

百香果自交不親和性探討及克服策略之建立

陳盈君¹⁾ 林慧玲²⁾

關鍵字：孢子體自交不親和、抗氧化酵素、切柱授粉

摘要：為探討百香果自交不親和性表現及克服其生殖障礙，進行花粉與柱頭型態觀察、花粉發芽力測試及柱頭可溶性蛋白及酵素含量分析。結果顯示黃色種百香果及墨西哥黃色種百香果具孢子體自交不親和性，'台農一號'百香果為自交親和，其花柱之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸含量皆高於不親和性的墨西哥黃色種；經自交授粉 10 分鐘後，'台農一號'百香果花柱之過氧化氫酶 (CAT) 及抗壞血酸過氧化物酶 (APX) 活性皆下降，其中 CAT 活性則在自花授粉 60 分鐘有增加的趨勢，經槲皮素處理後授粉花柱，其內含 CAT 活性下降而 APX 活性增加；墨西哥黃色種百香果柱頭授粉後 10 分鐘，無論是否經槲皮素處理，其 CAT 活性皆增加，但 APX 活性則是授粉後先下降而後再上升，推測此些反應與細胞程序性凋亡有關。切除墨西哥黃色種百香果柱頭頂端細胞後行自花授粉，可獲得成熟果實及種子，此些種子發芽長成植株於田間栽培開花後，再行切柱處理同樣可獲得自交種子，顯示此技術為克服百香果自交不親和障礙的可行性策略。

前 言

百香果屬於西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (*Passiflora*) 植物，為臺灣夏秋兩季重要果品之一，果實供鮮食及加工之用，主要栽培品種為'台農一號'百香果。為避免毒素病蔓延以及莖腐病感染造成產量下降，目前採每年更新無病毒健康嫁接苗之栽培模式，依據農業委員會農業統計資料，百香果至 2017 年總栽培面積達 680 公頃，總產量增加至 11,547 公噸，所需種苗數量約為每年 80 萬株。'台農一號'百香果種苗外銷量自 104 年開始快速增加，至 2017 年種苗出口量超過 800 萬株，主要出口國家為越南、中國大陸及泰國 (莊和江，2019)。由此可見，無病毒健康嫁接苗生產為百香果產業之發展關鍵。嫁接苗生產除了

1) 國立中興大學園藝系博士班研究生。
2) 國立中興大學園藝系教授，通訊作者。

需要木品台農一號木品百香果無病毒接穗之外，亦包括作為砧木用的種子苗，最常用的砧木品種為黃色種百香果 (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)，具有耐莖腐病之特性，但具自交不親和特性，需以異花授粉方式生產種子。

植物自交不親和性 (Self-incompatibility, SI) 為自然界植物維持其基因多樣性的重要生殖過程，藉此遺傳特性避免自交弱勢。自交不親和性主要分為兩類：配子體自交不親和 (gametophytic self-incompatibility, GSI) 及孢子體自交不親和 (sporophytic self-incompatibility, SSI)。茄科 (Solanaceae)、薔薇科 (Rosaceae) 及玄蔘科 (Scrophulariaceae) 屬於配子體自交不親和；十字花科 (Brassicaceae) 則為典型孢子體不親和性植物 (Takayama and Isogai, 2005)。十字花科藉由自我識別機制 (self-recognition mechanism)，與柱頭具有相同 S-haplotype 花粉被柱頭辨識並發生而專一性交互作用，導致本身花粉被排斥而產生自交不親和現象 (Fujii *et al.*, 2016)。關於百香果自交不親和性之控制機制，多篇研究提出見解及證據。*Passiflora cincinnata* 被鑑定具孢子體自交不親和性，研究提出其存在一個基因座含有 5 個 S-等位基因控制此項特性 (Ho and Shii, 1986)，以及具有 3 個與自交不親和相關的等位基因 (S1、S2 及 S3)，並認為應存在更多數量的等位基因 (Bruckner *et al.*, 1995)。黃色種百香果則被鑑定出具有 6 個 S-等位基因 (S1 至 S6)，由 2 個基因座所控制 (Rêgo *et al.*, 1999)。黃色種百香果授粉後，其花粉管伸長至花柱頂端 1/3 處前停止生長，伴隨無定向生長、花粉管壁變薄及花粉管前端腫脹等現象出現，認為百香果同時存在配子體及孢子體自交不親和性 (Rêgo *et al.*, 2000; Suassuna *et al.*, 2003)。Duarte 等 (2014) 針對巴西地區 5 種原生西番蓮屬植物進行生殖生物學研究，經 4 種授粉試驗 (套袋自花授粉、人工自花授粉、人工異花授粉及自然開放授粉)，結果顯示，*P. cincinnata* 及 *P. tricuspis* 具自交不親和性。

添加百香果開花當天之柱頭萃取液至培養基，抑制 4 個參試黃色種百香果花粉體外發芽 (卓等, 008)；*P. caerulea* 柱頭萃取液加入培養基使其發芽率由 54% 降至 35.7%，具自交親和性的紫色種百香果之柱頭萃取液則可使離體花粉發芽率由 49.1% 顯著提高到 89%，結果顯示柱頭組織所含發芽誘導因素及物質，對於花粉體外發芽呈抑制或促進效應，受種質本身不親和系統所影響 (李等, 1989)。近年來藉由細胞學及分子生物學證據，證實西番蓮屬植物屬於孢子體自交不親和性。黃色種百香果 2 個商業品種之不親和性花粉接觸柱頭後，花粉表面及花粉管細胞壁迅速累積沉澱胼氈質，柱頭細胞及引導組織細胞胞器無組織化，產生多量大液胞而後引發細胞程序性凋亡，造成花粉管在柱頭便無法萌發；並透過蛋白質序列分析篩選到 564 bp 大小片段，經序列比對顯示此片段與歐洲大葉楊 S-receptor kinase gene (SRK) 蛋白質序列、大星牽牛 SLG (S-locus glycoprotein) 蛋白質序列以及油橄欖 SRK 與 SLG 之蛋白質序列皆具有高度相似性，證實其屬於孢子體自交不親和性 (Madureira *et al.*, 2014)。

莖苔屬植物為典型孢子體自交不親和性植物，蕾期授粉為目前主要克服此項障礙的技術，其他技術包括高溫處理、電刺激、CO₂ 處理、混合花粉處理、鋼刷授粉及 γ 射線輻射

等物理、生物學及機械方法 (劉等, 2009; 周, 2004), 但此些方法易對柱頭造成直接傷害或是操作流程較為繁瑣; 利用化學藥劑來抑制柱頭分泌之醣蛋白以降低其對不親和性花粉辨識能力, 進而達到克服自交不親和性之目的, 被認為效果與蕾期授粉相近, 但較為節省人力, 已被提出的藥劑包括植物生長調節劑、植物凝集素、氯化鈉加上硼酸溶液及槲皮素 (quercetin) 等 (周, 2004; 劉等, 2009)。目前以鹽水加上硼酸之溶液於開花前 1-2 天噴施甘藍花苞 (曹和王, 1998; 周, 2004; 劉等, 2009; 周等, 2009) 或是於蕾期 (開花期兩週) 每日噴施 500-1500 μmol 槲皮素皆可提升自交不親和性的親和指數 (呂等, 2001; 周, 2004; 李等, 2005)。槲皮素是一種具有生物活性的天然黃酮類化合物, 作為蛋白激酶抑制劑可有效抑制 SRK 活性, 因而關閉自交不親和性的信號傳導, 使甘藍自交不親和性受阻, 進一步促進花粉發芽而順利受精形成種子 (吳, 2004)。

西番蓮屬植物之自交不親和性研究主要針對其現象及機制加以探討, 但對於克服此項障礙的技術進展較慢。黃色種百香果透過蕾期授粉或重複授粉, 其著果率由 0% 提高至 10-16.67% (Rêgo *et al.*, 2013) 或是 14.8% (Bruckner *et al.*, 1995)。以 2,4-D 處理可促進子房膨大, 但無法促使受精 (Ho and Shii, 1986)。Rêgo 等人 (2000) 研究顯示黃色種百香果蕾期授粉並經後裔篩選及回交等篩選可獲得具親和性品系 (BG), 其花粉接觸柱頭 30 分鐘後便可發芽, 60 分鐘進入至輸導組織, 授粉後 12 小時受精, 並形成連續性胼胝體。卓等 (2008) 則以蕾期授粉觀察到有 1 個黃色種雜交品系花粉可發芽, 但未調查胚珠受精率。2 種百香果基因型 (M7 及 N9) 於蕾期授粉、開花當日及開花當日切柱授粉以比較其著果率, 結果以開花當日、開花前 1 小時除雄套袋, 開花時切除約 1.5 mm 柱頭組織, 於 13 時及 17 時此 2 時段重複授粉, 7 天後平均著果率可提高至 81.94% (de Lira Júnior *et al.*, 2016)。

本研究目的為探討西番蓮屬植物自交不親和性之機制, 並擬定簡便且有效之克服策略以提高結實率及種子數, 將可應用於砧木種子生產。

材 料 和 方 法

一、植物材料

花粉與柱頭型態觀察以 '台農一號' 百香果、黃色種百香果及墨西哥黃色種百香果當日開放花朵為材料; 柱頭總可溶性蛋白及酵素含量分析則以 '台農一號' 百香果及墨西哥黃色種百香果之一年生成熟植株為材料, '台農一號' 百香果具自交親和性, 墨西哥黃色種百香果則為自交不親和。

二、花粉與柱頭型態觀察及花粉發芽力測試

(一) 掃描式電子顯微鏡觀察

樣品處理及操作流程參考 Chang 等 (2005) 之方法。採集百香果當日開放花朵之花粉及柱頭, 加入含有 2.5% 戊二醛 (Sigma-Aldrich Co., USA) 磷酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0) 之固定液, 於 5 °C 黑暗環境進行樣品固定 2 hr, 再以磷酸緩衝液清洗 3 次後, 經酒精-丙酮

序列脫水。樣品以超臨界乾燥機 (HPC-2 Critical Point Dryer, Hitachi, Japan)處理至完全乾燥、以鍍膜儀 (E-1010 ION SUPTTER, Hitachi, Japan)鍍金，於掃描式電子顯微鏡 (S-3500N, Hitachi, Japan)觀察型態並拍照記錄。

(二) 石蠟切片

切取百香果花柱置入固定液 (50%酒精：醋酸：福馬林=18：1：1, v/v/v)，抽氣固定 30 min，靜置 12 hr 以上。樣品以 50%酒精清洗 3 次、以三級丁醇 (t-butanol; TBA)序列脫水，移入 60°C 烘箱 (Firstek, Taiwan)中進行滲蠟 (McCormick 501006)，樣品於室溫下包埋成蠟塊，以轉動式切片機 (LEICA, RM2235, Germany)進行切片，切片厚度為 8 μm 。蠟條固定於載玻片上，以二甲苯處理脫臘 30 min，再經 100%、95%、70%及 50%酒精序列濃度各浸泡 3 min，1% Safranin O 染色 1 hr，再以 50%、70%及 95%酒精浸泡 3 min，以 0.5% Fast Green 染色 5-10 sec，將樣品浸泡於 100%酒精與二甲苯各 6 min，擦拭多餘之二甲苯，蓋上蓋玻片以封片膠 (Entellan, Merck)封片，40°C 烘箱 (Venticell, UK)烘乾，以光學顯微鏡 (Axioskop2, ZEISS, Germany)觀察並拍照紀錄 (CCD 影像系統, Prog Res MF scan, Germany) (蔡，2012)。

(三) 花粉發芽力測試-花粉體內發芽

花朵開放當天進行自花授粉，並於授粉後 1 小時切取子房及花柱，置入上述 (二)固定液並抽氣固定，靜置隔夜；以蒸餾水清洗數次，加入 3 N NaOH 於 60°C 軟化 2 hr；蒸餾水清洗數次，將子房夾出放置於載玻片上，並滴上適量含 2%甘油之 0.1% 苯胺藍 (aniline blue)，以蓋玻片將子房壓扁；置於黑暗環境下染色 1-4 hr (de Groot *et al.* 2004；Chiu *et al.*, 2011)。以螢光顯微鏡 (Axioskop2, ZEISS, Germany)觀察並以 CCD 影像系統拍照。

三、柱頭可溶性蛋白、總酚類化合物、總游離胺基酸及酵素活性分析

選取當日開花花朵之柱頭 (對照組)、自花授粉後柱頭 (包括未經槲皮素處理、甲醇處理及 3000 μM 槲皮素處理 15 sec，風乾 10 min)為供試材料，槲皮素處理後 10 分鐘、30 分鐘及 60 分鐘，分別剪取柱頭樣品以封口袋分裝，以 6-7 個花柱 (約 0.4-0.6g)為 1 樣品，暫放在含有碎冰的冰桶中，送至實驗室以電子天平秤重，液態氮處理後，保存於-20°C 冰箱。

(一) 可溶性蛋白含量 (soluble protein, SP)測定

參考修正 Lowry 等 (1951)之方法製備樣品。加入 5 mL 磷酸緩衝溶液 (0.1 M, pH7.0)及適量海砂至花柱樣品，於冰浴中以研鉢研磨，於 4°C 以 20000 \times g 高速離心 (RC5C, Sorvall, U.S.A)20 min，濾布 (Miracloth, Merck)過濾後，取上清液參考吳 (2013)方法進行分析。吸取 0.1 mL 萃取液稀釋至 2 mL，加入 5 mL 試劑 A (2 公克 Na_2CO_3 、1 mL 2% $\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 、1 mL 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、10 mL 1N NaOH、90 mL H_2O)，震盪均勻後靜置 10 min，加入 0.5 mL 試劑 B (Folin-Ciocalteus phenol reagent： H_2O =1：1)後，同樣震盪均勻並靜置 30 min，以酵素免疫分析測讀儀 (BMG LABTECH, FLUOstar Omega Ω , Germany)測定 660 nm 波長下之吸光值，標準曲線以 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 配製，並計算其總可溶性蛋白質含量。

(二) 總酚類化合物 (total phenolic compound, TPC)含量

樣品萃取方法同上述(一)，依據 Keith 等 (1958)方法進行分析。吸取 0.2 mL 萃取液以純水稀釋至 1 mL，加入 0.1 mL Folin-Ciocalteus phenol reagent、0.2 mL 之 20% Na₂CO₃、8.7 mL 去離子水，震盪均勻以沸水煮 3 min 後取出冷卻。隨後以酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 660 nm 波長下之吸光值，標準曲線則以 100 ppm caffeic acid 配製。總酚類化合物含量計算公式：TPC 含量 (μg·g⁻¹FW) = 吸光值 (ppm)×5 (稀釋倍數)×5 (mL) ÷ g (鮮重)。

(三)總游離胺基酸 (total free amino acid, FAA)濃度測定

樣品萃取方法同上述(一)，參考 Rosen(1957)方法進行分析。吸取 0.2 mL 萃取液稀釋至 1 mL，再加入 1 mL ninhydrin reagent (5 g·L⁻¹ ninhydrin、95 g·L⁻¹ KH₂PO₄、43 g·L⁻¹ Na₂HPO₃、3 g·L⁻¹ fructose)均勻震盪後，以沸水煮 10 min 後取出冷卻，再加入 5 mL color diluents (2 g KIO₃ 以 600 mL 去離子水完全溶解後，以 95%酒精定量至 1 L)，混合均勻以酵素免疫分析測讀儀測定各樣品 570 nm 波長之吸光值。標準曲線以 1 mM α-ananine 配製。

(四)過氧化氫酶 (catalase, CAT)活性測定

參考吳 (2013)之方法進行樣品萃取，再依據 Kato 及 Shimizu (1987)步驟分析。每樣品包括 6-7 個花柱，加入 5 mL 含有 1 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM polyethylene glycol (PEG-6000)、0.1 mM EDTA 之磷酸緩衝溶液 (pH 7.8)、0.1 g polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)及適量海砂於冰浴中研磨，於 4°C 以 20000×g 離心 20 min，樣品經濾布過濾後，吸取 20 μL 上清萃取液，依序加入 260 μL 之 100 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0)及 20 μL 之 50 mM H₂O₂ 隨即開始反應。酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 240nm 波長、1 分鐘內之吸光值變化，為酶萃取液 ΔA240。空白組以 20 μL 之萃取緩衝溶液代替酶萃取液進行測定。反應產物消光係數為 40 mM⁻¹·cm⁻¹，CAT 活性單位 (unit)表示每分鐘消耗 1 μmol 的 H₂O₂。

(五)抗壞血酸過氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX)活性測定

參考上述方法(五)製備樣品，依據 Nakano 及 Asada (1981)方法進行分析。吸取 10 μL 萃取液，依序加入 150 μL 之 150 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0)、100 μL 之 1.5 mM ascorbate、40 μL 之 0.75 mM EDTA，最後加入 50 μL 之 6 mM H₂O₂ 隨即開始反應。酵素免疫分析測讀儀測定各樣品於 290 nm 波長、1 分鐘內之吸光值數值，為酶萃取液 ΔA290。空白組以 10 μL 之萃取緩衝溶液代替酶萃取液進行測定。反應產物消光係數為 2.8 mM⁻¹·cm⁻¹，APX 活性單位 (unit)表示每分鐘消耗 1 μmol 的 ascorbate。

四、授粉障礙之克服

西番蓮屬植物具有孢子體自交不親和性，應用化學藥劑處理柱頭擾亂其分泌的醣蛋白，抑制其對不親和花粉的辨識作用；或是直接以切柱處理阻斷柱頭與花粉間的辨識作用，為可開發之方向。

(一)槲皮素處理

以墨西哥黃色種百香果及'台農一號'百香果為材料，於花朵開放當日摘除花藥，將柱頭浸泡於 750、1500、3000 μM 槲皮素溶液 10 秒，風乾 10 分鐘後進行人工自花授粉，觀察後續著果比例。

(二)切柱處理

以墨西哥黃色種百香果當日開花之花朵為材料，切除柱頭頂部組織進行自花授粉，觀察後續著果比例。成功著果之果實所獲得之種子於溫室進行播種，調查其後續生長與開花型態。

結果與討論

一、花粉與柱頭型態觀察及花粉發芽力測試

為進行授粉試驗，針對百香果柱頭及花粉進行基礎觀察。百香果柱頭為乾式柱頭，不具有黏液，石蠟切片及電子顯微鏡結果皆顯示柱頭表面之絨毛細胞排列整齊緊密，呈長柱狀，為花粉接觸柱頭時最先產生反應的區域(圖 1a, b)。3 種百香果花粉外壁之花粉長度介於 60-70 μm 之間，以黃色種百香果花粉表面花紋較為緊密(圖 1c, 1d, 1e)。

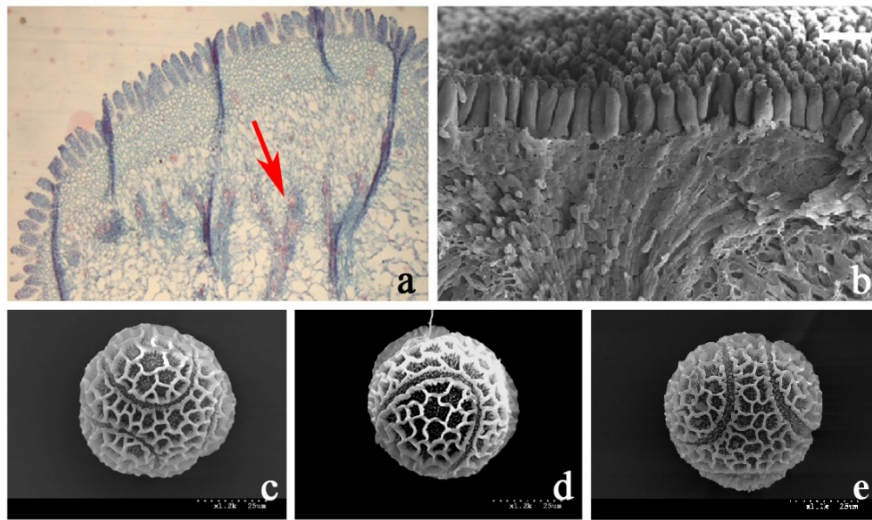


圖 1. 黃色種百香果柱頭細胞排列及 3 種百香果花粉型態。

a-b. 黃色種百香果柱頭之細胞排列及 Y 型輸導組織 (如圖中箭頭所示). c. 黃色種花粉表面型態. d. 台農一號百香果花粉表面型態. e. 墨西哥黃色種百香果花粉。Scale bars: 56.1 μm (a), 30.6 μm (b), 19.3 μm (c), 19.3 μm (d), 18.6 μm (e)。

Fig. 1. The cell pattern of stigma in yellow passion fruit and pollen morphology in 3 kinds of passion fruit.

a-b. Papillae cells and funnel-like pattern of transmitting tissue in yellow passion fruit. c-e. Surface morphology of pollen in yellow passion fruit (c), 'Tainung No.1' passion fruit (d), and *P. edulis* f. *flavicarpa* 'Mex' (e). Scale bars: 56.1 μm (a), 30.6 μm (b), 19.3 μm (c), 19.3 μm (d) and 18.6 μm (e).

前人研究以 ^{35}S -甲硫胺酸偵測柱頭上之絨毛細胞，證實其為合成 S 專一性醣蛋白主要位置，即為柱頭細胞辨識花粉親和性的主要區域，且成熟柱頭才有顯著的醣蛋白產生 (Nasrallah *et al.*, 1985; 卓, 1990)。百香果柱頭絨毛外壁具有附著物及色體。百香果花粉表面具有花紋，花粉外壁含有多量的親脂性物質 (lipophilic substances)，其中 pollenkitt 及 tryphine 可能直接參與柱頭辨識親和或不親和花粉的過程 (許和何, 1985; Soares *et al.*, 2013)。

黃色種百香果自花授粉 1 小時，極少部分花粉管可順利生長穿透柱頭頂端絨毛細胞，部分花粉管花粉管伸長但頂端不正常皺縮或腫脹 (圖 2)。台農一號百香果具自交親和特性，其授粉後花粉管則可順利穿透絨毛細胞並伸長至輸導組織。試驗結果顯示，百香果歸屬於孢子體自交不親和性，與前人研究結果相符 (Ho and Shii, 1986; Suassuna *et al.*, 2003; Madureira *et al.*, 2014)。

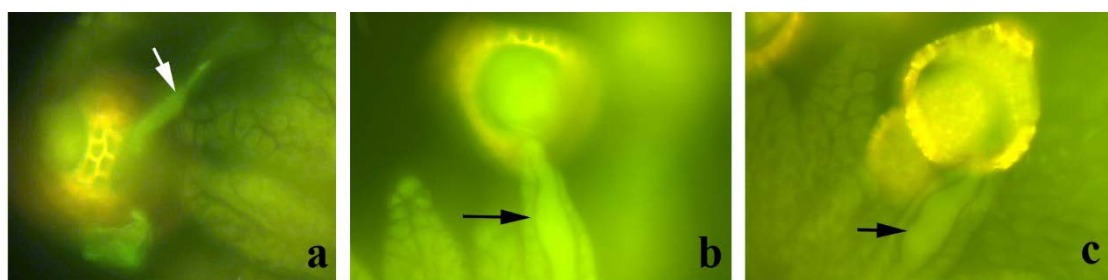


圖 2. 黃色種百香果自花授粉 1 小時後，花粉管於柱頭細胞發芽及生長情形。

a. 花粉管伸長但頂端不正常皺縮; b-c. 花粉管伸長未達花粉長度的兩倍以上，頂端腫脹。Scale bars: 25.4 μm (a), 22.6 μm (b), 20.3 μm (c)。

Fig. 2. Pollen *in vivo* germination and growth on stigma after 1 hr of self-pollination in yellow passion fruit.

a. The pollen tube elongated but the tip is shrunk. b-c. Pollen tube elongated less than twice of the length of pollen, and the top of tube is swollen. Scale bars: 25.4 μm (a), 22.6 μm (b), 20.3 μm (c).

以'台農一號'百香果及黃色種百香果為材料，進行授粉及槲皮素處理。'台農一號'百香果單花柱未授粉且未處理槲皮素，其 TPC、SP 與 FAA 含量皆最高，經槲皮素處理則 3 種含量皆降至最低。柱頭經自交授粉 10 分鐘後，3 種含量皆顯著降低，而後含量增加至與未授粉處理無差異；槲皮素處理授粉後 30 及 60 分鐘，TPC 及 SP 含量增加，FAA 含量則未顯著提高 (表 1)。墨西哥黃色種百香果單花柱之 TPC 含量則是以未授粉、槲皮素處理達 833.5 μg ，顯著高於甲醇處理與自交授粉 60 分鐘；單花柱 SP 以未授粉、槲皮素處理之含量最高，顯著高於甲醇處理及自交授粉 10 分鐘；以授粉與否進行比較，墨西哥黃色種百香果單柱頭 FAA 含量授粉前後並無

顯著差異，但經槲皮素處理後，自花授粉 10 分鐘後 FAA 含量最高，而後含量無明顯變化 (表 2)。比較 2 品種之差異，具自交親和性的'台農一號'百香果花柱之 TPC、SP 及 FAA 含量皆高於不親和性的墨西哥黃色種百香果。呂等人 (2010)研究美女櫻的雄不育性品系與可育性品系花器官發育過程的生理生化指標，結果顯示不育性品系花苞發育過程中的可溶性蛋白量及游離脯氨酸含量較低，指出可溶性蛋白內含的酵素與代謝調節物質對花藥及小孢子生長發育具關鍵作用，游離脯氨酸則提供充足能量和物質促進小孢子發育，此些物質的缺乏可能是導致花粉敗育的原因。鬱金香花柱可溶性蛋白質含量則是自交授粉含量高於雜交授粉 (王等，2010)。黃花菸草授粉前柱頭之游離胺基酸含量高於授粉後 (康等，2013)。木荷自交授粉之總量氨基酸高於異交授粉，且自交授粉子房內精氨酸(Arg)含量顯著較高，認為其為多胺生合成的前驅物，與木荷自交親和性有關 (楊，2017)。

表 1. '台農一號'百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸變化。

Table 1. Contents of Total phenolic compounds (TPC), soluble protein (SP) and total free amino acid (FAA) of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in 'Tainung No. 1' passion fruit.

Treatment ^z	TPC/one stigma+style (µg)	SP/one stigma+style (mg)	FAA/one stigma+style (µmole alanine)
No pollination, no quercetin	593.0 a	4.0 a	6.9 a
Self-pollination for 10 min	464.9 bc	3.2 bc	4.2 bc
Self-pollination for 60 min	525.8 ab	3.7 ab	5.6 ab
3000 µM Q, 15 sec, no pollination	358.2 c	2.6 c	3.3 c
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	516.6 ab	3.7 ab	4.6 bc
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	542.7 ab	3.5 ab	4.9 bc

^z Three repeats per treatment. Quercetin (Q) treatment: stigmas were dipped into 3000 µM quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

表 2. 墨西哥黃色種百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之總酚類化合物、可溶性蛋白及總游離胺基酸變化。

Table 2. Contents of total phenolic compounds (TPC), soluble protein (SP) and total free amino acid (FAA) of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

Treatment ^z	TPC/one stigma+style (µg)	SP/one stigma+style (mg)	FAA/one stigma+style (µmole alanine)
No pollination, no quercetin	656.1 abc	3.6 abc	7.4 ab
Self-pollination for 10 min	678.5 abc	3.2 bc	6.5 b
Self-pollination for 30 min	720.2 abc	3.5 abc	6.5 b
Self-pollination for 60 min	633.7 bc	3.5 abc	6.8 ab
Methanol, no pollination	548.7 c	2.9 c	6.0 b
3000 µM Q, 15 sec, no pollination	774.17 ab	3.7 abc	6.4 b
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 10 min	833.5 a	4.5 a	9.9 a
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	673.6 abc	3.6 abc	7.8 ab
3000 µM Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	678.4 abc	4.1 ab	7.4 ab

^z Three repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 µM quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

近年來，植物自交不親和性被認為與活性氧類物質 (reactive oxygen species, ROS) 及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 引發細胞程序性凋亡 (programmed cell death, PCD) 有關 (Serrano *et al.*, 2015)。本研究結果顯示'台農一號'百香果自花授粉 10 分鐘後，2 種酵素活性皆下降，其中 CAT 活性在自花授粉 60 分鐘有增加的趨勢；經槲皮素處理後授粉花柱，其內含 CAT 活性下降，APX 活性

則增加 (表 3)。墨西哥黃色種百香果柱頭授粉後 10 分鐘，無論是否經槲皮素處理，其 CAT 活性皆增加；但其 APX 活性則是授粉後先下降，而後再上升 (表 4)。

ROS 為花粉在柱頭萌發與花粉管在柱頭及花柱內生長的信號物質，累積 ROS 促使花粉管肌動蛋白 (actin)細胞骨架結構之瓦解，因而抑制花粉管生長 (Pasqualini *et al.*, 2015)。橄欖 (*Olea europaea*)不親和性花粉接觸柱頭，花粉內 H_2O_2 含量降低，花粉管內 NADPH oxidases 及 peroxidase (POD)作用使 O_2 增加，同時 NO 亦增加，促使 ONOO⁻ 含量提高而誘發 PCD，最終使花粉管萎縮死亡。該研究並提出花粉 H_2O_2 含量降低可能與 CAT 及 APX 有關 (Serrano *et al.*, 2012)。本研究中具有自交不親和性之墨西哥黃色種百香果，經授粉後其 CAT 與 APX 活性皆增加，與前人研究提出之推論相同，但仍待進一步探討。

表 3. '台農一號'百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之 CAT 及 APX 之活性表現。

Table 3. Activity of CAT and APX of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in 'Tainung No. 1' passion fruit.

Treatment ^z	CAT		APX	
	unit·g ⁻¹ ·FW	unit·mg ⁻¹ protein	unit·g ⁻¹ ·FW	unit·mg ⁻¹ protein
No pollination, no quercetin	0.88	0.020	8.42	0.191
Self-pollination for 10 min	0.62	0.012	3.11	0.061
Self-pollination for 60 min	1.54	0.032	5.24	0.109
3000 μM Q, 15 sec, no pollination	0.77	0.016	4.91	0.104
3000 μM Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	0.65	0.012	7.44	0.141
3000 μM Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	0.58	0.012	8.30	0.166

^z Three repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 μM quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand.

表 4. 墨西哥黃色種百香果柱頭授粉及槲皮素處理後之 CAT 及 APX 之活性表現。

Table 4. Activity of CAT and APX of style after quercetin treatment and then self pollination on stigma in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

Treatment ^z	CAT/one stigma+style (unit)	APX/one stigma+style (unit)
No pollination, no quercetin	0.009	0.169
Self-pollination for 10 min	0.018	0.592
Self-pollination for 30 min	0.010	0.309
Self-pollination for 60 min	0.015	0.400
Methanol, no pollination	0.030	0.054
3000 μ M Q, 15 sec, no pollination	0.010	0.533
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 10 min	0.064	0.031
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 30 min	0.016	0.309
3000 μ M Q, 15 sec, self-pollination for 60 min	0.006	0.655

^zThree repeats per treatment. Quercetin treatment: stigmas were dipped into 3000 μ M quercetin solution for 15 sec, air dried for another 10 min, and then self-pollinated by hand. The shown data was one of those three experiments.

由於墨西哥黃色種百香果經槲皮素處理未能克服其自交障礙，切除柱頭頂端細胞則可使子房膨大，部分著果至 2-3 周掉落，處理 8 周後獲得 1 個成熟果實 (圖 4 a-d)，假種皮橘黃色，果重 92 公克 (圖 4 e)，共收穫 105 粒種子 (圖 4 f)，冷藏保存於 5°C，8 周後播種於培養土中，2 周後順利發芽，發芽率達 90% (圖 4 g-h)。種子苗移至田間栽培，花芽順利形成且花朵型態正常 (圖 4 j-k)，再次進行切柱自花授粉，順利克服自交不親和障礙獲得自交果實及種子 (圖 4 l-m)。由本研究試驗結果顯示，切除柱頭頂端細胞可用以克服百香果自交不親和障礙，操作較為簡便，仍須配合適宜栽培管理避免落果。



圖 4. 墨西哥黃色種百香果切柱授粉著果、果實發育、自交種子發芽、種子苗生長發育及再次切柱授粉結果。

a. 墨西哥黃色種百香果花朵型態; b-c. 切柱處理後行自花授粉, 果實發育; d. 切柱處理自花授粉 8 週後果實成熟, 果形圓, 果色呈淡黃色; e. 假種皮呈橘紅色, 具香氣; f. 種子型態; g-h. 種子於 5°C 冷藏 8 周後, 播種於培養土 2 週後種子發芽型態; i. 種子苗田間栽培; j-k. 花芽形成與花朵型態; l-m. 果實及內部種子型態。Scale bars: 1.3 cm (a), 1.3 cm (b), 1.5 cm (c), 1.6 cm (d), 1.4 cm (e), 6 mm (f), 3.1 cm (g), 3.1 cm (h), 15.0 cm (i), 5 cm (j), 1.3 cm (k), 1.5 cm (l), 1.2 cm (m).

Fig. 4. The fruit set, development and inbred seeds germination from cut-column pollination technology in *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex'.

a. Flower morphology. b-c. Fruit developed successfully after cut-column and self-pollination. d. After 8 weeks of self-pollination, the mature fruit is round in shape and pale-yellow in color. e. The aril is orange-red, with aroma. f. Seed type. g-h. Seeds were stored for 8 weeks at 5°C, sown in soil, and germinated in 2 weeks. i. Seedling was cultivated in field. j-k. Flower-buds formed and flower opened. l-m. Fruit appearance and seed morphology. Scale bars: 1.3 cm (a), 1.3 cm (b), 1.5 cm (c), 1.6 cm (d), 1.4 cm (e), 6 mm (f), 3.1 cm (g), 3.1 cm (h), 15.0 cm (i), 5 cm (j), 1.3 cm (k), 1.5 cm (l), 1.2 cm (m).

結 論

百香果為西番蓮屬植物，此屬包含 576 種原種，種原豐富多樣為良好育種材料，然本屬已被報導多數具有孢子體自交不親和性，黃色種百香果同樣具有此特性，也因此無法產生自交種子，在作為砧木材料時須開放授粉以獲得種子，品質不易控制。本研究以切柱處理克服自交不親和障礙，獲得自交種子，此些種子發芽長成植株於田間栽培開花後，進行切柱處理同樣可獲得自交種子，結果顯示此技術為克服百香果自交不親和障礙之可行性策略。

參 考 文 獻

- 王彩霞、歐陽彤、姜彥成、樂啟福。2010。鬱金香授粉後雌蕊生理生化變化的初步研究。林業科學研究 23(4): 622-625。
- 吳庭嘉。2013。溫湯及蒸熱聯合處理對‘臺農二號’番木瓜果皮轉色、抗氧化物含量及抗氧化酶活性之影響。國立中興大學園藝學系碩士學位論文。62 pp。
- 吳能表。2004。甘藍自交不親合性引起的蛋白質磷酸化及其相關特徵研究。西南農業大學博士學位論文。69 pp。
- 呂俊、朱利泉、王小佳。2001。利用蛋白激酶抑制劑和激活劑調控甘藍自交不親和性。園藝學報 28(3): 235-239。
- 呂清璐、沈向群、汪玉、史湘華。2010。美女櫻雄性不育系與可育系花器官發育過程中生理生化指標的比較分析。江蘇農業科學 3: 221-223。
- 李成瓊、周慶紅、宋洪元、任雪松、司軍、吳能表。2005。槲皮素對甘藍自交不親和性及 SRK 活性的影響。園藝學報 32(5): 878-880。
- 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(2): 21-130。
- 卓俊銘、許圳塗、曾夢蛟。2008。百香果自交不親和性與花粉發芽之研究。興大園藝 33(1): 41-52。
- 卓俊銘。1990。百香果自交不親和性及其柱頭與花柱蛋白質合成之研究。國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文。106 pp。
- 周慶紅、曾勇軍、楊演貴、李成瓊。2009。鹽硼溶液克服甘藍自交不親和性研究。種子 28(12): 48-51。
- 周慶紅。2004。化學方法克服甘藍自交不親和性及其機理研究。西南農業大學碩士學位論文。60 pp。
- 康洪梅、廖菊鈞、龍春瑞、代瑾然、馬文廣、索文龍、姚恆、王建光、陳穗雲。2013。黃花菸草授粉前後雌蕊生理生化變化研究。華南師範大學學報 45(3): 95-98。

- 曹必好、王遠歐。1998。克服甘藍自交不親和性的探討。天津農業科學 4(1): 32-34。
- 莊凱恩、江秀娥。2019。臺灣百香果種苗產業拓展東南亞市場之策略。百香果產業新南向策略研討會專刊 p. 25-37。
- 許圳塗、何婉芬。1985。百香果柱頭型態及親和特性。中國園藝 31(1): 33-39。
農業委員會農業統計資料
<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/inquiry/InquireAdvance.aspx>
- 楊漢波。2017。木荷繁殖生物學特性及種子園交配系統研究。中國林業科學研究院博士論文。143 pp。
- 蔡淑華。2012。植物解剖學。世界書局股份有限公司。台北。358 p。
- 劉璐、李成瓊、任雪松、宋洪元、司軍。2009。甘藍自交不親和性的化學控制。植物生理學通訊 45(11): 1137-1140。
- Bruckner, C. H., V. W. D. Casali, C. F. de Moraes, A. J. Regazzi, and E. A. M. da Silva. 1995. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Acta Hort. 370: 45-57.
- Chang C., Y. C. Chen, and H. F. Yen. 2005. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. Bot. Bull. Acad. Sinica 46: 71-74.
- Chiu, Y. T., C. S. Lin, and C. Chang. 2011. In vitro fruiting and seed production in *Erycina pusilla* (L.) N. H. Williams & M. W. Chase. Propagation of Ornamental Plants 11(3): 131-136.
- de Groot, P., K. Weterings, M. de Been, F. Witting, R. Hulzink, J. Custers, M. van Herpen, and G. Wullems. 2004. Silencing of the pollen-specific gene NTP303 and its family members in tobacco affects *in vivo* pollen tube growth and results in male sterile plants. Plant Mol. Biol. 55: 715-726.
- de Lira Júnior, J. S., C. H. Bruckner, and P. C. S. Carneiro. 2016. Method for overcoming the passion fruit self-incompatibility. Rev. Bras. Frutic. 38(4): e-477.
- Duarte, M. O., M. F. Alves, M. Yamamoto, S. M. Sano, A. A. A. Barbosa, and P. E. Oliveira. 2014. Self-sterility and self-fertility of *Passiflora* L. (Passifloraceae) in the Cerrado of central Brazil. Braz. J. Bot. 37(1): 61-68
- Fujii, S., K. I. Kubo, and S. Takayama. 2016. Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. Nat. Plants 2: 16130.
- Ho, W. F. and C. T. Shii. 1986. Incompatibility system in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). Acta Hort. 194: 31-38.
- Kato, M. and S. Shimizu. 1987. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: Phenolic-dependent
- Keith, R. W., D. L. Tourneau, and D. Mahlum. 1958. Quantitative paper chromatographic determination of phenols. J. Chromatogr. 1: 534-536.
- Lowry, D. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1007-1012.

- Madureira, H. C., T. N. S. Pereira, M. D. Cunha, D. E. Klein, M. V. V. de Oliverira, L. de Mattos, and G. A. de Souza Filho. 2014. Self-incompatibility in passion fruit: cellular responses in incompatible pollinations. *Biologia* 69(5): 574-584.
- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase I spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Nasrallah, J. B., T. H. Kai, M. L. Golfberg, and M. E. Nasrallah. 1985. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* 318: 263-267.
- Pasqualini, S. M. Cresti, and C. Del Casino. 2015. Roles for NO and ROS signalling in pollen germination and pollen-tube elongation in *Cupressus arizonica*. *Biologia Plantarum* 59(4): 735-744.
- Rêgo, M. M., C. H. Bruckner, E. A. M. da Silva, F. L. Finger, and K. J. C. Pereir. 2000. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. *Theor. Appl. Genet.* 101: 685-689.
- Rêgo, M. M., C. H. Bruckner, E. A. M. da Silva, F. L. Finger, D.L. de Siqueira, and A. A. Fernandes. 1999. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. *Theor. Appl. Genet.* 98: 564-568.
- Rêgo, M. M., E. R. Rêgo, C. H. Bruckner, F. L. Finger, and W. C. Otoni. 2013. Overcoming self-incompatibility in passion fruit by double pollination in anthesis stage. *Acta Hort.* 1000: 533-536.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acid. *Arch Biophys.* 67(1): 10-15.
- Serrano, I., M. C. Romero-Puertas, L. M. Sandalio, and A. Olmedilia. 2015. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *J. Exp. Bot.* 66(10): 2869-2876.
- Serrano, I., M. C. Romero-Puertas, M. Rodríguez-Serrano, L. M. Sandalio, and A. Olmedilla. 2012. Peroxynitrite mediates programmed cell death both in papillar cells and in self-incompatible pollen in the olive (*Olea europaea* L.). *J. Exp. Bot.* 63(3): 1479-1493.
- Soares, T. L., O. N. de Jesus, J. A. D. Santos-Serejo, and E. J. de Oliveira. 2013. *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Rev. Bras. Frutic.* 35(4): 1116-1126.
- Suassuna, T. de M. F., C. H. Bruckner, C. R. de Carvalho, and A. Borém. 2003. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor. Appl. Genet.* 106: 298-302.
- Takayama, S. and Isogai, A. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-489.

Strategy Development in Overcoming the Self-Incompatibility in Passion Fruit

Ying-Chun Chen¹⁾ Huey-Ling Lin²⁾

Key words: Sporophytic self-incompatibility, Antioxidant enzyme, Cut-column pollination

Summary

In order to investigate the self-incompatibility performance of passion fruit and to overcome its reproductive obstacles, pollen and stigma structure observation, *in vivo* pollen germination test and soluble protein and enzyme content in pistils were carried out. The results indicated that the yellow passion fruit and Mexican yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 'Mex') had sporophytic self-incompatibility. 'Tainung No.1' passion fruit was self-compatible, and its total phenolic compound, soluble protein and total free amino acid of pistil were higher than the incompatible Mexican yellow passion fruit. After self-pollination for 10 mins, the activity of catalase (CAT) and ascorbic acid peroxidation (APX) in pistil of 'Tainung No.1' passion fruit was decreased, but the activity of CAT increased at 60 mins from self-pollination. After treatment with quercetin, the CAT activity decreased and APX activity increased. After 10 mins of pollination of the Mexican yellow passion fruit, the CAT activity increased with or without quercetin treatment, but the APX activity decreased first after pollination and then increased. It is speculated that these reactions are related to programmed cell death. After excising the surface cells of the stigma of the Mexican yellow species, the self-pollination can be carried out to obtain mature fruits and seeds. These seeds germinated, growth and then then planted in the field, and the seeds can also be obtained by cut-column technology. As the results shown, this technique is a feasible strategy to overcome the self-incompatibility obstacle.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.