

四季蘭栽培品種花粉萌芽特性之研究¹

陳美齡²、洪惠娟²、陳裕星³

摘 要

利用修正的花粉離體培養方法，分別探討四季蘭各栽培種不同開花日數及開花期之花粉萌芽率，以及冷凍保存90日對‘鐵骨’素心蘭花粉萌芽率之影響，以供四季蘭授粉及花粉保存之應用參考。結果顯示四季蘭不同品種間的花粉萌芽率在不同開花日數間略有差異，‘招財’四季蘭以開花第1~3日採集的花粉萌芽率較佳，‘向日葵’四季蘭則以開花第1~5日採集的花粉萌芽率較佳。四季蘭不同品種間的花粉萌芽率在不同開花期略有差異，其中‘彩虹’四季蘭在6及8月開花期的花粉萌芽率差異不大，‘玉花’四季蘭及‘赤芽’素心蘭花粉萌芽率則以6月開花期較高，8月開花期的花粉萌芽率較低。‘鐵骨’素心蘭之花粉冷凍保存90日後取出回溫並測試其花粉萌芽率，以開花第3日所採集的花粉萌芽率顯著高於其他開花日數採集的花粉。

關鍵詞：開花日數、花粉貯藏、花粉活力

前 言

四季蘭(*Cymbidium ensifolium*)屬地生性蕙蘭，在中國大陸被稱作「建蘭」，是以主要產地在福建省而得名，為建蘭亞屬植物⁽⁵⁾。拉丁文學名中，屬名蕙蘭屬(*Cymbidium*)是由希臘文的cymbid(船)演變而來，依其唇瓣的形狀命名，種小名ensifolium是形容葉片直立如劍^(13,16)。野生個體廣泛分佈於日本、中國南部、印度北部、錫金、中南半島、泰國、馬來西亞、印尼及新幾內亞，臺灣也在它的分布範圍之內⁽¹³⁾，喜溫暖濕潤和半遮陰的環境，不耐強光、淹水和乾旱，常出現在海拔500~2,000 m的疏林、灌叢或草叢之中⁽¹⁶⁾。在臺灣主要分布在南投、嘉義及臺中地區，當中又以‘鐵骨’素心、‘彩虹’(包含‘黃彩’)、‘錦旗’、‘金針’及‘玉花’為栽培數量的大宗，5個品種合計佔四季蘭栽培數量之86.3%，占國蘭總栽培量45.9%⁽⁶⁾。臺灣的國蘭外銷以韓國為主，占總國蘭外銷數量的95%以上，而四季蘭占國蘭外銷總數量約72%^(4,5)。四季蘭主要花期為7~10月，為總狀花序，開花時從基部向上逐漸開放⁽¹⁾，花朵顏色多為淡黃、黃綠或白色，具有香氣，形態玲瓏典雅，花朵無斑或線條者稱素心蘭⁽¹⁰⁾，植株自交親合，但花朵壽命短，花開後約3~7日即凋謝，故雜交時需取其花粉加以保存來授於其它母本親。

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0886 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場埔里分場研究助理、副研究員。

³ 行政院農業委員會臺中區農業改良場副研究員。

花粉保存能維持植物的單倍體基因，除有助於基因學之研究外，對於提升育種效率及保存、交換種原等甚為重要⁽⁹⁾。利用花粉保存，能在小空間內保存大量的植物基因並有利運輸、克服時間和空間的隔離而完成植物的授粉，同時也能長時間重複利用特定的基因型進行研究⁽⁹⁾。而溫度會影響花粉活力及保存時間，研究顯示以低溫保存最有效^(7,9,14)。花粉活力的評估，除直接計算離體萌芽率外，採用花粉授粉法，以花粉在柱頭上萌芽後，將精細胞送至胚囊中完成受精著果的比例來判斷，最為接近花粉的真正活力。而花粉以低溫保存使細胞分裂及生理代謝停滯，可維持生命力，延長保存時間，已普遍利用於種原長期保存及育種利用。了解溫濕度對四季蘭花粉活力之影響，有助於選擇適當環境進行人工授粉作業，減少人力、物力之浪費並提高授粉效率及品質。

本研究採不同開花日數與不同開花期之四季蘭栽培種花粉進行離體培養以了解其花粉萌芽率，並冷凍貯存素心蘭花粉90日，之後取出培養並觀察其萌芽率，找出最適合採收花粉之時機，而花粉離體培養技術可提供花粉保存及應用之相關資訊，做為以後育種及採種之參考。

材料與方法

一、試驗材料

本研究使用之材料為臺中區農業改良場埔里分場所栽種之植株，品種有四季蘭‘招財’、‘向日葵’、‘彩虹’、‘玉花’，素心蘭則有‘赤芽’及‘鐵骨’等共6種，栽培介質為臺糖蔗渣：蛭石：花生殼：椰纖土：椰纖塊=1:1:1:1:2，種植於15.5 cm (盆面直徑)黑色塑膠軟盆，每盆插有自動給水管線，病蟲害管理依慣行栽培方式進行，盆株置於遮光度50%內外針織網所遮蔽之植床上，並以溫濕度記錄器(HOBO[®] Pro v2 data logger, Part No. U23-001, Onset Computer Corporation)記錄溫室之溫濕度變化。

二、花粉離體培養

試驗方法依徐(2008)之方法修正：將滅菌過的濕潤濾紙與雙凹槽玻片放入無菌塑膠培養皿內備用，花粉塊以0.05%次氯酸鈉溶液滅菌30 sec，再以無菌水快速漂洗後放入玻璃培養皿內，並以解剖刀將花粉塊壓碎於0.5 ml液體BK培養基內^(8,11)，吸取部分滴在雙凹槽玻片上。BK培養基修改自Brewbaker及Kwack (1963)配製⁽¹²⁾：100 mg/l H₃BO₃、200 mg/l Ca(NO₃)₂·4H₂O、100 mg/l MgSO₄·7H₂O及100 mg/l KNO₃，另添加5 g/l蔗糖，pH調整為5.7，以血清瓶盛裝滅菌後備用。

培養皿放置在溫度25±2°C、濕度80±5%的黑暗環境中，於培養第1、3(4)、6日以光學顯微鏡(Primo Star, ZEISS)觀察花粉管生長情形。花粉管長度超過花粉直徑兩倍以上即視為萌芽(圖一B)，於放大100倍的倍率下，觀察花粉均勻分布之區塊，並選取3個視野計算花粉萌芽百分率。

三、試驗設計

(一)開花日數與花粉萌芽率之關係

花莖上小花開放以花瓣展開至可看見唇瓣時視為開花當日，以吊牌標示開花日期，試驗品種為四季蘭‘招財’、‘向日葵’、‘彩虹’、‘玉花’，素心蘭則有‘赤芽’及‘鐵骨’，取花開日數1、3、5、7日之花朵並帶回實驗室處理，每3朵花混合成一重複，每個開花日數取9朵花，共3重複。

(二)不同開花期對花粉萌芽率之影響

四季蘭‘彩虹’、‘玉花’及素心蘭‘赤芽’分別於2015年6月和8月各採一批花粉進行離體培養，培養方法如二所示。

(三)花粉貯藏後之萌芽率試驗

‘鐵骨’素心蘭取花開天數1、3、5、7日之花粉，分別以硫酸紙包裹後以夾鏈袋密封，置於0°C冰箱貯存90日後取出測試其萌芽率，培養方法如二所示。

四、統計分析

試驗調查資料以CoStat 6.3統計軟體(CoHort Software, USA)進行統計變方分析(analysis of variance, ANOVA)後，以最小顯著差異性(least significant difference, LSD)分析各處理間 $P \leq 0.05$ 之差異性。

結果與討論

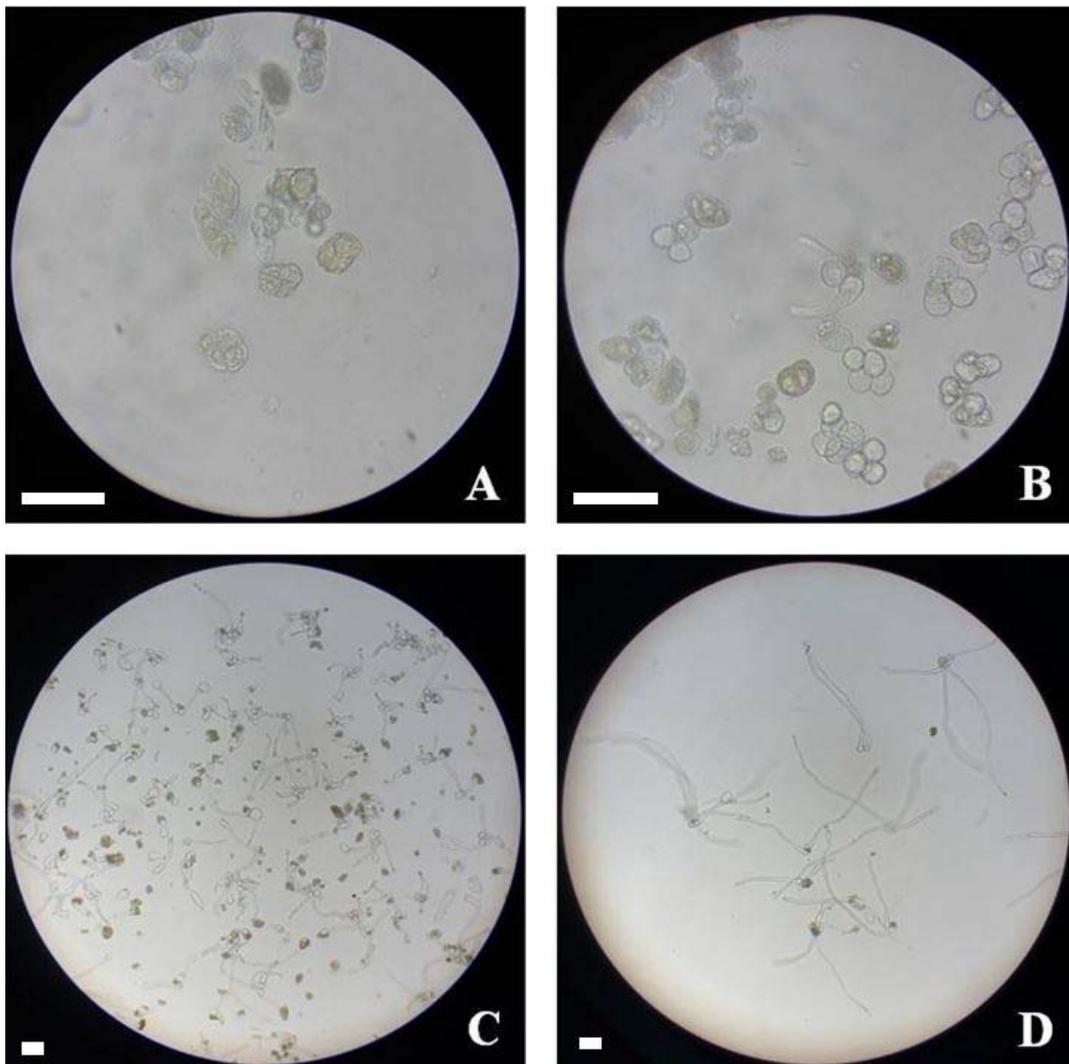
一、四季蘭花粉萌發形態觀察

四季蘭當營養充足及氣候條件適合時，一年有多次抽花梗的機會，在臺灣地區則多在7~10月為主要花期⁽¹⁾。一般植物花粉活力常受到培養環境的溫度、濕度影響，研究指出，番荔枝在相對濕度70~80%、溫度30~35°C為花粉萌芽之最適條件⁽¹¹⁾。本試驗利用顯微鏡觀察顯示，‘玉花’四季蘭花粉多為四分體結構(圖一A)，由4個花粉粒組成一個花粉團。經離體培養的結果顯示，在不同品種間的花粉其萌芽所需時間長短不同，但生長情形大致類似，初萌芽時花粉管自花粉團突出，隨培養時間增加而伸長，而四分體會融合成一花粉團，並隨花粉管伸長而逐漸消失(圖一B、C、D)。

二、開花日數與花粉萌芽率之關係

由6月開花之‘招財’四季蘭於不同開花日數的花粉萌芽率分析結果顯示(表一)，以開花第1日及第3日採集的花粉可以順利萌芽，開花第5日及第7日採集之花粉培養1日的萌芽率均為0%，之後因花粉發霉而無法觀察。花粉採集後培養1、4及6日的萌芽率，在開花第1日及第3日採集花粉間差異不顯著，惟以開花第3日採集之花粉培養6日後的萌芽率84.6%最高。由6月開花之‘向日葵’四季蘭於不同開花日數的花粉萌芽率分析結果顯示(表二)，以開花第1、3及5日採集的花粉可以順利萌芽，開花第7日採集之花粉萌芽率為0%。花粉採集後培養1及3日的萌芽率，在開花第1、3及5日採集花粉間差異不顯著；花粉採集後培養6日的萌芽率，以在開花第3及5日採集花粉顯著較高，花粉萌芽率達78.6~100%。有研究指出在相同環境下，花粉成熟度對發芽率影響甚鉅，梨樹取將開裂花藥的花粉，萌芽率為10.44%，低於全開裂花藥之花粉

(27.61%)⁽²⁾。百香果在開花當日自花授粉，花粉管大部分在絨毛層即停止生長而無受精反應，而在蕾期(開花前1~2日)有某些品系的少數花粉能進入柱頭⁽³⁾。綜合表一及二結果，四季蘭不同品種間的花粉萌芽率在不同開花日數間略有差異，‘招財’四季蘭以開花第1~3日採集的花粉萌芽率較佳，‘向日葵’四季蘭則以開花第1~5日採集的花粉萌芽率較佳，且上述四季蘭兩品種的花粉在25°C下離體培養6日後皆可萌芽，萌芽率在33.3~100%之間。



圖一、‘玉花’四季蘭花粉培養後花粉管生長情形(A)花開後第3日之花粉型態、(B)花開後第3日之花粉培養1日、(C)花開後第5日之花粉培養3日、(D)花開後第3日之花粉培養6日
 Fig. 1. The pollen tube growth of *Cymbidium ensifolium* ‘Yuh-Hwa’ after incubation *in vitro* (A) The third day pollens after flower opening, (B) The third day pollens after flower opening were incubated for 1 day, (C) The fifth day pollens after flower opening were incubated for 3 days, (D) The third day pollens after flower opening were incubated for 6 days. Scale bar= 50 μ m.

表一、不同開花日數之‘招財’四季蘭花粉萌芽率

Table 1. The pollen germination rate of *Cymbidium ensifolium* ‘Zhao-Cai’ collected on different day after flower opening

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1	day 4	day 6
1	10.1±17.4a ¹	33.3±57.7a	33.3±57.7a
3	11.1±19.0a	78.8±36.8a	84.6±26.7a
5	0 a	- ²	-
7	0 a	-	-

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

² ‘-’ means sample contamination.

表二、不同開花日數之‘向日葵’四季蘭花粉萌芽率

Table 2. Pollen germination percentages of *Cymbidium ensifolium* ‘Sunflower’ collected on different day after flower opening

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1	day 3	day 6
1	20.2±22.4a ¹	56.5±61.5a	57.7±59.9ab
3	7.1± 7.8a	72.1±48.4a	78.6±37.1a
5	13.8±10.5a	72.9±46.9a	100.0± 0.0a
7	0 a	0 a	0 b

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

三、不同開花期對花粉萌芽率之影響

由不同開花日數與不同開花期之‘彩虹’四季蘭花粉萌芽率分析結果顯示(表三)，在6及8月不同開花日數分別採集的花粉萌芽率並無顯著差異，在6月開花第1日且培養3日後的花粉萌芽率為23.8%，8月開花第1日且培養6日的花粉萌芽可達37.4%。

由不同開花日數與不同開花期之‘玉花’四季蘭花粉萌芽率分析結果顯示(表四)，6及8月分別採集花粉後培養1及3日的萌芽率，在開花第1、3、5及7日採集花粉間差異不顯著；花粉培養6日後萌芽率，在不同開花日數間略有差異，其中6月以開花第5日採集後培養6日的花粉萌芽率100%顯著較高，8月以開花第3日採集後培養6日的花粉萌芽率58.4%顯著較高。

由不同開花日數與不同開花期之‘赤芽’素心蘭花粉萌芽率分析結果顯示(表五)，6月採集花粉後培養1、3及6日的萌芽率，在不同開花日數間略有差異，其中以開花第3日採集後培養6日及開花第7日採集後培養3日的花粉萌芽率100%顯著較高，在培養6日所測得萌芽率降為66.7，推測應為鏡檢時選取不同視野所導致，在花粉培養時，以未搗碎之花粉塊較易萌發，故同一處理所呈現之花粉萌芽率亦有差異。8月於開花第1、3、5及7日採集花粉後培養1日的萌芽率均為0%，而以開花第3日採集後培養6日的花粉萌芽率20.0%較高。

綜合表三、四及五結果，四季蘭不同品種間的花粉萌芽率在不同開花期略有差異，其中‘彩虹’四季蘭在6及8月開花期的花粉萌芽率差異不大，‘玉花’四季蘭及‘赤芽’素心蘭花粉萌芽率則以6月開花期較高，8月開花期的花粉萌芽率較低。

表三、不同開花日數與不同開花期之‘彩虹’四季蘭花粉萌芽率

Table 3. The pollen germinations percentage of *Cymbidium ensifolium* ‘Rainbow’ collected on different days after flower opening in different seasons

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1 (6/10)	day 3	day 6
1	0 a ¹	23.8±25.0a	-
3	5.0±8.6a	- ²	-
5	0 a	0 a	-
7	0 a	0 a	-
	day 1 (8/5)	day 4	day 6
1	0 a	15.4±17.4a	37.4±54.6a
3	0 a	0 a	0 a
5	0 a	0 a	0 a
7	0 a	0 a	0 a

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

² ‘-’ means sample contamination.

表四、不同開花日數與不同開花期之‘玉花’四季蘭花粉萌芽率

Table 4. The pollen germination rate of *Cymbidium ensifolium* ‘Yuh-Hwa’ collected on different days after flower opening in different seasons

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1 (6/24)	day 3	day 6
1	7.7±13.4a ¹	36.8±55.0a	43.8±51.1ab
3	0 a	33.3±57.7a	33.3±57.7ab
5	0 a	25.8±10.7a	100.0± 0.0a
7	0 a	0 a	0 b
	day 1 (8/12)	day 3	day 6
1	0 a	4.7± 8.2a	9.2± 9.2b
3	4.7± 8.1a	27.7± 4.7a	58.4±36.9a
5	0 a	0 a	16.6±28.8ab
7	0 a	0 a	7.3±12.6b

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

表五、不同開花日數與不同開花期之‘赤芽’素心花粉萌芽率

Table 5. The pollen germination rate of *Cymbidium ensifolium* ‘Red Bud’ collected on different days after flower opening in different seasons

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1 (6/10)	day 3	day 6
1	9.8±17.0ab ¹	23.8±41.3b	33.3±57.7b
3	15.6±14.2ab	52.0±44.7ab	100.0± 0.0a
5	0 b	- ²	-
7	25.7±12.5a	100.0± 0.0a	66.7±57.7ab
	day 1 (8/7)	day 4	day 6
1	0	9.0± 8.2b	10.4± 9.1ab
3	0	18.1± 3.6a	20.0± 8.1a
5	0	0 c	0 b
7	0	0 c	0 b

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

² ‘-’ means sample contamination.

四、花粉貯藏後之萌芽率試驗

‘鐵骨’素心蘭未貯藏前，開花第1、3、5及7日的花粉在培養1日後花粉萌芽率為22.8~62.7% (表六)；開花第1、3、5日的花粉在培養4及6日後花粉萌芽率均達100%。本試驗將同批花粉保存於0℃冰箱中90日後取出培養並調查萌芽率(表六)，以開花第3日之花粉培養6日後的花粉萌芽率可達100%，顯著高於其他時間採集的花粉，故以開花第3日之花粉最適合採集後貯藏。低溫保存為使植物的組織或器官處在細胞及生理代謝停滯的狀態，利用此法來進行種源長期

表六、不同開花日數與貯藏 90 日後之‘鐵骨’素心花粉萌芽率

Table 6. The pollen germination rate of *Cymbidium ensifolium* ‘Iron Bone’ collected on different days after flower opening and after 90 days of storage

Pollen maturity (days after flower opening)	Pollen germination (%)		
	day 1 (7/24)	day 4	day 6
1	39.2± 3.2bc ¹	100 ± 0 a	100 ± 0 a
3	56.9±12.5ab	100 ± 0 a	100 ± 0 a
5	62.7± 5.6a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
7	22.8±20.1c	100 ²	100 ²
Storage 90 days	day 1 (10/27)	day 3	day 6
1	0.0 b	8.7± 1.0b	16.4± 8.8c
3	22.8± 7.6a	83.4±28.7a	100.0± 0.0a
5	18.0±16.6a	23.9± 8.7b	31.0±10.4b
7	0 b	0 b	0 d

¹ Mean ± standard deviation. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

² Other 2 repeats contamination.

保存及利用已相當普遍，在蘋果⁽¹⁴⁾、棉花⁽¹⁵⁾及辣椒⁽⁹⁾皆有應用。使用此法，可在異地保存父本親而不受時間、空間等限制。在雜交育種中，花粉具有較高萌芽率是保證有效雜交之關鍵，大花蕙蘭和報歲蘭花粉保存在-20℃和-80℃的環境下與保存在4℃的花粉比較，其活力較不易衰退⁽⁷⁾。

參考文獻

1. 利幸貞 1992 一、素心蘭與四季蘭之無菌播種 二、溫度對四季蘭開花之研究 臺灣大學園藝學研究所碩士論文。
2. 李金龍、林信山、廖萬正、林嘉興 1983 梨主要栽培品種之花粉發芽率研究 臺中區農業改良場研究彙報 7: 23-30。
3. 卓俊銘、許圳塗、曾夢蛟 2008 百香果自交不親和性與花粉發芽之研究 興大園藝33(1): 41-52。
4. 林春良 2015 臺灣蕙蘭產業概況 p3-20 2015國蘭產業研討會論文輯 臺中區農業改良場特刊第130號。
5. 林淑婷 2009 玉花四季蘭無菌播種與根莖繁殖 中興大學園藝學系碩士論文。
6. 洪惠娟、李皇照、吳欣穎 2015 臺灣國蘭產業調查 臺中區農業改良場研究彙報 126: 43-53。
7. 凌春英、肖恩、嚴冬瑾、霍麗麗、張后翔 2010 大花蕙蘭和墨蘭花粉活力測定及貯藏研究 安徽農業科學 38(5): 2312-2314。
8. 徐權君 2008 黃道報歲蘭之授粉、種子發育與發芽以及報歲蘭之品種特性比較 國立中興大學園藝學系碩士論文。
9. 郭宏遠、宋好 2014 辣椒花粉保存之研究 植物種苗 16(3): 1-18。
10. 陳俊源、張正 2012 鐵骨素心蘭生育週期與開花習性調查 興大園藝 37(4): 53-67。
11. 陳奕君、江淑雯 2014 柱頭抽出液和培養環境對番荔枝‘臺東二號’花粉發芽率之影響 臺東區農業改良場研究彙報 24: 83-94。
12. Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 50: 859-865.
13. Du Puy, D. and P. Cribb. 2007. The classification of *Cymbidium*: 41. CYMBIDIUM ENSIFOLIUM. pp.263-276. The Genus *Cymbidium*. Kew Publishing, London.
14. Imani, A., K. Barzegar, S. Piripireivatlou and S. H. Masomi. 2011. Storage of apple pollen and *in vitro* germination. Afr. J. Agric. Res. 6: 624-629.
15. Kakani, V. G., K. R. Reddy, S. Koti, T. P. Wallace, P. V. V. Prasad, V. R. Reddy and D. Zhao. 2005 Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. Ann. Bot. 96: 59-67.
16. Su, H. J. 2000. Orchidaceae. In Flora of Taiwan, 2nd ed. Vol. 5 pp. 820-833. Department of Botany, National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

Investigation on Characteristics of the Pollen Germination in *Cymbidium ensifolium*¹

Mei-Ling Chen², Hui-Chuan Hung² and Yu-Hsin Chen³

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of flowering season, days after flower opening (DAFO) and cold storage on the pollen viability of different varieties of *Cymbidium ensifolium*. The results could be used as references for cross pollination and pollen conservation in the future. Germination rates were higher for pollens collected on 1-3 DAFO and 1-5 DAFO for the *Cym. ensifolium* 'Zhao-Cai' and 'Sunflower', respectively. There was no significant difference in the percentage of pollen germination between flowers bloomed in June and August for the variety 'Rainbow', but was higher in June than in August for the varieties 'Yuh-Hwa' and 'Red Bud'. After cold storage for 3 months at 0°C, pollens of the variety 'Iron Bone' collected 3 DAFO showed the highest performance of germination rate.

Key words: days after flower opening, pollen storage, pollen viability

¹ Contribution No. 0886 from Taichung DARES, COA.

² Assistant and Associate Researcher, Puli Branch, Taichung DARES, COA.

³ Associate Researcher of Taichung DARES, COA.