

苦瓜花粉活力檢定

張正桓¹⁾ 宋好²⁾

關鍵字：苦瓜、花粉活力、體外發芽、組織化學法

摘要：本研究以 Brewbaker and Kwack(1963)液體培養基配方及三種組織化學(histochemical)法，檢定四品種苦瓜花粉活力的方法。'青皮'、'蘋果'、'大長'及'粉青'苦瓜花粉發芽以 10%蔗糖、100~150 ppm 的硼酸、200~300 ppm 的硝酸鈣之 B & K 液體培養基，將培養基 pH 調至 7.0，並於 25~30°C 下培養為最適合的培養條件。FDA 螢光法雖然有高估花粉活力之情形，但簡單快速又可處理大量重覆數樣品，適合用於苦瓜花粉活力檢定上。

前 言

苦瓜(*Momordica charantia* L.)為葫蘆科(Cucurbitaceae)、苦瓜屬(*Momordica*)之園藝作物，花粉活力檢定是園藝基礎研究及實際應用必備的操作技術(Huang and Johnson, 1996)。Shivanna and Johri(1985)指出對於培養基成分的需求，會因植物種類及品種間的差異而有所不同。本研究利用 Brewbaker and Kwack(1963)之配方作為基礎，研究適合苦瓜新鮮及儲藏花粉發芽的離體(*in vitro*)培養基與環境(如溫度)，建立適合作為苦瓜花粉活力檢定的液體培養基。許多報告指出利用組織化學(histochemical)法，如 FDA (Fluorescein dicaetate)、TTC (2,3,5,-triphenyl tetrazolium chloride)、CAA (carmine acetic acid)法等來測定花粉活力，比體外(*in vitro*)發芽法更加快速而便利的檢定花粉活力(Ak and Kaska, 1998; Maguire and Sedgley, 1997; Pinney and Polito, 1990)，由這些方法研究適合做為苦瓜花粉活力檢定的組織化學法。

1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生

2) 國立中興大學園藝系教授。

材料方法

一、供試材料

苦瓜植株材料選用'蘋果'、'粉青'、'青皮'及'大長'等苦瓜品種，種植於中興大學園藝系實驗田。田間栽培管理方式參照一般栽培模式進行。整枝修剪方法採單幹留子蔓整枝，初期不摘除子蔓，於主蔓長至棚頂架後選留強健的(有雌花)的子蔓10~12條，並於主蔓摘心，促進子蔓生長，摘除孫蔓。

二、體外(*in vitro*)發芽培養基條件研究

於苦瓜雄花開花前一天下午採集雄花花蕾，置於燒杯中，花梗基部浸於水中，以60瓦燈泡在距離30cm處予以電照處理，促進花藥開裂。於開裂花藥採集花粉，均勻散佈於單凹槽載玻片中，以滴管吸取液體培養基滴於單凹槽載玻片中，再將此載玻片放入一底部襯有完全吸濕紙巾的塑膠盤上，密封並放置於生長箱中培養，於2小時後，於光學顯微鏡下進行鏡檢，計算花粉發芽率，以花粉管長度超過花粉粒直徑兩倍視為發芽，而細胞質溢出者則不視為發芽。每處理取樣五次，取三個視景，共計數200~300個花粉粒，四重複。液體培養基採用Brewbaker and Kwack(1963)配方作為基礎(sucrose + 100 mg/l H_3BO_3 , 200 mg/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 300 mg/l $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 100 mg/l KNO_3 ，以0.1M HCl、KOH將pH值調至7.0)，分別作以下處理，除培養溫度處理，其他處理均於25°C生長箱中進行。

- (一)、蔗糖濃度：B&K培養基中濃度為0、5、10、15、20、25%。
- (二)、硼酸濃度：以含10%蔗糖之B&K培養基，硼酸濃度為0、50、100、150、200 g/l。
- (三)、鈣濃度：以含10%蔗糖之B&K培養基，硝酸鈣濃度為0、100、200、300、400 g/l。
- (四)、pH值：以含有10%蔗糖之B&K培養基，pH值為4、5、6、7、8。
- (五)、培養溫度：以含有10%蔗糖之B&K培養基，於20°C、25°C、30°C、35°C之生長箱中培養。

三、不同組織化學法測定苦瓜花粉活力

供試材料為'粉青'苦瓜，將採集之新鮮花朵，摘取雄蕊，放置於花粉收集器中，置於平面桌面上，於60燭光光照下，乾燥2小時後，收集花粉，分裝膠囊中，置於玻璃瓶，放入乾燥劑密封之，保存於-5°C、-20°C下，分別於7及14天後取出，以下列方法觀察，並以新鮮花粉做對照。觀察時利用計數器計數花粉的總數及具有活力(發出亮螢光或染成紅色)之花粉數目，每處理取樣五次，取三個視景，共計數200~300個花粉粒，四重複。

- (一)、FDA法：將花粉置於載玻片上，滴入一滴0.01% Fluorescein dicaetate (FDA) (溶劑為丙酮)及10% sucrose，蓋上蓋玻片後將其置於螢光顯微鏡下觀察。
- (二)、TTC法：將花粉置於載玻片上，滴入一滴1%TTC溶液(溶劑為2M pH 7.2的磷酸緩衝液)，蓋上蓋玻片之後將其置於光學顯微鏡下觀察。
- (三)、CAA法：將花粉置於載玻片上，滴入一滴0.5% Carmine acetic acid (CAA)溶液 (溶劑為45%冰醋酸)，蓋上蓋玻片之後將其置於光學顯微鏡下觀察。

三、統計分析

所有試驗數據以 SPSS 12.0 for windows (Statistics Package for the Social Sciences) 套裝軟體進行變方分析(analysis of variance, ANOVA)，以鄧肯氏多變域分析(Duncan's multiple range test)進行各處理間差異性之比較($\alpha=0.05$)。

結 果

一、體外(*in vitro*)發芽培養基條件研究

(一) 培養基中蔗糖濃度對花粉發芽率之影響

由圖 1 得知，供試苦瓜品種在 B&K 液體培養基中適合花粉發芽之蔗糖濃度不因品種不同而有差異，在 10%蔗糖濃度下，'青皮'、'蘋果'、'大長'及'粉青'四品種苦瓜花粉有最高之發芽率，分別為 92.58%、88.52%、91.88%及 88.9%，與其他蔗糖濃度有顯著差異，過高或過低的蔗糖濃度均有抑制花粉發芽的現象。於 15%蔗糖濃度下，'青皮'及'粉青'發芽率高於其他品種，5%蔗糖濃度下發芽率與 15%蔗糖濃度差異不大，發芽率在 50%左右，而在不含蔗糖之 B&K 液體培養基中四品種苦瓜花粉仍分別有 15.50%、12.69%、13.24%及 15.14%的發芽率，但是部分花粉管頂端呈現腫脹的情形。蔗糖濃度高過 20%，花粉發芽率迅速降低，在 25%蔗糖濃度下四品種苦瓜花粉均無發芽之情形。

(二) 培養基中硼酸濃度對苦瓜花粉之影響

由圖 2 得知，培養基中硼酸的有無對苦瓜花粉發芽有顯著的影響，最適合的硼酸濃度在 100~150 ppm 左右。'青皮'、'蘋果'、'大長'及'粉青'四品種苦瓜花粉在含有 10%蔗糖及 100 ppm 硼酸的 B&K 液體培養基中，發芽率分別為 89.21%、87.68%、87.66%及 89.27%。四品種苦瓜花粉於含有 150 ppm 硼酸的培養基中，以'青皮'苦瓜花粉發芽率顯著高於其他品種。而在其他硼酸濃度下花粉發芽率隨培養基硼酸之濃度或高或低皆有下降的趨勢，在 200 ppm 硼酸濃度下，以'蘋果'及'大長'之發芽率顯著高於另二品種。在缺硼酸的培養基中，花粉發芽率降低至 40%左右，惟多數的花粉管有肥短、彎曲的情形發生。

(三) 培養基中硝酸鈣濃度對苦瓜花粉之影響

培養基中硝酸鈣濃度對苦瓜花粉的影響可由圖 3 得知，在不添加硝酸鈣的 B&K 培養基，四種苦瓜花粉發芽率皆差，發芽率低於 35%，除了'蘋果'苦瓜花粉之外，其他三種苦瓜花粉發芽率皆因為培養基加入硝酸鈣 100ppm 後提升，蘋果苦瓜則需添加到 200 ppm 後才有顯著的效果，而對於苦瓜花粉培養基中的最適硝酸鈣濃度則為 200 ppm ~ 300 ppm，花粉發芽率高於 75%。於 300 ppm 下，'青皮'、'蘋果'、'大長'及'粉青'四品種苦瓜花粉發芽率分別為 90.68%、84.50%、88.47%及 89.99%，顯著高於其他硝酸鈣濃度。在 400 ppm 下硝酸鈣濃度花粉管有破裂及細胞質外溢的現象發生。

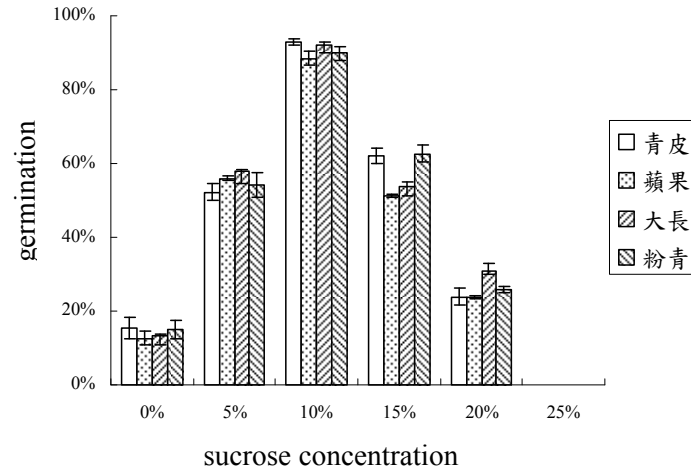


圖 1、B and K 液體培養基中不同蔗糖濃度對四品種苦瓜花粉發芽率之影響

Fig 1. The effect of sucrose concentrations in B&K medium on pollen germination of bitter gourd.

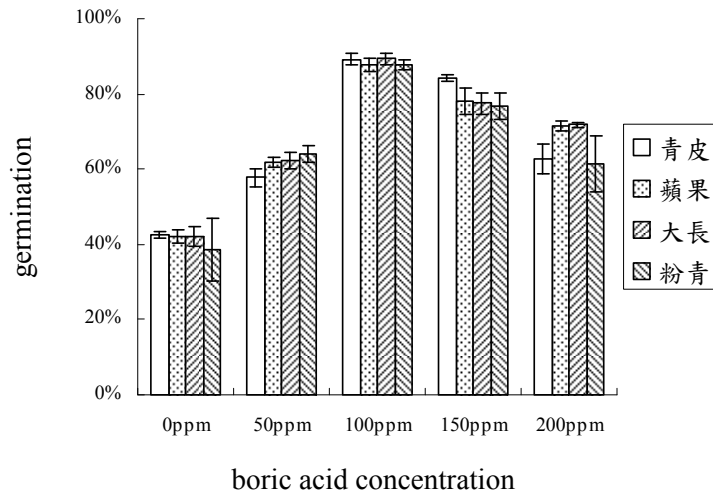


圖 2、B and K 液體培養基中不同硼酸濃度對四品種苦瓜花粉發芽率之影響

Fig 2. The effect of boric acid concentrations in B&K medium on pollen germination of bitter gourd.

(四) 培養基中 pH 值對苦瓜花粉之影響

由圖 4 得知，最適苦瓜花粉發芽之酸鹼值於'青皮'、'蘋果'及'粉青'苦瓜為 pH 7，其發芽率分別為 74.97%、76.58%及 71.35%，而'大長'則是在 pH 7 及 8，發芽率為 76.34% 及 72.34%，與其他 pH 下之花粉發芽率有顯著差異。在 pH 4 的培養基中苦瓜花粉雖可發芽，但是花粉管頂端會發生破裂的現象，而無法繼續生長。

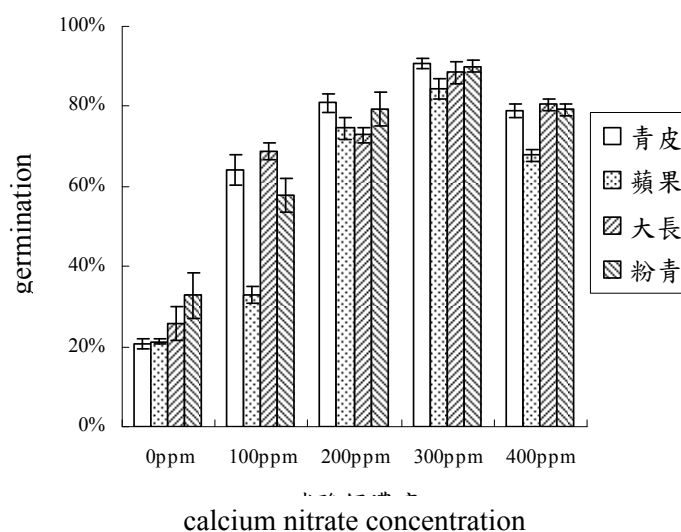


圖 3、B and K 液體培養基中不同硝酸鈣濃度對四品種苦瓜花粉發芽率之影響

Fig 3. The effect of calcium nitrate concentrations in B&K medium on pollen germination of bitter gourd.

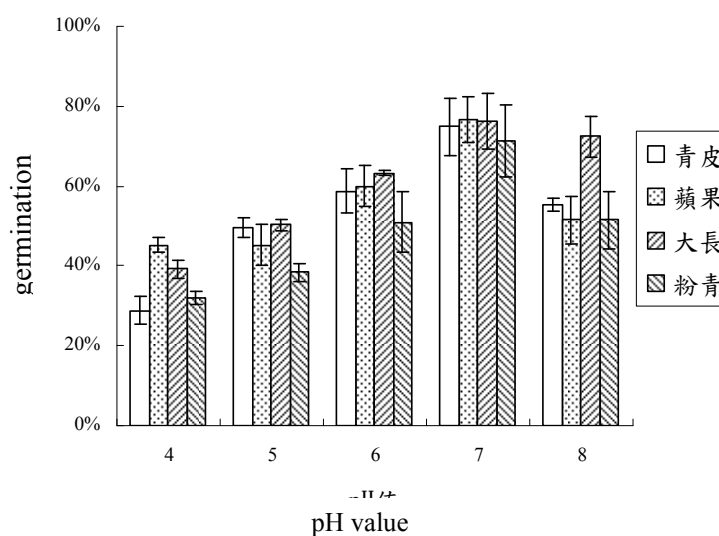


圖 4、B and K 液體培養基中不同 pH 值對四品種苦瓜花粉發芽率之影響

Fig 4. The effect of pH value in B&K medium on pollen germination of bitter gourd.

(五) 培養溫度對苦瓜花粉之影響

由圖 5 得知, '青皮'、'蘋果'、'大長'及'粉青'花粉發芽的最適溫度為 25°C, 發芽率分別為 63.25%、66.67%、62.11%及 72.54%, 除'大長'苦瓜花粉於 30°C 下培養外, 過高或過低的培養溫度, 使四品種苦瓜花粉發芽受到抑制, 使發芽率降低至 50%以下。

二、不同組織化學法評估苦瓜花粉活力

本實驗使用三種較常使用之花粉活力檢定方法: 2,3,5,-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色法、醋酸洋紅(CAA)染色法及雙醋酸螢光(FDA)法來檢定'粉青'苦瓜新鮮及貯藏後花粉活力, 由實驗結果得知(表 1), 在新鮮苦瓜花粉活力部分, 體外發芽法(GM)所測得的發芽率為 86.90%, TTC 染色法、CAA 染色法及 FDA 螢光法所測得的染色率分別為 91.22%、99.40%及 94.37%, 此三種組織化學法皆高估'粉青'苦瓜花粉活力。'粉青'苦瓜花粉經儲藏後, 隨著儲藏時間增加, 花粉體外發芽率隨之下降, 在-20°C 下比-5°C 下儲藏的'粉青'苦瓜花粉保持較高的花粉活力, 5°C 下儲藏 14 天及-20°C 下儲藏 14 天發芽率分別為 50.51%及 66.52%。TTC 染色法及 CAA 染色法兩種組織化學法則無法有效的分辨新鮮及儲藏後苦瓜花粉活力, 儲藏後苦瓜花粉染色率與新鮮花粉染色率無差異或差異並不大。FDA 螢光法所測得的-5°C 下儲藏 7 天、14 天及-20°C 下儲藏 7 天、14 天染色率分別為 77.55%、64.37、77.94%及 68.22%, 染色率皆隨儲藏時間增加而降低, 相同儲藏時間下兩儲藏溫度間花粉染色率則無差別。分析 FDA 螢光法與體外發芽法之相關性後發現(圖 6), 其相關係數達 0.86, 顯示 FDA 螢光法適合作為苦瓜花粉活力檢定之組織化學方法, 唯其有高估花粉活力之情形。另外分析 CAA 染色法與體外發芽法之相關性後發現(圖 7), 其相關係數只有 0.08, 不適合用於苦瓜花粉活力檢定。

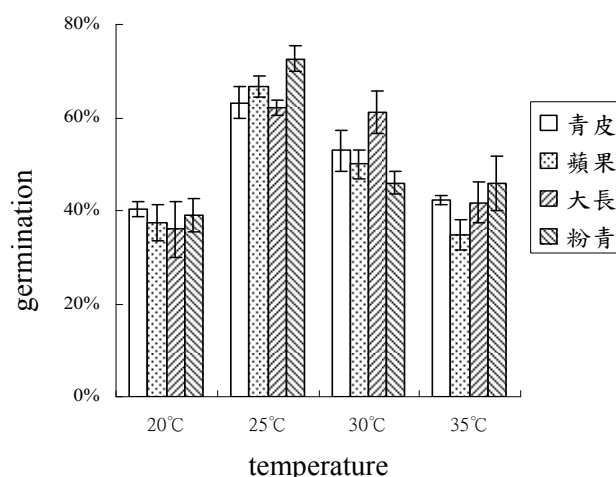


圖 5、B and K 液體培養基中不同培養溫度對四品種苦瓜花粉發芽率之影響

Fig 5. The effect of cultural temperatures in B&K medium on pollen germination of bitter gourd.

表 1、以不同方法測定新鮮及儲藏之'粉青'苦瓜花粉活力

Table 1. The pollen viability of 'Fen Cing' bitter gourd measured by various methods.

	TTC	FDA 染色率(%)	CAA	GM 發芽率(%)
-5°C下儲藏 7 天	89.21 a ^x	77.55 b	97.63 ab	64.90 c
-5°C下儲藏 14 天	81.90 b	64.37 c	98.91 ab	50.51 d
-20°C下儲藏 7 天	90.22 a	77.94 b	96.82 b	75.21 b
-20°C下儲藏 14 天	86.03 ab	68.22 c	97.04 b	66.52 bc
當天開花之花粉	91.22 a	94.37 a	99.40 a	86.90 a

^x: Means in each column followed by the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at 5% level.

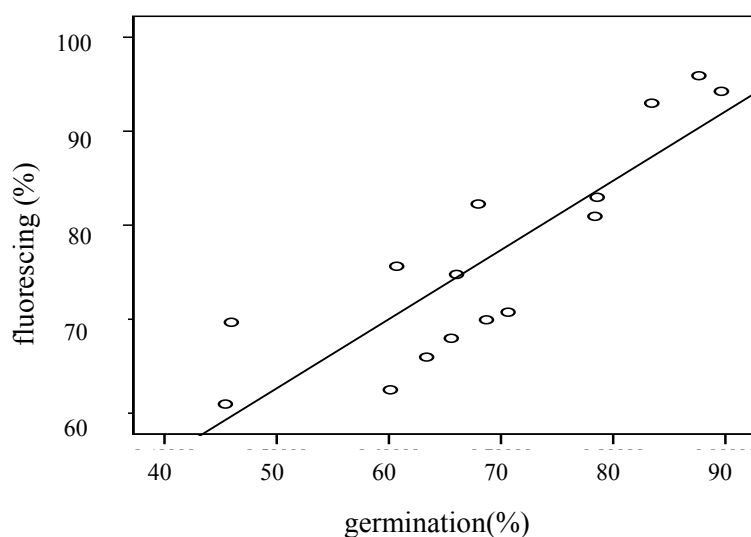


圖 6、FDA 染色法與體外發芽法測定苦瓜花粉活力相關性

Fig 6. Correlation of bitter gourd pollen viability between in vitro germination and FDA method. $Y = 0.736483X + 0.258171$, $r = 0.86$.

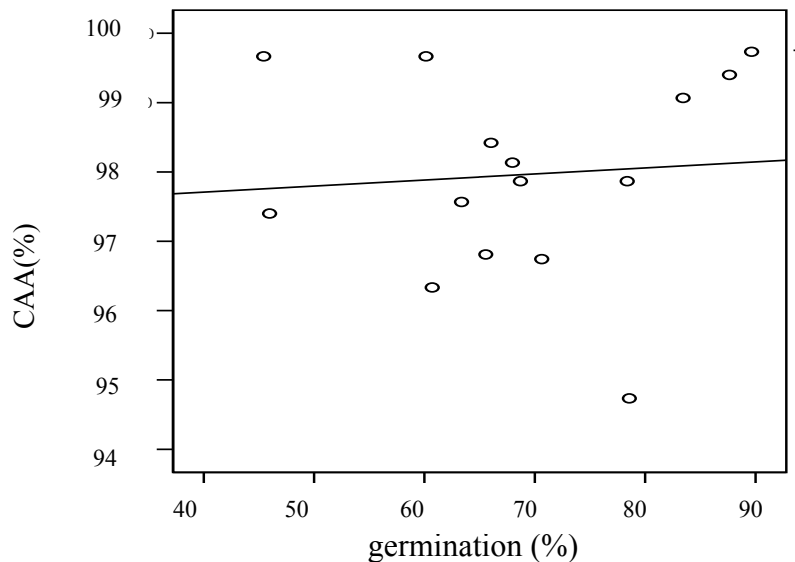


圖 7、CAA 染色法與體外發芽法測定苦瓜花粉活力相關性

Fig 7. Correlation of bitter gourd pollen viability between in vitro germination and CAA method.

$$Y=0.008728X+0.973599, r=0.08.$$

討 論

(一)、體外(*in vitro*)發芽法中不同培養基條件對苦瓜花粉發芽之影響

利用體外(*in vitro*)發芽法可以簡單且迅速的檢測花粉活力(Rosell *et al.*,1999)。由本研究結果得知利用 B&K 液體培養基測定四品種苦瓜花粉發芽率的最佳濃度為 10%蔗糖、100~150 ppm 的硼酸、200~300 ppm 的硝酸鈣、將培養基 pH 調至 7.0，並於 25~30°C 下培養為最適合的培養條件。但四品種間對於蔗糖、硼酸及硝酸鈣濃度，最適溫度的反應有些許的不同，例如適合苦瓜花粉發芽之酸鹼值於'青皮'、'蘋果'、'粉青'苦瓜為 pH 7，而'大長'則是 pH 7~8、'青皮'、'蘋果'與'粉青'花粉發芽適溫為 25°C，而'大長'苦瓜花粉為 25°C 及 30°C、蘋果苦瓜花粉培養基中硝酸鈣需添加至 200 ppm 後才有顯著提升發芽率的效果，其他三種苦瓜花粉只需添加至 100 ppm 等情形。這說明在各品種苦瓜花粉對於最適離體液體培養基的需求是不同的，故在取得一品種的苦瓜花粉後而需要檢測其活力，必須先對其作最適離體培養環境的檢定，方可準確的檢測其活力。Shivanna and Johri(1985)指出對於培養基成分的需求，會因植物種類及品種間的差異而有所不同。單與胡(1998)也曾對'檳城'、'長白'及'大頂'苦瓜的花粉萌發特性作一研究，結果顯示添加 10%蔗糖及 0.01%硼酸的培養基對於成熟苦瓜花粉的萌發最適宜，而培養溫度在 26°C 及 30°C 有最好的表現，另外對於相同成份的培養基而言，添加 0.8%洋菜的固體培養基與液體培養基相較，花粉發芽率差

異不顯著，此結果與本試驗相符。

糖在花粉培養基中扮演了滲透壓調節與營養供給的功能，培養基中過高或過低的蔗糖濃度均不利於花粉發芽及花粉管生長(Calzoni *et al.*, 1979 ; Rosell *et al.*, 1999)。本實驗中在低濃度或不含蔗糖的培養基中，花粉會發芽，但花粉管頂端呈現腫脹的情形，而高於 20% 的蔗糖濃度，明顯抑制花粉發芽，其原因可能與培養基中滲透壓過高，導致花粉失水而使發芽所需酵素活性降低所致。

由本實驗得知花粉液體培養基添加硼酸對於苦瓜花粉發芽有顯著的影響，硼對於花粉生長的影響主要在於對碳水化合物的吸收、運移及代謝，細胞壁果膠物質的生成與穩定與花粉內部滲透壓調節等生理作用，共同促進花粉發芽與花粉管生長(Blevins and Lukaszewski, 1998 ; O'Kelley, 1957 ; Taylor and Hepler, 1997)。在低濃度或不含硼酸的培養基中，四品種苦瓜之花粉管均有肥短、彎曲的情形發生，其不能計數為發芽，使發芽率低，造成原因可能為低硼環境使得花粉吸收養份困難。另外其他研究指出過高的硼酸濃度將導致花粉發芽率急速降低(Liu *et al.*, 1983)，本實驗尚無此情形，可能因為試驗採用之最高硼酸濃度 200 ppm 還在容許範圍內，惟此濃度下培養基有混濁情形。在其他研究也指出添加硼也可促進絲瓜及茄子花粉管伸長，缺乏硼使其花粉管生長速率減緩甚至停滯(Guler *et al.*, 1995)。

硼酸可與糖分子形成離子化的硼-糖複合體(ionized sugar-borate complex)，這些帶有正電荷，且極性強的分子比未離子化的中性糖分子(non-ionized sugar)更容易通過細胞膜，有利於糖的運輸，而這硼-糖複合體更增加了硼的運輸速率與分配(Blevins and Lukaszewski, 1998)。早期的研究指出在花粉離體培養基中添加硼酸可以增加凌霄花花粉管的生長速率，其原因之一即是硼可以增加花粉吸收代謝糖類(如蔗糖、果糖)的能力，並增加氧氣的吸收情形，代謝活性提高，有利於花粉發芽與花粉的伸長(O'Kelley, 1957)。

Obermeyer 等人(1996)發現硼也能促進未萌發的百合花粉管原生質膜上 H^+ -ATPase 的活性，增加 ATP 水解(hydrolysis)能力與 H^+ 轉移速率，推測其機制是通過硼與糖蛋白或糖脂的結合能力，影響 H^+ ATPase 周圍的環境而調節其活性，甚至可能直接參與鉀離子通道作用，為使花粉膜內外電位壓平衡，增加鉀離子流入花粉粒中，內部滲透壓增加，水分由外部流入，膨壓提高，花粉管向花粉粒的萌發孔或溝突出，形成花粉管，相同的機制也出現在生長中的花粉管頂端區域，促使花粉管生長伸長。硼為細胞壁的重要組成分，花粉管生長需要硼的供給，硼透過二元酯鍵與果膠物質 RG-II 形成 B-RG-II complex，穩定細胞壁結構，因此缺硼將造成花粉管生長緩慢、畸形(Buchanan *et al.*, 2000, Blevins and Lukaszewski, 1998 ; Kobayashi *et al.*, 1999 ; Matoh and Kobayashi, 1998)。

鈣離子也會影響花粉生體外發芽及花粉管生長，本實驗中除了'蘋果'苦瓜花粉之外，其他三品種苦瓜花粉發芽率皆因為培養基加入 100 ppm 硝酸鈣後提升。Steer and Steer(1989)指出隨著物種的不同，花粉發芽對於培養基中鈣離子濃度的需求範圍也會有所差異，花粉管只在最適濃度之範圍內生長。鈣離子在花粉管中保持著從極頂端到基部呈現逐漸遞減的

梯度(Taylor and Hepler, 1997)。而花粉管中的鈣離子梯度的維持是由極頂端的鈣離子離子通道，通過離子交換作用，將鈣離子打入花粉管中，另外在後方被隔離在內質網中的鈣離子被釋放後，隨著細胞質流向前運移。花粉管內與花粉管外 Ca^{2+} 都向著頂端流入，這個鈣離子梯度將影響花粉管的生長與方向的控制(Malho and Trewavas, 1996)。花粉管頂端內部過高或過低的鈣離子將抑制花粉管生長 (Malho *et al.*, 1995 ; Pierson *et al.*, 1994)。另外花粉管內鈣離子濃度控制了 auxin 的信息傳導，因此維持花粉管內 Ca^{2+} 濃度的梯度對花粉管生長是必須的。

適當的培養基 pH 值對花粉發芽及花粉管生長是相當重要的(Sharma and Shivanna, 1983)，依植物種類及品種不同，花粉離體培養所能忍受的培養基 pH 值範圍也會有所差異，一般而言大多數的作物花粉培養於為酸性至中性培養基中發芽情形會較佳(Calzoni *et al.*, 1979)。本研究中四個苦瓜品種之花粉在 pH 值為 7.0 時發芽率最佳，而大長苦瓜的 pH 值範圍較大，為 7.0 至 8.0 左右，當 pH 值過低 5.0 以下，苦瓜花粉雖可發芽，但是花粉管頂端會發生破裂的現象，可能因為花粉吸收大量的氫離子，而使得細胞質外溢。

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(Loupasski *et al.*, 1997)。一般作物花粉發芽適溫約在 20°C 至 30°C 左右，如荔枝(Stern and Gazit, 1998)、油栗(*Simmondaia chinebsis*)(Lee *et al.*, 1985)、酪梨(Loupasski *et al.*, 1997)、木瓜(Cohen *et al.*, 1989)等，也有一些例外如梨的花粉發芽適溫為 15 至 23°C(Vasilakakis and Porlingis, 1985)。本研究結果指出適合苦瓜花粉發芽適溫為 25°C 至 30°C，過高或過低的培養溫度，皆使苦瓜花粉發芽受到抑制，而造成發芽困難。對照單與胡(1998)及李(1987)對苦瓜花粉最適培養溫度的研究有相同情形。

(二)不同組織化學方法對新鮮及儲藏後苦瓜花粉活力之測定

組織化學法為利用不同染劑對花粉粒細胞上特定成分或組織進行染色或測定特定酵素的活性，以檢定花粉活力。優點為比較體外(*in vitro*)發芽法更加快速，可處理之樣品數更多，但容易因為染到其它未具生命或不正常花粉，而高估花粉活力(Maguire and Sedgley, 1997)。本實驗以 TTC 染色法、醋酸洋紅(CAA)染色法、雙醋酸螢光(FDA)法及生體外花粉發芽法分別檢定苦瓜新鮮及貯藏後花粉活力，評估並建立簡單容易、廉價且能實際使用的苦瓜花粉活力檢定方法。試驗結果發現 CAA 染色法與體外發芽法比較得知，不管對於新鮮花粉還是儲藏後的苦瓜花粉幾乎完全染色，而其他研究如辣椒花粉(張和孫 2002)也有相同情形，推測原因可能是醋酸洋紅染色法，其作用為對完整細胞的染色體及核酸進行染色，苦瓜花粉活力下降的原因並不是因為染色體及核酸被破壞，而此造成醋酸洋紅染色法高估苦瓜花粉活力。

TTC 染色法也無法有效的分辨新鮮及儲藏後苦瓜花粉活力，其原因可能為苦瓜花粉活力下降過程中，呼吸代謝中的還原酶的活力尚未下降，而使得 TTC 滲入花粉後仍能被其由無色的氧化態還原成紅色的還原態。而其他對於 TTC 染色法對於評估活力的研究如黃榛子屬及辣椒花粉的活力而言，為一簡單快速的方法(張和孫 2002 ; Ak and Kaska,

1998)。

FDA 雙醋酸螢光法(fluorescein diacetate)，為一種活體染色法，當 FDA 進入細胞內被脂肪分解酶(esterase)水解為螢光素(fluoresin)。此時細胞膜如果完整則螢光素無法穿過細胞膜而累積于細胞中，若細胞膜受傷害則螢光素擴散到胞外，在螢光顯微鏡下則無螢光反應(Widerlechner *et al.*, 1983)。FDA 染色法對於評量各類植物花粉的活力為一簡單快速又可處理大量重覆數樣品的便利方法(Pinney and Polito, 1990)，但容易因為染到其它未具生命或不正常花粉，而高估花粉活力。分析 FDA 染色法與體外發芽法相關性後顯示，olive、cherry 花粉相關係數皆高(Huang and Johnson, 1996；Pinney and Polito, 1990)，但 *Banksia menziesii* 花粉在儲藏後，FDA 法較體外發芽法容易高估花粉活力(Maguire and Sedgley, 1997)。FDA 法雖然也會高估新鮮及儲藏後苦瓜花粉活力，但是其與體外發芽法之相關係數達 0.86，這個結果顯示 FDA 螢光法適合作為苦瓜花粉活力檢定之組織化學方法，雖然有高估花粉活力之情形，但是與體外(*in vitro*)發芽法相比，為一個簡單快速又可處理大量重覆數樣品的便利方法(Porta and Roselli 1991)，它可單獨使用，也可在發芽培養基中添加低濃度的 FDA，並不影響花粉發芽與花粉管正常生長，因此合併利用 FDA 染色法與體外發芽法有助於改善兩者的缺點，發展更快速而便利的花粉檢定法(Abdul-Baki, 1992；Huang and Johnson, 1996)。

參 考 文 獻

- 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(11-12):345-356。
- 單彭義、胡開林。1998。苦瓜的開花習性及影響其花粉萌發的因素。中國蔬菜 5:16-18。
- 張子學、孫峰。2002。辣椒花粉生活粒最佳測定方法的篩選。種子 120:32-33。
- Abdul-Baki A. A. 1992. Determination of pollen viability in tomatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117(3):473-476.
- Ak, B. E. and N. Kaska. 1998. Determination of viability and germination rates of *Pistacia* spp. pollen kept for artificial pollination. Acta Hort. 470:300-306.
- 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(9):859-865.
- Blevins, D. G. and K. M. Lukaszewski. 1998. Boron in plant structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:481-500.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem, and R. L. Jones. 2000. The cell Wall. Biochemistry & molecular biology of plant. p.52-98. The American society of plant physiologists. U.S.A.
- Calzoni, G. L., A. Speranza, and N. Gani. 1979. *In vitro* germination of apple pollen. Sci. Hort.

- 10:49-55.
- Cohen, E., U. Lavi, and P. Spiegel-Roy. 1989. Papaya pollen viability and storage. *Sci. Hort.* 40:317-324.
- Guler, H. Y., K. Abak, and S. Eti. 1995. Method, medium and incubation time suitable for *in vitro* germination of eggplant (*Solanum melongena* L.) pollen. *Acta Hort.* 412:99-105.
- Huang, Y. and C. E. Johnson. 1996. A convenient and reliable method to evaluate blueberry pollen viability. *Hortscience* 31(7):1235.
- Kobayashi, M., H. Nakagawa, T. Asaka, and T. Matoh. 1999. Borate- rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher plant cell wall. *Plant Physiol.* 119:199-203.
- Lee, C. W., J. Thomas, and S. L. Buchmann. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110:671-676.
- Liu, X. H., Q. Lin, and Y. Cai. 1983. A study on the improvement of germination of litchi pollen. *Fujian Agric. Sci. & Tech.* 3:26-28.
- Loupassaki, M., M. Vasilakakis, and I. Androulakis. 1997. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. *Euphytic* 94:247-251.
- Maguire, T. L. and M. Sedgley. 1997. Storage temperature affects viability of *Banksia menziesii* pollen. *HortScience* 32(5) 916-917.
- Malho, R., N. D. Read, A. J. Trewavas, and M. S. Pais. 1995. Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell* 7:1173-1184.
- Malho, R. and A. J. Trewavas. 1996. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* 8:1935-1949.
- Martinez-Gomez, P. and T. M. Gradziel. 2000. Short-term storage of almond pollen. *HortScience* 35(6):1151-1152.
- Matoh, T. and M. Kobayashi. 1998. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. *J. Plant Res.* 111:179-190.
- O'kelley, J. C. 1957. Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germinating pollen. *Amer. J. Bot.* 44:239-244.
- Obermeyer, G., R. Kriechbaumer, D. Strasser, A. Maschessning, and F.W. Bentrup. 1996. Boric acid stimulates the plasma membrane H⁺-ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiol. Plant.* 98:281-290.
- Pierson, E. S., D. Miller, D. A. Callaham, A. M. Shipley, B. A. Rivers, M. Cresti, and P. K. Hepler. 1994. Pollen tube growth is coupled to the extracellular Calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-Type buffers and Hypertonic media. *Plant*

- Cell 6:1815-1828.
- Pinney, K. and V. S. Polito. 1990. Olive pollen storage and in vitro germination. *Acta Hort.* 286:207-210.
- Porta, N. L. and G. Roselli. 1991. Relationship between pollen germination in vitro and fluorochromatic reaction in cherry clone F12/1(*Prunus avium* L.) and some of its mutants. *J. Hort. Sci.* 66(2):171-175.
- Rosell, P., M. Herrero, and V. G. Sauco. 1999. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *in vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination. *Sci. Hort.* 81:251-265.
- Sharma, N. and K. R. Shivanna. 1983. Pollen diffusates of *Crotalaria retusa* and their role in pH regulation. *Ann. Bot.* 52:165-170.
- Shivanna, K. R. and B. Johri. 1985 *The angiosperm pollen structure and function*. Wiley Eastern, New Delhi.
- Steer, M. W. and J. M. Steer. 1989. Pollen tube tip growth. *Rev. New Phytol* 111: 323-358.
- Taylor, L. P. and P. K. Hepler. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:461-491.
- 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.
- Widerlechner, M. P., H. M. Pellett, P. D. Aschert, and S. C. Fuhrman. 1983. In vivo pollen germination and vital staining in deciduous Azaleas. *HortScience* 18:86-88.
- Yates, I. E. 1991. Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116(3):430-434.

Determination of Viability in Bitter Gourd Pollen (*Momordica charabtia* L.).

Cheng-huag Chang¹⁾ Yu Sung²⁾

Key words : bitter gourd 、 pollen viability 、 *in vitro* germination 、 histochemical method 、

Summary

The viability of four varieties of bitter gourd pollen was assessed with three histochemical methods, and by Brewbaker and Kwack (1963) solution as growth medium. Bitter gourd pollen germination could be determined using B&K liquid growth medium containing 10% sucrose, 100 to 150 ppm H₃BO₃, 200 to 300 ppm Ca(NO₃)₂, pH 7.0, and a culture temperature of 25 to 30°C. Among the histochemical methods, the FDA(fluorescein dicaetate) method was best for determining bitter gourd pollen viability. This method is easy and fast, and requires the fewest observations, but it overestimates pollen viability.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

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