

芭菲爾鞋蘭 (*Paphiopedilum*) 花粉活力檢測及貯藏之研究

童季芬¹⁾、劉黃碧圓²⁾、孫智賢³⁾、蔡智賢²⁾

¹⁾ 本文為第一作者博士論文之一部分

²⁾ 國立嘉義大學園藝系講師、教授(通訊作者)

³⁾ 台灣中油股份有限公司探採研究所地球化學探勘師

地址：嘉義市鹿寮里學府路 300 號

電話：05-2717435

傳真：05-2775765

電子信箱：jstsay@mail.ncyu.edu.tw

摘要：利用 Alexander's 溶液染色法，檢測芭菲爾鞋蘭 *Paphiopedilum niveum*、*P. ang-thong*、*P. wenshanense*、*P. tranlienianum*、*P. concolor* × *P. ang-thong*、*P. rothschildianum* × *P. micranthum* 及 *P. rothschildianum* × *P. armeniacum* 的花粉活力。結果得知，7 種供試材料之花粉活力均以盛開階段為最高，其中 *P. niveum*、*P. wenshanense*、*P. ang-thong* 及 *P. tranlienianum*，其花粉活力均在 85.1% 以上，雜交種 (F1) *P. concolor* × *P. ang-thong*、*P. rothschildianum* × *P. micranthum*、*P. rothschildianum* × *P. armeniacum*，則介於 42.0% ~ 75.7% 之間。花朵老化階段的花粉活力最低，原種介於 66.4% ~ 75.1%，而雜交種 (F1) 則介於 11.0% ~ 52.1% 之間。*P. niveum*、*P. wenshanense*、*P. tranlienianum* 及 *P. ang-thong* 的花粉活力以下午 4:00 時採集者為最高，分別為 97.9%、96.2%、94.7% 及 90.0%。將 *P. tranlienianum* 花粉貯藏在不同溫度下處理 150 min，其中以 25 °C 與 30 °C 處理組之花粉活力較高，均在 90.3% 以上，而貯藏在 50 °C 的花粉活力最低，僅為 60.0%。另以相同方法檢測 21 個原種及 22 個雜交種 (F1) 芭菲爾鞋蘭的花粉活力，其中原種 *P. lowii* 花粉活力 97.1% 為最高，最低為 *P. primulinum*，其花粉活力為 31.2%。22 個芭菲爾鞋蘭雜交種 (F1) 的花粉活力，同亞屬雜交種 (F1) 之花粉活力介於 45.1% ~ 87.0% 之間，皆高於異亞屬 (F1) 雜交種的花粉活力 (5.2% ~ 40.3%)。結果顯示，芭菲爾鞋蘭異亞屬雜交其後代的花粉活力皆低於同亞屬的雜交後代。

關鍵詞：亞力山大染劑、雜交育種、貯藏溫度、花粉萌芽

收到日期：100 年 9 月 13 日



前　　言

芭菲爾鞋蘭屬 (*Paphiopedilum*) 歸屬仙履蘭 (俗稱拖鞋蘭, Lady's slipper orchids), 其花型雅緻, 色彩穩重變化不多, 有白色、乳白、綠色、黃色、紅褐色及粗細的黑褐色斑點等 (黃, 1993)。花朵上萼片發達為觀賞的重點, 下萼片二片接合成一片與上萼片相對向, 著生於唇瓣之背後而稱為腹萼片。三枚花瓣中, 唇瓣形成趣味性的半橢圓形囊袋狀或碗杯狀, 與其他蘭族完全不同; 另兩片花瓣變化多呈長板狀或長條捲狀 (麥, 1987; Cribb, 1987)。蘭科植物的雄蕊與雌蕊合在一起稱“蕊柱”, 為蘭科植物的特徵之一, 芭菲爾鞋蘭屬都有三個花藥, 在蕊柱上左右各一, 第三個為不孕性, 發育成一明顯的盾狀體, 位於蕊柱先端, 稱為雄蕊節或假雄蕊, 花粉則集結形成花粉塊。芭菲爾鞋蘭屬花粉塊著生在蕊柱的兩端, 稱為二雄蕊群 (Diandrae), 花粉塊呈粘質軟密狀 (多數之 *Paphiopedilum*) 或乾粉狀 (*P. delenati*), 其他如嘉德麗雅蘭 (*Cattleya*)、蕙蘭 (*Cymbidium*)、石斛蘭 (*Dendrobium*)、蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*), 其兩組花粉塊集中於蕊柱頂端, 稱為一雄蕊群 (Monandrae) (麥, 1987; Cribb, 1987)。

花粉是種子的雄配子體 (周等, 2006), 在有性繁殖中花粉扮演著極重要的角色, 且花粉直接關係到雜交授粉的成功率。St-Arnaud *et al.* (1992) 及 Arditti and Ernst (1993) 稱芭菲爾鞋蘭屬被視為無菌發芽困難的蘭花種類。溫度為花粉活力、花粉管生長及花粉發芽率最主要的影響因子。凌等 (2010) 以氯化三苯基四氮唑 (TTC; triphenyltetrazolium chloride) 測定大花蕙蘭 (*Cymbidium hybridum*) 及報歲蘭 (*Cymbidium sinense*) 的花粉活力, 經染色 12 h 後可觀察到花粉的活力, 且 -20 °C 低溫乾燥為最適合大花蕙蘭及報歲蘭的貯藏溫度。仙客來的新鮮花粉在 80 °C 下 24 h, 會失去活力 (Rodriguez-Riano and Dafni, 2000)。桃樹 (*Prunus persica* L. Batsch) (Hedhiy *et al.*, 2005)、陸生棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) (Liu *et al.*, 2006; Kakani *et al.*, 2005) 及伊朗野生杏仁 (*Prunus* L. spp.) (Sorkhen *et al.*, 2011) 的花粉管生長及花粉發芽率的最適生長溫度在 30 °C 以下, 而最高生長溫度不可超過 45 °C。此外, 西瓜 (*Citrullus lanatus* Mansfeld) 的花粉萌發適宜溫度是 18 °C ~ 38 °C 之間, 最高的臨界溫度為 48 °C, 且在較高的生長溫度條件下其花粉活力較強 (郭和王, 2006)。留 (2008) 研究發現白葱蘭 (*Zephyranthes candida*) 或黃葱蘭 (*Z. citrina*) 較適合花粉發芽的溫度為 30 °C, 發芽率可達 71%, 韭蘭 (*Z. rosea*) 或小



韭蘭 (*Z. grandiflora*) 之花粉發芽適溫為 25 °C。且針對韭蘭屬之種間育種雜交、回交與三交的後代，進行花粉活力檢測，在 12 個種間雜交組合中，以韭蘭為母本與白葱蘭、黃葱蘭或小韭蘭雜交，小韭蘭為母本或父本與韭蘭和白葱蘭雜交，其雜交之後代或自交一代與二代的結實率較低，且種間和品種之間的差異大(留, 2008)。在人工授粉或雜交授粉時，利用一些指標可快速瞭解花粉的活力，以及儲藏對花粉活力的影響，有助於縮短育種、時間及減少花費的成本，故研究花粉活力是相當重要 (Pinney and Polito, 1990)。而利用 Alexander's 染色法進行花粉活力的評估，為判斷花粉活力最迅速、簡便及穩定的方法，且具可行性評估的染色法 (Alexander, 1969)。

本研究以芭菲爾鞋蘭 21 個原種，22 個 (F1) 雜交種及 1 個雜交種 *P. Hsin-Ying Halo* 為材料，檢測花朵在不同的開花階段、採集時間及貯藏溫度下的花粉活力，並比較芭菲爾鞋蘭原種與雜交種間、親本與雜交第一代 (F1) 間的花粉活力，建立芭菲爾鞋蘭原種及子代花粉活力的資料庫。以利於雜交育種時將活力較高的種作為父本，提高選種的準確性及育種成功率。

材料與方法

一、試驗材料

實驗材料來自嘉義縣竹崎鄉愛蘭島園藝公司、宇芫蘭園、南投縣水里鄉蘭友及台中縣大雅鄉穎川蘭藝工作室等蘭園，取得之芭菲爾鞋蘭開花株，先置於嘉義縣中埔鄉羅氏蘭園中馴化 1 星期後，採集花粉為試驗材料，其栽培環境為簡易網式，芭菲爾鞋蘭有 21 個原種，22 個 (F1) 雜交種及 1 個雜交種 *P. Hsin-Ying Halo* (表一)。

二、實驗方法

(一) 花粉活力的染色檢測

蓋上載玻片以顯微鏡觀察並拍照，每朵花為一重複，共三重複。以掃描式電子顯微鏡 (S.E.M) 觀察 *P. hangianum* × *P. niveum* 花粉的形狀 (圖一 A)，具活力的花粉經 Alexander's 染色後呈現紫紅色 (圖一 B)，無活力的花粉則染成蒼白或青藍色 (圖一 C)。Alexander's 染色法之母液 (50 倍) 組成為：95% 乙醇 10 mL, 1% 孔

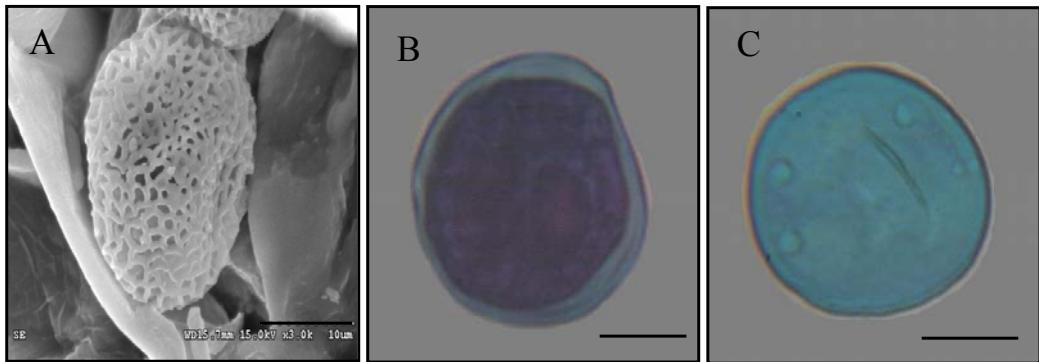
雀石綠 (Malachite green) 5 mL、5 g 苯酚 (phenol)、1% 酸性品紅 (Acid fuchsin) 5 mL、1% 橙紅 G 0.5 mL、蒸餾水 50 mL 及甘油 25 mL。再分別添加冰醋酸 (Glacial Acetic acid) 1、2、3 及 4 mL。將新鮮花粉塊置於乾淨的載玻片上，加上 1~2 滴 Alexander's 溶液，攪勻後置於 35 °C 恒溫烘箱中染色 15 min，再蓋上載玻片以顯微鏡觀察並拍照，每朵花為一重複，共三重複。

表一、供試植物材料

Table 1. Plant material of experiment

<i>Parvisepalum</i> (subgenres)	Hybrids of same subgenres (F1)
<i>P. hangianum</i>	<i>P. concolor</i> × <i>P. ang-thong</i>
<i>P. delenati</i>	<i>P. callosum</i> × <i>P. lawrenceanum</i>
<i>P. vietnamense</i>	<i>P. leucochilum</i> × <i>P. concolor</i>
<i>P. micranthum</i>	<i>P. malipoense</i> × <i>P. hangianum</i>
<i>P. malipoense</i>	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. philippinense</i>
<i>P. armeniacum</i>	<i>P. delenati</i> × <i>P. vietnamense</i>
<i>Brachypetalum</i> (subgenres)	<i>P. delenati</i> × <i>P. micranthum</i>
<i>P. bellatulum</i>	<i>P. delenati</i> × <i>P. armeniacum</i>
<i>P. thaianum</i>	<i>P. philippinense</i> × <i>P. lowii</i>
<i>P. wenshanense</i>	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. moquetteanum</i>
<i>P. niveum</i>	Hybrids of different subgenres (F1)
<i>P. leucochilum</i>	<i>P. delenati</i> × <i>P. wilhelminiae</i>
<i>P. concolor</i>	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. micranthum</i>
<i>P. ang-thong</i>	<i>P. sukhakulii</i> × <i>P. bellatulum</i>
<i>Paphiopedilum</i> (subgenres)	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. armeniacum</i>
<i>P. lowii</i>	<i>P. bellatulum</i> × <i>P. armeniacum</i>
<i>P. tranlienianum</i>	<i>P. primulinum</i> × <i>P. esquirolei</i>
<i>P. esquirolei</i>	<i>P. ang-thong</i> × <i>P. stonei</i>
<i>P. callosum</i>	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. hangianum</i>
<i>P. rothschildianum</i>	<i>P. hangianum</i> × <i>P. niveum</i>
<i>P. philippinense</i>	<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. malipoense</i>
<i>P. moquetteanum</i>	<i>P. philippinense</i> × <i>P. niveum</i>
<i>P. primulinum</i>	<i>P. primulinum</i> × <i>P. armeniacum</i>
	Hybrids species
	<i>P. Hsin-Ying Halo</i>





圖一、A:掃描式電子顯微鏡下的花粉形狀; B: Alexander's 染色後具活力的花粉; C: 經 Alexander's 染色後不具活力的花粉

Fig. 1. Image of pollen by SEM (A), stained viable pollen (B) and inviable pollen (C) with Alexander's solution; Scale bars=10 μm .

(二)芭菲爾鞋蘭花粉採集適期與採集時間、最佳貯存溫度與貯存時間的花粉活力

依花朵開放程度分半開階段（花瓣頂梢微展開之花朵）、盛開階段（盛開之成熟花朵）及老化階段（老化的花朵），以 Alexander's 溶液檢測 *P. wenshanense*、*P. ang-thong*、*P. niveum*、*P. tranlienianum*、*P. concolor* \times *P. ang-thong*、*P. rothschildianum* \times *P. micranthum* 及 *P. rothschildianum* \times *P. armeniacum* 的花粉活力，每一朵花為一重複，共三重複。另一試驗以 Alexander's 溶液檢測 *P. niveum*、*P. wenshanense*、*P. tranlienianum* 與 *P. ang-thong* 花粉活力，由上午 8:00 至下午 8:00 止，每間隔 2 h 採集花粉一次，每一朵花為一重複，共三重複。花粉貯藏溫度試驗則採集 *P. tranlienianum* 花粉，貯藏於烘箱中，在 25 °C、30 °C、40 °C 及 50 °C 的溫度下，分別於貯藏 30、60、90、120 及 150 min 後，以 Alexander's 溶液檢測花粉活力，每一朵花為一重複，共三重複。另將 *P. tranlienianum* 與 *P. Hsin-Ying Halo* 之花粉貯藏在 30 °C 下的烘箱，經 8、16、24、48 及 72 h 後，以 Alexander's 溶液檢測其花粉活力的變化，每一朵花為一重複，共三重複。原種及雜交種之花粉活力比較試驗，則以花朵的盛開階段及下午 4:00 時作為花粉取樣時期及取樣時間點，檢測 21 個芭菲爾鞋蘭原種及 22 個芭菲爾鞋蘭雜交種的花粉活力，每朵花為一重複，共三重複。

(三)統計分析

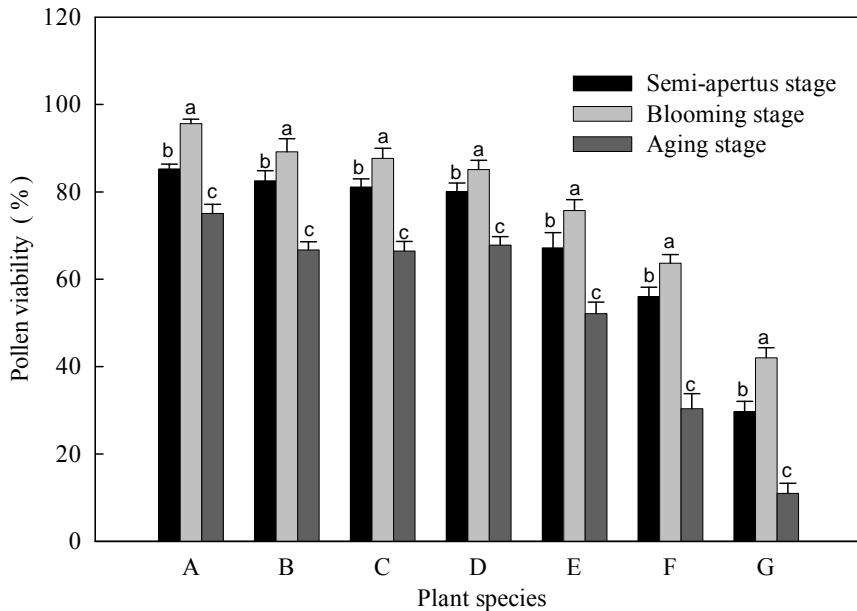
數據經統計分析系統 (Statistical Analysis System, SAS) 分析及 Fisher 的最小顯著性測驗(Fisher's protected least significant difference test, LSD)，進行處理差異性比較。

結 果

一、芭菲爾鞋蘭花粉採集適期、採集時間及貯藏溫度的花粉活力

P. wenshanense、*P. ang-thong*、*P. niveum* 與 *P. tranlienianum* 於花朵盛開階段之花粉活力均在 85.1% 以上 (圖二)。*P. concolor* × *P. ang-thong* 花朵盛開階段與老化階段，其花粉活力分別為 75.7% 及 52.1%，雜交種 *P. rothschildianum* × *P. micranthum* 及 *P. rothschildianum* × *P. armeniacum* 之花朵盛開階段的花粉活力，分別為 63.7% 及 42.0%，花朵老化階段的花粉活力介於 11.0% ~ 30.4% 之間。結果顯示，*P. wenshanense*、*P. ang-thong*、*P. niveum* 與 *P. tranlienianum* 的花粉活力以花朵盛開階段最高，老化階段為最低，四個原種芭菲爾鞋蘭花朵發育各階段的花粉活力均高於三個雜交的芭菲爾鞋蘭後代 (圖二)。一天中在七個不同時間點採集，*P. niveum*、*P. wenshanense*、*P. tranlienianum* 與 *P. ang-thong* 花粉，此 4 個原種花粉活力皆以 16:00 時最高，分別為 97.9%、96.2%、94.7% 及 90.0%；以 12:00 時花粉活力最低，分別為 91.0%、87.0%、86.7% 及 83.7% (表二)。貯藏在 25 °C 及 30 °C 下 150 min 之花粉活力均在 90.3% 以上，當溫度提升 50 °C 時，貯藏 150 min 後花粉活力下降至 60.0% (圖三)。將芭菲爾鞋蘭 *P. tranlienianum* 與 *P. Hsin-Ying Halo* 之花粉貯存於 30 °C 下，經 0、8、16、24、48 及 72 h 處理，*P. tranlienianum* 之花粉貯存 72 h 後，花粉活力由 95% 下降至 66%，而 *P. Hsin-Ying Halo* 之花粉活力亦由 88% 降至 58% (圖四)。





圖二、花朵發育階段與花粉活力之關係。

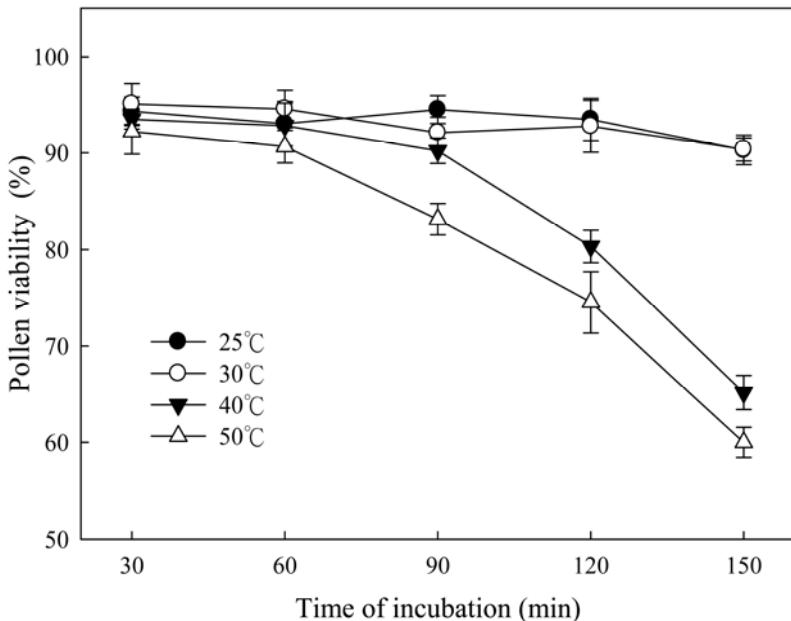
Fig. 2. The relationship between flower development stage and pollen viability in *Paphiopedilum*; A: *P. wenshanense*; B: *P. ang-thong*; C: *P. niveum*; D: *P. tranlienianum*; E: *P. concolor* × *P. ang-thong*; F: *P. rothschildianum* × *P. micranthum*; G: *P. rothschildianum* × *P. armeniacum*. Means within the same species followed by the same letter are not significantly different at 0.5% level by Fisher's protected LSD test, n=3.

表二、採集時間與花粉活力 (%) 之關係

Table 2. The relationship between harvest-time and pollen viability (%) in *Paphiopedilum*

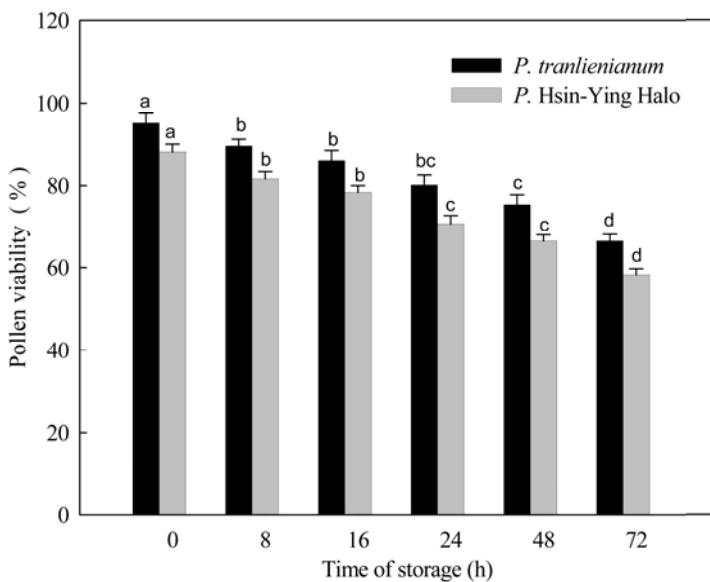
Time	<i>P. niveum</i>	<i>P. wenshanense</i>	<i>P. tranlienianum</i>	<i>P. ang-thong</i>
8:00	92.7 c ^z	91.6 b	91.2 b	87.6 b
10:00	92.8 c	91.2 b	87.7 c	86.8 b
12:00	91.0 d	87.0 c	86.7 d	83.7 d
14:00	93.6 bc	90.8 b	88.5 c	85.4 c
16:00	97.9 a	96.2 a	94.7 a	90.0 a
18:00	94.8 b	91.4 b	92.4 b	87.3 b
20:00	92.1 c	89.6 b	90.6 bc	86.8 b

^z Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 0.5% level by Fisher's protected LSD test, n=3.



圖三、溫度處理對 *Paphiopedilum tranlienianum* 花粉活力之影響。

Fig. 3. Effect of temperatures on pollen viability in *Paphiopedilum tranlienianum*, n=3.



圖四、在 30°C 溫度貯存對芭菲爾鞋蘭花粉活力之影響。

Fig. 4. Effect of storage on pollen viability in *Paphiopedilum* at 30 °C, n=3.

二、21 個原種及 22 個雜交種的花粉活力

在花朵盛開時期，以下午 4:00 時為取樣時間的條件下，以短瓣亞屬 7 個種花粉活力最高，介於 91%~97% 之間（表三）。21 個原種中，花粉活力高於 90% 者，有 *P. hangianum*、*P. bellatulum*、*P. thaianum*、*P. wenshanens*、*P. niveum*、*P. leucochilum*、*P. concolor*、*P. ang-thong*、*P. lowii*、*P. tranlienianum*、*P. esquirolei* 及 *P. callosum*（表三）。花粉活力介於 70%~80% 者，有 *P. delenalii*、*P. vietnamense*、*P. micranthum*、*P. malipoense*、*P. rothschildianum*、*P. philippinense* 及 *P. moquetteanum*。低於 69% 者有 *P. armeniacum* 及 *P. primulinum*，花粉活力分別為 59.2% 及 31.2%（表三）。同亞屬芭菲爾鞋蘭屬雜交種後代，花粉活力介於 70%~80% 者，有 *P. concolor* × *P. ang-thong*、*P. callosum* × *P. lawrenceanum*、*P. leucochilum* × *P. concolor*、*P. malipoense* × *P. hangianum* 及 *P. rothschildianum* × *P. philippinense*，低於 69% 者有 *P. delenatii* × *P. vietnamense*、*P. delenalii* × *P. micranthum*、*P. delenalii* × *P. armeniacum*、*P. philippinense* × *P. lowii* 及 *P. rothschildianum* × *P. moquetteanum*（表四）。另外，12 個不同亞屬芭菲爾鞋蘭屬雜交種後代，其花粉活力均低於 70%（表四）。

討 論

花粉活力之維持受本身條件及外在環境的影響，貯藏前花粉預備處理及人工授粉前進行花粉活力之評估是相當重要（李，1987；Stone *et al.*, 1995）。李等（1983）指出新世紀梨 (*Pyrus communis* Rehd cv. Shinseiki) 之花粉發芽率以花藥全開時期較高。桂花 (*Osmanthus fragrans*) 的不同品種，以盛花期的花粉活力最高（楊和向，2007）。韓等（2008）稱野生及栽培牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 在花蕾早期花粉萌發率較低，隨花發育期而逐漸增高，盛花期之後隨著花朵敗落而逐漸下降。李等（2007）稱黃瓜 (*Cucumis sativus* L.) 在 5 °C ~ 25 °C 的範圍內，隨著貯藏溫度的降低會延長花粉的壽命，且以傍晚約 18:00 時採摘及盛花期的花蕾為最好的貯藏材料。本研究 7 個芭菲爾鞋蘭皆以盛花期之花粉活力最高，而老化階段最低（圖二）；以下午 4:00 時採摘花粉的活力最高，最低為 12:00（表二）。因此建議研究芭菲爾鞋蘭雜交育種時，應於盛花期及下午 4:00 為最佳採取花粉的時間。

表三、原種芭菲爾鞋蘭屬的花粉活力檢測結果

Table 3. Pollen viability of *Paphiopedilum* species

Plant species	pollen viability (%)
<i>Parvisepalum</i> (subgenres)	
<i>P. hangianum</i>	94.3 a ^z
<i>P. delenalii</i>	88.3 bc
<i>P. vietnamense</i>	87.2 bc
<i>P. micranthum</i>	85.5 bc
<i>P. malipoense</i>	84.1 bc
<i>P. armeniacum</i>	59.2 c
<i>Brachypetalum</i> (subgenres)	
<i>P. bellatulum</i>	97.0 a
<i>P. thaianum</i>	96.0 b
<i>P. wenshanense</i>	96.0 b
<i>P. niveum</i>	95.5 b
<i>P. leucochilum</i>	93.3 c
<i>P. concolor</i>	92.2 cd
<i>P. ang-thong</i>	91.5 d
<i>Paphiopedilum</i> (subgenres)	
<i>P. lowii</i>	97.2 a
<i>P. tranlienianum</i>	95.5 b
<i>P. esquirolei</i>	91.3 c
<i>P. callosum</i>	90.5 c
<i>P. rothschildianum</i>	80.3 d
<i>P. philippinense</i>	79.0 d
<i>P. moquetteanum</i>	73.0 e
<i>P. primulinum</i>	31.2 f
	<i>Pardalopetalum</i> (section)
	<i>Paphiopedilum</i> (section)
	<i>Paphiopedilum</i> (section)
	<i>Barbata</i> (section)
	<i>Coryopedilum</i> (section)
	<i>Coryopedilum</i> (section)
	<i>Cochlopetalum</i> (section)
	<i>Cochlopetalum</i> (section)

^z Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 0.5% level by Fisher's protected LSD test, n=3.



表四、雜交種芭菲爾鞋蘭的花粉活力檢測結果
Table 4. Pollen viability of *Paphiopedilum* hybrids

Hybrids	pollen viability (%)	source (♀×♂)
Hybrids of same subgenres (F1)		
<i>P. concolor</i> × <i>P. ang-thong</i>	87.0 a ^z	<i>Brachypetalum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. callosum</i> × <i>P. lawrenceanum</i>	85.4 b	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
<i>P. leucochilum</i> × <i>P. concolor</i>	83.2 b	<i>Brachypetalum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. malipoense</i> × <i>P. hangianum</i>	80.5 bc	<i>Parvisepalum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. philippinense</i>	73.2 c	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
<i>P. delenatii</i> × <i>P. vietnamense</i>	64.0 d	<i>Parvisepalum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. delenatii</i> × <i>P. micranthum</i>	60.3 de	<i>Parvisepalum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. delenatii</i> × <i>P. armeniacum</i>	54.2 e	<i>Parvisepalum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. philippinense</i> × <i>P. lowii</i>	51.2 ef	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. moquetteanum</i>	45.1 f	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
Hybrids of different subgenres (F1)		
<i>P. delenatii</i> × <i>P. wilhelminiae</i>	40.3 a	<i>Parvisepalum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. micranthum</i>	35.2 b	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. sukhakulii</i> × <i>P. bellatulum</i>	34.5 b	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. armeniacum</i>	33.2 bc	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. bellatulum</i> × <i>P. armeniacum</i>	32.2 bc	<i>Brachypetalum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. primulinum</i> × <i>P. esquirolei</i>	28.2 c	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. ang-thong</i> × <i>P. stonei</i>	25.2 c	<i>Brachypetalum</i> × <i>Paphiopedilum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. hangianum</i>	12.5 d	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. hangianum</i> × <i>P. niveum</i>	12.1 d	<i>Parvisepalum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. rothschildianum</i> × <i>P. malipoense</i>	10.5 d	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Parvisepalum</i>
<i>P. philippinense</i> × <i>P. niveum</i>	8.2 de	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Brachypetalum</i>
<i>P. primulinum</i> × <i>P. armeniacum</i>	5.2 e	<i>Paphiopedilum</i> × <i>Parvisepalum</i>

^z Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 0.5% level by Fisher's protected LSD test, n=3.

Luza and Polito (1985) 研究花粉採收後之乾燥及貯藏溫度，發現花粉採收後如遇到高溫時其花粉活力會快速下降，貯放時間愈長其活力亦會下降。桃樹 (Hedhiy *et al.*, 2005)、陸生棉花 (Liu *et al.*, 2006; Kakani *et al.*, 2005) 及伊朗野生杏仁 (Sorkhen *et al.*, 2011) 的花粉管生長及花粉發芽率的最適生長溫度在 30 °C 以下，而最高生長溫度不可超過 45 °C。大花蕙蘭及報歲蘭花粉貯藏在 -20 °C 和 -80 °C 保存 1 年後，其花粉仍保持高活力，而以 -20 °C 低溫乾燥為其花粉保持的簡易方法 (凌等, 2010)。大麥 (*Hordeum vulgare*) 開花前遭遇高溫會產生異常之花粉 (Sakata *et al.*, 2000)。而甜椒 (*Capsicum annuum L. var. grossum (L.)Sendt.*) 和花生 (*Arachis hypogea L.*) 的花粉活力在 33 °C 及 39 °C 高溫下會顯著降低 (Erickson and Markhart, 2002; Vara Prasad *et al.*, 2001)。本研究結果得知，芭菲爾鞋蘭 *P. tranlienianum* 花粉適當貯藏條件為 25 °C ~ 30 °C 之間 (圖三)，且 *P. tranlienianum* 與 *P. Hsin-Ying Halo* 花粉在 30 °C 下，新鮮採後 0 h 的花粉活力最高，隨著採收後貯藏時間的增加而降低花粉活力，經貯存 72 小時後，花粉活力下降至 58.2%~66.5% (圖四)。

李 (1987) 以 43 科 133 種作物進行花粉活力之檢定，將作物花粉發芽百分率分為高、中及低三類，花粉發芽率在 70 % 以上者為高發芽率之作物；69%~5% 為中發芽率之作物；而 4% 以下者為難發芽。本研究結果得知，21 個芭菲爾鞋蘭原種，除了 *P. primulinum* 及 *P. armeniacum* 花粉活力為 31.2 % 及 59.2 % 屬中發芽率外，其餘 19 個原種花粉活力皆高於 70%，屬於高發芽率者 (表三)；在 22 個雜交組合後代的花粉活力中，同亞屬芭菲爾鞋蘭屬雜交種後代，*P. concolor* × *P. ang-thong*、*P. callosum* × *P. lawrenceanum*、*P. leucochilum* × *P. concolor*、*P. malipoense* × *P. hangianum* 及 *P. rothschildianum* × *P. philippinense* 的花粉活力均高於 70%，屬於高發芽率者，而 *P. delenatii* × *P. vietnamense*、*P. delenatii* × *P. micranthum*、*P. delenatii* × *P. armeniacum*、*P. philippinense* × *P. lowii* 及 *P. rothschildianum* × *P. moquetteanum*，花粉活力介於 69%~5% 之間，屬於中發芽率。另，12 個不同亞屬芭菲爾鞋蘭屬雜交種後代，其花粉活力均介於 69%~5% 之間，均屬於中發芽率者 (表四)。

楊和向 (2007) 稱桂花 (*Osmanthus fragrans*) 花粉活力的高低可作為人工育種時選擇父本的重要參考。趙等 (2009) 檢測 68 個百合品種花粉的活力，麝香系百合 (*Longiflorum Hybrids lily*) 的花粉活力最高，卷丹 (tiger lily) 花粉活力最低。

趙等 (2009) 及凌等 (2010)建議百合及大花蕙蘭及報歲蘭在育種時，可選擇花粉活力高的品種做為父本。本研究以 *P. hangianum* 為母或父本與同亞屬雜交後代的花粉活力為 80.5%，而與不同亞屬雜交，其後代花粉活力只達 12.5%。芭菲爾鞋蘭同亞屬雜交種之後代花粉活力，較不同亞屬雜交種後代高，但後代又皆低於父母本。同亞屬雜交其花粉活力均高於不同亞屬雜交的花粉活力，雜交後代 (F1) 之花粉活力皆明顯低於親本 (原種)，尤其是不同亞屬雜交之 (F1) 後代花粉活力更低。結果得知，同亞屬芭菲爾鞋蘭屬雜交種後代之花粉活力 (介於 45.1%~87.0%)，較不同亞屬雜交種 (介於 5.2%~40.3%) 後代高，但後代又皆低於父母本，*P. concolor* (花粉活力 92.2%; 表三) 為母本或父本與同亞屬雜交後代可得到的花粉活力，分別為 87.0% 及 83.2% (表四)。*P. hangianum* 的花粉活力為 94.3% (表三)，與同亞屬雜交其後代的花粉活力為 80.5%；另以 *P. hangianum* 為父本或母本與不同亞屬雜交，其後代花粉活力只達 12.5% 及 12.1%。芭菲爾鞋蘭亞屬可分為多花型 (*Coryopedilum*)、紅瓣多花型 (*Pardalopetalum*)、單花型 (*Barbata*)、序花型 (*Cochlopetalum*) 及標準型 (*Paphiopedilum*) 等 5 個亞節，*P. callosum* × *P. lawrenceanum* 與 *P. rothschildianum* × *P. philippinense* 為同亞屬且同亞節雜交的後代，其花粉活力分別為 85.4% 及 73.2%，均高於同亞屬不同亞節雜交後代，如 *P. rothschildianum* × *P. moquetteanum* (45.1%) 與 *P. philippinense* × *P. lowii* (51.2%)。另外，*P. rothschildianum* 花粉活力為 80.3%，同亞屬的 *P. philippinense* 花粉活力為 79.0%、*P. moquetteanum* 花粉活力為 73.0%，其雜交後代 *P. rothschildianum* × *P. philippinense*、*P. rothschildianum* × *P. moquetteanum* 的花粉活力，分別為 73.2% 及 45.1%。但 *P. rothschildianum* 與不同亞屬硬葉小萼亞屬的 *P. micranthum* (花粉活力為 85.5%)、*P. hangianum* (花粉活力為 94.3%) 及 *P. malipoense* (花粉活力為 84.1%) 雜交，其雜交後代 *P. rothschildianum* × *P. micranthum*、*P. rothschildianum* × *P. hangianum* 及 *P. rothschildianum* × *P. malipoense* 的花粉活力，分別為 35.2%、12.5% 及 10.5% (表四)。結果顯示同亞屬雜交後代的花粉活力均高於不同亞屬雜交的後代，且雜交後代 (F1) 之花粉活力皆明顯低於親本，不同亞屬雜交 (F1) 後代花粉活力更低，相較於親本的花粉活力降至為 5.2%~40.3% (表三、表四)。

由以上結果得知，芭菲爾鞋蘭屬在育種時，應以盛開階段之花粉為材料，取樣時間為下午 4:00 時，貯存溫度為 25 °C 及 30 °C，且在雜交育種時，先評估親

緣之遠近及其親本花粉活力的高低，應以花粉活力高的種為其父本，因授粉成功與否，花粉活力扮演著極重要的角色。

參考文獻

- 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。
- 李金龍。1987。園藝作物花粉活力測定與貯藏研究。科學農業 35: 347-356。
- 李光、鄧強、魏愛民、韓毅科、孟攀奇、孟煥文。2007。貯藏溫度對黃瓜花粉活力的影響。中國蔬菜 9: 22-24。
- 周莉花、郝日明、趙宏波。2006。蠟梅花粉活力檢測方法篩選及保存時間觀察。
浙江林學院學報 23: 270-274。
- 留欽培。2008。韭蘭屬物種之種間雜交。國立中興大學園藝學系研究所碩士論文。
72 頁。
- 郭尚、王季英。2006。不同因素對西瓜花粉生活力的影響。華北農學報 21: 91-94。
- 凌春英、肖恩、嚴冬瑾、霍麗麗、張啟翔。2010。大花蕙蘭和墨蘭花粉活力測定
及貯藏條件。安徽農業科學 38: 2312-2314。
- 麥奮。1987。拖鞋蘭-芭菲爾鞋蘭屬。淑馨出版社。284 頁。
- 黃敏展。1993。蘭花栽培藝術。銀禾文化事業公司。154-160 頁。
- 楊秀蓮、向其柏。2007。桂花花粉活力測定與‘晚籽銀’桂柱頭可授性分析。林業科
技開發 3: 22-25。
- 趙興華、張道旭、印東生、李丹、張艷玲。2009。百合花粉生活力測定和貯藏方
法研究。北方園藝 2: 172-175。
- 韓麗、張秀新、王新建、張付春、張盈。2008。牡丹花粉活力測定方法的研究。
中國農學通報 24: 379-382。
- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Tech.
44: 117- 122.
- Arditti, J. and R. Ernst. 1993. *Paphiopedilum*. Micropropagation of orchids. John Wiley
and Sons, Inc, New York. p. 434-466.
- Cribb, P. 1987. The Genus *Paphiopedilum*. Collingridge and Royal Botanic Gardens



- Kew. p.132-136.
- Erickson, A. N. and A. H. Markhart. 2002. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. Plant, Cell Env. 25: 123-130.
- Hedhly, A., J. I. Hormaza, and M. Herrero. 2005. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in Peach. Plant Biol. 7: 476-483.
- 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.
- Liu, Z., Y. L. Yuan, S. Q. Liu, X. N. Yu, and L. Q. Rao. 2006. Screening for high-temperature tolerant cotton cultivars by testing *in vitro* pollen germination, pollen tube growth and boll retention. J. Integr. Plant Biol. 48: 706-714.
- Luza, J. G. and V. S. Polito. 1985. In vitro germination and storage of English walnut pollen. Hort. Sci. 27: 303-316.
- Pinney, K. and V. S. Polito. 1990. Olive pollen storage and *in vitro* germination. Acta Hort. 286: 207-210.
- Rodriguez-Riano, T. and A. Dafni. 2000. A new procedure to asses pollen viability. Sex Plant Reprod. 12: 241-244.
- Sakata, T., H. Takahashi, I. Nishiyama, and A. Higashitani. 2000. Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. J. Plant Res. 113: 395-402.
- Sorkheh, K., B. Shiran, V. Rouhi, and M. Khodambashi. 2011. Influence of temperature on the *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of various native Iranian almonds (*Prunus* L. spp.) species. Trees 25: 809-822.
- St-Arnaud, M., D. Lauzer, and D. Barabe. 1992. In vitro germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana 7: 22-27.
- Stone, J. L., J. D. Thomson, and S. J. Dent-Acosta. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments. Amer. J. Bot. 82: 1186-1197.
- Vara Prasad, P. V., P. Q. Craufurd, V. G. Kakani, T. R. Wheeler, and K. J. Boote. 2001.

Influence of high temperature during pre- and post-anthesis stages of floral development on fruit-set and pollen germination in peanut. Aust. J. Plant Physiol. 28: 233-240.



Study of Pollen Viability on *Paphiopedilum* and Pollen Preservation

Chi-Fen Tung¹⁾、Pi-Yuan Liu Huang²⁾、Chih-Hsien Sun³⁾、
Jyh-Shyan Tsay²⁾

¹⁾ This paper is a part of Ph.D. dissertation of the first author.

²⁾ Instructor and Professor (corresponding author), respectively, Department of Horticultural Science, National Chiayi University, Taiwan, R.O.C.

³⁾ Geochemistry Department, CPC Corporation Exploration and Development Research Institute Miaoli, Taiwan, R. O. C.

Address: 300, Syuefu Rd., Chiayi City 60004, Taiwan, R. O. C.

Tel: 05-2717435

Fax: 05-2775765

E-mail: jstsay@mail.ncyu.edu.tw

Summary: In this study, the Alexander's solution staining was used to test the pollen vitality of *Paphiopedilum niveum*, *P. wenshanense*, *P. ang-thong*, *P. tranlienianum*, *P. concolor* × *P. ang-thong*, *P. rothschildianum* × *P. micranthum* and *P. rothschildianum* × *P. armeniacum*, respectively. It was learned from the results that the highest pollen viability of all seven materials provided was obtained in the bloom stage, among which that of *P. niveum*, *P. wenshanense*, *P. ang-thong*, and *P. tranlienianum* were over 85.1%. Pollen viability of hybrids of (F1) as *P. concolor* × *P. ang-thong*, *P. rothschildianum* × *P. micranthum*, and *P. rothschildianum* × *P. armeniacum* were between 42.0% and 75.7%. The lowest pollen viability was shown in the aging stage of flower, between 66.4% and 75.1% for native species, and between 11.0% and 52.1% for hybrids (F1). The pollen viability of *P. niveum*, *P. wenshanense*, *P. tranlienianum*, and *P. ang-thong* were highest when collected at 4:00 pm, as 97.9%, 96.2%, 94.7%, and 90.0%, respectively. After storing *P. tranlienianum* pollens under different temperatures for 150 minutes, the pollen viability of treatments in 25 °C and 30 °C were higher, over 90.3%, and the lowest pollen viability was in 50 °C, only 60.0%. In addition, the same method was used to test the pollen viability of 18 native species and 12 hybrids (F1) of *Paphiopedilum*, among which the pollen viability of



native species *P. lowii* was 97.1% as the highest, and *P. primulinum* was the lowest as 31.2%. Among 22 *Paphiopedilum* hybrids (F1), the pollen viability of hybrids (F1) of same subgenres were between 45.1% and 87.0%, which was higher than that of (F1) hybrids of different subgenres (5.2%~40.3%). The results showed that the pollen viability of *Paphiopedilum* hybrids crossed from different subgenres were lower than that of hybrids crossed from same subgenres.

Key words: Alexander's solution, hybride breeding, storage temperature, pollen germination

Received for publication 13 September 2011.

