

乾燥處理及超低溫保存對兩種原生種白花蝴蝶蘭 種子活力之影響¹

相爾璇² 蔡媚婷^{3,6} 謝廷芳³ 松本敏一⁴ 新野孝男⁵

摘 要

相爾璇、蔡媚婷、謝廷芳、松本敏一、新野孝男。2011。乾燥處理及超低溫保存對兩種原生種白花蝴蝶蘭種子活力之影響。台灣農業研究 60:309–317。

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume 及 *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f. 為白花原生種蝴蝶蘭，是極重要之育種材料。本研究測試乾燥處理與超低溫保存對該二原生種種子活力的影響，結果顯示 *Phal. amabilis* 無論有無經過超低溫處理，其種子活力率及發芽率皆隨乾燥處理日數之增加而降低。新鮮種子未經過乾燥處理而直接進行超低溫保存後仍有 99.3% 之發芽率，而乾燥處理 1、4 或 7 天之種子發芽率分別為 96.7、87.0 或 72.0%。然而，*Phal. aphrodite* 新鮮種子若未經過乾燥處理而直接進行超低溫保存，則種子完全失去活力，種子經播種 4 週後亦完全不生長。而種子經過 1–7 天之乾燥後再進行超低溫保存，種子之活力率雖然由 87.0% 降至 77.0%、而發芽率由 97.0% 降至 87.0%，但是仍有極高之活性。本研究顯示不同原生種蝴蝶蘭種子對超低溫保存所需之乾燥需求不同，對此二個原生種而言，乾燥處理 1 天後再進行超低溫保存，可保持與新鮮種子相同之活力。

關鍵詞：蝴蝶蘭、種子、超低溫保存。

前 言

蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis* spp.) 為單莖著生性蘭科植物，約有 66 種原生種 (Christenson 2001)，主要分佈於南、北迴歸線間之熱帶亞洲地區，台灣的恆春半島及蘭嶼亦為原生地之一。其中 *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume 及 *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f. 為蝴蝶蘭屬中極為重要之育種材料，多數之商業品種皆含有此

二原生種之親緣。二者之形態及原生地相近，且因為花色純白優雅、花形優美、且具有多花之特性，在商業生產中常被獨立成為一個銷售品項，許多業者仍以種子作為繁殖材料，是相當重要的商業原種及育種親本。

由於蘭科植物種質資源的保存對於蘭花產業發展及生物多樣性有長遠的重要性 (He *et al.* 2010)，且蘭科植物之種子數量大而細小，所需貯藏空間小，極有利於作為種質資源保存的材料

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2604 號。接受日期：100 年 11 月 30 日。

2. 國立嘉義大學園藝系學生。台灣 嘉義市。

3. 本所花卉研究中心聘用副研究員、研究員兼主任。台灣 雲林縣。

4. 日本島根大學生物資源科學部附屬生物資源教育研究中心副教授。日本 島根縣。

5. 日本獨立行政法人農業生物資源研究所種原庫上級研究員。日本 筑波市。

6. 通訊作者，電子郵件：wttsai65@tari.gov.tw；傳真機：(05)5820835。

(Engelmann 1997; Martinez *et al.* 1999; Sakai *et al.* 2000; Gonzalez-Arnoa *et al.* 2008)。而超低溫保存被認為具有便利、低成本、節省空間及人力之優點 (Roos & Davidson 1992)，在-196°C 的液態氮中，可穩定保存材料的遺傳特性、降低多次繼代培養產生的突變及污染機會，並維持細胞再生能力 (Tsai & Wang 2006)，為一種可以長期保存植物種質資源的技術 (Bajaj 1995; Towill 1996; Engelmann 2000; Burritt 2008)。

本研究以 *Phal. amabilis* 及 *Phal. aphrodite* 二個白花蝴蝶蘭原生種之種子為材料，調查經乾燥處理及液態氮超低溫保存後之種子發芽能力，以作為未來蝴蝶蘭屬其它原生種種子長期保存研究之參考。

材料與方法

供試材料

以行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心蒐集與栽培的兩個白花蝴蝶蘭原生種 *Phal. amabilis* (L.) Blume 及 *Phal. aphrodite* Rchb. f. 之種內雜交授粉果莢為材料。授粉日期為 2011 年 3 月 9 日，果莢採收期為 2011 年 7 月 25 日。於採收當日，將果莢以 70% 酒精擦拭後，經 2% NaOCl 溶液進行表面消毒 10 分鐘，再以無菌水沖洗 3 次，然後於無菌操作台將果莢剖開取出新鮮種子。

試驗設計

試驗採完全隨機設計，每一個原種之新鮮種子經過 0、1、4、或 7 天之乾燥處理，乾燥天數結束再各取部分種子，進行液態氮超低溫處理 1 小時 (+ LN) 與不處理 (- LN) 兩種處理方式，計有乾燥 0 天 - LN、乾燥 0 天 + LN、乾燥 1 天 - LN、乾燥 1 天 + LN、乾燥 4 天 - LN、乾燥 4 天 + LN、乾燥 7 天 - LN、乾燥 7 天 + LN，共 8 種處理，每處理重複 3 次，經此處理後再進行種子活力率與發芽率檢測。

種子乾燥處理

新鮮種子均分成 12 份，各用已滅菌之 9.5 cm × 9.5 cm 秤藥紙包裝。在直徑 10 cm 已滅菌玻璃培養皿中放入 14 g 高溫乾燥之矽膠粒，每一培養皿放 4 包種子，蓋上皿蓋再以石蠟膜封口。隨即將玻璃培養皿放入直徑 30 cm 的乾燥缸，乾燥缸底部置入 200 g 矽膠粒，再將乾燥缸置於 25°C 組培室。無超低溫處理者，經過乾燥 1、4、或 7 天之後，自培養皿內隨機各取出 1 包種子，進行活力及發芽率檢測。

超低溫保存與回溫處理

每個原種種子經過 1、4、或 7 天乾燥處理之後，自乾燥缸之培養皿內各隨機取出 1 包種子，裝入已滅菌之 2 mL 冷凍管中，再放入冷凍盒後投入液態氮中。經 1 小時後取出冷凍管，迅速投入 40°C 水浴槽中解凍 1 分鐘，然後進行種子活力與發芽率檢測。

種子 TTC 活力檢測

於 5 mL 固定瓶中加入 1.5 mL 之 1% TTC (triphenyl tetrazolium chloride, pH7.0) 染劑，然後將種子倒入固定瓶中，於 30°C、黑暗之恆溫箱中染色 24 小時。之後將種子取樣置於載玻片上，利用光學顯微鏡觀察並調查種子被染色之情形。每支固定瓶隨機算取 200 粒有胚種子，以胚被染成洋紅色者代表種子具有活力 (圖 1A、1B)，呈現淡粉紅色 (圖 1A) 或是不被染色 (圖 1B) 者視為不具活力。

種子活力率 (%) = (胚呈洋紅色之種子數 / 有胚種子數) × 100

種子發芽率檢測及生長調查

取 2 mL 已滅菌冷凍管，於距底部 2 mm 處劃上刻度，然後將種子倒入至試管之刻度處，再加入無菌水至 2 mL 後搖晃均勻，製成種子懸浮液。然後以吸管吸取 0.6 mL 種子懸浮液，播種於直徑 55 mm 培養皿中。培養皿內為 7 mL 含 Knudson C (1946) 無機鹽類、蔗糖 20 g L⁻¹

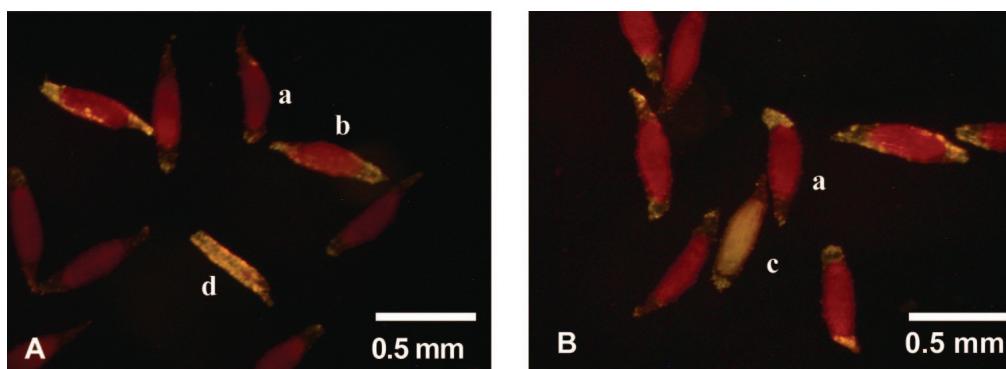


圖 1. TTC 染色法測定蝴蝶蘭種子活力。(A) *Phalaenopsis aphrodite*; (B) *Phalaenopsis amabilis*; (a) 胚具活力; (b) 及(c) 胚不具活力; (d) 無胚種子。

Fig. 1. Viability tests of seeds of *Phal. aphrodite* (A) and *Phal. amabilis* (B) by the TTC staining method. Note differences in color of viable seeds (a), non-viable seeds (b and c) and embryoless seed (d).

及馬鈴薯 34 g L^{-1} 、pH 5.8 之洋菜固體培養基。然後將培養皿置於 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光期 12 小時、 $33 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PPF (photosynthetic photon flux density) 環境下培養。之後每隔一週於解剖顯微鏡下觀察及量測胚之生長增大情形，計調查 4 週，每個培養皿隨機量測 30 粒有胚種子之胚的平均直徑。發芽率則以播種 2 週後，胚直徑膨大 2 倍以上者視為發芽，每個培養皿隨機算取 200 粒有胚種子。

發芽率 (%) = (播種 2 週後胚膨大 2 倍以上之種子數/有胚種子數) $\times 100$

統計分析

活力率與發芽率資料在進行分析之前先予以 Sin^{-1} 角度轉換，再以 COSTAT 6.2 統計分析軟體 (CoHort Software, USA) 進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA) 及最小顯著差異性 (Least significant difference, LSD) 測驗比較各處理間平均值之差異。

結 果

Phal. amabilis 新鮮種子之活力 (即 TTC 之染色率) 及發芽率分別為 93.3% 及 100.0%，其經乾燥處理及超低溫保存後之種子活力及發芽

率如表 1 所示。無論有無經過超低溫保存處理，其種子活力及發芽率皆隨乾燥處理日數之增加而降低，而且乾燥處理 1 或 4 天之種子活力及發芽率降低幅度較小，而乾燥處理 7 天後之種子無論活力及發芽率皆大幅下降。而且種子經過相同之乾燥日數，無論有無經過超低溫保存，其活力及發芽率無顯著差異。至於以染色率所代表之活力雖較發芽率為低，但是與發芽率有相同之趨勢。

另外，*Phal. aphrodite* 種子經乾燥處理及超低溫保存處理後之種子活力及發芽率如表 2 所示。無經過超低溫保存者，其種子 TTC 染色率由 96.0% 降至 69.3%，而發芽率則由 97.7% 降至 83.7%，雖然皆隨乾燥處理日數之增加而降低，但是下降之幅度較 *Phal. amabilis* 小。而且新鮮種子若未經過乾燥處理即直接進行超低溫保存處理，則種子完全失去活力，且完全不發芽 (表 2、圖 2A)。而種子經過 1-7 天之乾燥後，再進行超低溫保存，雖然種子之活力由 87.0% 降至 77.0%，而發芽率由 97.0% 降至 87.0%，但是仍有相當之活性 (表 2、圖 2B)。

Phal. amabilis 種子經乾燥處理及超低溫保存後，將種子進行無菌播種，其原球體生長速

表 1. 種子乾燥處理日數及超低溫保存對 *Phalaenopsis amabilis* 種子活力及發芽率之影響Table 1. Effects of drying treatment and cryopreservation on seed viability and seed germination of *Phal. amabilis*

Treatment ^z	Seed drying (d)	Seed viability (%)	Seed germination (%)
- LN	0	93.3 ± 0.5 a ^y	100.0 ± 0.0 a
	1	91.7 ± 0.5 ab	97.0 ± 0.8 b
	4	87.7 ± 0.5 c	88.0 ± 0.8 c
	7	59.0 ± 2.2 d	69.7 ± 2.4 d
+ LN	0	91.7 ± 0.9 ab	99.3 ± 0.5 a
	1	88.7 ± 1.3 c	96.7 ± 0.9 b
	4	89.7 ± 1.7 bc	87.0 ± 0.8 c
	7	62.7 ± 1.7 d	72.0 ± 2.2 d

^z - LN, without cryopreservation; + LN, with cryopreservation.

^y Values are Mean ± standard error (n = 3). Means followed by the same letter(s) within each column are not significant difference at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

表 2. 種子乾燥處理日數及超低溫保存對 *Phalaenopsis aphrodite* 種子活力及發芽率之影響Table 2. Effects of drying treatment and cryopreservation on seed viability and seed germination of *Phal. aphrodite*

Treatment ^z	Seed drying (d)	Seed viability (%)	Seed germination (%)
- LN	0	96.0 ± 0.8 a ^y	97.7 ± 0.5 a
	1	89.0 ± 0.8 b	96.0 ± 0.8 a
	4	70.7 ± 2.1 d	90.0 ± 0.8 b
	7	69.3 ± 0.9 d	83.7 ± 3.7 c
+ LN	0	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 d
	1	87.0 ± 1.4 b	97.0 ± 0.8 a
	4	78.7 ± 1.3 c	87.0 ± 1.6 bc
	7	77.0 ± 0.8 c	87.0 ± 0.8 bc

^z - LN, without cryopreservation; + LN, with cryopreservation.

^y Values are Mean ± standard error (n = 3). Means followed by the same letter(s) within each column are not significant difference at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

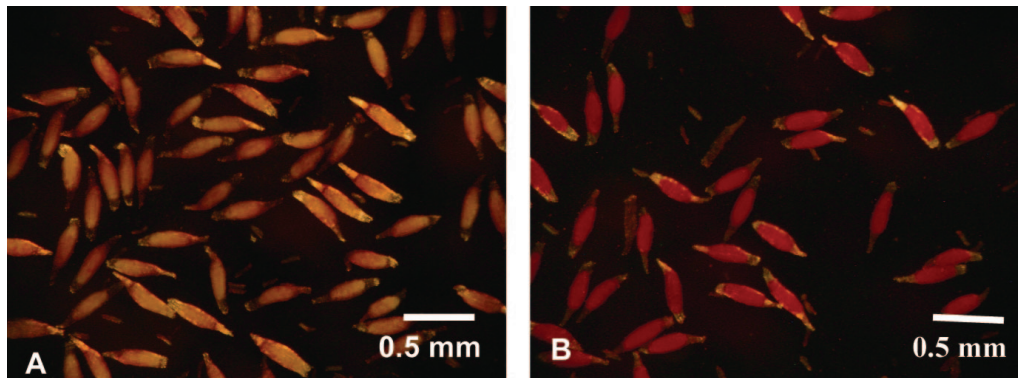


圖 2. 乾燥預處理 7 天對超低溫保存後 *Phalaenopsis aphrodite* 種子 TTC 活力檢測之影響。(A) 未乾燥處理；(B) 乾燥處理 7 天。

Fig. 2. Effect of drying treatment and cryopreservation on seed viability of *Phal. aphrodite*. Seeds were stained by the TTC method. Note differences in seed color in the sample treated with cryopreservation only (A) and the sample dried for 7 days prior to cryopreservation (B).

率如圖 3 所示。未經過超低溫處理者，播種後 4 週後原球體之生長，以乾燥處理 1 天者生長較快，其次為乾燥 4 或 7 天者，未經乾燥處理者生長較慢 (圖 3A)。而種子經過 0-7 天之乾燥後，再進行超低溫處理，經播種後其生長幾

無差異 (圖 3B)。

Phal. aphrodite 種子經乾燥處理及超低溫保存後，將種子進行無菌播種，其原球體生長速率如圖 4 所示。未經過超低溫處理者，在 0-7 天乾燥前處理，其原球體在播種後 4 週之

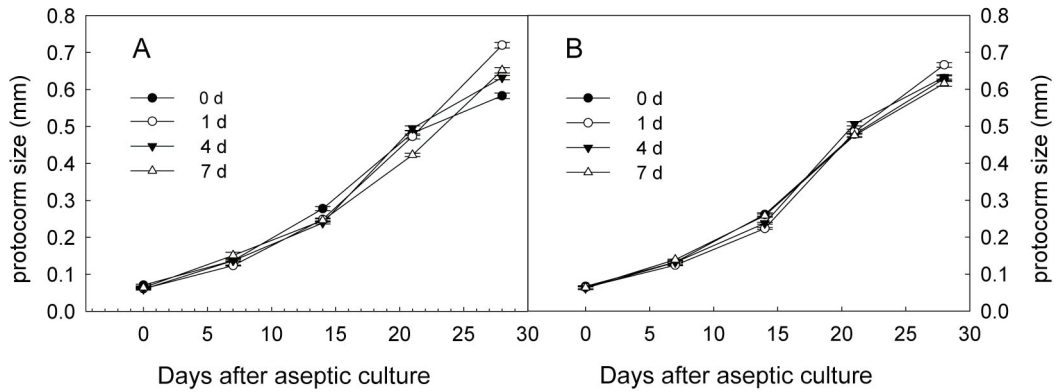


圖 3. 乾燥處理日數及超低溫保存對 *Phalaenopsis amabilis* 種子無菌播種原球體生長之影響。(A) 無超低溫處理；(B) 超低溫處理。

Fig. 3. Effects of drying period and cryopreservation of seeds on the protocorm growth of *Phal. amabilis*. (A) Seeds without cryopreservation; (B) Seeds with cryopreservation. The vertical bars indicate standard deviation.

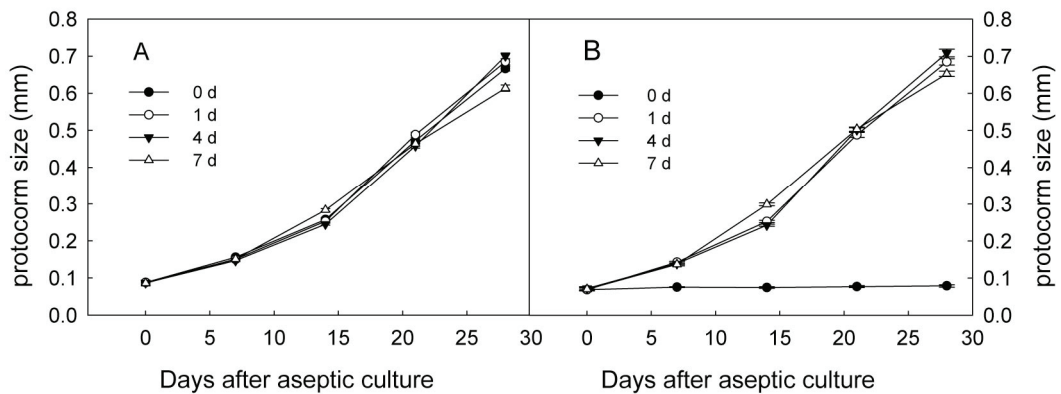


圖 4. 乾燥處理日數及超低溫保存對 *Phalaenopsis aphrodite* 種子無菌播種原球體生長之影響。(A) 無超低溫處理；(B) 超低溫處理。

Fig. 4. Effects of drying period and cryopreservation of seeds on the protocorm growth of *Phal. aphrodite*. (A) Without cryopreservation; (B) With cryopreservation. The vertical bars indicate standard deviation.

生長速率並無差異 (圖 4A)。而未經乾燥即進行超低溫貯藏者,解凍後種子 TTC 檢測則呈現沒活力 (圖 2A),經播種 4 週後亦完全不生長 (圖 4B、圖 5A)。而種子經過 1-7 天乾燥處理後,再經超低溫處理,其種子可正常發芽且原球體生長速率無差異 (圖 4B),播種 4 週後之原球體已產生吸收毛 (圖 5B)。

討 論

許多研究指出,植物組織中含有水分,利用超低溫液態氮保存處理時,細胞內易因形成冰晶而破壞造成死亡 (Sakai *et al.* 1990; Pence 1992; Vendrame *et al.* 2007)。因此適當的脫水和保護可以增加抗凍性而提升發芽率,而良好的脫水步驟是成功的關鍵。Hirano *et al.* (2009) 指出,使用 PVS2 (plant vitrification solution 2) 來預處理脫水乾燥,有嚴格的條件和規範,預處理的時間和溫度,皆因不同品種而有所差異,所以不利於進行大規模的冷凍保存。雖然 PVS2 常被作為超低溫保存時之冷凍保護劑,但因蝴蝶蘭的種子細小,僅有未分化原始胚而不含胚乳,且水分含量相對少,因此本研究不採用玻

璃質液處理方法,而以矽膠粒進行乾燥脫水。由表 1 與表 2 顯示乾燥處理後再經超低溫處理,其種子活力與發芽率皆高於 60%,證明運用矽膠粒達到乾燥的可行性。

Hirano *et al.* (2009) 指出,鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 之成熟種子以超低溫保存在 -196°C 的液態氮下,不管是放入 30 分鐘或 12 個月的時間,種子的活力和發芽率皆不受影響,所以短期的液態氮浸入,得到的結果就可以用來估算長期的保存效果。因此本研究以置入液態氮 1 小時後之發芽率代表長期貯藏後之種子活力。

植物物種或品種間基因組成或生理成熟程度不同,因此對於低溫保存的最適含水量與乾燥脫水的反應會有所差異 (Hirano *et al.* 2009)。有研究指出,部份蘭科種子不需經過預處理,就可以成功地達到超低溫保存的效果 (Pritchard 1984; Pritchard *et al.* 1999; Thammasiri 2000; Nikishina *et al.* 2001)。然而有些蘭科種子已被證實,如欲長期保持活力,其種子含水量則需要由 5% 降至 3%,才有利於超低溫的長期保存

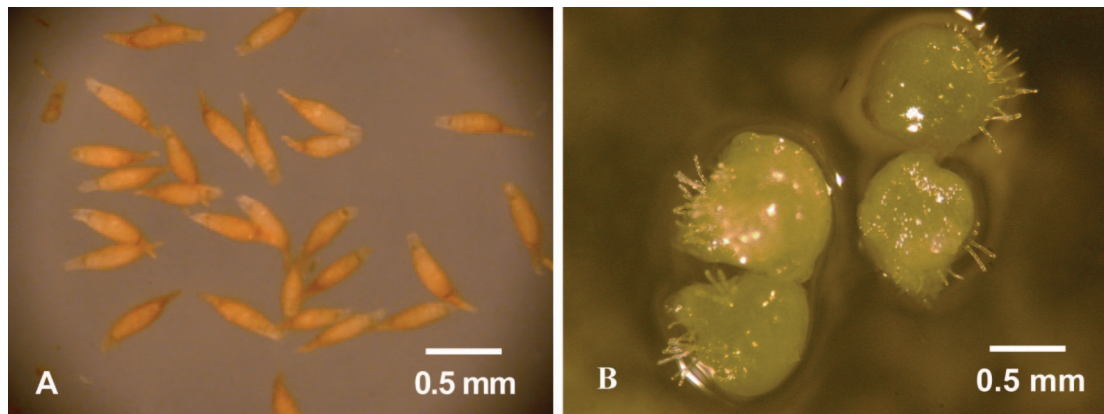


圖 5. *Phalaenopsis aphrodite* 種子經超低溫處理後進行無菌播種 4 週之原球體生長情形。(A) 未乾燥處理;(B) 乾燥處理 7 天。

Fig. 5. Formation of protocorms of *Phal. aphrodite* from seeds dried for 7 days, treated with cryopreservation and then cultured for 4 weeks under aseptic conditions (B). Note no germination of cryopreserved seeds without drying treatment (A).

(Seaton & Hailes 1989; Pritchard *et al.* 1999)。本研究結果顯示，*Phal. amabilis* 種子即使不經過乾燥處理而直接進行超低溫保存，仍有極高之活力與發芽率 (表 1、圖 3)，但是 *Phal. aphrodite* 種子則完全失去活性及發芽能力 (表 2、圖 4B、圖 5A)，顯示不同原生種蝴蝶蘭之種子仍有極大差異，而此差異是否因為新鮮種子之含水量不同所造成，仍需進一步研究。然而兩個原生種種子經過 1 天乾燥後，皆可達 96% 以上之發芽率，且發芽率隨乾燥日數增加而降低 (表 1、2)。因此建議此兩個原生種的種子在進行冷凍保存之前，先乾燥處理 1 天為較佳。

另外，已有研究證明 TTC 染色法可以成功地估計蘭科種子的存活率，並證實在長期保存後的種子發芽率 (Singh 1981; Van Waes & Debergh 1986a, b)，因此本研究以 TTC 染色法估算種子活力，並與播種發芽率進行比較，結果顯示以 TTC 染色法估算之種子活力率，皆較實際之播種發芽率為低 (表 1、2)，推測其原因可能是因為本研究將胚染色後呈淡粉紅色者視為無活力種子所造成的結果。但是因為活力率之變化趨勢與播種發芽率相近，因此，TTC 檢測結果仍可視為蝴蝶蘭種子活力之參考指標。

本研究比較兩種白花蝴蝶蘭原生種種子之簡易乾燥處理對超低溫保存後活力之影響，並證明其可行性，可做為未來蘭科種子超低溫保存研究之參考依據。

誌 謝

本研究承蒙農業試驗所作物組呂椿棠博士協助統計分析，特致謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

- Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. p.3-18. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry Cryopreservation of Plant Germplasm I. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer, New York.
- Burritt, D. J. 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begoniex erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 95:209-215.
- Christenson, E. A. 2001. *Phalaenopsis*: A monograph. Timber Press Inc. Portland, Oregon, USA. 396 pp.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. p.119-162. *in*: Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use. (Ford, B. V., J. H. Newbury, and J. A. Callow, eds.) CAB International. Wallingford, UK.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. p. 8-20. *in*: Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application. (Engelmann, F. and H. Takagi, eds.) Japan International Research Center for Agriculture Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- He, M. G., R. X. Wang, X. Q. Song, S. Q. Song, and R. L. Zhang. 2010. Study on cryopreservation of *Dendrobium chrysanthum* (Orchidaceae) seeds. *Acta Bot. Yunnanica.* 32:334-338. (in Chinese with English abstract)
- Hirano, T., T. Godo, and K. Miyoshi. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnol. Rep.* 3: 103-109.
- Gonzalez-Arnoa, M. T., A. Panta, W. M. Roca, R. H. Escobar, and F. Engelmann. 2008. Development and large scale application of cryopreservation technique of shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92: 1-13.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 15:214-217.
- Martinez, D., S. R. Tames, and A. M. Revilla. 1999. Cryopreservation of in vitro grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep.* 19:59-63.
- Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, and B. N. Golovkin. 2001. Effect of cryopreservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russ. J. Plant Physiol.* 48:810-815.

- Pence, V. C. 1992. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology* 29:391–399.
- Pritchard, H. W. 1984. Liquid nitrogen preservation of terrestrial and epiphytic orchid seed. *CryoLetters* 5:295–300.
- Pritchard, H. W., A. L. C. Poyner, and P. T. Seaton. 1999. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. *Lindleyana* 14:92–101.
- Roos, E. E. and D. A. Davidson. 1992. Record longevities of vegetable seeds in storage. *HortScience* 27:393–396.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30–33.
- Sakai, A., T. Matsumoto, D. Hirai, and T. Niino. 2000. Newly developed encapsulation/dehydration protocol for plant cryopreservation. *CryoLetters* 21:53–62.
- Seaton, P. T. and N. S. J. Hailes. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seeds. p.17–29. *in: Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology, and Management.* (Pritchard, H.W., ed.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Singh, F. 1981. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 50:416–418.
- Thammasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. *CryoLetters* 21:237–244.
- Towill, L. E. 1996. Vitrification as a method to cryopreserve shoot tips. p.297–304. *in: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises.* (Trigiano, R. S. and D. J. Gray, eds.) CRC Press. Boca Raton.
- Tsai, K. S. and Y. N. Wang. 2006. Study on Cryopreservation of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* by vitrification technique. *Quar. J. Chin. For.* 39: 469–475. (in Chinese with English abstract)
- Vendrame, W. A., V. S. Carvalho, and J. M. M. Dias. 2007. *In vitro* germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Sci. Hort.* 114:188–193.
- Van Waes, J. M. and P. C. Debergh. 1986a. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electroscopy study of some Western European orchid. *Physiol. Plant.* 66:435–442.
- Van Waes, J. M. and P. C. Debergh. 1986b. *In vitro* germination of some Western European orchid. *Physiol. Plant.* 67:253–261.

Effects of Drying Treatment and Cryopreservation on Seed Viability of *Phalaenopsis amabilis* and *Phalaenopsis aphrodite*¹

Eur-Hsuan Hsiang², Wei-Ting Tsai^{3,6}, Ting-Fang Hsieh³,
Toshikazu Matsumoto⁴, and Takao Niino⁵

Hsiang, E. H., W. T. Tsai, T. F. Hsieh, T. Matsumoto, and T. Niino. 2011. Effects of drying treatment and cryopreservation on seed viability of *Phalaenopsis amabilis* and *Phalaenopsis aphrodite*. J. Taiwan Agric. Res. 60:309–317.

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume and *Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f., are important native species of white flower *Phalaenopsis* used in the orchid breeding program. The objective of this study was to determine effects of seed-drying and cryopreservation on seed viability of these two native *Phalaenopsis* species. Results showed that viability and germination of *Phal. amabilis* seeds, with or without cryopreservation treatment, decreased with increased time of drying treatment. Germination rates of seeds of *Phal. amabilis* drying for 0, 1, 4 and 7 days and then treated by cryopreservation were 99.7, 96.7, 87.0 and 72.0%, respectively. In *Phal. aphrodite*, cryopreservation of fresh seeds without pre-treatment of seed drying resulted in complete loss of seed viability and germinability. However, when the seeds were dried for 1–7 days and then treated with cryopreservation, viability and germination of seeds of *Phal. aphrodite* remained high, 77.0% for viability and 87.0% for germination. These results indicate that the time required for seed drying treatment before cryopreservation varies between *Phal. amabilis* and *Phal. aphrodite* and that seeds drying for 1 day before cryopreservation can maintain the same viability as the fresh seeds without cryopreservation.

Key words: *Phalaenopsis amabilis*, *Phalaenopsis aphrodite*, Seed, Cryopreservation.

-
1. Contribution No. 2604 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: November 30, 2011.
 2. Senior student, Department of Horticulture, National Chiayi University, Chiayai, Taiwan, ROC.
 3. Associate Researcher and Researcher, Floriculture Research Center, TARI, Taichung, Taiwan, ROC.
 4. Associate Professor, Education and Research Center for Biological Resources, Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University, Shimane, Japan.
 5. Senior Scientist, Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.
 6. Corresponding author, e-mail: wtsai65@tari.gov.tw; Fax: (05)5820835.