

## 長壽花節間雜交後代之多倍體化

余 君 修<sup>1)</sup> 陳 彥 銘<sup>2)</sup>

關鍵字：燈籠草屬、節間雜交、多倍體化

**摘要：**本試驗以 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* 之節間雜交後代 '102-1' 為材料，進行瓶內多倍體化與誘變植株之倍數性檢測，並調查誘變植株之花粉發芽率。*K. 'Hayworth' × K. pinnata* '102-1' 培植體於 1000 mg/L 秋水仙素培養基中有最高之型態變異率，僅有 280 個植株存活，獲得之型態變異植株有 184 株，約佔整體植株之 65.7%。誘變株編號 2 號及 3 號誘變株株高變矮，節間、葉長及葉寬皆變短，但花徑增大，與 *K. 'Hayworth' × K. pinnata* '102-1' 之性狀也有顯著差異。以流式細胞儀檢測 2 號及 3 號誘變株，其相對 DNA 含量分別為 3.95 及 3.84，皆確認為 4 倍體植株，但花粉發芽率為 0。

### 前 言

長壽花 (*Kalanchoe blossfeldiana* Poellen.) 為景天科 (Crassulaceae) 燈籠草屬 (genus *Kalanchoe*) 之多年生肉質草本植物。燈籠草屬內約有 140 個物種，大多特產於馬達加斯加約 60 種，東非及南非亦有 56 個種原分布、美洲產 1 種 (Allorge-Boiteau, 1996)，其餘則生長在東南亞、阿拉伯半島等地 (Descoings, 2003)。因長壽花及種間雜交種之花期長且具低維護性，已是歐洲市場最重要盆花作物 (Kuligowska *et al.*, 2015)，丹麥每年產量約 4100 萬盆 (Floradania, 2014)，荷蘭拍賣市場於西元 2013 年更有近 8300 萬盆長壽花產量 (FloraHolland, 2014)。

盧 (2013) 以 *K. blossfeldiana* 'Hayworth' 與 *K. pinnata* 進行節間雜交，獲得具新穎性狀之節間雜交後代 '102-1'，然而該節間雜交後代並無稔性導致育種進程受阻，本試驗藉由秋水仙素培養瓶內培植體，期望獲得恢復稔性之植株，以作為雜交親本。

---

1) 國立中興大學園藝學系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝學系助理教授，通訊作者。

## 材料與方法

### 一、植物材料

試驗所使用材料為盧(2013)以 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* 之節間雜交後代'102-1'之莖段進行培養。消毒方式以棉花棒沾取 70%酒精清潔表面，再以 1%次氯酸鈉及一滴 Tween 20 進行消毒 10 分鐘，之後以無菌水清洗 3 次即完成表面消毒。使用預先滅菌之器械進行莖段分切。培養基使用 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962)之商用配方 2.2 g/L(Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma Chemical, Mo., U.S.A.)並添加 30 g/L 蔗糖(台糖細粒特砂，台灣糖業公司)與 0.1 mg/L NAA、0.5 mg/L BA。培養基以 0.1 N HCl 或 NaOH 調整至 pH 5.7。最後添加 7.5 g/L 洋菜(Difco Bacto agar, Sigma Chemical, Mo., U.S.A.)，待洋菜融解後，以自動分注器分裝 10 ml 至玻璃試管(2.5 cm × 10 cm)，再放入高壓滅菌釜滅菌 121°C、1.1 Kg/cm<sup>2</sup> 15 分鐘，滅菌後冷卻備用。繼代培養基與上述培養基成分相同。秋水仙素誘變培養基同上述培養基滅菌完成後移至操作台，以預先滅菌之玻璃注射筒(トッブ株式会社，日本)與 25 mm 過濾器(Pall Corporation, U.S.A.)，配合 0.45 μm 圓形過濾膜(Millipore, U.S.A.)過濾含 100、250、500 及 1000 mg/L 秋水仙素至培養基，並分裝至(90 × 15 mm)培養皿中冷卻備用。增殖體培養溫度為 25±3°C，光週期為明期 16 小時、暗期 8 小時。光線為白冷日光燈照射 35±5 μmol/m<sup>2</sup>s。

### 二、秋水仙素誘變培養

於西元 2015 年 7 月取面積 10 mm 之增殖體繼代至含 100、250、500 及 1000 mg/L 秋水仙素之培養基中 1 個月，接著繼代至與上述相同培養基內培養 2 個月。

### 三、出瓶馴化與秋水仙素誘變株管理

自西元 2015 年 10 月將瓶內芽體進切割，假植於 200 格穴盤中，並至於噴霧床中馴化。待發根成苗後，定植於 2 吋塑膠盆中。栽培介質以泥炭土(7H P0351941, Bas van Buuren B. V., Coldenhovelaan, The Netherlands)與珍珠石(好成特選珍珠岩 4-9 mm, Hoper Int'l Floriculture & Horticulture Co.)混合體積 2:1(v/v)。植株栽培於台中市霧峰區中興大學園藝試驗場之網室床架。每週施用 2 次 0.5 g/L Jack's 水溶性肥料(20-20-20) (Scotts- Sierra Horticultural Products Co., Marysville, OH, U.S.A.)；另外適時補充 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub> (Bittersalz, K +SKALI GmbH 34111 Kassel, Germany)與 0. g/L EDTA-Fe(DE-Fe-13 Chelated Iron Powder 13%, Akzo Nobel, The Netherlands)，病蟲害防治則依據危害情形予以防治。在西元 2015 年 11 月至西元 2016 年 1 月進行夜間暗期中斷，於晚上 10 點開始電照 4 小時，將光週期調整為長日，以延長苗株營養生長時期。最後移至自然短日環境下使其花芽分化。

### 四、秋水仙素誘變植株性狀調查與花粉活力檢測

於開花期調查秋水仙素誘變植株株高、分枝數、節間長度、葉長、葉寬、總花朵數、花徑與花粉發芽率。花粉活力測定參考侯(2003)方法檢測。花粉活力測定培養基以 Brewbaker 和 Kwack(1963)作為基本配方，培養基每公升含有 0.3 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O、0.1

g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 與 0.1 g KNO<sub>3</sub>，另添加 5% 蔗糖(台糖細粒特砂，台灣糖業公司)，並再調整培養基 pH 值到 6.0。收集當日花藥開裂之新鮮花粉，均勻撒佈於添加上述培養基之雙凹槽載玻片上，並將載玻片置於加濕保鮮盒中，再將保鮮盒置於維持 25°C 黑暗環境生長箱(R180, Firstek Scientific, Taiwan)中培養。經過 2 小時後取出於光學顯微鏡(ZEISS HBO 50/AC, Zeiss Axiolab, Germany)下進行觀察，以花粉伸出花粉管超過花粉粒直徑兩倍即視為發芽，試驗每重複 200 粒花粉，共 3 重複。

#### 五、秋水仙素誘變植株倍數性調查

相對 DNA 含量檢測方法以三葉草(*Trifolium repens*)為標準品，秋水仙素誘變植株以及 *K. 'Hayworth' × K. pinnata '102-1'* 同時進行相對 DNA 含量測定，取嫩葉約 1 cm<sup>2</sup> 於含有 Nuclei extraction buffer (0.4 ml) 之培養皿切碎後，添加 1.6 ml staining buffer 混合，再通過 30 μm 濾網獲得之澄清樣品液使用流式細胞儀(CyFlow® Cube 6)分析。

#### 六、統計分析

試驗採用完全隨機設計(Completely Randomized Design, CRD)，所得數據以 SAS 套裝軟體 9.1 版(SAS Institute, Cary, NC)中 ANOVA(Analysis of Variance)進行變方分析( $\alpha=0.05$ )，以 Fisher's LSD 進行試驗間各處理平均值的比較。

## 結 果

*Kalanchoe blossfeldiana 'Hayworth' × K. pinnata '102-1'* 培植體分別繼代至 100、250、500 及 1000 mg/L 秋水仙素培養基中培養，之後移回不含秋水仙素之培養基，並於植株出瓶後調查各處理之芽體存活數及型態變異率(表 1)。試驗結果指出繼代至 100 mg/L 秋水仙素培養基之培植體有 525 個植株存活，具型態變異者為 187 株，約佔整體植株之 35.6%。當繼代至 250 mg/L 秋水仙素培養基之培植體有 375 個植株存活，具型態變異者為 80 株，約佔整體植株之 21.3%。當繼代至 500 mg/L 秋水仙素培養基之培植體有 224 個植株存活，具型態變異者為 86 株，約佔整體植株之 38.4%。而繼代至 1000 mg/L 秋水仙素培養基之培植體僅有 280 個植株存活，具型態變異者為 184 株，約佔整體植株之 65.7%，其植株型態變異率為所有處理間最高。

由圖 1A、1B 繼代至含有 100 及 250 mg/L 秋水仙素培養基之培植體的生長狀況，較繼代於含有 500 及 1000 mg/L 秋水仙素培養基為佳。而圖 1C、1D 結果顯示 *Kalanchoe blossfeldiana 'Hayworth' × K. pinnata '102-1'* 培植體繼代於含有 500 及 1000 mg/L 秋水仙素培養基後一個月，兩者均生長較慢且部分培植體有褐化現象。

經秋水仙素處理之培植體於出瓶後，挑選具型態變異之誘變株進行植株性狀調查及相對 DNA 含量檢測。型態變異挑選標準主要根據植物性狀如株高、分枝數、節間長度、葉片長寬、花器性狀等植物特徵，與未進行誘變處理之原始單株植物性狀具明顯差異者進行挑選及後續調查。如(表 2)所示 *Kalanchoe blossfeldiana 'Hayworth' × K. pinnata '102-1'* 之株

表 1. 利用不同濃度秋水仙素培養基培養 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1'之培植體存活率及型態變異率。

Table 1. Effects of colchicine on the survival rate of explants and percentage of morphological variation of *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1'.

濃度 Concentrations (Mg/L)	培植體存活率 Survival rate of explants (%)	型態變異率 Percentage of morphological variation (%)
100	100(10/10)	35.6(187/525)
250	100(10/10)	21.3(80/375)
500	100(10/10)	38.4(86/224)
1000	100(10/10)	65.7(184/280)

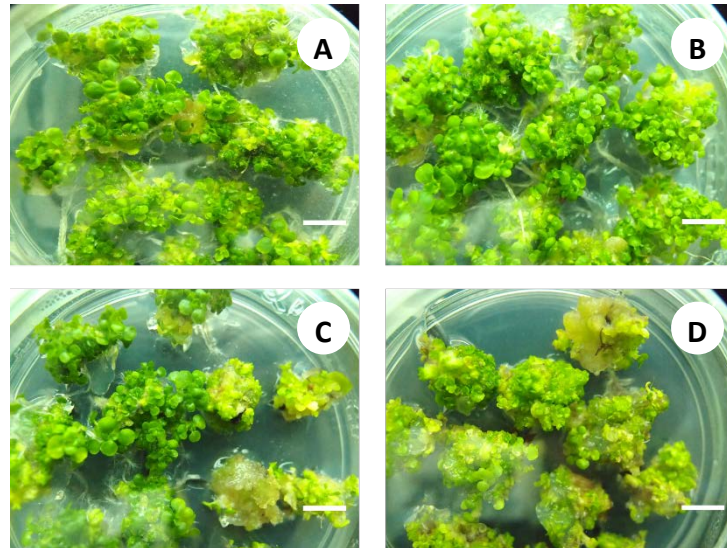


圖 1. 利用不同濃度秋水仙素培養基培養 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1'培植體一個月之情形。(A : 100 mg/L ; B : 250 mg/L ; C : 500 mg/L ; D : 1000 mg/L) Bar = 1cm。

Fig. 1. Appearances of *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' explants after one month of cultivation on the 1/2 MS medium contained various concentrations of colchicine. (A : 100 mg/L ; B : 250 mg/L ; C : 500 mg/L ; D : 1000 mg/L)

表 2. *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 與秋水仙素誘變植株性狀比較  
 Table 2. Plant characteristics of *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' and colchicine-mutated plants.

植株 Plants	株高 Plant height (cm)	分枝 數 No. of branch	節間長 度 Internode length (cm)	葉長 Leaf length (cm)	葉寬 Leaf width (cm)	總花 朵數 No. of total flower	花徑 (cm) Flower diameter	相對 DNA 含量 Rel. DNA contents	花粉發芽 率 Rate of Pollen germination (%)
H × P <sup>x</sup>	38.0 a <sup>z</sup>	2	1.8 b	7.9 a	4.6 a	28	1.7 b	2.00	0
誘變株 編號 1 <sup>y</sup>	35.4 a	2	2.2 a	6.0 b	4.5 a	13	2.2 a	2.21	0
誘變株 編號 2	24.6 b	2	1.5 b	5.4 c	4.3 b	17	2.2 a	3.95	0
誘變株 編號 3	10.5 c	1	1.3 c	4.9 d	3.7 c	16	2.3 a	3.84	0

<sup>x</sup>: H × P: *K. 'Hayworth'* × *K. pinnata* '102-1'.

<sup>y</sup>: colchicine-mutated plants 1~3.

<sup>z</sup>: 數據顯示為平均值，且同一列英文字母相同者，表示 Fisher's LSD 5 % 最小顯著差異分析結果不顯著。Means in a column within the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level according to Fisher's LSD mean separation test.

高為 38.0 公分，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之株高分別為 35.4、24.6 及 10.5 公分。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1'、誘變株編號 1 與誘變株編號 2 之分枝數皆為 2 枝，僅誘變株編號 3 之分枝數為 1 枝。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 之節間長為 1.8 公分，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之節間長分別為 2.2、1.5 及 1.3 公分(圖 2A)。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 之葉長為 7.9 公分，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之葉長分別為 6.0、5.4 及 4.9 公分。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 之葉寬為 4.6 公分，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之葉寬分別為 4.5、4.3 及 3.7 公分(圖 2B)。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 之總花朵數為 28 朵，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之總花朵數分別為 13、17 及 162 朵。*K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 之花徑為 1.7 公分，而誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之花徑分別為 2.2、2.2 及 2.3 公分(圖 2C)。

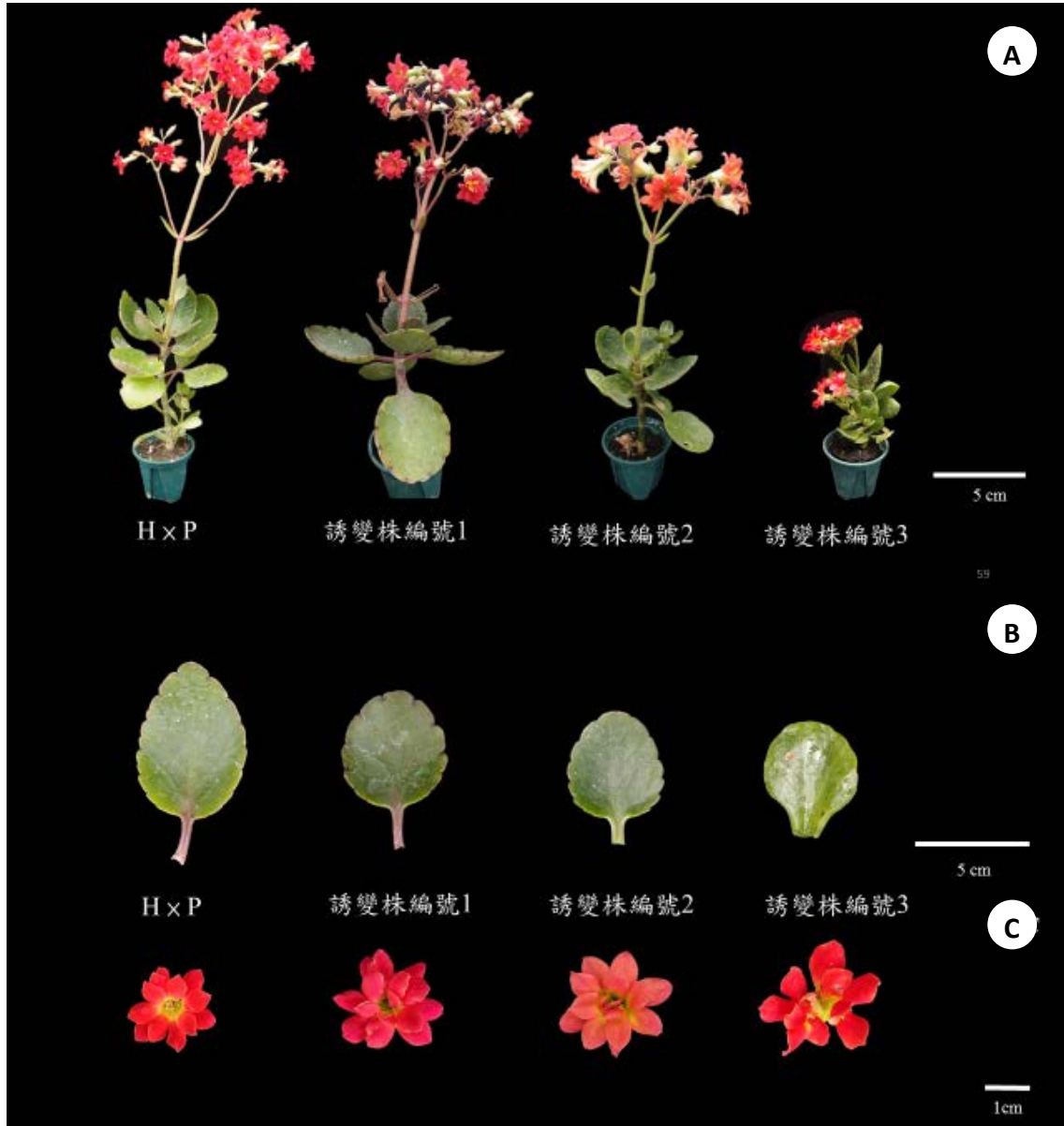


圖 2. *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1'與秋水仙素誘變植株性狀比較。

(A：植株型態、B：葉片、C：花朵) (H × P： *K.* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1')。

Fig. 2. Appearances of *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' and colchicine-mutated plants.

由圖 3 之結果顯示誘變植株誘變株編號 1、誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之相對 DNA 含量分別為 2.21、3.95 及 3.84。圖 2A 可見誘變株編號 1 之峰值與 H × P 植株重疊，而誘變株編號 2 及誘變株編號 3 之峰值則約為 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 兩倍。全數誘變株經花粉活力檢測發現花粉皆為皺縮形態且不具任何發芽能力。

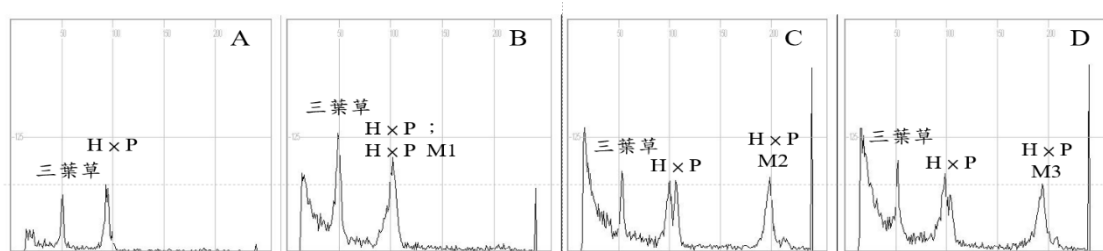


圖 3. 利用流式細胞分析 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' 及其誘變植株。(H × P : *K. 'Hayworth'* 與 *K. pinnata* ; H × P M1 : 誘變株編號 1 ; H × P M2 : 誘變株編號 2 ; H × P M3 : 誘變株編號 3)。

Fig 3. Flow cytometric histograms of of *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' and colchicine-mutated plants. (H × P : *K. 'Hayworth'* × *K. pinnata* '102-1' ; H × P M1 : mutated plant 1 ; H × P M2 : mutated plant 2 ; H × P M3 : mutated plant 3)。

## 討 論

近年來多倍體育種創造作物特定的性狀，如較大的花朵、果實(Yang *et al.*, 2011)，而觀賞作物運用此一方法行之有年，用以創造新性狀或克服種間雜交障礙(Eeckhaut *et al.*, 2006)。長壽花遠緣雜交後代之花粉常表現低活力或無稔性，造成後續育種進程受到限制，王(2011)使用 *Kalanchoe blossfeldiana* 'Isabella' 與落地生根節物種 *K. pinnatum*、*K. 'Wendy'* 之節間雜交後代回交親本，皆無法獲得實心種子。而長壽花'0089A' × *K. pubescens* 之節間雜交產生具稔性及無稔性後代，利用光學顯微鏡觀察其花粉可見未減數分裂 2n 配子，推測少數產生有效花粉可能與未減數分裂配子形成有關(Kuligowska *et al.*, 2015)。

本試驗以秋水仙素配合組織培養成功獲得 4 倍體植株(表 2、圖 2)。長壽花於栽培過程、組織培養或進行遠緣雜交的過程中，時常發生多倍體化情形，加速長壽花品種的發展(Aida and Shibata, 2002 ; Izumikawa *et al.*, 2007)。2002 年 Aida 與 Shibata 使用 4 倍體長壽花 *K. blossfeldiana* 'Tetra Vulkan' 葉片作為培植體再生小植株即有 79.3% 多倍體化植株產生，其中 8 倍體數量最多、型態也近似於 4 倍體；12 倍體與 16 倍體植株矮小且生長緩慢、葉

子較小而厚。Izumikawa 等人於 2007 年選用長壽花'QY'與 *K. pumila*、*K. daigremontiana* 以及 *K. laxiflora* 之種間雜交後代進行組織培養，成功誘導染色體加倍植株。

本篇研究原欲透過秋水仙素恢復植株花粉稔性，但最後並無獲得具花粉活力之誘變植株，推測可能染色體數量協同或染色體組配對相關相關。Kuligowska 等人於 2015 年使用四倍體長壽花與二倍體燈籠草物種進行雜交(長壽花  $2n = 4x = 68$ 、*K. pubescens*  $2n = 2x = 34$ ) (*K. blossfeldiana*  $2n = 4x = 68$ 、*K. marnieriana*  $2n = 2x = 34$ )，結果顯示均可產生具花粉稔性之後代。但使用相同倍數性之雜交組合其後代均無稔性。此結果也與 Izumikawa 等人於 2007 年進行燈籠草屬雜交研究時亦發現此現象。其結果暗示燈籠草屬物種其越具相近同源染色體可能會降低後裔稔性。而本篇研究進行多倍體誘變均無法獲具稔性誘變單株可能與染色體加倍皆為同源染色體所造成。但仍須後續研究驗證。

Lucía 等人於 2015 年使用組織培養與秋水仙素誘導多倍體之美女櫻(*G. peruviana* × *G. scrobiculata*)，結果顯示 2 倍體植株與 4 倍體植株的花朵大小有顯著差異，與本試驗所獲得之結果相同。聖誕紅種間雜品種之'Dulce Rosa<sup>TM</sup>'再經秋水仙素處理後，獲得之誘變植株花徑皆增加，且葉片短圓與原株外觀具明顯差異。同時雄花器恢復正常，花絲可順利伸出並自然開裂花粉，且有 8 % 之花粉發芽率(陸，2015)。然而本試驗所獲得之 4 倍體誘變植株雖外觀與原株具型態差異(圖 3)，且有花粉釋出，但經過檢測後並無花粉粒發芽。

## 參 考 文 獻

- 王嘉偉、朱建鏞。2011。長壽花'Isabella'節間雜交種之性狀表現及其回交。興大園藝 36: 39-51。
- 侯宇龍。2003。鵝鑾鼻燈籠草與長壽花之種間雜交育種。國立中興大學園藝系研究所碩士論文。pp. 24-25。
- 盧勝鍵。2013。燈籠草屬同節物種或異節物種之種間雜交。國立中興大學園藝系研究所碩士論文。pp. 32。
- 陸雅芬。2015。聖誕紅之種間雜交與多倍體化。國立中興大學園藝系研究所碩士論文。pp. 29-30。
- Allorge-Boiteau, L. 1996. Madagascar centre de speciation et d'origine du genre *Kalanchoe* (*Crassulaceae*). Biogéographie de Madagascar. pp. 137-145.
- Aida, R. and M. Shibata, 2002. High frequency of polyploidization in regenerated plants of *Kalanchoe blossfeldiana* cultivar 'Tetra Vulcan'. Plant Biotech. 19: 329-334.
- 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.
- Descouings, B. 2003. *Kalanchoe*. In: Egli U, Hattmann HEK (eds) Illustrated handbook of



- succulent plants: Crassulaceae. Springer Verlag, New York. pp. 143-181.
- Escandón, A. S., J. C. Hagiwara, and L. M. Alderete. 2006. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by in vitro polyploidization. *Electron. J. Biotechnol.* 9: 157-162.
- Floradania. 2014. Floradania marketing. Top 10 over de størstekulturer i Danmark 2013. [http://floradania.dk/fileadmin/s3/pdf/Markedsinformation/Top\\_lister/2013\\_Top\\_10\\_over\\_kulturer\\_i\\_Danmark.pdf](http://floradania.dk/fileadmin/s3/pdf/Markedsinformation/Top_lister/2013_Top_10_over_kulturer_i_Danmark.pdf).
- FloraHolland. 2014. FloraHolland. Facts and figures 2013. <https://www.floraholland.com/media/2460310/Kengetallen-EN-2013.pdf>.
- Izumikawa, Y., I. Nakamura, and M. Mii. 2007. Interspecific hybridization between *Kalanchoe blossfeldiana* and several wild *Kalanchoe* species with ornamental value. *Acta Hort.* 743: 59-65.
- Izumikawa, Y., S. Takei, I. Nakamura, and M. Mii. 2008. Production and characterization of intersectional hybrids between *Kalanchoe spathulata* and *K. laxiflora* (= *Bryophyllum crenatum*). *Euphytica.* 163: 123-130.
- Kuligowska, K., H. Lütken, B. Christensen, I. Skovgaard, M. Linde, T. Winkelmann, and R. Müller. 2015. Evaluation of reproductive barriers contributes to the development of novel interspecific hybrids in the kalanchoë genus. *BMC Plant Biology.* 15: 15.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Lucía, G. R., I. Jesica, C. Andrea, B. Verónica, B. Paula, P. Á. Sandra, and E. Alejandro. 2015. A protocol for the *in vitro* propagation and polyploidization of an interspecific hybrid of *Glandularia* (*G. peruviana* × *G. scrobiculata*). *Scientia Hort.* 184: 46-54.
- Yang, X. H., C. Y. Ye, Z. M. Chen, T. J. Tschaplinski, S. D. Wulschleger, W. L. Yin, X. L. Xia, and G. Tuskan. 2011. Genomic aspects of research involving polyploid plants. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 104: 387-397.

## Polyploidization of *Kalanchoe* Intersectional Hybrids

Chun-Hsiu Yu <sup>1)</sup> Yen-Ming Chen <sup>2)</sup>

Key words: *Kalanchoe*, intersectional hybridization, polyploidy induction

### Summary

In this research, the polyploidy mutants of intersectional hybrids *Kalanchoe blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' were processed with 1000 mg/L colchicine *in vitro*. Two hundred and eighty plantlets were survived. Among them, 184 morphological mutants were found, it complied a 65.7% mutation rate. The height, internode length, leaf length and leaf width of *K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' mutant-2 and *K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' mutant-3 were decreased and the diameter of flower were increased. The mutants were identified by flow cytometry. The relative DNA contents of *K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' mutant-2 and *K. blossfeldiana* 'Hayworth' × *K. pinnata* '102-1' mutant-3 were 3.95 and 3.84, but no pollen germination was found.

---

1) Student in M.S. program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Assistant professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.