

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

金線連與彩葉蘭及其雜交種之菌根生理研究()

Studies on the Mycorrhizal Physisology of *Anoectochilus*, *Haemaria* and Their Hybrid.

計畫編號：NSC 88-2313-B-002-060

執行期限：87年8月1日~88年7月31日

計畫主持人：張喜寧 執行機構：國立台灣大學

摘 要

已由台灣地生蘭根部分離並純化出有用的8種蘭菌菌種，以綠豆小苗接種蘭菌，證實所分離的蘭菌並無致病性，而接種蘭菌於金線連及彩葉蘭具有促進種子發芽及小苗生長的作用，在瓶外之自然環境下接種皆可顯著促進彩葉蘭植株的生長，彩葉蘭無菌播種以花寶一號及花寶三號蔗糖以每升中添加20或30g者發芽率較佳，添加活性碳促進瓶內金線連植株的頂芽優勢，但不利於側芽的產生，椰子水的添加與否對植株生長無太大的影響，已知金線連的生長適溫為20/15，而本試驗結果證實，彩葉蘭的生長適溫為30/25。今年已在彩葉蘭及金線連開花時，經人工授粉取得果莢，以供進一步研究之用。

關鍵詞：彩葉蘭、金線連、蘭菌

Abstract

Eight kind of orchid mycorrhizal fungi (OMF) were isolated and purified from roots of terrestrial orchids in Taiwan. All of them showed no harmful effects for the growth of 7-days-old mungbean sprouts. The inoculation of OMF to *Anoectochilus formosanus* Hayata and *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* all showed significant enhancement for seed germination and seedling growth *in vitro* as well as those *in vivo*. *In vitro*, Hyponex No. 1 or 3 with either 20

or 30 g/l of sucrose in growth medium had higher germination rate for *Haemaria discolor*. For *Anoectochilus formosanus*. Activated carbon enhanced the expression of apical dominance but inhibited the formation of lateral buds. Also there was no significant effect for the presence of coconut water in the growth medium. It was known previously that the optimum temperature for the growth of *Anoectochilus formosanus* was 20/15 (day/night temperature), and the results showed that for *Haemaria discolor*, 30/25 was optimum. Many fruit capsules for both plants were collected by hand pollination, and the seeds will be useful materials for next years research.

Key words: *Haemaria discolor* var. *dawsoniana*, *Anoectochilus formosanus* Hayata, orchid mycorrhizal

緣由與目的

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 及彩葉蘭 (*Haemaria discolor* var. *dawsoniana*) 皆為多年生草本植物，兼具觀賞與藥用價值^(6,12)，本計畫以此材料進行蘭花菌根生理研究，期望瞭解蘭菌與蘭科植物間的關連性，並將組織培養技術與蘭菌的利用充分配合，解決目前金線連栽培不易，彩葉蘭販售不普遍的現象，為金線連與彩葉蘭的大量繁殖與生產，提供更新的繁殖方法與技

術，並使更多人重視蘭花菌根應用的研究與應用⁽⁴⁾。

材料與方法

一、絲核菌屬蘭菌的篩選培養與純化

取蘭花之根部沖洗乾淨，於 1 % 次氯酸鈉下消毒 15 分鐘，然後以無菌水洗滌三次，切取一小段根置於 1/6 PDA 中，放在黑暗下培養，斷定其是否有蘭菌存在，之後將菌絲挑到 PDA 培養基，進行純化的工作。

二、蘭菌對綠豆芽致病性的調查

綠豆種子置於內含栽培介質（泥炭苔:蛭石=1:1（v/v））之直徑8公分的圓形塑膠盆，並加入5 % V-8juice，種子發芽後，取發芽後之綠豆小苗進行蘭菌小塊接種，接種量約為 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 的菌種，觀察綠豆幼苗的生長狀況共七天，以瞭解所分離的菌種是否具有致病性⁽⁵⁾。

以下依試驗材料分別進行金線連及彩葉蘭試驗：

彩葉蘭部分：

一、培養基成分對彩葉蘭生長之影響

（一）花寶培養基試驗：

取彩葉蘭種子播種，分別置於花寶培養基中，每升使用三克花寶一號、花寶二號、花寶三號（N-P-K：10-30-20）、花寶四號及花寶五號，加 tryptone 3 g/l、蔗糖 20 g、洋菜 7.8 g 及 pH=5.2，每一處理十五重複。

（二）蔗糖濃度試驗：

取彩葉蘭種子，置於 MS 培養基中，並將蔗糖濃度調整為 0、10、20、30、40、50 g/l，加 tryptone 3 g/l、蔗糖 20 g、洋菜 7.8 g 及 pH=5.2，每一處理十五重複。

二、溫度與蘭菌對彩葉蘭生長之影響

（一）溫度對彩葉蘭生長之影響：

取剛長出二片約 1cm 小子葉的彩葉蘭出瓶小苗，於根基旺三號介質中，置於日/夜溫度分別為 15/13、20/15、25/20、30/25 的人工氣候室，每一處理十五重複。

（二）蘭菌對彩葉蘭生長之影響：

取彩葉蘭 0.5 公分的植株，分別置於 WM、WY 及燕麥等培養基中，並接種約 1 mm^2 蘭菌菌種（代號 R.01）及未接種，觀察植株的生長情形，每一處理十五重複。

（三）測試蘭菌管內與管外接種技術

取彩葉蘭經人工授粉後 45 天之果莢，試管內播種以酒精擦拭及 1% 次氯酸鈉消毒 7-15 分鐘，再以無菌水洗滌三次，取出種子並播種於燕麥培養基分別接種蘭菌（R.01 R.08）。試管外則將種子灑播於含有蘭菌之彩葉蘭母株及不含蘭菌之母株旁邊，並以花寶三號為培養基之組培苗作對照，觀察種子的發芽情形，每一處理十重複。

金線連部分：

培養基成分及介質對金線連生長之影響

（一）蔗糖濃度試驗：

取五公分的金線連小苗，置於 MS 培養基中，並將蔗糖濃度調整為 0、10、20、30、40 及 50 g/l，加 tryptone 3 g/l、蔗糖 20 g、洋菜 7.8 g，pH=5.2，每一處理十五重複。

（二）活性碳濃度試驗：

取金線連 3-4 公分的幼苗，置於 MS 培養基，並將活性碳濃度調整為 0、1、2、3、4 g/l，加 tryptone 3

g/l、蔗糖20 g、洋菜7.8 g， pH=5.2，每一處理十五重複。

(三) 生長介質對金線連生長之影響

取大小約3公分的金線連植株，分別置於不同栽培介質中，栽培介質分別為(1) 根基旺三號(G3)、(2) 根基旺三號:BVB#2 =1:1 (v/v) (GB) 及(3) 根基旺三號:BVB#2:泥炭苔=1:1:1 (v/v/v) (GBP)，觀察植株的生長情形，共十五重複。

結果與討論

一、絲核菌屬蘭菌的篩選培養與純化

由台灣各地所收集到的地生蘭根部，可分離並篩選出蘭菌，並將純化的蘭菌保存在馬鈴薯葡萄糖培養基。在菌種篩選時需將細菌即其他非絲核菌屬之真菌去除，以防止其污染到菌種的純化工作⁽⁷⁾。已由不同來源的地生蘭根部分離出數種蘭菌菌種，但仍繼續收集不同來源的蘭科植物，取其根部作菌種分離及鑑定的工作。

二、蘭菌對綠豆芽致病性的調查

由試驗結果顯示，由蘭科植物根部所分離的菌種，接種於綠豆小苗，一星期之後觀察皆無病徵，綠豆植株生長良好，皆無倒伏現象，故推測所分離之蘭菌皆無致病性。

彩葉蘭部分：

一、培養基成分對彩葉蘭生長之影響

(一) 花寶培養基試驗：

彩葉蘭種子發芽以花寶一號及三號的發芽率較佳，發芽率都在40-50%，而花寶四號及五號的發芽率為零。建議彩葉蘭之種子發芽可使用花寶1,2,3號，但使用花寶二號者需要在

種子發芽形成原球體之前即進行移植的工作，而花寶一號及花寶三號則可等到小苗期再移植⁽⁴⁾。

(二) 蔗糖濃度試驗：

添加20或30g蔗糖對彩葉蘭的發芽率較佳，未添加蔗糖者發芽率為零，推薦以添加20g為宜，因其效果與30g者類似，但可省33%成本。故認為適當的蔗糖濃度具有促進種子發芽的功效，但蔗糖濃度過高或過低都會降低發芽率。

二、溫度與蘭菌對彩葉蘭生長之影響

(一) 溫度對彩葉蘭生長之影響：

彩葉蘭於不同日/夜溫度的生長，以30/25 的生長效果最佳，其鮮重為15/13 的5.4倍，在低溫有生長緩慢且停滯的現象，故認為彩葉蘭具有耐高溫的作用，極適合在台灣推廣種植⁽¹⁾。

(二) 蘭菌對彩葉蘭生長之影響：

接種蘭菌(R.01)以生長在燕麥培養基最佳，無論株高、鮮重等都可達到極顯著差異，故選用適當的培養基，是影響試驗成功與否的重要關鍵。而培養基過於營養，則植株會被蘭菌所覆蓋無法生長，但完全無營養份則植物生長不良。

(三) 測試蘭菌管內與管外接種技術

在燕麥培養基中，未接種種子無法發芽，接種R.02之發芽率可達36.6%，其餘菌種皆不發芽。故認為接種蘭菌對燕麥培養基種子發芽是必須的，但所接種的蘭菌是否適合種子的發芽需要經過篩選。

在試管外未接菌則發芽率為零，而播於有蘭菌的母株旁之發芽率約0.01%，將接種發芽與組織培養的植

株相比較，其鮮重可增加2.4倍等。故於自然環境下，須有蘭菌的參與種子才能發芽，但此法繁殖之植株株數偏低，僅能提供趣味栽培之用，無法達到快速大量繁殖植株的目標。

金線連的部分：

培養基成分與介質對金線連生長之影響

(一) 蔗糖濃度試驗：

在小苗生長過程中，以添加20克蔗糖的生長最佳，無論在株高、鮮重等都有極顯著差異。故適當的添加蔗糖可促進植株的生長勢，但過與不及對植株的生長皆不佳。

(二) 活性碳濃度試驗：

在MS培養基中，添加活性碳則植株不長側芽，但可促進植株的生長，故推測添加活性碳對金線連側芽的生長具有抑制作用。

(三) 生長介質對金線連生長之影響

三種不同的培養基中，以G3及GB的效果較GBP為佳，建議在栽培介質的選擇上，盡量採用商品化且實用的栽培介質為佳。即以材料取得容易，不需花費人工再進行混土，透氣性及通水性佳的材質為主，如此才能達到省工栽培，並提高植株的產量。

結 論

將已純化完全的菌種，接於綠豆苗無致病性反應，將蘭菌接種於彩葉蘭及金線連小苗，皆具可促進植株的生長與發育，而蘭菌的有效利用，須配合適當的培養基成分，方可使蘭菌的發揮功效。使用花寶1,2,3號培養基，皆可促進種子發芽，尤以花寶一號及三號較佳，故使用簡易的培養基配方，即可達到促使種子發芽，達到

大量繁殖的目的，應可將此培養基配方推廣給農民使用，降低生產成本及時間。將彩葉蘭種子播在含有蘭菌的母株旁，約有0.01 % 的發芽率，此法可作為業餘蘭花栽培者自行播種之用，但產業上的大規模繁殖，還是配合組織培養技術為宜。彩葉蘭及金線連的果莢收集，可經由人工授粉方式取得，但在授粉前需先知到植株花朵的形態構造，如花粉塊及蕊柱等構造的位置，才能提高授粉成功率，使植株的授粉成功率達到100 %。

參考文獻

1. 周玲勤、張喜寧. 1999. 彩葉蘭之栽培管理. 中國園藝45(1):11-18.
2. 周玲勤、張喜寧. 1999. 彩葉蘭之無菌播種與小苗生長. 植物種苗1:57-67.
3. 周玲勤. 1997. 彩葉蘭之大量繁殖與蘭菌的利用. 國立台灣大學園藝所碩士論文. 124頁.
4. 張喜寧. 1999. 菌根真菌在花卉之研究與應用. 引進海外新科技-農業生物技術研討會. 國立屏東科技大學編印. 第21頁.
5. 陳智信. 1995. 台灣土壤中的雙絲絨菌. 國立台灣大學植物病蟲害研究所植物病理組碩士論文. 64頁.
6. 蔡靜怡. 1997. 蘭菌及溫度對台灣金線連生長之影響. 國立台灣大學園藝所碩士論文. 80頁.
7. Baruch, S. , B. Lee. and O. Akira. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS. Press. The American Phytopathological Society. 133pp.
8. Jorgensen, B. I. 1995. Hardy Orchids : symbiotic *in vitro* propagation cultivation. Acta. Hort. 393 : 165 - 170.

