

香莢蘭開花習性及高溫下花粉生長之研究¹

林宜樺²、葉志新²、周佳頤²、陳凱儀³

摘 要

香莢蘭是重要的香料作物，為瞭解國內栽培環境下影響人工授粉成功的因素，本研究評估不同香莢蘭開花時間之花粉發芽率及短暫高溫處理對花粉活性與花粉管發育之影響，花粉活性的檢測方法是藉由測試香莢蘭的花粉體外發芽的最佳條件而建立。試驗結果顯示，香莢蘭花粉體外發芽以不含蔗糖的 BK 培養基最佳，25-30°C 為最適培養溫度，香莢蘭開花期間，花粉發芽率在午夜 12 時最高，但在 9 時以前差異不大，而中午 12 時以後花粉發芽率就明顯下降；高溫會影響花粉發芽率，經 35°C 處理 1 h 即造成花粉管異常，同時降低生長速度，回到 25°C 室溫下尚可恢復生長，但高溫處理時間越久異常越嚴重，也越難恢復；40°C 處理 1 h 就對花粉管造成嚴重傷害，並且難以恢復。本研究結果顯示，高溫會影響花粉發芽率及抑制花粉管生長，在授粉期間應注意田間溫度管理以提高結莢的成功率。

關鍵字：花粉管、溫度、發芽率

前 言

香莢蘭 (*Vanilla planifolia*) 被稱為“冰淇淋蘭花”，是唯一可作為食用香料的蘭花，其結出的綠色蒴果俗稱為香草豆，果莢經過調製後顏色變為棕黑色，可產生眾所周知的香草香氣 (Ecott, 2004)。生產香草莢必須藉由外力授粉，在原生棲息地可由蘭花蜂 (euglossine bees)、無螫蜂 (*Melipona* bees) 或其他傳粉媒介完成授粉工作；香莢蘭海外的種植地曾經由其原生地墨西哥引進這些授粉昆蟲進行授粉，但都沒有成功 (Lubinsky *et al.*, 2006; Arditti *et al.* 2009)。因此，目前栽培的香莢蘭仍然依靠人工授

¹ 行政院農業委員會桃園區農業改良場研究彙報第 532 號。

² 桃園區農業改良場助理研究員、副研究員(通訊作者，zeamays@tydais.gov.tw)及研究助理。

³ 國立臺灣大學農藝系副教授。

粉，才能大規模生產香草莢。香莢蘭授粉後，果莢開始生長，在授粉後 45 日左右發育至完整果莢大小 (Yeh *et al.*, 2021)，隨後在 40-60 日會開始生理落莢；而造成生理落莢的原因包含高溫、強光、通風不良或濕度過低等生育逆境，結莢過多造成植株衰弱及養分不足，或是受鐮孢菌、炭疽菌等病菌感染 (Bhai *et al.*, 2006)。在國內生理落莢時間落在 5 月中旬至 7 月上旬，落莢率從 15%到 70%不等，嚴重降低產量 (葉等, 2021)。近年來，5 至 6 月香莢蘭開花期間常會出現 35°C以上高溫，因此須瞭解溫度對香莢蘭花粉的活力及生長之影響。

許多作物的研究指出花粉發芽率影響著果率及果實品質，開花時的溫度影響花粉及柱頭之活性，溫度提升會加速花粉管的生長但亦會促使胚珠和柱頭老化 (Hedhly *et al.*, 2005)；在小孢子母細胞發育階段，若遇高溫會顯著影響花粉的發育，從而導致花粉不育或活力降低；原因可能與花藥發育過程中碳水化合物代謝降低，導致花粉粒中可溶性醣類降低 (Karni and Aloni, 2002；Pressman *et al.*, 2002) 有關。高溫在開花前及開花期間會延遲大孢子發育及促使小孢子異常，使得花粉活性降低進而減少著果率及產量 (Nava *et al.*, 2009；Suzuki *et al.*, 2001)。不同作物的花粉對於溫度之耐受性具差異，高溫抑制李子的花粉管生長而降低著果率，開花期可透過微噴灌系統降溫以利正常著果 (Deceault and Polito, 2010)。高溫使番茄的花粉粒數減少，且造成花藥內澱粉濃度降低而影響成熟花粉粒內糖的濃度，使花粉活力降低 (Pressman *et al.*, 2002)。開花期間的異常溫度降低果實產量甚鉅。此外，因氣候變遷，近年在臺灣各地花期時有異常高溫發生，例如 2021 年 5 月上旬在臺灣南部連續出現 36-39°C高溫，且在生理落果期發生異常的大量落果，落果率達到 5 成以上，推測可能是由於莢果發育初期遭逢高溫，降低花粉管成功授精機率而導致落果 (葉等, 2021)。因此，瞭解作物最適花粉發芽及花粉管生長溫度，除了作為調整栽培環境依據，花粉活性亦可作為耐熱性品種的逆境篩選指標，透過高溫處理進行品種選拔 (Deceault and Polito, 2010)。

為瞭解香莢蘭適合執行人工授粉的時間，本試驗觀察香莢蘭的花朵開花時期，並進行香莢蘭花粉體外 (*in vitro*) 發芽之試驗，探討最適花粉發芽培養基蔗糖濃度及培養溫度，並使用此花粉體外發芽的花粉活性檢測系統評估開花後不同時間之花粉活性。另外，本試驗利用花粉體外發芽的花粉活性檢測方法，探討短暫高溫處理對花粉活性與花粉管發育之影響，藉以瞭解香莢蘭最適合的授粉時間及溫度，以提供降低高溫逆境之參考。

材料與方法

一、植物材料

供試植株為種植於桃園區農業改良場 3 年生之香茛蘭植株，種植於遮陰度 50%-70%的溫室，並於開花期間以灑水方式降溫，將溫度控制於 35°C 以下，濕度介於 70%-80%，於 2021 年植株自 4 月 28 日始有觀察到花苞開始開放，至 5 月 30 日花期接近尾聲，試驗於開花期間取香茛蘭花粉塊進行試驗。

二、香茛蘭花朵開花之觀察

為瞭解香茛蘭花朵開放時間以進行花粉授粉試驗及後續判斷授粉時期的基礎，針對香茛蘭花朵開放時間進行基礎調查，於開花前 1 日 22 時開始至開花當日 16 時，每隔 2 h 拍照記錄香茛蘭花朵開放狀態。

三、不同蔗糖濃度對花粉體外發芽之影響

於上午 8-9 時隨機取 10 朵不同植株上的花，分別於雙凹玻片凹槽內滴入添加 0%、5%、10%、15%及 20%蔗糖之 BK 發芽培養基 (Brewbaker and Kwack, 1963)，培養基配方為 $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ 、 $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 及 $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ KNO}_3$ (All Merck KGaA, Germany)，pH 值調整至 6.0。而後取花粉塊以鑷子夾住輕沾培養基使花粉散開，以 1 朵花花粉塊沾 1 片雙凹槽載玻片，每個濃度皆重複 2 玻片，以 25°C 黑暗培養 4 h 後，以光學顯微鏡觀察花粉發芽情形，每處理調查 4 重複，每重複在顯微鏡下選取花粉粒分散均勻的區域畫面拍照，以計算花粉發芽率。

四、開花後不同時間之花粉體外發芽及花粉管生長觀察

臺灣香茛蘭開花週期於上午 0 時始綻放至下午 3 時閉合，於 2021 年 5 月 22 日 (0、3、6、9、12 及 15 時) 代表不同開花時期，上午 0 時為花朵開始綻放，3 時為花朵半開放，6 時為花朵盛開，9 時為花朵開始閉合，12 時花朵接近閉合，15 時表示花朵完全閉合，觀察各時期的花粉活力，分別隨機取不同植株上的花，每朵花花粉塊取出放入含 1 mL 無添加蔗糖之 BK 培養基之離心管中混合搖散，以吸管吸取 100 μL 培養液滴入雙凹槽載玻片的凹槽中，以 25°C 黑暗培養 4 h 後，以光學顯微鏡觀察花粉發芽情形，每處理 3 重複，每重複 2 個玻片，並在顯微鏡下選取花粉粒分散均勻的區域

畫面拍照，以計算花粉發芽率及測量花粉管長度。

五、不同溫度對花粉體外發芽之影響

依上述試驗每 1 朵花粉塊配置於 1 mL 培養基培養效果最佳，於上午 8-9 時隨機取盛開之花朵，每朵花花粉塊取出放入含 1 mL 無添加蔗糖之 BK 培養基之離心管中混合搖散，以吸管吸取 100 μ L 培養液滴入雙凹槽載玻片的凹槽中製作 5 片玻片，分別置在 20、25、30、35 及 40°C 下黑暗培養 4 h，共 3 重複，以光學顯微鏡觀察花粉發芽情形，並在顯微鏡下選取花粉粒分散均勻的區域畫面拍照，以計算花粉發芽率及測量花粉管長度。

六、高溫逆境對花粉管體外發育之影響

於上午 8-9 時隨機取盛開之花朵，每朵花花粉塊取出放入含 1 mL 無添加蔗糖之 BK 培養基之離心管中混合搖散，以吸管吸取 100 μ L 培養液滴入雙凹槽載玻片的凹槽中，製作 9 片玻片，置於塑膠培養皿中，以石蠟膜密封置於室溫避光培養 1 h 後，分別放置於室溫 25、35 及 40°C 下避光培養，分別在處理後 1、2、3 h 後先以光學顯微鏡觀察紀錄後，再移至室溫下避光培養 4 h（圖 1），每處理 3 重複，以光學顯微鏡觀察花粉發芽情形及花粉管形態，選取花粉粒分散均勻的區域畫面拍照，以計算花粉發芽率、花粉管長度及形態。

七、花粉管鏡檢調查

試驗處理後用 Olympus BX51 光學顯微鏡（接目鏡 10X／接物鏡 20X 及 40X）進行鏡檢，每處理每重複取樣 4 次，每次取樣觀察不重疊的視野，每個視野至少計算 200 個花粉，計算視野中花粉總數與花粉萌發之數目，換算成百分率。花粉管長度大於花粉之直徑 2 倍即認定為花粉萌發；花粉管捲曲或末端膨大認定為花粉管生長異常（圖 3）。花粉管長度利用 image J 軟體進行測量，每處理每重複計算 50 個花粉管。

八、統計方法

試驗資料先以 SAS 統計軟體進行變方分析（analysis of variance, ANOVA），若處理間差異顯著，再進行最小顯著差異性測驗（least significant difference, LSD），比較各處理平均值間之差異性。

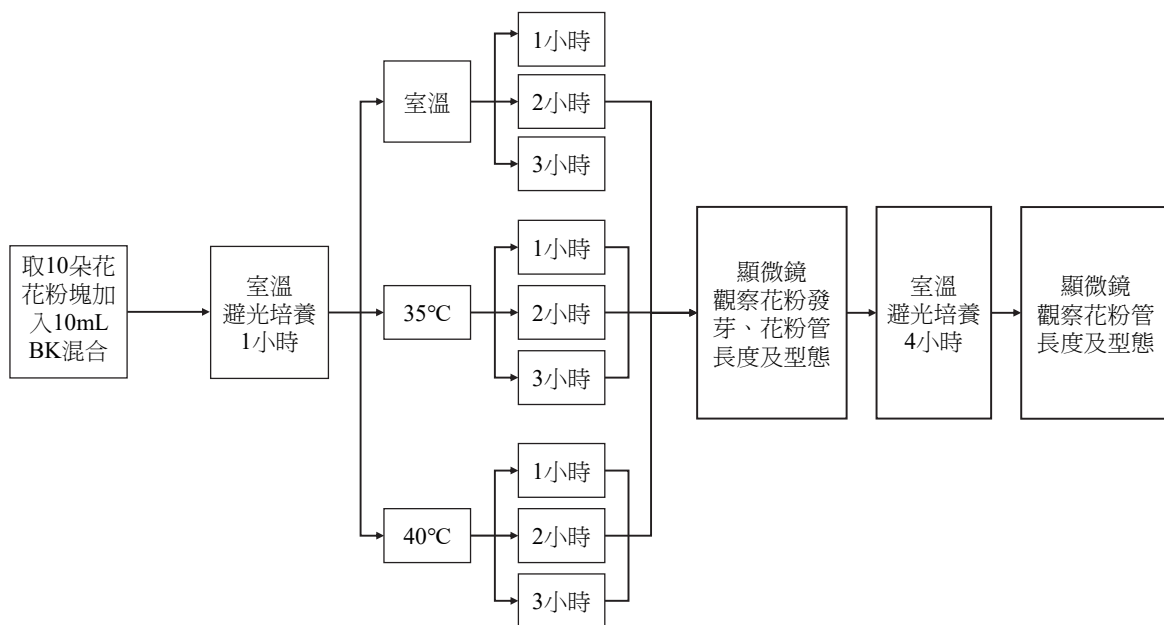


圖 1. 高溫逆境對香莢蘭花粉管發育之影響試驗流程

Fig. 1. Flow chart of the influence of high temperatures on pollen tube growth in *V. planifolia*.

結果與討論

一、香莢蘭花朵開花之觀察

種植於桃園區農業改良場的香莢蘭，約在 2 月下旬至 3 月上旬溫度回升後花芽發育突出葉腋，至 5 月上旬開花，花期持續至 6 月中旬。觀察香莢蘭花朵開花週期（圖 2），在開花前 1 日花苞已膨大接近開花日的尺寸，花被呈現光亮之淡黃綠色，於 22 時左右先由萼片開始打開，接著在 24 時花瓣也開始張開，然後慢慢綻放，上午 4 時萼片完全張開，至上午 6 時為花朵盛開，隨後太陽升起光線變強後，花瓣就慢慢閉合，真正盛開的時間只有 4-6 h，至上午 10 時花瓣已經合在一起，12 時萼片也開始閉合，到 16 時整個花被完全閉合，此時與未開放的花苞外觀類似，但仔細觀察除了花瓣萼片微張開外，顏色也較暗黃及略呈脫水狀。如果未完成授粉，則開花後 1 日花被會呈現脫水狀並於 2-3 日後脫落，但子房柱仍會宿存，之後失去光澤，尾端變黃，並逐漸向果柄擴展，最後整個子房柱變黃或略變黃，於 7-10 日後才脫落。香莢蘭花序為總狀花序，由葉腋生長而出，每個花序約有 15-20 朵花；由於香莢蘭的花粉塊與柱頭間有一層蕊喙（rostellum）相隔，無法自花授粉，除了原產地墨西哥及中美洲外，其他栽

培地區並沒有授粉的昆蟲，因此只能仰賴人工授粉 (Lubinsky *et al.*, 2006)。人工授粉時以竹籤將蕊喙往上撥開，再將花粉塊下壓，使其黏在柱頭，即完成授粉 (Bory *et al.*, 2010)。授粉後果莢迅速膨大，子房轉位朝下生長，花被仍會宿存在果莢末端，至授粉後 210-240 日果莢轉淡綠色，尾端轉為黃色即為成熟，再採收進行調製為香草莢 (葉等, 2021)。

Shadakshari 等 (2003) 曾觀察 *V. planifolia* 的花粉在開花前 23 h 到花閉合後 16 h 期間內花粉具有活力，而柱頭則在花開前 41 h 可以讓花粉發芽，並保持到花閉合後 17 h。本試驗結果香莢蘭花於午夜開放至中午 12 時開始閉合，於中午後進行授粉皆無法成功。實務上，人工授粉應在上午 6 時至中午前進行，不宜在花朵閉合或已經枯萎時進行，以提高授粉成功率。



圖 2. 香莢蘭花朵開放時間

Fig. 2. Blooming time of flowers of *V. planifolia*.

二、香茛蘭花粉體外發芽之探討

不同蔗糖濃度對香茛蘭花粉發芽之影響，結果顯示香茛蘭花粉在不添加蔗糖之培養液中發芽率達 50% 最高，隨著蔗糖濃度的增加，花粉發芽率逐漸下降（表 1），蔗糖濃度達 20% 時花粉粒在顯微鏡下觀察皆明顯脫水萎縮，本試驗以在不添加蔗糖的培養基下香茛蘭花粉發芽率最佳。蔗糖在花粉發芽及生長過程中通常扮演相當重要角色，其作用在於調整滲透壓與營養的供給，提供花粉於培養基中發芽及花粉管生長所需（Vasil, 1987）。

Nissar 等（2006）指出香茛蘭花粉在添加 5% 蔗糖、150 mg mL⁻¹ 硼酸及 25°C 時發芽率較佳，但許多作物也可以在不含蔗糖的培養基中花粉發芽及花粉管生長。何等（1998）發現臺灣泡桐花苞開放後，花粉可在含或不含有蔗糖的 BK 培養液中發芽，且發芽率高達 95%。本試驗的結果顯示，香茛蘭花粉在不添加蔗糖的培養基下其活力較佳，與 Nissar 研究結果不同，此原因可能是植株材料生長環境不同造成花粉養分累積上有所差異；另外，本試驗使用 BK 培養基有添加硫酸鎂、硝酸鈣及硝酸鉀等鹽類可使香茛蘭花粉在無蔗糖的環境下正常發芽，且結果顯示蔗糖濃度越高反而抑制花粉發芽。因此，後續的試驗皆以不添加蔗糖的 BK 培養基進行試驗。

表 1. 添加不同濃度蔗糖之培養基對香茛蘭花粉體外發芽率之影響

Table 1. Effect of sucrose concentration on pollen germination in *V. planifolia*.

蔗糖濃度 Sucrose concentration (%)	花粉發芽率 Pollen germination (%)
0	50.6 ^a
5	19.5 ^{bc}
10	12.8 ^b
15	8.1 ^{cd}
20	1.9 ^d

同行英文字母不相同表示經 LSD 顯著性測驗在 5% 水準差異顯著。

Different letters within a column indicate significant differences at $P < 0.05$ using LSD test.

香茛蘭花粉的發芽相當快速，在 BK 培養基中 1 h，就可觀察到多數花粉管從花粉突出伸長（圖 3-A）。許多園藝作物研究指出體外培養基發芽法可以部分代表花粉在生物體內的活力，但不同物種對花粉培養條件要求不同，必須再配合體內（*in vivo*）

花粉發芽試驗，才較具代表性（李，1987）。一般體外培養花粉發芽率 50%以上屬於高發芽率，發芽率 5%-50%以上屬於中發芽率，低於 5%以下屬於低發芽率，難發芽者可改變培養基的物理、化學條件，或提供部分有機物質，以增加其發芽率（Chiang, 1974；Ferrari and Wallace, 1975；Subbaiah, 1984；李，1987；李等，1989）。在本試驗中使用適合於多數作物花粉之 BK 培養基，可獲得接近高的體外發芽率。Ravindran（1979）培養香菸蘭花粉 30-40 min 後即開始發芽，5 h 後的發芽率為 45%，與本試驗結果相近。

香菸蘭需人工授粉才能結莢，花粉發芽率影響果莢之產量及品質，為瞭解不同開花程度的花粉發芽率，找出適合授粉時段以提高授粉成功率；試驗取不同開花時段的花粉以體外培養之方式進行試驗；試驗結果顯示上午 0 時花朵未完全展開，花粉發芽率達 36.6%，經體外培養 4 h 後花粉管長度平均為 201.2 μm ，此時花粉管生長最快；上午 3 時至 9 時，花粉發芽率為 28.6%-32.3%，花粉管長度為 130.8-158.2 μm 差異不顯著；12 時後花朵接近閉合，花粉發芽率開始顯著降低於 20%，且花粉管長度也顯著降低；至 15 時花粉發芽率只剩 12.1%，花粉管長度也只有 98.8 μm （圖 2 及表 2）。前人研究指出香菸蘭在上午 6 時花完全展開，花粉具有活力的期間為開花前 23 h 至開花後 16 h（Shadakshari *et al.*, 2003），本試驗顯示臺灣的香菸蘭在上午 6 時花朵完全展開（圖 2），不同的開花時段花粉發芽率不同，上午 0 時花粉發芽率最佳，9 時以前差異不大，至 12 時後明顯降低，較不利於授粉。

表 2. 開花後不同時間香菸蘭花粉發芽率及花粉管生長之差異

Table 2. Effect of different time in a day on pollen germination and pollen tube growth in *V. planifolia*.

取樣時間 Time	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長度 Length of pollen tube (μm)
00:00	36.6 ^a	201.2 ^a
03:00	32.3 ^a	158.2 ^b
06:00	29.0 ^a	130.8 ^{bcd}
09:00	28.6 ^{ab}	144.2 ^{bc}
12:00	19.8 ^{bc}	118.3 ^{cd}
15:00	12.1 ^c	98.8 ^d

同行英文字母不相同表示經 LSD 顯著性測驗在 5%水準差異顯著。

Different letters within a column indicate significant differences at $P < 0.05$ using LSD test.

三、不同溫度對香莢蘭花粉體外發育之影響

為觀察不同培養溫度對花粉發芽之影響，試驗中將花粉放入 BK 培養基於不同溫度進行培養 4 h，結果顯示 25°C 下發芽率最佳，在低溫 20°C 環境下發芽率降低，且花粉管長度也明顯較短；在 30°C 環境下花粉發芽率略低於 25°C 處理，但花粉管長度平均為 317 μm 最長；在高溫 35°C 環境下花粉發芽率則顯著下降，僅為 18.9%，花粉管長度平均為 168 μm ，當溫度達 40°C 高溫時花粉幾乎沒有發芽（表 3）。培養溫度對於花粉的影響，在許多研究中皆有被探討，依作物種類及品種的不同，花粉發芽適溫也有所差異，一般作物花粉發芽適溫在 20-30°C 左右，如荔枝（Stern and Gazit, 1998）、木瓜（Cohen *et al.*, 1989）、芒果（Sukhvibul *et al.*, 2000）等；棉花高溫耐受性較高，以 28-32°C 時發芽率及花粉管伸長最佳（Burke *et al.*, 2004; Kakani *et al.*, 2005）；溫帶果樹如梨的花粉發芽適溫則為 15-23°C（Vasilakakis and Porlingis, 1985）。本試驗結果指出香莢蘭花粉在 25°C 時發芽率最高，在 30°C 花粉管伸長速度最快，35°C 以上已顯著抑制花粉的發芽及花粉管伸長。

表 3. 不同溫度處理對香莢蘭花粉體外發芽率之影響

Table 3. Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth in *V. planifolia*.

處理溫度 Temperature (°C)	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長度 Length of pollen tube (μm)
20	27.9 ^b	113.9 ^d
25	48.3 ^a	197.7 ^b
30	29.0 ^b	317.6 ^a
35	18.9 ^c	168.2 ^c
40	0.7 ^d	0.0 ^e

同行英文字母不相同表示經 LSD 顯著性測驗在 5% 水準差異顯著。

Different letters within a column indicate significant differences at $P < 0.05$ using LSD test.

已知高溫會抑制香菸蘭的花粉發芽，為模擬授粉後已發芽花粉管遇到短暫高溫逆境後的反應，將花粉於 25°C 先培養 1 h，待花粉發芽後再進行高溫處理（圖 1），觀察生長中的花粉管生長情形及異常狀態。花粉管的異常形態包括花粉管粗胖（圖 3-F）、尖端膨大（圖 3-G）或是捲曲（圖 3-H）、尖端破裂（圖 3-I）等現象。結果顯示高溫 35°C 處理 1-3 h 後花粉管異常率為 15.1%-23.4%，不同處理時間花粉管異常率差異不顯著。高溫 40°C 處理 1-3 h 下異常率高達 37.9%-47.0%，處理間差異也不顯著（表 4）。同樣時間處理下比較不同溫度結果顯示，40°C 處理 1 h 異常率高於 35°C 及對照組，處理 2 h 以上，高溫處理組異常率顯著高於對照組（表 4），此結果顯示只要處於 40°C 高溫逆境 1 h 即造成花粉管異常率大幅增加。另外，以花粉管長度比較，在 35°C 處理後 1、2、3 h，花粉管長度分別為 54.0、88.3 及 134.3 μm ；與同一時間對照組 46.2、197.0 及 240.0 μm 相比顯著降低；而 40°C 處理後同一時間分別為 45.0、52.6 及 48.2 μm ，花粉管幾乎停止伸長（表 4）。本試驗結果指出發芽後的花粉管在遇到高溫下會抑制花粉管伸長，溫度越高影響越大。

表 4. 不同溫度處理及處理時間對香菸蘭花粉管異常比例與長度之影響

Table 4. Effect of the duration of different high temperatures on abnormal pollen tube ratio and pollen tube length in *V. planifolia*.

處理時間 Time (h)	花粉管異常 abnormal pollen tube ratio (%)			花粉管長度 pollen tube length (μm)		
	CK	35°C	40°C	CK	35°C	40°C
1	6.84 ^y	15.08 ^{a,y}	47.01 ^{a,x}	146.18 ^x	53.49 ^{c,y}	44.95 ^{a,y}
2	4.02 ^z	23.39 ^{a,y}	40.92 ^{a,x}	196.97 ^x	88.33 ^{b,y}	52.61 ^{a,z}
3	5.97 ^z	22.05 ^{a,y}	37.91 ^{a,x}	239.96 ^x	134.25 ^a	48.24 ^a

在 LSD 檢驗中，每行或每列中後跟不同字母（a、b、c 表示行，x、y、z 表示列）的數據在 $P < 0.05$ 時顯著不同。

Data followed by different letters (a,b,c for lines and x,y,z for columns) within each line or column are significantly different at $P < 0.05$ with LSD Test.

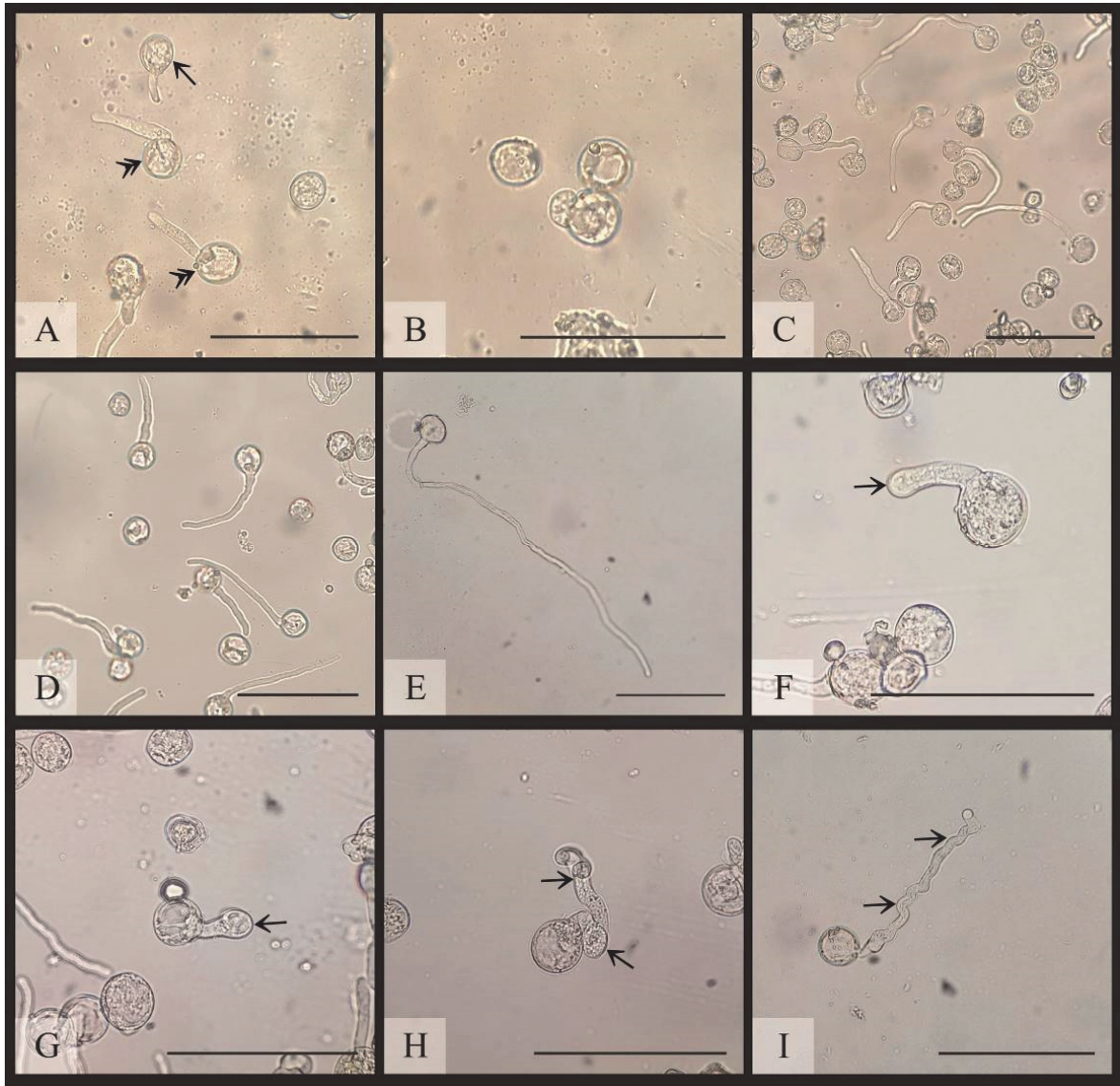


圖 3. 香莢蘭花粉體外培養發芽情形 (A) 香莢蘭花粉發芽判定，花粉管達花粉粒直徑 2 倍長視為發芽 (箭號為未發芽，雙箭頭為發芽)；(B) 未發芽之花粉粒；(C) 體外培養 1 h；(D) 體外培養 2 h；(E) 體外培養 3 h；(F、G) 花粉管尾端膨大生長異常；(H、I) 花粉管異常捲曲或破裂。Bar = 100 μm 。

Fig. 3. *In vitro* pollen germination of *V. planifolia*. (A) Arrow: Ungerminated pollen, double arrow head: germinated pollen, (B) Ungerminated pollen, (C) After *in vitro* incubating 1 hour (D) After *in vitro* incubating 2 hours, (E) After *in vitro* incubating 3 hours, (F、G) Abnormal swelling and growth at the end of pollen tube, (H、I) Pollen tube abnormally curled or cracked. Bar = 100 μm .

進一步觀察高溫逆境後於室溫下花粉管是否會恢復生長，經 35°C 處理花粉管長度分別 111.3、156.2 及 174.1 μm ，再經 4 h 室溫培養後增長 57.8、67.8 及 39.9 μm ，對照組 (25°C) 為 271.7、330.7 及 472.3 μm ，經 4 h 培養後增長 125.5、133.7 及 200.5 μm ，顯示在 35°C 處理下，除了會直接降低生長速率，恢復室溫後生長速率也減緩 (表 5)。高溫達 40°C 時，會造成花粉管異常且抑制花粉管生長，恢復室溫後 4 h 為 52.0、57.2 及 58.3 μm 也就只有增加 7.1、4.6 及 10.0 μm ，顯示經 40°C 高溫後，花粉管即使在室溫 (25°C) 下也完全無法恢復正常生長。因此，本試驗結果推測在授粉期至著果期間，應避免受到 35°C 以上高溫而影響花粉管生長，而無法正常受精造成落莢。

表 5. 不同高溫及時間處理後再置於室溫 4 h 後對花粉管長度之影響

Table 5. Effect of the duration of different high temperatures on pollen tube growth in *V. planifolia*. The lengths of pollen tubes were measured after high-temperature treatment and move to normal temperature (25°C) for four hours.

處理溫度 Treatment (°C)	花粉管長度 Length of pollen tube (μm)					
	1 h		2 h		3 h	
	伸長量	長度	伸長量	長度	伸長量	長度
25	125.5 ^x	271.7	133.7 ^x	330.7	200.5 ^x	472.3
35	57.8 ^{a,y}	111.3	67.8 ^{a,y}	156.2	39.9 ^{b,y}	174.1
40	7.1 ^{a,z}	52.0	4.6 ^{a,z}	57.2	10.0 ^{a,z}	58.3

在 LSD 檢驗中，每行或每列中後跟不同字母 (a、b、c 表示列，x、y、z 表示行) 的數據在 $P < 0.05$ 時顯著不同。

Data followed by different letters (a,b,c for rows and x,y,z for columns) within each row or column are significantly different at $p < 0.05$ with LSD Test.

香莢蘭需要人工授粉才能獲得香草莢，而且人工授粉占生產過程中 50% 勞動力，授粉成功後結莢與否對香莢蘭生產很重要 (葉等，2021)，因此，進行花粉活力的評估。試驗中觀察到香莢蘭的花朵開花週期，花朵盛開的時間自凌晨 4 時到 8 時，花粉體外發芽 (*in vitro*) 試驗結果顯示，不含蔗糖的 BK 培養基最適花粉發芽，25-30°C 為最適培養溫度；雖然花粉發芽率在午夜 12 時最高，但考量到人工操作的的便利性，在凌晨 4-5 時天色漸亮後花朵盛開到中午前是最適合完成授粉的時段；中午 12 時以

後花粉發芽率就明顯下降，可能影響果莢種子量或甚至會授粉失敗。高溫逆境試驗中，35°C處理 1 h 對花粉管已有影響，除會造成花粉管異常，生長速度也會趨緩，但只要回到 25°C室溫下尚可恢復生長。而處理時間越久花粉管異常情況越嚴重，也越難恢復。而 40°C處理 1 h 即對花粉管造成嚴重傷害，並難以恢復。

香莢蘭授粉後，從花粉管萌芽、生長一直到進入胚囊到受精完成，過程需要 21-35 日。而上述期間高溫將會影響花粉發芽及花粉管生長，進而造成無法受精而落莢，或種子過少影響產量及品質。因此，每日授粉作業建議在凌晨 4-5 點到中午前完成，並在授粉後 1 個月做好田間溫度管理，避免 35°C以上高溫影響，以提升香莢蘭的品質及產量。

致 謝

試驗期間特別感謝花卉及生技研究室葉秀梅小姐、溫曼竹小姐、徐貴文先生協助香莢蘭栽培、樣本採集及田間管理等作業。

參考文獻

- 何政坤、張淑華、陳振榮、蔡錦瑩。1998。台灣泡桐花粉發芽與試管內授粉。臺灣林業科學 13:127-138。
- 李金龍。1987。園藝作物花粉活力測定與貯藏之研究。科學農業 35:347-356。
- 李紅曦、許圳塗、李金龍。1989。聚乙二醇對百香果花粉體外發芽之影響。中國園藝 35:121-130。
- 葉志新、周佳頤、林宜樺。2021。香莢蘭的栽培管理。桃園區農業專訊 117:1-4。
- Arditti, J., A.N. Rao, and H. Nair. 2009. History-Pollination, pp. 233-249 in *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, X*, edited by T. Kull, J. Arditti, and S.M. Wong. Springer, Dordrecht.
- Bhai, R.S., A. Ishwara Bhat, and M. Anandaraj. 2006. Yellowing and premature bean dropping in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). J. Plant. Crops 34:115-117.
- Bory, S., S. Browm, M.F. Duval, and P. Besse. 2010. Evolutionary processes and diversification in the genus *Vanilla*, pp. 15-28 in *Vanilla*, edited by E. Odoux and M.

- Grisoni. Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Brewbaker, J.L. and B.H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50:859-865.
- Burke, J.J., J.Velten, and M.J. Oliver. 2004. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. *Agron. J.* 96:359.
- Chiang, M.S. 1974. Cabbage pollen germination and longevity. *Euphytica* 23:579-584.
- Cohen, E., U. Lavi, and P. Spiegel-Roy. 1989. Papaya pollen viability and storage. *Sci. Hortic.* 40:317-324.
- DeCeault, M.T. and V.S. Polito. 2010. High temperatures during bloom can inhibit pollen germination and tube growth, and adversely affect fruit set in the *Prunus domestica* cultivars 'Improved French' and 'Muir Beauty'. *Acta Hortic.* 874:163-168.
- Ecott, T. 2004. *Vanilla: Travels in search of the ice cream orchids*. Michael Joseph, London.
- Ferrari, T.E. and D.H. Wallace. 1975. Germination of *Brassica* pollen and expression of incompatibility *in vitro*. *Euphytica* 24:757-765.
- 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. 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.
- Karni, L. and B. Aloni. 2002. Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. *Ann. Bot.* 90:607-612.
- Lubinsky, P., M. Van Dam, and A. Van Dam. 2006. Pollination of *Vanilla* and evolution in Orchidaceae. *Orchids* 75:926-929.
- Nava, G.A., G.A. Dalmago, H. Bergamaschi, R. Paniz, R.P. dos Santos, and G.A.B. Marodin. 2009. Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of 'Granada' peach. *Sci. Hortic.* 122:37-44.
- Nissar, V.M., T. Hrideek, K. Kuruvilla, K. Madhusoodanan, and J. Thomas. 2006. Studies on pollination, inter specific hybridization and fruit development in vanilla. *J. Plant. Crops* 34:167-170.

- Pressman, E., M.M. Peet, and D.M. Pharr. 2002. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann. Bot.* 90:631-636.
- Ravindran, P.N. 1979. Nuclear behaviour in the sterile pollen of *Vanilla planifolia* (Andrews) . *Cytologia* 44:391-396.
- Shadakshari, Y.G., D. Madaiah, M. Dinesh Kumar, K.V. Shivakumar, and K.H. Bhagavantha Goudra. 2003. Pollen viability and stigma receptivity in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *J. Spices Aromat. Crops* 12:194-196.
- Stern, R.A. and S. Gazit. 1998. Pollen viability in Lychee. *Journal of the American Society for Hortic. Sci.* 123:41-46.
- Subbaiah, C.C. 1984. A polyethylene glycol based medium for *in vitro* germination of cashew pollen. *Can. J. Plant Sci.* 62:2473-2475.
- Sukhvibul, N., A.W. Whiley, V. Vithanage, M.K. Smith, V.J. Doogan, and S.E. Hetherington. 2000. Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75:214-222.
- Suzuki, K., T. Tsukaguchi, H. Takeda, and Y. Egawa. 2001. Decrease of pollen stainability of green bean at high temperatures and relationship to heat tolerance. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:571-574.
- Vasil, I.K. 1987. Physiology and culture of pollen. *Int. Rev. Cytol.* 107:127-174.
- Vasilakakis, M. and I.C. Porlingis. 1985. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. *HortScience* 20:733-735.
- Yeh, C.H., K.Y. Chen, and Y.I. Lee. 2021. Asymbiotic germination of *Vanilla planifolia* in relation to the timing of seed collection and seed pretreatments. *Bot. Stud.* 62:6.

Study on flowering characteristics and Pollen Growth of Vanilla at High Temperature¹

Yi-Hua Lin², Chih-Hsin Yeh², Chia-Yi Chou², and Kai-Yi Chen³

Abstract

Vanilla is an important spice crop. To understand the factors that affect the implementation of artificial pollination in the cultivation environment in Taiwan, this study evaluated the pollen activity of different times in a day during vanilla flower open, the effect of short-term high-temperature on pollen activity and pollen tube development. The method to measure pollen activity was developed from the *in vitro* pollen germination trials. The results included BK medium without sucrose is the best for *in vitro* pollen germination, and 25-30°C is the optimum temperature. During vanilla flowers opened, the pollen activity was highest at midnight and had no significant reduction before 9 am, but decreased significantly after 12 pm. High temperature significantly affects pollen activity. It is harmful effects at 35°C for 1 hour, including abnormal pollen tubes and stunt growth of pollen tube, but the growth of pollen tube can be restored at 25°C. The longer the high-temperature treatment, the worse the harmful effects; treatment at 40°C for 1 hour will cause severe damage to the pollen tube and unable to recover. In this study, high temperature affects the pollen germination rate and inhibits the growth of pollen tubes. During the pollination period, attention should be paid to field temperature management to improve the success rate of pod formation.

Key words: pollen tube, temperature, germination percentage

¹. Contribution No. 532 from Taoyuan DARES, COA.

². Assistant Researcher, Associate Researcher (Corresponding author, zeamays@tydais.gov.tw), and Research Assistant, Taoyuan DARES, COA.

³. Associate Professor, Department of agronomy, NTU.