 ABA 濃度也最高 (Lee *et al.*, 2007)。ABA 為調節種子胚成熟、休眠及發芽的重要荷爾蒙 (Koorneef *et al.*, 1989)。鈴蘭 (*Epipactis helleborine*) 成熟種子之 ABA 濃度為未成熟種子的 14 倍 (van der Kinderen, 1987)。臺灣喜普鞋蘭 (*Cypripedium formosanum*) 種子內生 ABA 含量隨授粉後天數增加而上升，且發芽率隨培養基添加的 ABA 濃度上升而下降，故內生 ABA 可能抑制種子發芽 (李, 2003)。因此，推測黃萼捲瓣蘭果莢開裂之發芽率最低可能與種子內生 ABA 之累積有關。

(四) Fluridone 處理對人工授粉之黃萼捲瓣蘭果莢無菌播種發芽之影響

Fluridone 為 ABA 生合成抑制劑，施用於玉米 (Hole *et al.*, 1989; Oishi and Bewley, 1990) 與向日葵 (Le Page-Degivry and Garello, 1992) 之種子皆可有效提升

其發芽率，但蘭科植物少有施用 fluridone 而提升其發芽率的相關文獻。本研究於授粉後 130 天時對果莢處理 50 及 100 μM fluridone 皆可有效提高後續黃萼捲瓣蘭種子之發芽率，其中又以 50 μM fluridone 處理者最高 (表 2.4)。李 (2003) 指出臺灣喜普鞋蘭種子內生 ABA 含量隨授粉後天數增加而上升，授粉後 60-90 天種子發育至原胚時期階段，此時種子內生 ABA 含量為自果莢形成至開裂期間最低，約為 $1 \text{ ng}\cdot\text{mg FW}^{-1}$ 。三板根節蘭亦於授粉後 60-90 天種子發育至原胚時期，其種子內生 ABA 含量最低，約為 $2.16\text{-}2.26 \text{ ng}\cdot\text{mg FW}^{-1}$ (Lee *et al.*, 2007)。向日葵 (*Helianthus annuus*) 於胚內生 ABA 含量增加之前施用 fluridone，可抑制 ABA 的累積以及胚休眠 (Le Page-Degivry and Garello, 1992)。本研究於黃萼捲瓣蘭授粉後 130 天進行藥劑處理，由果莢成熟度試驗之種子切片結果推測授粉後 130 天約為受精至原胚時期 (圖 2.14A)，種子內生 ABA 含量不高，且內外珠被皆尚未皺縮，因此 fluridone 較易滲透入種子而抑制 ABA 之生合成，故 fluridone 處理提高了其無菌播種之發芽率。而培養基添加 fluridone 的處理組均無法有效提升發芽率 (表 2.4)，可是因授粉後 190 天種子內生 ABA 含量已足以抑制其發芽。

Fluridone 除了為 ABA 的生合成抑制劑外，也會影響葉綠素及類胡蘿蔔素的生合成 (Bartels and Watson, 1978; Fong and Schiff, 1979)。利用 fluridone 處理植株來抑制 ABA 之生合成易造成光漂白 (photo bleaching) 之植株白化現象 (Harvey *et al.*, 1994)。但黃萼捲瓣蘭果莢在處理各濃度 fluridone 後，外觀均無白化現象，且不影響果莢生長 (表 2.3)，故可利用 fluridone 來處理果莢以提升黃萼捲瓣蘭無菌播種之發芽率。

(五) 不同種臺灣原生豆蘭無菌播種之種子發芽及發育

本試驗採用果莢已開裂的種子進行試驗，六種臺灣原生豆蘭屬植物皆有一部分種子發芽但種間的發芽階段有些許差異，發芽率由高往低排序分別為狹萼捲瓣

蘭 (*Bulb. drymoglossum*)、阿里山豆蘭 (*Bulb. pectinatum*)、白毛捲瓣蘭 (*Bulb. albociliatum*)、臺灣捲瓣蘭 (*Bulb. taiwanense*)、小豆蘭 (*Bulb. aureolabellum*)，而發芽率最低的為烏來捲瓣蘭 (*Bulb. macraei*) (表 2.5)。

根據鐘 (2008) 對蘭科植物野外族群概況的分類，六種豆蘭屬植物中以狹萼捲瓣蘭、白毛捲瓣蘭及烏來捲瓣蘭被列為安全的物種，屬於在臺灣野外數量較多且穩定生長的一群，其餘三種均為稀有植物需被保育。狹萼捲瓣蘭及白毛捲瓣蘭成熟種子發芽率高，而烏來捲瓣蘭雖發芽率為最低，但果莢內種子數較多，所以無菌播種所得的植株數量較多，高的無菌播種發芽率或較多的小苗植株數，應為造成臺灣的野外數量較多的原因之一。而阿里山豆蘭亦有較高的發芽率且果莢內種子數亦較多，但為稀有物種，可能為阿里山豆蘭的花徑為本屬中較大者 (約 8 公分) 且花形優美，在野外易被採集而使族群量少 (鐘，2008)。

小豆蘭與烏來捲瓣蘭在先前的試驗中使用未成熟果莢進行無菌播種，發芽率分別可達 59.3% (圖 2.9) 及 87.9% (圖 2.1)，但使用開裂果莢播種的發芽率分別僅有 10.0% 及 4.8% (表 2.5)。一般而言，多數蘭科植物未成熟果莢較成熟果莢發芽較快且有較多的原球體產生 (Arditti et al., 1981)，但也有 10 種 *Ophrys* 屬植物恰好相反，反而是成熟種子皆較未成熟種子有較高的原球體形成比例 (Kitsaki et al., 2004)。然而未成熟果莢發芽率會因採收時間不同而異 (Lee et al., 2007a; Yamazaki and Miyoshi, 2006)，未成熟果莢採收的時期是否為採收適期為影響發芽率的重要因素。

蘭科植物成熟種子可長期冷凍貯藏且配合適當的處理可降低貯藏傷害 (Arditti et al., 1981)，其中成熟種子經表面消毒可能提高發芽率 (李，1998; Harvais and Hadley, 1967; Lee et al., 2007a; Miyoshi and Mii, 1988)，但過度的表面消毒會影

響蘭科種子活性與降低發芽率 (Van Waes and Debergh, 1986)。另一方面，未成熟的果莢容易進行表面消毒 (Arditti, 1967)，可提早播種、避免種子成熟後發芽抑制物質的累積、可減少消毒液對種子的直接危害 (易等, 2005; Sauleda, 1976)，但缺點為有採收適期，且採收後需立即播種不耐貯藏 (Arditti et al., 1981)。

使用成熟與未成熟果莢各有優缺點，而未成熟果莢之胚成熟度為影響發芽率的重要因素，如為人工授粉而得的果莢可用授粉後天數定義成熟度，但野外採集或不確定授粉時間的果莢則不易得知適合的播種時期，若果莢數量夠多時尚可進行種子切片觀察，當果莢數量少時，為保險起見可留幾個果莢待開裂時再進行無菌播種。而找尋與發芽率相關性高的非破壞性指標是無菌播種未來的研究方向。

參考文獻 (Reference)

- 王博仁. 1985. 中國蕙蘭組織培養器官分化之研究. 國科會計畫報告.
- 朱欽昌. 1988. 臺灣一葉蘭的胚器官發生學與小苗之自營生長. 國立臺灣大學園藝學系碩士論文.
- 呂依倫、李晔. 1990. 鳳蘭之無菌播種. 中國園藝 36:198-209.
- 李志仁. 1991. 報歲蘭與素心蘭之開花與種子無菌播種之研究. 國立臺灣大學植物學研究所碩士論文.
- 李勇毅. 1998. 原生拖鞋蘭胚發育與無菌播種之研究. 國立臺灣大學園藝學系碩士論文.
- 李勇毅. 2003. 臺灣喜普鞋蘭之生長週期、胚胎發生與內生ABA之變化及無菌繁殖. 國立臺灣大學園藝學系博士論文.
- 李晔. 1990. 蘭之胚培養. 中國園藝 36:223-244.
- 易美秀、王才義、蔡宛育. 2005. 文心蘭果莢和胚的成熟度對種子發芽之影響. 臺中區農業改良場研究彙報 86:37-45.
- 邱金春、王博仁. 1985. 嘉德麗雅蘭與蕙蘭種子發芽與芽的形成. 中國園藝 31:10-22.
- 徐淑芬. 2004. 乙烯對蝴蝶蘭葉片再生及出瓶期對組培苗品質之影響. 國立中興大學園藝學系碩士論文.
- 張莉欣. 1994. 培養基成分對素心蘭根莖生長與分化及光度對幼苗生長之影響. 國立臺灣大學園藝學系碩士論文.
- 陳美惠. 1996. 果莢成熟度、種子前處理及培養基成分對拖鞋蘭無菌播種與幼苗生長之影響. 國立臺灣大學園藝學系碩士論文.
- 陳裕星、張莉欣. 2004. 臺灣原生蕙蘭屬植物遺傳資源之分類與生育特性. 臺中區農業改良場研究彙報 82:51-60.

- 楊昭容. 1982. 玉華蘭地下莖分化成芽體的形態變化過程的研究. 國立臺灣大學植物學研究所碩士論文.
- 楊遠波、劉和義、林讚標. 2001. 臺灣維管束植物簡誌第五卷. 中華民國行政院農業委員會. 臺北. p. 222-227.
- 廖曼利. 1995. 一、光度及肥料濃度對報歲蘭營養生長與生殖生長的影響 二、培養基成分、光度及溫度對報歲蘭根莖生長與分化的影響. 國立臺灣大學植物學研究所碩士論文.
- 潘貞嫻. 2007. 培養條件對報歲蘭根莖生長分化之影響及培植期間瓶內氣體之變化. 國立臺灣大學園藝學系碩士論文.
- 蔡淑華. 1978. 植物組織切片技術綱要. 茂昌圖書公司, 臺北.
- 蔡媚婷. 2004. 通氣性和液體培養基對蝴蝶蘭瓶苗生長之影響. 國立中興大學園藝系博士論文.
- 鐘詩文. 2008. 臺灣野生蘭 (上冊). 中華民國行政院農業委員會林務局、臺灣植物分類學會. 臺北. p. 31-59.
- Abeles, F.B., P.W. Morgan, and M.E. Saltveit. 1992. Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Aharoni, N. and M. Lieberman. 1979. Ethylene as a regulator of senescence in tobacco leaf discs. *Plant Physiol.* 64:801-804.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- Arditti, J. 1992. *Fundamental of orchid biology.* John Wiley and Sons, New York.
- Arditti, J., J.D. Michaud and A.P. Oliva. 1981. Seed germination of North American orchids. I. Native California and related species of *Cailpso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Bot. Gaz.* 142:442-453.
- Arigita, I., R.S. Tames, and A. Gonzalez. 2003. 1-Methylcyclopropene and ethylene as regulators of in vitro organogenesis in kiwi explants. *Plant Growth Regulat.* 40:59-64.

- Arigita, L., R.S. Tames, and A. Gonzalez. 2004. Ethylene biosynthesis and endogenous polyamines in relation to development of in vitro cultured kiwifruit explants. *Funct. Plant Biol.* 31:603-609.
- Atta-Aly, M.A., J.M.E. Saltveit, and G.E. Hobson. 1987. Effect of silver ions on ethylene biosynthesis by tomato fruit tissue. *Plant Physiol.* 83:44-48.
- Bais, H.P., G.S. Sudha, and G.A. Rarishankar. 2000. Putrescine and silver nitrate influences shoot multiplication, in vitro flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *Plant Growth Regulat.* 19:238-248.
- Bartels, P.G. and C.W. Watson. 1978. Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon. *Weed Sci.* 26:198-203.
- Bhadra, S.K., H. Barua, and M.H. Hossain. 2004. In vitro germination and rapid micropropagation of *Bulbophyllum lilacinum* Ridley. *Bangladesh J. Bot.* 33:103-107.
- Biddington, N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulat.* 11:173-187.
- Boufford, D.E., H. Ohashi, T.C. Huang, C.F. Hsieh, J.L. Tsai, K.C. Yang, C.I. Peng, C.S. Kuoh, and A. Hsiao. 2003. A checklist of the vascular plants of Taiwan. In: D.E. Boufford, C.F. Hsieh, T.C. Huang, C.S. Kuoh, H. Ohashi, C.I. Peng, J.L. Tsai, and K.C. Yang (eds.). *Flora of Taiwan* 2nd ed., 6:374-376. Dept. Bot., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C. and E.J. Woltering. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regulat.* 15:1-16.
- Burg, S.P. and E.A. Burg. 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol.* 42:144-152.

- Chu, C.C. and K.W. Mudge. 1994. Effects of prechilling and liquid suspension culture on seed germination of the yellow lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* var. *pubescens*). *Lindleyana* 9:153-159.
- Chung, S.W. and T.C. Hsu. 2006. *Bulbophyllum kwanwuensis* (Orchidaceae), a new species in Taiwan. *Taiwania* 51:139-142.
- Da Silva, U.F., E.L. Borba, J. Semir, and A.J. Marsaioli. 1999. A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Phytochemistry* 50:31-34.
- De Wild, H.P.J., E.J. Woltering, and H.W. Peppelenbos. 1999. Carbon dioxide and 1-MCP inhibit ethylene production and respiration of pear fruit by different mechanisms. *J. Expt. Bot.* 50:837-844.
- Dimasi-Theriou, K. and A.S. Economou. 1995. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica* × *P. amygdalus*). *Plant Cell Rpt.* 15:87-90.
- Dimasi-Theriou, K., A.S. Economou, and E.M. Sfakiotakis. 1993. Promotion of petunia (*Petunia hybrida* L.) regeneration in vitro by ethylene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32:219-225.
- Evans, P.T. and R.L. Malmberg. 1989. Do polyamines have role in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:235-269.
- Figueira, A. and J. Janick. 1994. Optimizing carbon dioxide and light levels during in vitro culture of *Theobroma cacao*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:865-871.
- Fong, F. and J.A. Schiff. 1979. Blue-light-induced absorbance changes associated with carotenoids in *Euglena*. *Planta* 146:119-127.
- Fredrikson, M. 1991. An embryological study of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.* 174:213-220.
- Giridhar, P., B.O. Reddy, and G.A. Ravishankar. 2001. Silver nitrate influences in vitro

- shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. Curr. Sci. 81:1166-1170.
- Harvais, G. and G. Hadley. 1967. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. New Phytol. 66:217-230.
- Harvey, B.M.R., G. Bowden, C. Reavey, and C. Selby. 1994. Stimulation of in vitro root and shoot growth of potato by increasing sucrose concentration in the presence of fluridone, an inhibitor of abscisic acid synthesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37:271-276.
- Hasegawa, A. and M. Goi. 1987. Rhizome formation in *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. and *Cymbidium kanran* Makino in shoot-tip culture. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 56:70-78.
- Hasegawa, A., H. Ohashi, and M. Goi. 1985. Effect of BA, rhizome length, mechanical treatment and liquid shaking culture on the shoot formation from rhizome in *Cymbidium faberi* Rolfe. Acta Hort. 166:25-40.
- Hegarty, C.P. 1955. Observations on the germination of orchid seed. Amer. Orchid Soc. Bull. 24:457-464.
- Hole, D.J., J.D. Smith, and B.G. Cobb. 1989. Regulation of embryo dormancy by manipulation of abscisic acid in kernels and associated cob tissue of *Zea mays* L. cultured in vitro. Plant Physiol. 91:101-105.
- Hsu, T.C. and S.W. Chung. 2008. Two new *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species in Taiwan: *B. brevipedunculatum* and *B. ciliisepalum*. Taiwania 53: 23-29.
- Huang, C.L. and H. Okubo. 2005. In vitro morphogenesis from rhizome of *Cymbidium sinense*. J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 50:11-18.
- Jackson, M.B., A.J. Abbott, A.R. Belcher, K.C. Hall, R. Butler, and J. Cameron. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Ann. Bot. 67:1-11.

67:229-237.

Jackson, M.B., A.R. Belcher, and P. Brain. 1994. Measuring shortcomings in tissue culture aeration and their consequences for explant development., p. 191-203. In: P.J. Lumsden, J.R. Nicholas, and W.J. Davies (eds.). Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Jacobsen, J.V. and W.B. McGlasson. 1970. Ethylene production by autoclaved rubber injection caps used in biological systems. *Plant Physiol.* 45:631.

John, P. 1997. Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiol. Plant.* 100:583-592.

Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44:283-307.

Kepeczyński, J., A. Nemoykina, and E. Kepeczyńska. 2006. Ethylene and in vitro rooting of rose shoots. *Plant Growth Regulat.* 50:23-28.

Kitsaki, C.K., S. Zygouraki, M. Ziobora, and S. Kintzios. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Rpt.* 23:284-290.

Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz.* 73:1-25.

Kofranek, A.M. and J.L. Paul. 1975. The value of impregnating cut stems with high concentrations of silver nitrate. *Acta Hort.* 41:199-206.

Koornneef, M., C.J. Hanhart, H.W.M. Hilhorst, and C.M. Karssen. 1989. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90:463-469.

Kumar, P.P., D.M. Reid, and T.A. Thorpe. 1987. The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata* in

- vitro. *Physiol. Plant.* 69:244-252.
- Kumar, P.P., P. Lakshmanan, and T.A. Thorpe. 1998. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:94-103.
- Le Page-Degivry, M.T. and G. Garello. 1992. In situ abscisic acid synthesis a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol.* 98:1386-1390.
- Le Page-Degivry, M.T., P. Barthe, and G. Garello. 1990. Involvement of endogenous abscisic acid in onset and release of *Helianthus annuus* embryo dormancy. *Plant Physiol.* 92:1164-1168.
- Lee, Y.I., E.C. Yeung, N. Lee, and M.C. Chung. 2006. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Ann. Bot.* 98:1311-1319.
- Lee, Y.I., C.F. Lu, and M.C. Chung. 2007a. Developmental changes in endogenous abscisic acid concentrations and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132:246-252.
- Lee, Y.I., E.C. Yeung, and M.C. Chung. 2007b. Embryo development of orchids, p. 23-44. In: W.H. Chen and H.H. Chen (eds.). *Orchid Biotechnology*. World Scientific Publishing, Singapore.
- Lelièvre, J.M., A. Latche, B. Jones, M. Bouzayen, and J.C. Pech. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101:727-739.
- Lin, T.P. and L.L. Kuo Huang. 2005. *Bulbophyllum albociliatum* (Liu & Su) Nakejima var. *weiminianum* and *Flickingeria shihfuana*, two new native orchids from Taiwan. *Taiwania* 50:290-296.
- Lin, W.M., L.L. Kuo Huang, and T.P. Lin. 2006. Newly discovered native orchids of Taiwan. *Taiwania* 51:162-169.
- Liu, J.-H. and D.M. Reid. 1992. Auxin and ethylene-stimulated adventitious rooting in

- relation to tissue sensitivity to auxin and ethylene production in sunflower hypocotyls. *J. Expt. Bot.* 43:1191-1198.
- Lucke, E. and B. Beßler. 1997. Abscisic acid-responsible for inhibition of germination of orchid seeds? *Gartenbauwissenschaft* 62:189-190.
- Ma, J.H., J.L. Yao, D. Cohen, and B. Morris. 1998. Ethylene inhibitors enhance in vitro root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Rpt.* 17:211-214.
- Majumder, P.L., S. Pal, and S. Majumder. 1999. Dimeric phenanthrenes from the orchid *Bulbophyllum reptans*. *Phytochemistry* 50:891-897.
- Mathooko, F.M. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharv. Biol. Technol.* 7:1-26.
- Mensuali-Sode, A., M. Panizza, and F. Tognoni. 1992. Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiol. Plant.* 84:472-476.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1988. Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Hort.* 35:127-130.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1995. Enhancement of seed germination and protocorm formation in *Calanthe discolor* (Orchidaceae) by NaOCl and polyphenol absorbent treatments. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 12:267-272.
- Miyoshi, K. and M. Mii. 1998. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. *Physiol. Plant* 102:481-486.
- Mohiuddin, A.K.M., M.K.U. Chowdhury, Z.C. Abdullah, and S. Napis. 1997. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51:75-78.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- O'Neill, S.D. 1997. Pollination of flower development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:547-574.
- Ogasawara, N., S. Haneishi, C. Suzuki, and H. Takagi. 1995. The growth and CO₂ exchange of *Cymbidium* protocorm-like bodies related to sugar in the culture medium. *Acta Hort.* 393:85-90.
- Ogura-Tsujita, Y. and H. Okubo. 2006a. Effects of nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in in vitro shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42:614-616.
- Ogura-Tsujita, Y. and H. Okubo. 2006b. Promotion of in vitro shoot formation from protocorm-like bodies of a hybrid between tropical and temperate *Cymbidium* species. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 75:334-336.
- Oishi, M.Y. and J.D. Bewley. 1990. Distinction between the responses of developing maize kernels to fluridone and desiccation in relation to germinability, α -amylase activity, and abscisic acid content. *Plant Physiol.* 94:592-598.
- Olmos, E., A. Piqueras, J.R. Martínez-Solano, and E. Hellín. 1997. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. *Plant Sci.* 130:97-105.
- Ozudogru, E.A., Y. Ozden-Tokatli, and A. Akcin. 2005. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:151-156.
- Peak, K.Y. and T. Kozai. 1998. Micropropagation of temperate *Cymbidium* via rhizome culture. *HortTechnology* 8:283-288.
- Peidgeon, A. 1992. *The illustrated encyclopedia of orchids*. Timber Press, Portland, OR., USA.

- Phan, C.T. and P. Hafadus. 1986. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in in vitro culture, called 'vitreous plants'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6:83-94.
- Prevost, I. and M.T. Le Page-Degivry. 1985. Inverse correlation between ABA content and germinability throughout the maturation and the in vitro culture of the embryo of *Phaseolus vulgaris*. *J. Expt. Bot.* 36:1457-1464.
- Qin, Y. and S. Zhang. 2005. Response of in vitro strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *HortScience* 40:747-751.
- Quatrano, R.S., D. Bartels, T.D. Ho, and M. Pages. 1997. New insight into ABA-mediated processes. *Plant Cell* 9:470-475.
- Ragolsky, E. and T.A. Thorpe. 1989. Physiological effects of fluridone on shoot cultures of *Brassica napus* L. and *Beta vulgaris* L. *J. Plant Physiol.* 134:613-618.
- Reid, M.S. 1995. Ethylene in plant growth, development, and senescence, p. 486-508. In: P.J. Davis (ed.). *Plant hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ringe, F. and J.P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured in vitro. *Plant Cell Physiol.* 9:639-652.
- Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, L.G. Iglesias-Andreu, M.d.C. Montalvo-Peniche, G. Lopez-Puc, and F. Barahona-Perez. 2006. Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41:405-409.
- Sauleda, R.P. 1976. Harvesting times of orchid seed capsules for the green pod culture process. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 45:305-309.
- Serek, M., E.J. Woltering, E.C. Sisler, S. Frello, and S. Sriskandarajah. 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. *Biotechnol. Adv.* 24:368-381.

- Shiau, Y.J., S.M. Nalawade, C.N. Hsai, and H.-S. Tsay. 2005. Propagation of *Haemaria discolor* via in vitro seed germination. *Biol. Plant.* 49:341-346.
- Shimazaki, K. 1992. The role of ethylene in the plantlet formation of *Cymbidium kanran* from rhizome cultures. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 9:202-205.
- Shimazaki, K. 1995. Interactive effects between cytokinin and ethephon on shoot regeneration in rhizome cultures of *Cymbidium kanran* Makino. *Plant Tissue Cult Lett.* 12:27-33.
- Shimazaki, K. and S. Uemoto. 1990. Micropropagation of terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22:237-244.
- Singh, F. and D. Prakash. 1985. Suspension culture technique for the culture of orchid embryos. *Gartebauwissenschaft* 50:236-238.
- Sisler, E.C. and M. Serek. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100:577-582.
- Sisler, E.C. and S.M. Blankenship. 1996. Method of counteracting an ethylene response in plants. U.S. Patent No. 5,518,988. US Patent Office, Washington, DC.
- Steel, R.G.D., J.H. Torrie, and D.A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 3rd ed. McGraw-Hill, New York.
- Steinbach, H.S., R.L. Benech-Arnold, and R.A. Sánchez. 1997. Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiol.* 113:149-154.
- Stewart, S.L. and L.W. Zettler. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquat. Bot.* 72:25-35.
- Stewart, S.L. and M.E. Kane. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86:147-158.

- Su, H.J. 2000. *Bulbophyllum*. In: D.E. Boufford, C.F. Hsieh, T.C. Huang, C.S. Kuoh, H. Ohashi, C.I. Peng, J.L. Tsai, and K.C. Yang (eds.). *Flora of Taiwan* 2nd ed., 5:760-776. Dept. Bot., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan.
- Suttle, J.C. and J.F. Hultstrand. 1994. Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 105:891-896.
- Swamy, B.G.L. 1949. Embryological studies in the Orchidaceae. II. Embryology. *Amer. Midland Naturalist* 41:184-201.
- Tan, K.H., R. Nishida, and Y.C. Toong. 2002. Floral synomone of a wild orchid, *Bulbophyllum cheiri*, lures *Bactrocera* fruit flies for pollination. *J. Chem. Ecol.* 28:1161-1172.
- Than, M.M.M., A. Pal, and S. Jha. 2009. In vitro flowering and propagation of *Bulbophyllum auricomum* Lindl., the royal flower of Myanmar. *Acta Hort.* 829:105-111.
- Thompson, D.I., T.J. Edwards, and J. Van Staden. 2006. Evaluating asymbiotic seed culture methods and establishing *Disa* (Orchidaceae) germinability in vitro: relationships, requirements and first-time reports. *Plant Growth Regulat.* 49:269-284.
- Thompson, D.I., T.J. Edwards, and J. Van Staden. 2007. A novel dual-phase culture medium promotes germination and seedling establishment from immature embryos in South African *Disa* (Orchidaceae) species. *Plant Growth Regulat.* 53:163-171.
- Thorpe, T.A. and D.D. Meier. 1974. Starch metabolism in shoot-forming tobacco callus. *J. Expt. Bot.* 25:288-294.
- Tsai, W.T. and C.Y. Chu. 2008. Static liquid culture of *Doritaenopsis* seedlings. *HortScience* 43:206-210.
- van der Kinderen, G. 1987. Abscisic acid in terrestrial orchid seeds: A possible impact on their germination. *Lindleyana* 2:84-87.

- Van Waes, J.M. and P.C. Debergh. 1986. In vitro germination of some western European orchids. *Physiol. Plant.* 67:253-261.
- Veen, H. and S.C. van de Geijn. 1978. Mobility and ionic form of silver as related to longevity of cut carnations. *Planta* 140:93-96.
- Wimber, D.E. 1963. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 32:105-107.
- Yamazaki, J. and K. Miyoshi. 2006. In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 98:1197-1206.
- Yang, S.F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. *HortScience* 20:41-45.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.
- Yi, Q.F., F.W. Xing, X.X. Huang, H.F. Chen, and F.G. Wang. 2005. Medicinal plants of *Bulbophyllum* species in China. *J. Trop. Subtrop. Bot.* 13:65-69.
- Yoder, J.A., L.W. Zettler, and S.L. Stewart. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci.* 156:145-150.
- Yu, Y.B. and S.F. Yang. 1980. Biosynthesis of wound ethylene. *Plant Physiol.* 66:281-285.
- Ziv, M. 1991. Quality of micropropagated plants-vitrification. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:64-69.