

臺灣嚴重瀕絕植物-紫芋蘭之無菌播種與植株再生

Asymbiotic germination and plant regeneration of *Eulophia dentata* Ames, a critically endangered plant in Taiwan

張麗慧* 劉丞祥 李權裕

Li-Hui Chang*, Cheng-Hsiang Liu and Chiuan-Yu Li

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 55244 南投縣集集镇民生東路 1 號

Endemic Species Research Institute, Jiji, Nantou, Taiwan

*通訊作者: joann@tesri.gov.tw

*Corresponding author: joann@tesri.gov.tw

摘要

依據臺灣維管束植物紅皮書初評名錄對 4,174 種適用評估物種中，紫芋蘭(*Eulophia dentata* Ames)為嚴重瀕臨絕滅(Critically Endangered, CR)植物，其近 80 年來僅見於兩個分布地，個體數量僅 50~250 株，因分布狹窄且生育地易受干擾破壞，急待進行保育之研究。本研究以修正無菌播種 MS 培養基巨量元素減半為 1/2 或 1/4，並於培養基中添加香蕉泥(banana homogenate, BH)、椰子水(coconut water, CW)、馬鈴薯(Potato, PO)及蛋白胨(peptone, PET)等有機添加物，結果顯示暗培養 35~40 天以 1/2 MS+ PET、1/4 MS+ PET 及 1/4 MS+CW 培養基中，擬原球體(Protocorm Like Bodies, PLBs)形成數分別 301.17 ± 75.47 、 297.33 ± 73.43 和 286.00 ± 41.79 為最多，較其他培養基有顯著性差異。而 PLBs 芽體增殖試驗經培養 4 個月，平均 1 個 PLB 可誘導 8.27 ± 3.68 個芽體，且可繼續發育成型態正常之小植株。本研究成功建立臺灣嚴重瀕絕植物紫芋蘭無菌播種與小植株再生，可作為臺灣嚴重瀕絕植物繁殖、種原保存及後續復育再引回之基礎研究。

Abstract

According to the A Preliminary Red List of Taiwanese Vascular Plants, *Eulophia dentata* belongs to the category of Critically Endangered (CR). Nearly 80 years ago only two habitats have been found. The number of individuals are only about 50-250 strains. The specie's narrow distribution and vulnerability to disturbance make it an urgent case for conservation researches. In this study, we successfully established a protocol for asymbiotic germination and plant regeneration of *Eulophia dentata* Ames, a critically endangered plant in Taiwan. Seeds of this species were collected in a native habitat, and their surface were disinfected before growing *in vitro* on 1/2 MS and 1/4 MS medium. Organic growth supplements such as banana homogenate, coconut water, potato, and peptone were added. After 35 to 40 days of dark culture, embryos grew to protocorm, followed by plantlet formation. Results show that the medium 1/2 MS+PET, 1/4 MS+PET, and 1/4 MS+CW were the best for PLBs formation. The shoots proliferated from PLBs and were maintained by subculturing on the 1/2 MS medium. On average, 8.27 ± 3.68 shoots could be obtained from a PLB after being transferred to the 1/2 MS medium. Shoot buds elongation and root formation occurred after four months of culture. This study could be used as a reference for endangered plants propagation, germplasm preservation, and restoration in Taiwan.

關鍵字：紫芋蘭、無菌播種、嚴重瀕絕

Key words: *Eulophia dentata*、Asymbiotic germination、Critically Endangered(CR)

收件日期：2013年12月18日 接受日期：2014年03月24日

Received: December 18, 2013 Accepted: March 24, 2014

緒 言

蘭科(Orchidaceae)植物是維管束植物中種類最豐富的一群(約20,000種),幾乎地球的每個生態環境都可以看到蘭花的蹤跡;由於其花型奇特且具有高度的觀賞價值,因此許多野生的蘭花面臨被過度採集的命運,加上其生育地的破壞,應有保育這群植物的措施(東亞野生物貿易研究委員會,Trade Record

Analysis of Flora & Fauna in Commerce East Asia)。目前全世界所有蘭科植物均列入瀕臨絕種野生動植物國際貿易公約(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora;又稱華盛頓公約;簡稱CITES)附錄中(<http://www.cites.org/>)。臺灣的蘭科植物是維管束植物中物種最多的一群(Huang *et al.* 2003),紫芋蘭(*Eulophia dentata* Ames)依據臺灣維管束植物誌第二版第六卷

學名修正，為蘭科芋蘭屬(*Eulophia*)植物，另根據臺灣維管束植物誌第二版第五卷之敘述，其假球莖卵形，高 3cm，直徑 2-2.5 cm，4-5 節。葉於開花後出現，線形 2 至 4 片，長 10-25 cm，寬 3-5 cm 銳尖至漸尖。花莖直立、細長，由假球莖上的節抽出，約 20-40 cm 高，總狀花序 10-15 cm 長，花鞘紫色數個，苞片披針形，長 5-10 mm，花梗與子房長約 7-11 mm，花紫色下垂(圖 1A)，萼片線狀橢圓形，長 8-13mm，寬 1.5-2.5 mm (Huang *et al.* 2000)。目前有關臺灣原生芋蘭屬植物相關文獻有研究禾草芋蘭(*E. graminea* Lindl.)試管內開花與配育系統的研究 (Chang *et al.* 2010)。依據臺灣維管束植物紅皮書初評名錄之調查資料，紫芋蘭雖然宜蘭和台東皆有發現記錄，但近八十年來卻僅見於宜蘭縣南澳地區及苗栗縣沙岸兩處，生育地為開闊河床之草原荒地，全日照，砂質壤土。個體數 50~250 株，在物種保育屬嚴重瀕臨絕滅(Critically Endangered, CR)等級，其接近人為開發頻繁地區，若不加保護及復育，目前現有分布之族群很可能會再消失(王等 2012)。

面對全球在氣候變遷及人為干擾，對臺灣瀕危植物造成嚴重的威脅，物種的滅絕不只是單一物種的問題，它可能代表著棲地環境的劣化、授粉昆蟲族群的變化、取食該物種生物及後續層層生物鏈的交互影響。目前利用體外繁殖方法對於瀕危植物物種繁殖、遺傳多樣性的保育及利用上，被視為可行性的替代方法(Wochok 1981; Fay 1994)。而利用有性的種子或孢子較無性繁殖材料有更廣泛的遺傳基礎，且其遺傳多樣性得以有效的保存(Fay 1992)。利用此技術建立繁殖體系除可供臺灣嚴重瀕臨滅絕植物種原保存外，另可作為進行研究及再引回之補充，藉此期望能

減緩臺灣瀕絕植物的滅絕速度，並保存該族群之遺傳多樣性，以符合國際上生物多樣性保育的目標與國人對於保育研究的期待。

材料與方法

植物材料、培植體準備與表面殺菌

於 2013 年 3 月在苗栗縣溪邊砂床紫芋蘭生育地採集不同植株之未熟果莢，攜回實驗室後，果莢先以 75 % 酒精擦拭，再以 2 % 次氯酸鈉表面消毒 15 分鐘後，於無菌操作台以無菌水沖洗 3 次，再進行無菌播種。

無菌播種培養基及培養環境

經表面消毒後之果莢於無菌操作台內接種於 1/2 及 1/4 MS (Murashige & Skoog 1962) 基礎培養基，並添加香蕉泥(BH) 50gL⁻¹、椰子水(CW)100gL⁻¹、馬鈴薯(PO) 50gL⁻¹ 及蛋白胨(Peptone)-(PET) 1gL⁻¹，共 7 種不同組合接種培養基，Sucrose (3%)、gelrite 3g L⁻¹，每處理 6 重複，培養基 pH 在加入 gelrite 前調整為 5.2，於高溫(121°C)高壓(15psi)滅菌 20 分鐘。播種培養容器為 9 公分之無菌培養皿。播種培養環境溫度於 25±2°C，暗處理。

芽體增殖及小植株再生試驗

選取紫芋蘭無菌播種發芽之 PLBs 約 0.1~0.15cm，分別接種於芽體增殖培養基 1/2 MS 添加 BA (N⁶-benzyladenine)，濃度為 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mgL⁻¹ 及 kinetin (6-urfurylaminopurine)，濃度為 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mgL⁻¹ 之組合培養基內，共 25 種，sucrose (3%)、activated charcoal (1%)、gelrite 3g L⁻¹，每一培養基接種 3 個 PLB，每處理 4 重複。培養基 pH 在加入 gelrite 前調整為 5.2，於高溫

(121°C)高壓(15psi)滅菌 20 分鐘。培養容器為 5 公分廣口瓶，誘導植株再生環境溫度 25±2°C，光照(2,500-3,000Lux)、14 小時光週期。

試驗設計與統計分析

數據均以 SPSS (SPSS for windows, 2013, SPSS Inc.) 統計軟體分析，顯著誤差為 $P < 0.05$ 。

結 果

一、無菌播種 PLBs 之形成

本研究以無菌播種方式建立紫芋蘭實生苗之再生，取紫芋蘭未熟果莢(圖1B)消毒後於無菌操作台進行無菌播種，種子(圖1C)播種於7種培養基內，經暗培養 35-40 天，以 1/2 MS+PET、1/4 MS+PET 和 1/4 MS+CW 培養基胚膨大冒出種皮形成米白色 PLBs (圖1D) 平均數分別為 301.17 ± 75.47 、 297.33 ± 73.43 和 286.00 ± 41.79 為最多，參試之 7 種不同培養基所形成之 PLBs 數量以統計軟體分析呈現(表1)。

表 1. 添加不同有機生長添加物對紫芋蘭無菌播種形成 PLBs 之影響

Table 1. Effect of different organic growth supplement for asymbiotic germination and PLBs formation of *E. dentata*

Medium	Shoots number(mean±SD)
1/2 MS	124.83±18.85 ^a
1/2 MS+PET	301.17±75.47 ^b
1/4 MS	130.83±39.60 ^a
1/4 MS+PET	297.33±73.43 ^b
1/4 MS+CW	286.00±41.79 ^b
1/4 MS+PO	148.67±30.15 ^a
1/4 MS+BH	170.00±26.12 ^a

註：a、b 字母相同者為差異不顯著，不同者為差異顯著。



圖 1. 紫芋蘭無菌播種 PLBs 形成與發育。A. 紫芋蘭原生地開花植株。B. 未熟果莢內之種子。C. 種子 300 倍電子顯微照片。D、E. 白色 PLB 不同生長發育階段。(bar=1cm)

Fig. 1 Asymbiotic germination and PLBs formation of *E. dentata*. A. Flowering plant in native habitat. B. Seeds of immature fruit. C. Seeds (Scanning electron microscopic). D, E. Various phases of PLB development.

(一) 巨量元素之減半為 1/2 及 1/4

1. 1/2 MS 與 1/4 MS 培養基之比較

此試驗中培養基之巨量元素減半為 1/2 及減為 1/4，其 PLBs 形成數平均為 124.83 ± 18.85 及 130.83 ± 39.60 ，兩者 PLBs 形成數並無顯著性差異。

2. 1/2 MS+PET與1/4 MS+PET培養基之比較

此試驗中PLBs形成平均數為 301.17 ± 75.47 及 297.33 ± 73.43 ，形成數量上並無顯著性差異，故可以1/4MS作為基礎之培養基。

(二) 培養基添加PET之差異

1/2 MS、1/2 MS+PET與1/4 MS、1/4 MS+PET比較。1/2 MS在未添加PET與添加後，PLBs形成平均數由 124.83 ± 18.85 增加為 301.17 ± 75.47 (表1)，形成數量增加2.41倍。另1/4 MS在未添加PET與添加後，PLBs形成平均數由 130.83 ± 39.60 增加為 297.33 ± 73.43 (表1)，數量亦增加2.27倍。由此可見，無論接種於1/2或1/4 MS培養基內，添加PET，結果顯示在PLBs形成數量上有顯著性之差異，因此添加PET有助於紫芋蘭無菌播種PLBs之形成。

(三) 1/4 MS 培養基與1/4 MS添加PET、CW、BH、PO培養基比較

在表1 中以1/4 MS為基礎培養基下，添加PET、CW、BH、PO，添加PET和CW之有機添加物，其結果顯示PLBs形成平均數分別為 297.33 ± 73.43 及 286.00 ± 41.79 ，形成之數量與完全不添加之對照組數量有顯著性差異，因此添加此二類添加物有助於PLBs之形成。而添加BH和PO，PLBs形成平均數分別為 170.00 ± 26.12 及 148.67 ± 30.15 ，PLBs形成數則與對照組無顯著性之差異。

二、PLBs 芽體增殖及小植株再生之建立

上述紫芋蘭無菌播種 PLBs 均勻形成後，取0.1-0.15 cm大小之PLBs接種於芽體增殖培養基內，此培養基是以1/2 MS添加BA及kinein之25種組合培養基，經過4個月之培

養，各培養基所增殖之芽體數在5.08-11.75個/PLB，各培養基之間所增殖之芽體數並無顯著性之差異(表2)。此試驗結果顯示0.1-0.15 cm大小之PLBs接種於25種不同組合培養基中，在培養期間PLBs平均有41.67%之褐化率(表2)，而這些PLBs無法再繼續生長與發育(圖2A)，經4個月之培養，只有58.33%之PLBs正常分化與發育(圖2B、C)，且隨芽之伸長(圖2D)，亦有少數根之形成，並發育為型態正常小植株(圖2E、F)。

表 2. Cytokinins 對紫芋蘭 PLBs 芽體增殖之影響及 PLBs 褐化情形

Table 2. Effect of various types of cytokinins on shoot multiplication through PLBs and PLBs browning of *E. dentata*

BA(mg L ⁻¹)	Kn(mg L ⁻¹)	Shoots number(mean±SD)	Browning(%)
0	0	8.17±4.20	16.67
0	1	10.71±4.52	16.67
0	2	7.04±4.26	41.67
0	3	9.00±4.16	50.00
0	5	7.92±2.71	50.00
1	0	8.67±2.46	58.33
1	1	7.67±2.93	33.33
1	2	8.08±3.42	41.67
1	3	11.08±3.63	41.67
1	5	8.75±3.86	33.33
2	0	7.67±3.52	8.33
2	1	10.83±3.27	58.33
2	2	8.17±4.06	83.33
2	3	9.08±3.32	50.00
2	5	6.00±3.57	41.67
3	0	8.92±2.78	58.33
3	1	7.00±2.13	75.00
3	2	8.92±3.90	8.33
3	3	9.75±3.49	25.00
3	5	11.75±4.16	50.00
5	0	5.75±1.96	50.00
5	1	8.25±3.70	25.00
5	2	5.67±1.56	33.33
5	3	5.08±1.24	66.67
5	5	6.92±3.68	25.00
平均		8.27±3.68	41.67

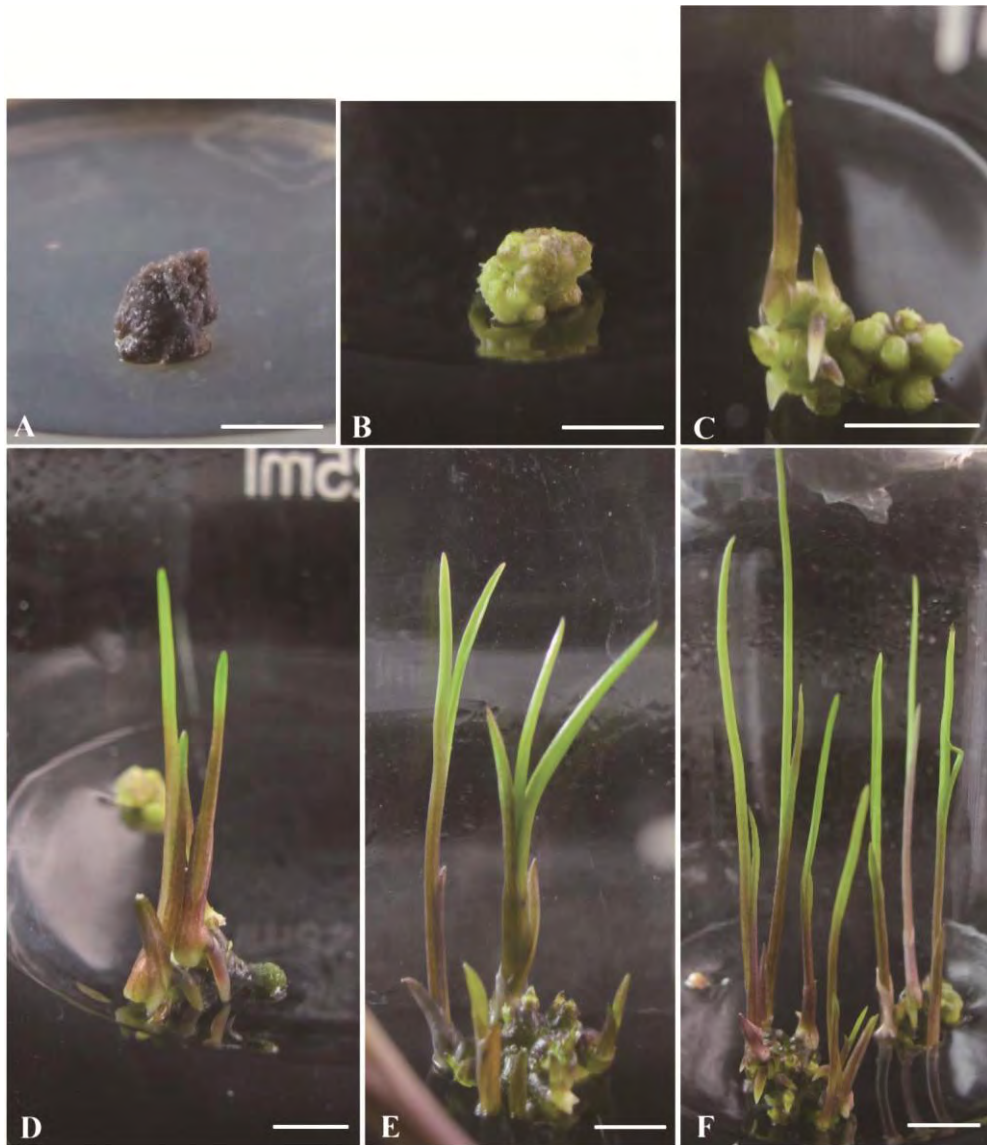


圖 2. 紫芋蘭小植株瓶苗之建立。A. PLBs 褐化情形(bar=5mm)。 B. PLBs 芽體增殖情形 (bar=5mm)。 C、D. PLBs 芽體伸長及形成少數根(bar=1cm)。 E、F. PLBs 發育為 型態正常之小植株(bar=1cm)。
Fig. 2. *In vitro* plantlet regeneration from PLBs of *E. dentata*. A. Browning of PLBs. B. Formation of multiple shoots from PLB. C, D. Elongation of shoots and few roots formation from PLB. E, F. Plantlet regeneration from PLBs.

討 論

雖然有機添加物對生長之影響機制很複雜，但添加有機氮化合物於含無機鹽類培養基中已廣泛被應用在蘭科作物之微體繁殖 (Arditti and Ernst 1993; Arditti 2008; George *et al.* 2008)，如 BH、CW、PET 及胰蛋白胨 (tryptone) 及酪蛋白水解物 (casein hydrolysate) 等，這些物質含多肽或游離胺基酸，可促進蘭花種子發芽和實生苗之生長 (Huang *et al.* 2001; Pierik *et al.* 1988)，另可促進癒合組織之增殖 (Chen and Chang 2000)、癒合組織形成 PLBs 及 PLBs 之再生 (Shina and Roy 2004)，而本研究添加之有機添加物含 BH、CW 及 PET。先前的研究報告中有類似結論指出有機生長添加物質 (BH、CW、PET) 對於植物 PLBs 生長分化與實生苗進一步發育有促進之效果 (Arditti 1979)。而 BH 在先前文獻亦指出有促進石斛蘭屬 (*Dendrobium*) PLBs 之再生、萬代蘭屬 (*Vanda*) 莖之伸長及紫苞舌蘭屬之 *Spathoglottis kimbalianai* 葉的培養 (Aktar *et al.* 2008; Minea *et al.* 2004; Sudeep *et al.* 1997)。相反地高濃度 BH 75gL^{-1} 對於蕙蘭屬 *Cymbidium pendulum* 之生長是不利的 (Saranjeet and Bhutani 2012)。而本研究試驗 BH 對於紫芋蘭無菌播種 PLBs 之形成數與對照組之形成數並無顯著性之差異，但有可能助於 PLBs 後續之發育分化與小植株之再生。

有關 CW 文獻報導相當多，在石斛蘭屬雜交種亦有類似生長促進之影響 (Lekha Rani *et al.* 2005)。CW 的影響亦包括誘導細胞分裂、促進 PLBs 早期之分化 (Intuwong and Sagawa 1973)。還有促進一些附生蘭花生長與發根 (Mcintyre *et al.* 1974)。CW 亦成功誘導了萬代蘭屬之 *Vanda teres* PLBs 莖分化和蝴蝶蘭屬之

Phalaenopsis gigantean PLBs 之增殖 (Murdad *et al.* 2006)。此外文獻揭示 PET 為水溶性蛋白水解物，有高成分之胺基酸，可促進植物於無菌培養中之生長。PET 在培養蕙蘭屬 (*Cymbidium*) 植物亦有類似的影響 (Kusumoto and Furukuwa 1977)。而在蝴蝶蘭屬 (*Phalaenopsis*)、朵麗蝶蘭屬 (*Doritaenopsis*) 與鳳蘭屬 (*Neofinetia*) 蘭花亦會刺激癒合組織生長 (Ichihashi and Islam 1999)、促進芭菲爾鞋蘭屬 (*Paphiopedilum*)、鶴頂蘭屬 (*Phaius*)、萬代蘭屬及鴿子蘭屬 (*Peristeria*) 實生種子苗進一步的生長發育 (Curtis 1947; Pierik *et al.* 1988; Bejoy *et al.* 2004)。本研究試驗之培養基中添加 CW 和 PET 結果數據顯示，1/4 MS+PET、1/2 MS+PET 和 1/4 MS+CW 所形成之 PLBs 平均數較完全不添加之對照組有顯著性差異，其有效促進紫芋蘭無菌播種 PLBs 之形成及其 PLBs 早期之生長發育。

有機生長物質添加於蘭花培養基，在商業生產利用上簡單且有益於一般傳統方法，是於改善植物培養期間之生長發育。在本研究中，利用的有機生長添加物質 PET、CW，這 2 種添加物質內含之成分可能負責促進植物 PLBs 生長與發育，但其確切之影響因子及其機制仍需更進一步之研究。本研究試驗有機生長添加物或 MS 培養基鹽類成分減半或 1/4 試驗，建立紫芋蘭種子從無菌播種形成 PLBs、PLBs 之生長發育、芽體增殖及植株再生等，結果顯示播種培養基以 1/2 MS+PET、1/4 MS+PET 及 1/4 MS+CW 所形成之 PLBs 和早期小植株發育有明顯之促進。由此，我們可選擇最簡單且較低成本之配方建立臺灣嚴重瀕絕植物紫芋蘭之繁殖體系，以期未來有利於簡化種原保存程序，並可節省成本。

本研究在 PLBs 增殖芽體 Cytokinins

(BA、Kn)試驗中，各培養基間所形成之平均芽體數於 8.27 ± 3.68 個/PLB，在各組合培養基間並無顯著性之差異，其可能之原因：(1) 參試之 PLBs 褐化率平均高達 41.67%，同時在培養基內釋放紅褐色之物質，這物質推測可能為抑制 PLBs 發育成小植株之限制因素之一，但此物質成分未確定，未來可進一步研究或探討此抑制物之成分或尋求避免其生成之方法。(2) 芽體增殖所選取之 PLBs 大小在 0.1-0.15cm，結果顯示褐化率高且發育時間長達近 4 個月，未來可依 PLBs 之不同發育階段嘗試試驗(圖 1E)，進一步的探討其 PLB 發育階段是否為加速發育成小植株或降低褐化率之因子。

本研究取未熟果莢進行臺灣嚴重瀕絕植物紫芋蘭之無菌播種與 PLBs 芽體增殖，其 1 個 PLB 可誘導 8.27 ± 3.68 個芽，並發育成型態正常之小植株。由於成本、繁殖效率和種原保存等方面之考量下，在添加生長調節劑 BA 和 Kinetin 之組合培養基中，對於紫芋蘭 PLBs 芽體增殖上並無顯著性之差異，故選擇以不添加任何生長調節劑之 1/2 MS 培養基，作為繁殖、後續繼代及種原保存之基礎培養基。

謝 誌

感謝農業委員會特有生物研究保育中心支持本研究計畫。另感謝本中心黃助理研究員朝卿及與計畫助理王一霖小姐協助野外調查與採種工作。感謝審查委員對文稿的建議與修正。

引用文獻

王震哲、邱文良、張和明。2012。臺灣維管束植物紅皮書初評名錄。行政院農業委員會

特有生物研究保育中心及臺灣植物分類學會。

- Aktar, S., K. M. Nasiruddin and Hossain K. 2008. Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid. *Journal of Agricultural and Rural Development* 6: 69-74.
- Arditti, J. 1979. Aspects of physiology of orchids. *Advances in Botanical Research* 7: 421-655.
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 434-466.
- Arditti, J. 2008. *Micropropagation of orchids* 2nd Edition. Blackwell Publishing Ltd. pp. 63-83.
- Bejoy, M., S. C. Kumar, B. J. Radhika and J. Joemon. 2004. Asymbiotic seed germination and early seedling development of the dove orchid *Peristeria elata* Hook. *The Journal of the Orchid Society of India* 17: 75-79.
- Bhasker, J. 1996. *Micropropagation of Phalaenopsis*. [Ph.D. Thesis.] Thrissur, Kerala Agricultural University.
- Chang, C., W. H. Hu, Y. C. Chen, Y. L. Su and Y. T. Chiu. 2010. *In vitro* flowering and mating system of *Eulophia graminea* Lindl. *Botanical Studies* 51: 357-362.
- Chen, J. T. and W. C. Chang. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Science* 160: 87-93.
- Chen, J. T. and W. C. Chang. 2002. Effects of tissue culture conditions and explants

- characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 41-44.
- Curtis, J. T. 1947. Studies on nitrogen nutrition of orchid embryos. I. Complex nitrogen sources. *American Orchid Society Bulletin* 16: 654-660.
- Fay, M. F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? *Biodiversity and Conservation* 3:176-183.
- Fay, M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 28P : 1-4.
- George, E. F., M. A. Hall and D. K. Geert-Jan. 2008. *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition. Springer, The Netherlands.
- Huang, L. C., C. J. Lin, C. I. Kuo, B. L. Huang and T. Murashige. 2001. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 91: 111-121.
- Huang, T. C. and Editorial Committee of the Flora of Taiwan. (eds.). 2003. *Flora of Taiwan*, Volume Six. 2nd ed. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan. pp. 130-139.
- Ichihashi, S. and M. O. Islam. 1999. Effect of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 68: 269-274.
- Intuwong, O. and Y. Sagawa. 1973. Clonal propagation of sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescences. *American Orchid Society Bulletin* 42: 264-270.
- Kusumoto, M. and J. Furukuwa. 1977. Effect of organic matter on growth of *Cymbidium* protocorms cultured *in vitro*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 45: 421-426.
- Lekha Rani, C., C. Vidya, K. Rajmohan and S. T. Mercy. 2005. Protocorm differentiation and seedling growth in *Dendrobium* hybrid seed cultures as influenced by organic additives. *The Journal of the Orchid Society of India* 19: 67-70.
- Mcintyre, D. K., G. J. Veitch and J. W. Wrigley. 1974. Australian orchids from seeds II. Improvement in techniques and further successes. *American Orchid Society Bulletin* 43: 52-53.
- Minea, M., C. Piluek, T. A. Menakani and S. Tantiwiwat. 2004. A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis kimbali*. *Journal of National Academy of Sciences* 38: 141-156.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murdad, R., S. K. Hwa, C. K. Seng, A. M. Latip, A. Z. Aziz and R. Ripin. 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. *Scientia Horticulturae* 111: 73-79.
- Pierik, R. L. M., P. A. Sprenkels, B. Van Der

- Hask and Q. G. Van Der Meys. 1988. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro. *Scientia Horticulturae* 34: 139-153.
- Saranjeet, K. and K. K. Bhutani. 2012. Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb) Sw. *Horticultural Science* 39: 47-52.
- Shina, P. and S. K. Roy. 2004. Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through *in vitro* culture. *Plant Tissue Culture* 14: 55-61.
- Su, H. J. 2000. Orchidaceae. pp. 876-878. *In*: Huang, T.C. and Editorial Committee of the Flora of Taiwan. (eds.). *Flora of Taiwan*, Volume Five. 2nd ed. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Sudeep, R., P.K. Rajeevan, P.K. Valasalakumari and C.K. Geetha. 1997. Influence of organic supplements on shoot proliferation in *Dendrobium*. *Journal of Horticulture* 3: 38-44.
- Wochok, Z.S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biodiversity and Conservation* 20:83-89.