

矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究

吳容儀¹ 林景平² 謝廷芳³ 莊耿彰⁴ 戴廷恩⁵ 張育森^{6,*}

摘要

吳容儀、林景平、謝廷芳、莊耿彰、戴廷恩、張育森。2020。矽膠乾燥技術於蘭科植物種子超低溫保存上之應用研究。台灣農業研究 69(4):286–297。

矽膠乾燥法 (silica gel desiccation) 已成功應用於台灣白及 (*Bletilla formosana*) 種子超低溫保存 (cryopreservation)，本研究持續探討經 24 h 乾燥的種子配合不同超低溫保存期間對台灣白及與白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 種子保存後活力之影響。經於液態氮 (liquid nitrogen; LN) 保存 48 mo 後，台灣白及種子仍能維持 87.7% 高發芽率，比新鮮種子更高；白花蝴蝶蘭種子於 LN 保存 15 mo 後，亦能維持 100.0% 高發芽率，且較新鮮種子發芽率 (74.6%) 顯著更高，後續小苗生長發育也正常。將乾燥法作為前處理，應用在紅花鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 花粉、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭 (*Vanda lamellata*) 及丹尼森萬代蘭 (*Vanda denisoniana*) 的種子超低溫保存。結果顯示，經過前處理再於 LN 保存之紅花鶴頂蘭花粉可維持高發芽率 (81.0%)，在種子保存方面，經過 24 h 乾燥處理再進行超低溫保存 24 h，保存後白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭、丹尼森種子發芽率分別為 88.0%、100.0% 及 100.0%。其中，雅美萬代蘭種子對水分逆境具有耐性，能夠忍受乾燥且能於低溫下保存不會失去活力，符合正貯型種子的特質。因此，矽膠乾燥法同樣適用於紅花鶴頂蘭花粉、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭及丹尼森萬代蘭種子，可作為超低溫保存之前處理。

關鍵詞：蘭花、乾燥法、遺傳資源、長期保存。

前言

隨著全球環境的變遷，氣候日益惡化，許多珍貴值得開發的蘭花因自然環境與人為因素，其野生族群逐年驟減，致使蘭花種原收集難度遽增。因此，所保存的種原如何長期且有效的延續，越益顯得格外重要。蘭花種子或花粉常見以低溫冷藏、低相對濕度或者結合兩種方式之保存，短期內可維持活力，但超過一定的時間，活力便受到影響。例如，台灣白及 (*Bletilla formosana*) 與鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 種子在低溫或低相對濕度環境保存 4 mo，可以維持高活力，但 6 mo 以後種子活力

便受到影響 (Chang *et al.* 2006; Hirano *et al.* 2009)。業界常使用的保存方式，如溫網室植株保存或花粉種子於冰箱低溫環境之保存，這幾種方式多屬於短期保存，保存期間也容易因栽培或環境因素產生生理或病蟲害等問題，最終將面臨種原流失的結果 (Wu *et al.* 2016)。因此，就蘭花產業永續發展而言，發展蘭花遺傳資源長期保存的方式非常重要。超低溫保存 (cryopreservation) 技術應用在種原之長期保存方面已行之有年，為目前國際公認可作為長期保存技術之一。保存前之前處理技術與超低溫保存能否成功有密切相關 (Ishikawa *et al.* 1997; Thammassiri 2000; Hirano *et al.*

投稿日期：2020 年 5 月 29 日；接受日期：2020 年 9 月 16 日。

* 通訊作者：yschang@ntu.edu.tw

¹ 農委會農業試驗所花卉研究中心副研究員兼系主任。台灣 雲林縣。

² 農委會農業試驗所花卉研究中心計畫助理。台灣 雲林縣。

³ 農委會農業試驗所植病組研究員兼組長。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼系主任。台灣 雲林縣。

⁵ 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼中心主任。台灣 雲林縣。

⁶ 國立台灣大學園藝暨景觀學系教授。台灣 台北市。

2006; Gonzalez-Arno *et al.* 2008)，許多蘭花種子於液態氮 (liquid nitrogen; LN) 保存之前處理方式已經建立 (Ishikawa *et al.* 1997; Thammasiri 2000; Hirano *et al.* 2005a, 2005b; Hsiang *et al.* 2011; Popova *et al.* 2016)。種子前處理結束後，於 LN 中的保存時間，理論上當植物組織或器官置入超低溫 -196°C LN 環境中保存，在此極度低溫下幾乎所有細胞生理代謝活動幾已停止，但是仍能維持生命活力，不易發生退化或體細胞變異的現象，因此推測可以長期有效地保存植物組織 (Na & Kondo 1996; Engelmann 2000; Matsumoto *et al.* 2001; Gonzalez-Arno *et al.* 2008; Hirano *et al.* 2009)。多數研究報告僅以短時間之 LN 保存視同具有長期保存之效果，例如：10–30 min、1 h、1 d、1 wk、1–3 mo 或 1 yr (Thammasiri 2000; Wood *et al.* 2000; Nikishina *et al.* 2007; Hay *et al.* 2010; Hirano *et al.* 2011; Galdiano *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013)，事實上有關植物組織實際在 LN 中經多年長期保存後之活力變化鮮有相關研究 (Hirano *et al.* 2009; Hu *et al.* 2013)。作者前已建立實用的台灣白及種子超低溫保存流程 (Wu *et al.* 2013; Wu *et al.* 2018)，本研究則進一步將此技術應用至其他蘭科植物遺傳資源之長期保存。保存物種的考量，以具有觀賞性或其他特用價值、經濟價值者為主要保存對象，並觀測不同超低溫保存時間對台灣白及與蝴蝶蘭種子後續活力等之影響，冀望研究成果能實際應用在產業，帶來經濟效益。

本研究選定紅花鶴頂蘭 (*P. tankervilleae*)、白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)、丹尼森萬代蘭 (*Vanda denisoniana*) 及雅美萬代蘭 (*Vanda lamellata*) 的種子或花粉為保存對象，將矽膠乾燥法應用於以上蘭花之遺傳資源，並期待後續能擴大應用在其他蘭科植物上，建立蘭花遺傳資源超低溫長期保存之資料庫平台，有助於種原長期保存。

材料與方法

超低溫保存時間對台灣白及與白花蝴蝶蘭種子保存後活力之影響

本試驗以種子為試驗材料，分別於台灣白

及授粉後 90 d、白花蝴蝶蘭授粉後 189 d 時，將果莢取下，以 1% 次氯酸鈉 (sodium hypochlorite; NaOCl) 溶液消毒 10 min，再以無菌水沖洗果莢表面 3 次。取出種子充分混合後分裝成小包，每小包重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理為 3 重複。先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒 (silica gel) 的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，在實驗室環境下 ($27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 進行乾燥 24 h。乾燥結束後，再將種子取出置入冷凍管 (cryotube vial) 內，然後放入 LN 保存，於保存後第 1、6、12、18、24、27、30、33、36、48 個月將再將冷凍管取出，以 40°C 水浴、1 min 回溫處理。將種子進行無菌播種，接著調查發芽率。

白花蝴蝶蘭試驗用種子，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理 5 重複。保存前的預處理方式與台灣白及相同，於 LN 中保存 3、6、15 mo 後，將冷凍管取出經上述回溫處理，予無菌播種後，進行發芽率調查。以直徑 6 cm 的塑膠培養皿為播種容器，播種培養基為經 121°C 高溫、 1.05 kg cm^{-2} 高壓滅菌 20 min 之 1/2 MS 培養基 (Murashige & Skoog 1962)，並含有 2% 蔗糖、7% 洋菜、0.1% 活性碳，pH 調整為 6.0。播種後置於恆溫 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光強度 $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 及 14 h 光週期環境中培養。經播種後 30 d，以解剖顯微鏡觀察並記錄種子發芽數，每個重複樣品計算 200 個種子。

台灣白及種子之活力檢測與掃描式電子顯微鏡觀察

台灣白及種子超低溫保存後活力之影響

取台灣白及自交後成熟度 60 d 的果莢，依照前述果莢消毒的方式處理，取出種子作為試驗材料。種子分裝成小包，每小包種子重量 50 mg，每包為 1 重複，每處理 3 重複。本試驗有 3 種處理方式：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN (-196°C) 中、新鮮種子以矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN。矽膠乾燥處理者，先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶保存，置於實驗室環境下 ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 24 h。後續經超低溫保存之處理，先將種子放入 1.8 mL

冷凍管，再置於 LN 保存 24 h 後。將冷凍管取出，以 40°C 水浴、1 min 回溫處理後，以 triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色法檢測種子之活力率。新鮮種子與經 LN 保存 24 h 回溫後的種子，以 2, 3, 5-TTC 染色法進行活力檢測。以 1% TTC 進行染色處理，於 25°C 處理 24 h 後，在解剖顯微鏡下觀察種子染色情形，胚具有紅色反應者即視為具有活力表現。每個重複樣品計算 200 個種子，據以估算種子活力百分率 (Hirano *et al.* 2005a; Hirano *et al.* 2005b; Hirano *et al.* 2009)。種子活力率 (%) = (胚呈現紅色種子數/有胚種子數) × 100%。

台灣白及種子之掃描式電子顯微鏡觀察

藥品試劑

1. 固定液 (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M, PBS pH 7.3) 配製：取 25% glutaraldehyde 10 mL，加入 40 mL 的二次水 (distilled-deionized water; d. d. water)，再加 50 mL 0.2 M, PBS pH 7.3，即為固定液。固定液最好當天新鮮配製，試驗中所用到的磷酸緩衝液可於前一天先行配製，並置於 4°C 中冷藏。
2. 磷酸緩衝液 PBS (0.2 M, pH 7.3)，A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g L⁻¹ (0.2 M)，B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 g L⁻¹ (0.2 M)，取 A 77 mL + B 23 mL 即可。另外，可加 5–8% sucrose 維持固定液滲透壓。
3. 1% Osmium tetroxide 配製：取 4% Osmium tetroxide 10 mL，加 10 mL 二次水，再加 20 mL 0.2 M, PBS pH 7.3，置於 4°C 中冷藏。

方法

試驗參考 Wu (2013) 之方法修改進行，採集台灣白及授粉後 60 d 的果莢，經消毒後取出新鮮種子作為試驗材料。共 3 種處理：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN (-196°C) 中、新鮮種子以矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN。矽膠乾燥處理者，先將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶保存，置於實驗室環境下 (25°C ± 1°C) 24 h；後續經超低溫保存，先將種子放入冷凍管，再置於 LN 24 h 後，將冷凍管取出，以 40°C 水浴、1 min 回溫處理。新鮮種子與其他二組經超低溫保存後回溫之種

子，將之置於含 2.5% 戊二醛 (glutaraldehyde, Merck, Darmstadt, Germany) 之磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2) 中，於 4°C 進行前固定 30 min，再於室溫下以 30×g 震盪過夜。以磷酸鹽緩衝液清洗 3 次後，置於含 1% 鐵酸 (osmium tetroxide, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) 之磷酸鹽緩衝液中，進行後固定 1 h，清洗 3 次後，分別以 35、35、50、60、70、85、90 及 95% 之乙醇依序浸泡 15 min，再以 100% 之絕對乙醇 (Merck) 浸泡 15 min 3 次。最後，進行二氧化碳臨界點乾燥 (critical point dryer, EM CPD300, Leica, Wetzlar, Germany)，再利用離子覆膜機 (ion sputter, SC502, Microscience Division, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) 鍍金。以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, JSM-6510LV, JEOL, Peabody, MA, USA) 拍攝種子表面影像。

以矽膠乾燥方式進行蘭科植物遺傳資源超低溫保存

種子含水量分析

採取雅美萬代蘭自交後成熟度 300 d 的果莢，經消毒後取出種子作為材料，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 20 mg，每包為 1 重複，每處理 4 重複。再將種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，置於實驗室環境下 (25°C ± 1°C)，並於採收後 0、2、4、6、24 h 分別以電子天平 (AG204, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) 秤重並記錄。再將種子置於 80°C 烘箱乾燥至種子恆重為止，量秤種子乾重並記錄之。最後，依下列公式計算種子含水量。種子含水量 (%) = (種子鮮重 - 種子乾重) / 種子鮮重 × 100%。

矽膠乾燥處理對其他蘭科植物遺傳資源超低溫保存後活力之影響

在紅花鶴頂蘭花朵盛花期取新鮮花粉塊，以 70% 酒精棉花擦拭表面消毒後，植入培養基。共有 3 種處理：新鮮花粉塊、新鮮花粉塊直接置入 LN 保存、新鮮花粉塊經矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN 中保存。矽膠乾燥處理，在 LN 保存前，先將花粉塊放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，於實驗室環境下

($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 進行乾燥 24 h。經超低溫保存者，將花粉塊置入 1.8 mL 冷凍管中，再放進 LN 中保存 24 h (Hirano *et al.* 2009)。之後將冷凍管取出，以 40°C 水浴、1 min 回溫處理後，進行活力檢測。每處理 4 重複，每重複 1 個花粉塊。

白花蝴蝶蘭、丹尼森萬代蘭及雅美萬代蘭則分別採自交後成熟度 189 d、260 d 及 239 d 的果莢，消毒後取出種子作為材料。種子經充分混合後，以秤藥紙分裝成不同小包裝，每小包重量 20 mg，每包為 1 重複，每處理 4 重複。本研究以新鮮種子作為對照組，共有 3 種處理：新鮮種子、新鮮種子直接置入 LN 保存、新鮮種子經矽膠乾燥 24 h 後再置入 LN 容器中保存。經矽膠乾燥之預處理，於 LN 保存前將整包種子放入裝有 15 g 矽膠粒的 20 mL 玻璃固定瓶進行乾燥，於實驗室環境下 ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 進行乾燥 24 h。經超低溫保存者，將種子置入冷凍管中，放進 LN 24 h。之後將冷凍管取出，以 40°C 水浴、1 min 回溫處理後，進行發芽率檢測。

活力檢測

花粉塊以 70% 酒精棉花擦拭表面消毒後，置於固體培養基，每培養皿植入 2 個花粉塊。自培養基中取出 4 朵不同花朵的花粉塊進行觀察。花粉塊取出後將其均勻壓散，於光學顯微鏡放大倍率 $200\times$ 下觀察花粉發芽情形。以花粉發芽率作為花粉活力調查，花粉管只要一突出花粉粒即視為已發芽，每重複逢機取 200 粒花粉進行調查。培養環境為 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，完全黑暗。培養基採用 Brewbaker & Kwack (1963) 之基本培養基配方，成分為 2% 蔗糖、 100 mg L^{-1} H_3BO_3 、 200 mg L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 300 mg L^{-1} $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 100 mg L^{-1} KNO_3 及 1% agar，pH 為 5.5 ± 0.1 (Lee 1987; Hu 2001)。種子發芽率試驗，係將種子無菌播種於直徑 6 cm 的塑膠培養皿中，培養基成分與培養環境同前述方式。於播種後 30 d，以解剖顯微鏡觀察並記錄種子發芽數，每個重複樣品計算 200 個種子。發芽率 (%) = (胚突破種皮並已轉綠之種子數/有胚種子數) $\times 100\%$ 。

調查各處理之種子發芽率，並持續進行各處理間之小苗後續形態觀察與拍照記錄。

統計分析

試驗設計採完全逢機設計 (complete randomized design; CRD)，以 Costat 6.4 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 後，並以最小顯著差異分析 (least significant difference; LSD) 探討各處理間平均值之差異性。

結果與討論

超低溫保存時間對台灣白及與白花蝴蝶蘭種子保存後活力之影響

雖然許多超低溫保存相關研究報告已指出，當植物組織或器官於極低的溫度 -196°C LN 環境中保存時，幾乎所有細胞生理代謝活動已停止，但仍能維持生命活力 (Na & Kondo 1996; Engelmann 2000; Matsumoto *et al.* 2001; Gonzalez-Arno *et al.* 2008; Hirano *et al.* 2009)。然而，此為理論值，因為試驗年限久需長期觀察，有實際執行上之困難。因此，絕大多數研究僅將保存材料短暫時間 (10–30 min、1 h、1 d、1 wk、1–3 mo 或 1 yr 等) 存放於 LN 中，便將之視為長期保存之效果 (Thammasiri 2000; Wood *et al.* 2000; Nikishina *et al.* 2007; Hay *et al.* 2010; Hirano *et al.* 2011; Galdiano *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013)，鮮見植物組織或器官實際在 LN 中保存多年之相關研究結果 (Marks *et al.* 2014)。本研究以台灣白及與白花蝴蝶蘭種子為保存材料，於保存前進行矽膠乾燥處理 24 h，經過不同的超低溫保存時間後，結果顯示新鮮採收之台灣白及種子發芽率為 60.3%，於 LN 中貯藏 6 mo 後發芽率為 70.6%，貯藏 1 yr 後之種子發芽率提升至 78.0%，在 6–27 mo 貯藏期間之種子發芽率略有波動，範圍在 70.0–79.0% 之間，而在 30 mo 以上發芽率則達 80.0% 以上。目前台灣白及種子已於 LN 中保存 48 mo (4 yr)，經回溫後種子發芽率為 87.7% (圖 1)。貯藏期間發芽率數值之變動，可能是因為種子個體間的差

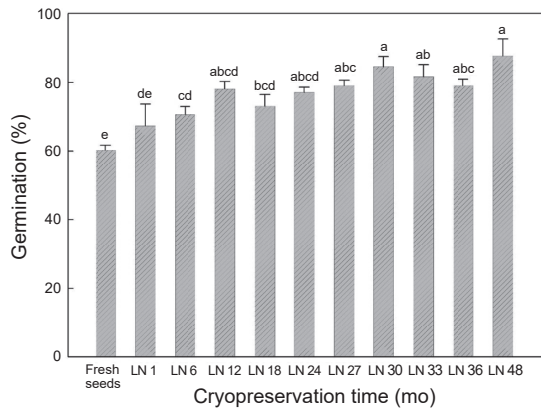


圖 1. 不同超低溫保存期間對台灣白及種子保存後發芽率之影響。

Fig. 1. Effect of cryostorage duration on germination percentage of *Bletilla formosana* seeds after cryopreservation. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

異，或是每批種子播種時所遭遇環境不完全相同所致。但整體超低溫保存過程，呈現出種子發芽率有略為上升的趨勢，較新鮮採收種子來得高。此結果與 Hu *et al.* (2013) 進行台灣白及種子不同期間的超低溫保存結果有相同趨勢，其保存 1 yr 後的種子發芽率有增加的情形。

在白花蝴蝶蘭種子的長期保存方面，結果顯示新鮮種子發芽率為 74.6%，種子於 LN 中保存 3 mo 者發芽率提升至 89.2%，在第 6 個月時略有下降，目前已在 LN 中保存 15 mo，種子發芽率達 100.0% (圖 2)。整體而言，超低溫保存過程中，種子的發芽率並無減少的情形，反而有略為上升的趨勢，且較新鮮採收種子來得高。

其他物種的研究報告顯示，不同期間的超低溫保存並不會影響種子發芽率 (González-Benito *et al.* 1998a; González-Benito *et al.* 1998b; Pence 2003)。Hu *et al.* (2013) 以台灣白及種子為保存材料，以玻璃質化法配合超低溫保存，冷凍保存期間從 10 min 至 1 yr，經回溫後種子發芽率並無顯著變化。相較於其他貯藏方式，許多物種不會受到超低溫影響種子發芽 (Pence 1991; Touchell & Dixon 1993; González-Benito *et al.* 1998b)，但有些

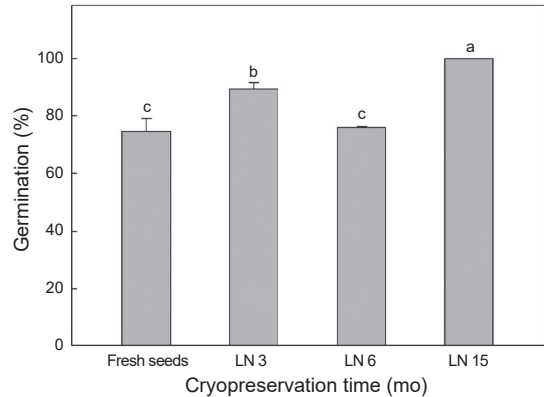


圖 2. 不同超低溫保存期間對白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*) 種子保存後發芽率之影響。

Fig. 2. Effect of cryostorage duration on germination percentage of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* seeds after cryopreservation. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

物種，則會因為超低溫而使發芽率受到改變 (Tikhonova 1999)。許多經 LN 保存過的種子，經回溫後，發芽率明顯高於未經 LN 保存者，超低溫保存可以增加蘭花種子的發芽率已經陸續被證實 (Nikishina *et al.* 2001a, 2001b; Popov *et al.* 2004; Nikishina *et al.* 2007; Hu *et al.* 2013)。在本研究所採用的台灣白及與白花蝴蝶蘭種子以矽膠乾燥法配合超低溫保存，所得到的結果，經過 LN 保存者，回溫後種子發芽率較未經 LN 保存者來得高，此結果與前人所研究之結論相同 (Nikishina *et al.* 2001a, 2001b; Popov *et al.* 2004; Nikishina *et al.* 2007; Hu *et al.* 2013)。再者，台灣白及與白花蝴蝶蘭的種子於 LN 中保存期間之延長，發芽率亦有增加之趨勢 (圖 1、圖 2)。LN 保存再回溫後經無菌播種，種子均可順利發芽正常生長，觀察小植株與未經 LN 保存者之外表型並無不同，此結果與前人所觀察種子經超低溫保存後，並不影響後續植株的發育有一致的結論 (Popov *et al.* 2004)。本研究結果可知，在進行台灣白及種子長期保存時，選用成熟度較高、授粉後 90 d 的種子，施以矽膠乾燥處理 24 h 後，於 LN 環境可以保存 48 mo 以

上，並能維持種子高發芽率 (87.7%)，後續小苗生長發育正常。相同的操作程序應用在白花蝴蝶蘭授粉後 189 d 的種子，同樣可使種子於超低溫保存 15 mo 以上，並能維持高發芽率 (100.0%)。

台灣白及種子之活力檢測與掃描式電子顯微鏡觀察

採收之新鮮種子經 24 h 矽膠乾燥後，置入 LN 中保存，以新鮮種子為對照組，於掃描式電子顯微鏡下觀察種皮表面變化。結果顯示，未經 LN 保存的新鮮種子種皮表面完整 (圖 3A)，直接將新鮮種子置入 LN 保存者，種子回溫後種皮表面受到嚴重的破壞 (圖 3B)，呈現不規則的裂痕。相較之下，經 24 h 矽膠乾燥處理與 LN 保存之未成熟種子，在種子回溫後於觀察到種皮表面有皺縮，少許破裂的情況 (圖 3C)。以 TTC 染色法進行種子活力檢測，觀察胚是否仍具有活力，圖 4 顯示新鮮種子的胚呈現紅色反應，表示胚具有良好活力 (圖 4A)。直接將新鮮種子置入 LN 保存者，回溫後種子的胚為無色反應 (圖 4B)，表示經保存後的胚已無活力，應是保存前未經矽膠乾燥處理致使胚受到貯藏期間冰晶之損害。經 24 h 矽膠乾燥處理者，回溫後種子以 TTC 染色結果，多數胚仍具有活力 (圖 4C)，顯示經矽膠乾燥 24 h 與超低溫保存 24 h 後的種子表面雖有些許受到破壞，但是多數胚並未受到傷害仍然具有活力。種子並未因 LN 造成傷害使發芽率降低，反而較新鮮種子的發芽率更高。試驗結果顯示，經過乾燥處理與 LN 保存後，造成種皮破裂但多數胚未受到傷害，推估因種皮的破損提供水分進入的管道 (Patanè & Bradford 1993)，而有利於回溫後種子之發芽。類似的情形也出現在其他物種，LN 會造成扣形苜蓿 (*Medicago orbicularis*) 的種皮破裂，進而提高發芽百分率及促進發芽速度，發芽率的提升乃種皮破裂加快了水合作用 (hydration) 所致 (Patanè & Gresta 2006)。蝴蝶蘭與蕓苔屬 (*Brassia*) 種子表皮也因 LN 造成種皮破裂之機械性傷害，可能促進吸收培養基中的溶質，同時刺激胚展開與改善發芽 (Mweetwa & Welbaum 2007)。

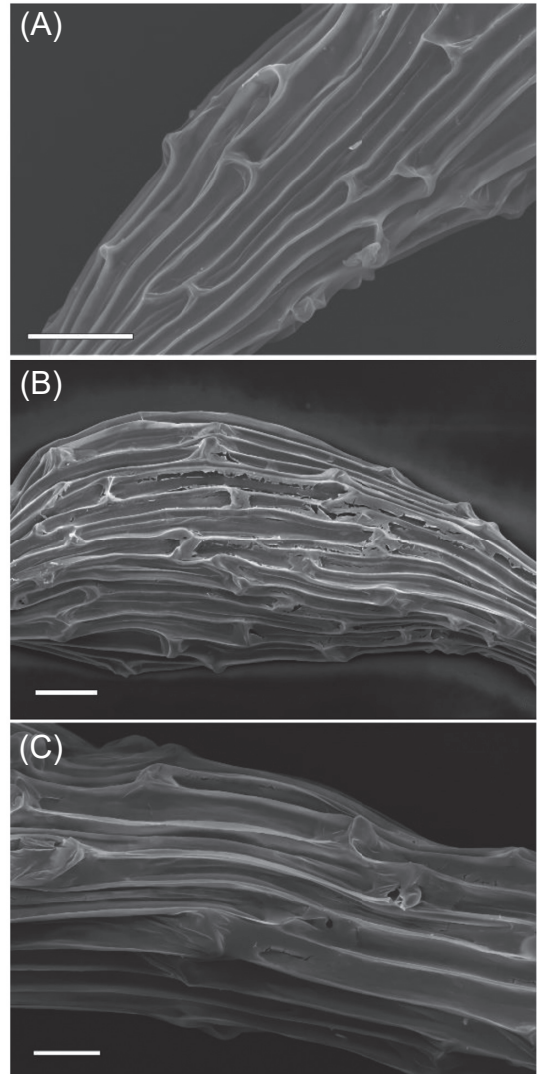


圖 3. 台灣白及授粉後 60 d 的種皮電子顯微鏡觀察 (A) 新鮮種子種皮外觀完整 (Bar = 50 μ m); (B) 新鮮種子直接置入液態氮保存，種子回溫後種皮表面受到嚴重的破壞，呈現不規則的裂痕 (Bar = 50 μ m); (C) 新鮮種子經過 24 h 乾燥，置入液態氮保存，種子回溫後之種皮有少許破損 (Bar = 20 μ m)。

Fig. 3. Electron micrographs of testa of *Bletilla formosana* fresh seeds 60 days after pollination. (A) Complete testa of fresh seeds (Bar = 50 μ m); (B) severe cracked testa of cryopreserved fresh seed (no 24 h desiccation) after thawing (Bar = 50 μ m); and (C) broken testa of cryopreserved fresh seeds (24 h desiccation) after thawing (Bar = 20 μ m).

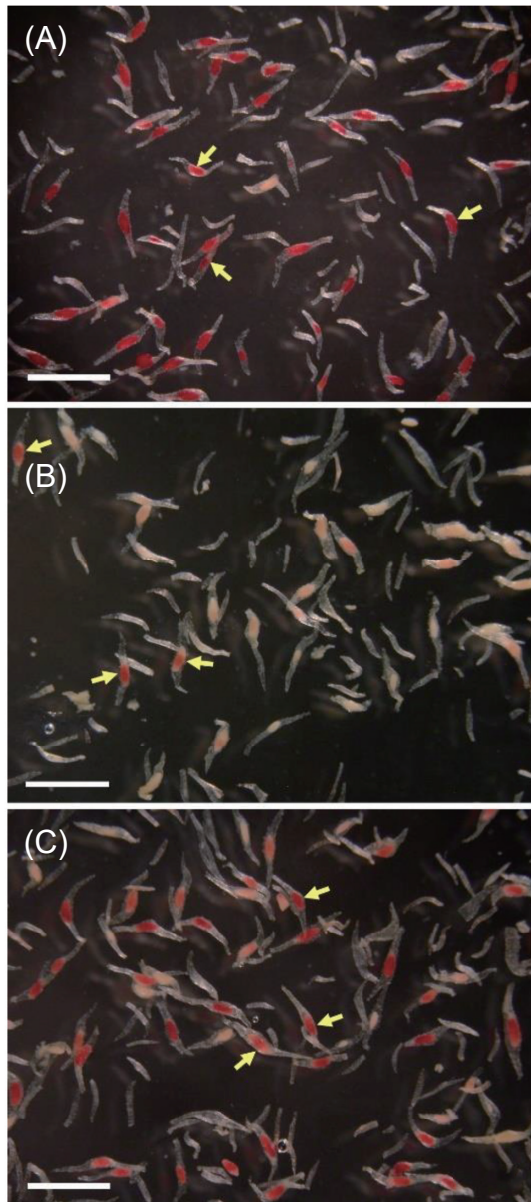


圖 4. 台灣白及授粉後 60 d 種子之 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 活力檢測 (A) 多數新鮮種子的胚具有活力；(B) 新鮮種子直接置入液態氮中保存，回溫後多數胚已無活力；(C) 新鮮種子經過 24 h 乾燥，置入液態氮保存，回溫後多數胚仍有活力。箭頭處：有活力種子 (Bar = 1 mm)。

Fig. 4. 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) viability staining of *Bletilla formosana* seeds 60 days after pollination. (A) Fresh seeds; (B) cryopreserved directly fresh seeds after thawing; and (C) cryopreserved fresh seeds (24h desiccation) after thawing. Arrows: viable seeds. Bar = 1 mm.

以矽膠乾燥方式進行蘭科植物遺傳資源超低溫保存

前以乾燥法作為台灣白及種子長期保存之前處理，已成功地保存種子並可維持高活力 (Wu *et al.* 2013)，乃進一步將建立之流程應用於其他蘭科植物。本試驗以紅花鶴頂蘭花粉塊、白花蝴蝶蘭、雅美萬代蘭及丹尼森萬代蘭種子為材料進行保存，結果顯示紅花鶴頂蘭新鮮花粉塊經過培養後的發芽率為 81.4%，花粉塊置入 LN 前未經任何前處理者，在保存後活力驟降至 25.4%，為所有處理中最低者。經矽膠乾燥 24 h 的花粉塊，再置入 LN 保存 24 h，回溫後花粉發芽率力可維持在 81.0% (表 1)。以成熟的雅美萬代蘭種子作為保存材料，新鮮種子含水量為 34.6% (圖 5)，經過 2 h 矽膠乾燥後，含水量急遽降低至 8.6%，乾燥 4 h 已達 5.7%。此時含水量變化已漸趨穩定，種子在乾燥 24 h 後的含水量為 4.2%。在種子發芽率方面，以成熟的白花蝴蝶蘭種子作為長期保存材料，對照組新鮮種子的發芽率為 77.5% (圖 6A)，在超低溫保存前未經任何乾燥處理者，保存後無菌播種 1.5 mo，種子完全不發芽。若保存前種子經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 者，保存 24 h 後的種子發芽率為 88.0%。雅美萬代蘭新鮮採收種子的發芽率為 93.8%，在保存前未經任何乾燥處理者，於保存後的種

表 1. 乾燥處理對紅花鶴頂蘭 (*Phaius tankervilleae*) 花粉超低溫保存 24 h 後發芽之影響。

Table 1. Effect of desiccation on pollen tube growth of *Phaius tankervilleae* pollens after cryopreservation.

Treatment	Pollen germination (%) ^z
Fresh pollen	81.4 a ^y
LN ^x	25.4 b
Dry + LN ^w	81.0 a

^z Fresh pollens were cultured *in vitro* on BK (Brewbaker & Kwack 1963) medium. The germination percentage of pollens observed under microscope.

^y Means within each column followed by the same letters indicate no significant difference at 5% level by least significant difference (LSD) test.

^x Fresh pollens without drying treatment directly plunged into liquid nitrogen (LN, -196°C).

^w Fresh pollens dried with silica gel for 24 h, then plunged into liquid nitrogen.

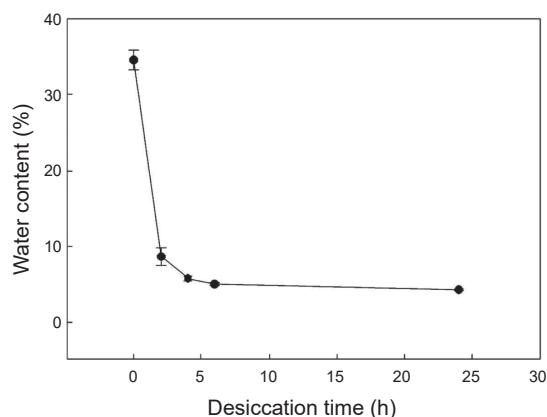


圖 5. 雅美萬代蘭種子於矽膠乾燥處理期間之含水量變化。

Fig. 5. Changes in water content of *Vanda lamellata* seeds during silica gel drying. Bars represent standard error of the mean and are not visible if smaller than the symbol.

子發芽率為 0.0%，保存材料經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 保存 24 h 者，種子發芽率則為 100.0% (圖 6B)。以成熟的丹尼森萬代蘭種子作為保存材料，新鮮採收種子的發芽率為 100.0%，保存前未經任何乾燥處理者，於保存後的種子發芽率僅為 1.6%，保存前種子經 24 h 矽膠乾燥處理後再置入 LN 24 h 者，發芽率為 100.0% (圖 6C)。

Stanwood & Bass (1981) 曾提出，種子能成功地在極度低溫的 LN 中保存，含水量為關鍵點，過多的水分會造成冷凍保存期間組織中的游離水形成冰晶，因而對細胞造成傷害。雖然多數蘭花種子經過適當的脫水處理後再置入 LN 中保存，得以維持高活力 (Thammasiri 2000; Hirano *et al.* 2006; Wu *et al.* 2013; Popova *et al.* 2016)，但是少數蘭花種子對乾燥敏感。例如，當鶴頂蘭種子含水量降太低時 (2.0%)，會影響種子在 4°C 與 25°C 環境下的保存活力 (Hirano *et al.* 2009)。類似的情形也發生在嘉德麗雅蘭 (*Cattleya aurantiaca*)，當種子含水量低於 5.6% 時，對一定貯藏溫度下 (-18°C、5°C、20°C) 的種子不利其生存 (Seaton & Hailes 1989)。因此，乾燥的程度依種類不同而異。雅美萬代蘭的含水量試驗中，新鮮種子之含水量為 34.6% (圖 5)，經過 24 h 的

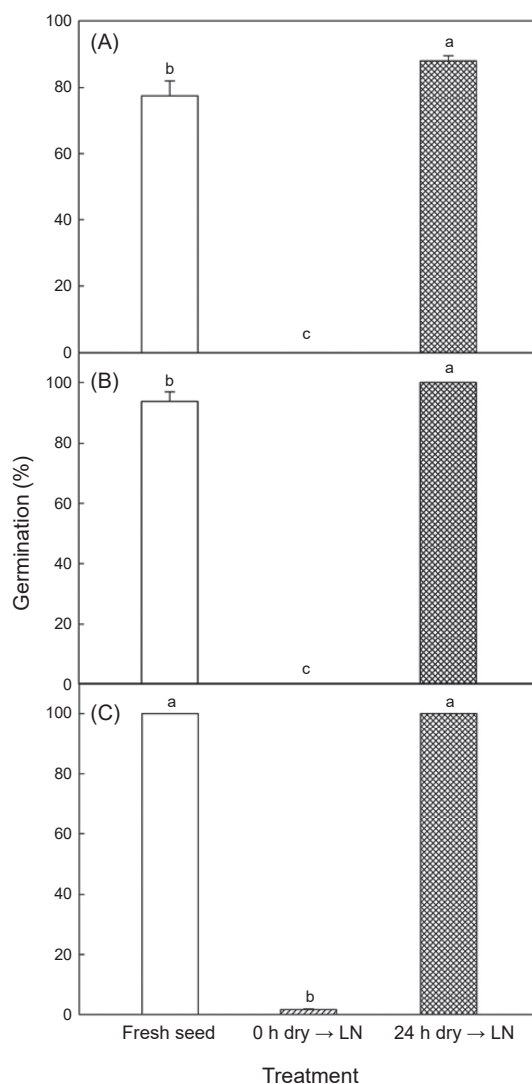


圖 6. 乾燥處理及超低溫保存對 (A) 白花蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*)；(B) 雅美萬代蘭；(C) 丹尼森萬代蘭種子發芽之影響。

Fig. 6. Effect of silica gel desiccation and cryopreservation on germination of (A) *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*; (B) *Vanda lamellata*; and (C) *Vanda denisoniana* seeds after thawing. Mean values with the same letter are not significant by least significant difference (LSD) test ($P \leq 0.05$).

矽膠乾燥後已趨穩定，含水量降低至 4.2%。然而，在如此低的含水量，種子發芽率仍達 100.0% (圖 6)。此種對水分逆境具有耐性的特質，能夠忍受乾燥而且能長期保存，符合正貯型種子的特質 (orthodox seed)，能忍受乾燥

處理而且不會失去種子活力，可以進行長期保存 (Grout *et al.* 1983; Dickie *et al.* 1991)。這類型的物種，例如紫葉挪威楓 (Norway maple, *Acer platanoides* L.) 種子也是屬於正貯型種子，能在室溫下緩慢地乾燥直到種子含水量達 8.0–10.0%，而且不會失去活力 (Dickie *et al.* 1991)。油棕 (*Elaeis guineensis* L.) 種子果仁含水量為 21.0% 時，活力為 96.0%，而當果仁乾燥至含水量為 4.4% 時，仍未失去活力，亦屬正貯型種子 (Grout *et al.* 1983)。

由上述結果可知，多數蘭花遺傳資源在進行 LN 長期保存前，保存材料如果未經過預處理，在經過 -196°C 超低溫保存後，花粉或種子的發芽率近乎 0.0%，此與前人研究所述一致。多數生物組織在接觸到如此低的溫度，且沒有任何針對含水量的前處理時，保存組織通常會因為細胞內的結凍現象而致死 (Stanwood & Bass 1981; Hirano *et al.* 2009)。必需經過一段時間的前處理流程，方能有效地保存材料並維持高活力 (Wang *et al.* 1998; Hirano *et al.* 2009)，而保存後的活力因蘭花種類不同而有程度上的差異 (Sakai 2000; Hirano *et al.* 2006)。

誌謝

本研究承李岷教授、陳福旗院長、黃光亮院長、張正博士、張祖亮博士悉心協助論文審閱與斧正，特此致謝。

引用文獻

- Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* 50:859–865. doi:10.1002/j.1537-2197.1963.tb06564.x
- Chang, C., P. G. Sung, C. H. Chang, Y. C. Chen, and Y. H. Lin. 2006. Seed development and storage of *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. *Seed Nursery (Taiwan)* 8:29–38. (in Chinese with English abstract)
- Dickie, J. B., K. May, S. V. A. Morris, and S. E. Titley. 1991. The effect of desiccation on seed survival in *Acer platanoides* L. and *Acer pseudoplatanus* L. *Seed Sci. Res.* 1:149–162. doi:10.1017/S0960258500000829
- Engelmann, F. 2000. Importance of crop for conservation of plant genetic resources. p.8–20. *in: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm.* (Engelmann, F. and H. Takagi, eds.) International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 496 pp.
- Galdiano, Jr., R. F., E. G. M. Lemos, R. T. Faria, and W. A. Vendrame. 2012. Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. *Sci. Hortic.* 148:154–160. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.036
- Gonzalez-Arno, M. T., A. Panta, W. M. Roca, R. H. Escobar, and F. Engelmann. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 92:1–13. doi:10.1007/s11240-007-9303-7
- González-Benito, M. E., F. Fernández-Llorente, and F. Pérez-García. 1998a. Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species. *Ann. Bot.* 82:683–686. doi:10.1006/anbo.1998.0711
- González-Benito, M. E., J. M. Iriondo, and F. Pérez-García. 1998b. Seed cryopreservation: An alternative method for the conservation of Spanish endemics. *Seed Sci. Technol.* 26:257–262.
- Grout, B. W. W., K. Shelton, and H. W. Pritchard. 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.* 52:381–384. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a086586
- Hay, F. R., D. J. Merritt, J. A. Soanes, and K. W. Dixon. 2010. Comparative longevity of Australian orchid (Orchidaceae) seeds under experimental and low temperature storage conditions. *Bot. J. Linn. Soc.* 164:26–41. doi:10.1111/j.1095-8339.2010.01070.x
- Hirano, T., T. Godo, M. Mii, and K. Ishikawa. 2005a. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Rep.* 23:534–539. doi:10.1007/s00299-004-0893-9
- Hirano, T., K. Ishikawa, and M. Mii. 2005b. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis Graminifolia* var. *Suzukiana* by vitrification. *CryoLetters* 26:139–146.
- Hirano, T., K. Ishikawa, and M. Mii. 2006. Advances in orchid cryopreservation. *Floriculture Ornamental Plant Biotechnol.* 2:410–414.
- Hirano, T., T. Godo, K. Miyoshi, K. Ishikawa, M. Ishikawa, and M. Mii. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnol. Rep.* 3:103–109. doi:10.1007/s11816-008-0080-5
- Hirano, T., T. Yukawa, K. Miyoshi, and M. Mii. 2011. Wide applicability of cryopreservation with vitrifi-

- cation method for seeds of some *Cymbidium* species. *Plant Biotechnol.* (Tokyo) 28:99. doi:10.5511/plantbiotechnology.10.1115a
- 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. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2011.06004.07
- Hu, J. R. 2001. Pollen development, pollen viability, fruit set, and seed germination *in vitro* of *Oncidium* and Allied genera. Master Thesis, Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 112 pp. (in Chinese with English abstract)
- Hu, W. H., Y. H. Yang, S. I. Liaw, and C. Chang. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. *Bot. Stud.* 54:33. doi:10.1186/1999-3110-54-33
- Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu, and K. Shimomura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 16:754–757. doi:10.1007/s002990050314
- Lee, C. L. 1987. Studies on pollen viability and preservation of horticultural crops. *Sci. Agric.* 35:347–356. (in Chinese with English abstract)
- Marks, T. R., P. T. Seaton, and H. W. Pritchard. 2014. Desiccation tolerance, longevity and seed-siring ability of entomophilous pollen from UK native orchid species. *Ann. Bot.* 114:561–569. doi:10.1093/aob/mcu139
- Matsumoto, T., K. Mochida, H. Itamura, and A. Sakai. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Rep.* 20:398–402. doi:10.1007/s002990100350
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Mweetwa, A. M. and G. E. Welbaum. 2007. Orchid seed storage for germplasm preservation. *Acta Hort.* 760:629–636. doi:10.17660/ActaHortic.2007.760.89
- Na, H. Y. and K. Kondo. 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. *Plant Sci.* 118:195–201. doi:10.1016/0168-9452(96)04438-X
- Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, and B. N. Golovkin. 2001a. Cryopreservation of seeds of some tropical orchids. *Dokl. Biochem. Biophys.* 378:231–233. doi:10.1023/A:1011585801668
- Nikishina, T. V., A. S. Popov, G. L. Kolomeitseva, and B. N. Golovkin. 2001b. Effect of cryoconservation on seed germination of rare tropical orchids. *Russ. J. Plant Physiol.* 48:810–815. doi:10.1023/A:1012520927743
- Nikishina, T. V., E. V. Popova, M. G. Vakhrameeva, T. I. Varlygina, G. L. Kolomeitseva, A. V. Burov, E. A. Popovich, A. I. Shirokov, V. Y. Shumilov, and A. S. Popov. 2007. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. *Russ. J. Plant Physiol.* 54:121–127. doi:10.1134/S1021443707010189
- Patanè, C. and K. J. Bradford. 1993. Seed dormancy in two *Medicago* species typical of natural pastures of Ragusa plateau. *Riv. di Agron.* 27:412–418.
- Patanè, C. and F. Gresta. 2006. Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. *J. Arid Environ.* 67:165–173. doi:10.1016/j.jaridenv.2006.02.001
- Pence, V. C. 1991. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. *Seed Sci. Technol.* 19:235–251.
- Pence, V. 2003. *In vitro* growth of embryo axes after long-term storage in liquid nitrogen. p.483–492. in: *Seed Conservation: Turning Science into Practice.* (Smith, R. D., J. B. Dickie, S. H. Linington, H. W. Pritchard, and R. J. Probert, eds.) Royal Botanical Garden, Kew, London. 1023 pp.
- Popov, A. S., E. V. Popova, T. V. Nikishina, and G. L. Kolomeytseva. 2004. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. *CryoLetters* 25:205–212.
- Popova, E., H. H. Kim, P. K. Saxena, F. Engelmann, and H. W. Pritchard. 2016. Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnol. Adv.* 34:380–403. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.01.001
- Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. p.1–7. in: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm.* (Engelmann, F. and H. Takagi, eds.) Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Tsukuba, Japan. 496 pp.
- Seaton, P. T. and N. S. J. Hailes. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. p.17–30. in: *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management.* (Pritchard, H. W., ed.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. 184 pp.
- Stanwood, P. C. and L. N. Bass. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. Tech-*

- no. 9:423–437.
- Thammasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. *CryoLetters* 21:237–244.
- Tikhonova, V. L. 1999. Long-term storage of seeds. *Russ. J. Plant Physiol.* 46:400–408.
- Touchell, D. H. and K. W. Dixon. 1993. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. *Biodivers. Conserv.* 2:594–602. doi:10.1007/BF00051960
- Wang, J. H., J. G. Ge, F. Liu, H. W. Bian, and C. N. Huang. 1998. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo Letters* 19:123–128.
- Wood, C. B., H. W. Pritchard, and A. P. Miller. 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *CryoLetters* 21:125–136.
- Wu, C. 2013. Effect of acid adaptation on the physiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* and its environmental stress tolerance. Master Thesis, Department of Animal Science and Technology, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 96 pp. (in Chinese with English abstract)
- Wu, R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh, and Y. S. Chang. 2013. Cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) by desiccation. *Sci. Hortic.* 157:108–112. doi:10.1016/j.scienta.2013.03.033
- Wu, R. Y., S. Y. Chang, T. F. Hsieh, K. C. Chuang, I. Ting, Y. H. Lai, and Y. S. Chang. 2016. Cryopreservation of orchid genetic resources by desiccation: A case study of *Bletilla formosana*. p.201–217. in: *Cryopreservation in Eukaryotes*. (Marco-Jiménez, F. and H. Akdemir, eds.) InTechOpen. Rijeka, Croatia. 228 pp. doi:10.5772/65302
- Wu, R. Y., K. C. Chuang, T. F. Hsieh, and Y. S. Chang. 2018. Effect of capsule maturity and desiccation time on viability of Taiwan native orchid, *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae) after cryopreservation. *Taiwania* 63:345–350. doi:10.6165/tai.2018.63.345

Study on Cryopreservation of Orchidaceae Seeds by Silica Gel Desiccation and Its Application

Rung-Yi Wu¹, Ching-Ping Lin², Ting-Fang Hsieh³, Keng-Chang Chuang⁴, Ting-En Dai⁵, and Yu-Sen Chang^{6,*}

Abstract

Wu, R. Y., C. P. Lin, T. F. Hsieh, K. C. Chuang, T. E. Dai, and Y. S. Chang. 2020. Study on cryopreservation of orchidaceae seeds by silica gel desiccation and its application. *J. Taiwan Agric. Res.* 69(4):286–297.

Desiccation method has been successfully applied for the cryopreservation of *Bletilla formosana* seeds (Orchidaceae). This study investigated the effects of cryostorage duration on the viability of *B. formosana* and *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* seeds after cryopreservation. After 24 h desiccation by silica gel and cryopreservation for 48 mo, *B. formosana* seeds still remained high germination percentage (87.7%) and higher than fresh seeds. *Phal. aphrodite* subsp. *formosana* seeds could retained significant higher germination percentage (100.0%) than fresh seed treatment (74.6%) after cryopreservation for 15 mo. The plantlet from cryostored seeds could grow and develop well. The germination percentage of dried and cryopreserved seed for 24 h was higher than that of fresh seeds after cryopreservation. Under scanning electron microscopy, it is clear that immersing seeds in liquid nitrogen (LN) induces breakage in the seed coat, then cracks in the seed coat provide channels that facilitate hydration and may increase germination. The technique could be applied for the pre-treatment prior to cryopreservation of *Phaius tankervilleae* pollen, *Phal. aphrodite* subsp. *formosana*, *Vanda lamellata* and *Vanda denisoniana* seeds. The results showed that the germination percentage of freshly harvested pollen of *P. tankervilleae* was 81.4%, pollens directly placed in LN was low (25.4%) after thawing. However, the germination percentage increased to 81.0% for seeds dried with silica gel for 24 h prior to cryopreservation. In the case of seed preservation, the water content of *V. lamellata* fresh seeds was 34.6%, then decreased to 4.2% after desiccation for 24 h. The germination percentage of *Phal. aphrodite* subsp. *formosana*, *V. lamellata* and *V. denisoniana* fresh seeds were 77.5, 93.8 and 100.0%, respectively. The germination percentage of seeds that were directly placed in LN was low (0.0, 0.0 and 1.6%) after thawing, instead, the percentage increased to 88.0, 100.0 and 100.0% for seeds dried with silica gel for 24 h prior to cryopreservation for 24 h, respectively. These findings demonstrate that the seeds of *V. lamellata* exhibit a high tolerance toward desiccation and is suitable to be preserved at low temperature for long-term, and can be considered as an orthodox seed storage. Therefore, silica gel desiccation could be also applied for *P. tankervilleae* pollens, *Phal. aphrodite* subsp. *formosana* seeds, *V. lamellata* seeds and *V. denisoniana* seeds prior to cryopreservation.

Key words: Orchid, Desiccation method, Genetic resource, Preservation for long-term.

Received: May 29, 2020; Accepted: September 16, 2020.

* Corresponding author, e-mail: yschang@ntu.edu.tw

¹ Associate Research Fellow and Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

² Project Assistant, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

³ Research Fellow and Division Director, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow and Head, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

⁵ Research Fellow and Center Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yulin County, Taiwan, ROC.

⁶ Professor, Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University, Taipei City, Taiwan, ROC.