花粉保存與應用技術研究

郭宏遠
行政院農業委員會種苗改良繁殖場

摘　　要

本研究先採不同溫度進行辣椒花粉保存以瞭解其效果，再進行液態氮保存與應用之相關研究，以探討該法應用於育種及採種之可能性。結果顯示室溫下花粉只能維持 3 天活力；在 4 ℃下花粉活力持續下降，9 週後已無發芽能力，而授粉後之單果種子數及種子發芽率則在 4 週後開始顯著降低。在-20 ℃下保存之花粉發芽率在第 12 週時開始明顯降低，而以液態氮保存 12 週後仍保有活力，此兩處理對授粉後之單果種子數及種子發芽率均無影響。液態氮回溫條件試驗以 D、E 處理為適當，保存 1 年後仍能保持其活力及遺傳穩定性，且不影響花粉結構，在花粉回溫後發芽時偵測到 ATP 含量升高，故液態氮至少可維持辣椒花粉一年之保存效果，有利於育種及採種之應用。

關鍵詞：花粉保存、花粉活力、超低溫保存

前　　言

花粉保存能維持植物的單倍體基因，有助於種原保存交換、提升育種效率及基因學之相關研究(Hanna, 1994)。利用花粉保存，能在小空間內保存大量的植物基因並有利運輸、克服時間和空間的隔離而完成植物的授粉，同時也能長時間重複利用特定的基因型進行研究(Barnabas and Kovacs, 1997; Hanna and Towill, 1995; Hecker *et al*., 1986; Tandon *et al*., 2007)。溫度為影響花粉活力及保存時間之重要因子，以低溫保存方式最為有效(Imani, 2011; Rajasekharan *et al*., 1994; Kozlowski and Pallardy, 2002)。花粉活力的評估，除直接計算其離體發芽率外，採用花粉授粉法，以花粉在柱頭上發芽後，將精細胞送至胚囊中完成受精著果的比例來判斷，最為接近花粉的真正活力(Boughedri and Bounaga, 1987; Rodriguez-Riano and Dafni, 2000; Shivanna *et al*., 1991)。

超低溫保存(cryopreservation)為利用液態氮進行保存之方式，將植物的組織或器官，在液態氮(-196 ℃)中保存，理論上，植物在此低溫狀態下，細胞分裂及

生理代謝停滯，不易發生體細胞變異現象(Kartha, 1985; Engelmann, 2004)，可維持生命力(Matsumoto *et al*., 2001)，且無保存時間之限制(Engelmann, 2004)，已普遍利用於種原長期保存及育種利用（Bajaj, 1979; Crisp and Grout, 1984; Hanna and Towill, 1995 ; Sparks and Yates, 2002; Tandon *et al*., 2007）。種原保存後須保有其遺傳穩定性，方具有保存之意義及利用性，AFLP、RAPD 和 ISSR 等分子標誌技術可應用於種子及組培苗保存後之遺傳穩定性鑑定(胡等，2003; 莊，2008; Lakshmanan, 2007; Schafer-Menuhr *et al*., 1996)。

由於育種家權利的高漲，植物品種權日益受到重視，育種家除利用植物品種權做為自身之保障之外，在實務操作上，如何於種子生產時落實雜交親本之保護及控管實為重要。對於蔬菜育種及採種公司來說，預防採種親本流失，提升品種純度及種子品質是重要課題，而採種親本遭竊及種子純度、品質之爭議仍時有所聞。育種家保存大量的花粉可以進行多次的雜交授粉工作，而不需重複種植花粉親。雖然利用種子或無性繁殖形式作為植物種原的保存已實用於世界各國，而花粉的保存及利用於蔬菜雜交種子生產的研究則相對較晚。根據前人研究顯示，種子及花粉之低溫保存較含水量高的活體組織保存容易，是植物種原保存的良好方法。由於國內對於花粉保存之研究尚少，期待藉由本文，提供花粉保存應用之相關資訊，連結學理與實務之應用，提升品種保護之技術及育種與採種業者之競爭力。

材料與方法

一、植物材料及栽培管理

本試驗材料為辣椒(*Capsicum annuum* L.)品系 hp27 及 C。供採收花粉之參試品系，於育苗 45 天後定植於直徑 60 公分之紅色塑膠盆，介質採泥炭土（Kakilla）、珍珠石（南海）與蛭石（南海 4 號，南海工業股份有限公司）以 2：1：1（V/V/V）比例混合，每盆混入 5 克 14 N-14 P_2O_5-14 K_2O 之 Osmocote 100 天型緩效性肥料。試驗期間每週以稀釋 1000 倍之 Peters 速效性肥料（5 N-11 P_2O_5-26 K_2O）澆灌 1 次；進行授粉試驗之苗株則定植於簡易鋅管網室中，試驗田區施用之基肥為每 10 公畝施用台肥 1 號有機肥 200 公斤及台肥 43 號化學肥 80 公斤，試驗期間每二週以稀釋 1000 倍之 Peters 速效性肥料（5 N-11 P_2O_5-26 K_2O）澆灌 1 次。病蟲害依各季節發生情形進行防治。植株第一分叉以下之側芽完全去除，以上節位之枝條則不再整枝，並去除第一分叉節位所生之花朵。

二、試驗方法

（一）保存溫度對辣椒花粉活力及授粉後果實性狀之影響

1.保存溫度對花粉活力之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株之花粉，先測量新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，分別置於室溫、4 ℃、-20 ℃及液態氮中進行保存，每一處理有 5 管。其中室溫處理組每天取出 1 管測量其發芽率，直至發芽率降至零為止；其餘處理則於保存 1、3、5、7 及 9 星期後，分別取出 1 管測試其發芽率。花粉發芽率試驗之培養基採 Brewbaker 和 Kwack（1963）為基本配方，蔗糖含量為 10 %。將培養皿至於 25 ℃之黑暗培養箱中 1 小時後，以花粉管長度超過花粉直徑兩倍者視為發芽。每處理之發芽率觀察為 3 重複，每重複至少計算 200 粒花粉。

2.保存溫度及時間對花粉授粉後果實性狀之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，先測量新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，分別置於 4 ℃、-20 ℃及液態氮中進行保存，每一處理含 4 管，於保存 1 星期、2 星期、1 個月及 3 個月後，分別取出 1 管測試其發芽率，並將花粉平均授於 9 株之品系 C 柱頭上，每株授粉 2 朵花，於果實紅熟後，隨機採收量測果實長度、寬度、果肉厚度、種子數及種子發芽率。每授粉處理 3 重複，每重複 5 個果實。

（二）回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉採種之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，先測量其新鮮花粉之發芽率，接著分裝於液態氮保存管中，共 9 管，置於液態氮中保存 1 星期後，分次進行下列之回溫處理：1. A、B、C 處理；2. D、E、F、G 處理；3. H、I、J、K 處理。回溫後先行花粉活力測試，再將花粉平均授於 9 株之品系 C 柱頭上，授粉及調查方式同前一試驗。

（三）液態氮保存花粉對遺傳穩定性之影響

參試材料為辣椒品系 hp27 及 C，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 8 管(處理)，其中 1 管之新鮮花粉先測量其發芽率，並授粉於品系 C 柱頭上，於果實成熟轉色後，採收種子保存於 8 ℃之種子冷藏庫，其餘 7 管於液態氮中保存分別保存 1 星期、2 星期、1 個月、2 個月、3 個月、6 個月及 12 個月後，先測量其花粉發芽率，再將花粉授於品系 C 柱頭上，之後採收種子保存於 8 ℃之種子冷藏庫，待所有處理之種子採收完畢後，統一進行播種定植於直徑 60 公分之紅色塑膠盆中，每處理 3 盆，進行植株

遺傳穩定性分析。

A、分子標誌分析：當植株生長至第二分叉後，每處理混合採取嫩葉 6 片，以 AFLP 分子標誌技術分析不同處理間之遺傳穩定性。遺傳相似性分析以電泳結果記錄產生之分離條帶資料，根據條帶之有無分別以 1 和 0 表示，樣品間遺傳相似性的估算採用 Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908)。

B、型態調查：於植株生長過程中，參考農糧署公告之「辣椒品種性狀調查表」調查主要性狀，以判斷不同處理是否對雜交後代植株外觀造成影響。

（四）液態氮保存對花粉活力之影響

1.花粉採收時期對液態氮保存後之活力影響

參試材料為辣椒品系 hp27，試驗於春季、夏季及秋季進行，分別選擇盛花期之一日，混合採收 10 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，其中 1 管之新鮮花粉直接測量花粉發芽率，另一管放入液態氮保存 1 星期後，再取出測量其花粉發芽率。每處理之發芽率觀察為 3 重複，每重複至少計算 200 粒花粉。

2.花粉液態氮保存對發芽時 ATP 生合成之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株品系 hp27 之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，分別代表新鮮及液態氮保存 1 星期之處理，以量測花粉發芽時 ATP 含量。先將液態氮保存之花粉回溫，分別秤取 0.1 g 之新鮮與回溫後之花粉，放入含 1 mL 液體培養基之離心管中分別培養 15、30、45 及 60 分鐘後，再進行 ATP 含量分析。花粉培養基以 Brewbaker 和 Kwack（1963）為基本配方，蔗糖含量為 10%。分析時，以 PerkinElmaer 之 ATPlite 1step kit 進行。

3.花粉液態氮保存對花粉粒外表與內部形態之影響

參試材料為辣椒品系 hp27，選擇盛花期之一日，混合採收 50 株之花粉，分裝於液態氮保存管中，共 2 管，其中 1 管為新鮮花粉組、另一管為液態氮保存處理組，該組為放入液態氮保存 1 星期後進行回溫，兩組之花粉分別以掃描式電子顯微鏡、穿透式電子顯微鏡進行花粉粒外觀及超薄切片之觀察與攝影。

結　果

一、保存溫度對辣椒花粉活力及授粉後果實性狀之影響

（一）保存溫度對花粉活力之影響

參試辣椒品系 hp27 花粉，置於室溫、4 ℃、-20 ℃及液態氮中進行不同時間保存後之花粉發芽率如圖 1。結果顯示花粉於室溫下保存時，保存 1 日後，發芽率從 60.2 %迅速降至 25.3 %，至第 4 日即無發芽率(圖 1A)。當花粉保存於 4 ℃時，保存 1 週後，發芽率從 65.2 %降至 31.3 %，發芽率隨保存時間增加而下降，至第 9 週發芽率為 0.5 % (圖 1B)。當花粉保存於-20 ℃時，新鮮花粉之發芽率為 62.5 %，保存 1 週後，發芽率為 60.5 %，保存過程花粉發芽率變化不大，至第 9 週仍有 57.6 % (圖 1C)。當花粉保存於液態氮時，新鮮花粉之發芽率為 62.8 %，不同保存時間處理之發芽率在 63.2 %至 67.1 % (圖 1D)。

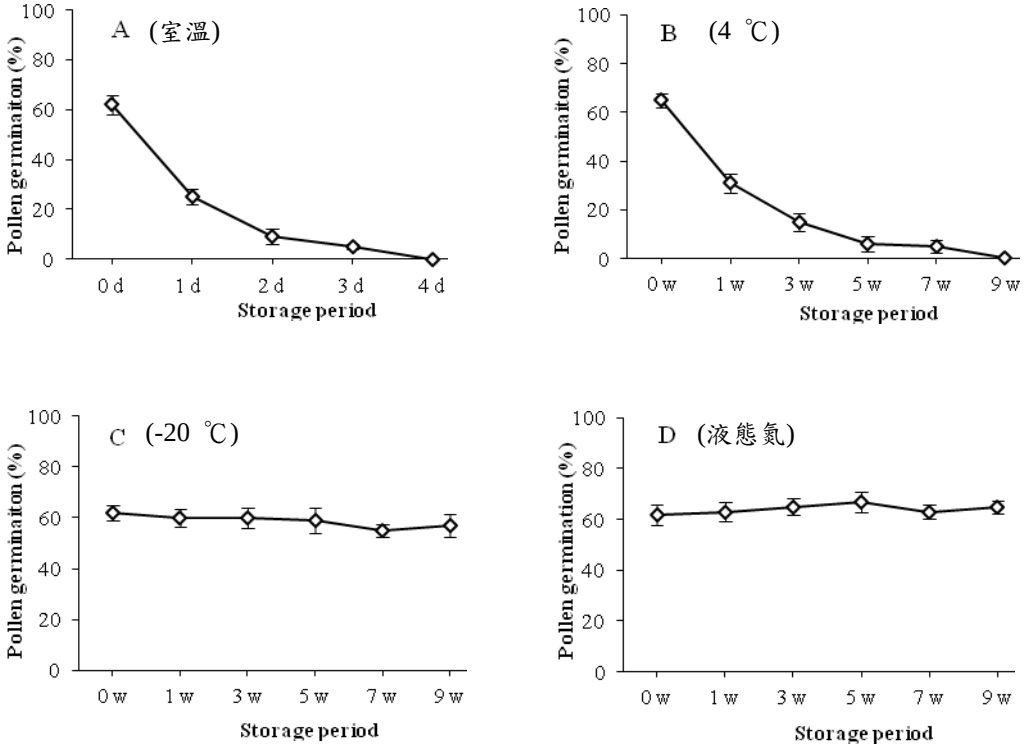


圖 1. 保存溫度及時間對辣椒品系 hp27 花粉活力之影響,室溫(A)、4 ℃(B)、-20 ℃(C)及液態氮(D)。

表一、保存溫度及時間對辣椒品系 hp27 之花粉活力及授粉後對品系 C 果實及種子性狀之影響

保存處理[y] Storage treatment		花粉發芽率 Pollen germination (%)	果長 Fruit length (mm)	果寬 Fruit width (mm)	果肉厚 Flesh thickness (mm)	種子數/果 Seed/fruit	種子發芽率 Seed germination (%)
4 ℃	Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
	1 W[x]	35.3b	124.5a	12.4a	3.3a	68.4a	90.5a
	2 W	26.6c	123.4a	12.3a	3.2a	65.6a	91.5a
	4 W	7.0d	110.5b	11.7a	3.0a	9.2b	70.8b
	12 W	0	-	-	-	-	-
-20 ℃	Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
	1 W	65.0a	125.3a	12.5a	3.1a	70.5a	92.5a
	2 W	62.3a	125.1a	12.4a	3.1a	70.9a	91.2a
	4 W	63.2a	125.0a	12.4a	3.2a	70.5a	89.8a
	12 W	55.1b	124.8a	12.3a	3.1a	68.4a	90.3a
LN	Fresh	65.3a	125.3a	12.3a	3.3a	70.3a	90.3a
	1 W	68.3a	125.6a	12.6a	3.2a	73.6a	91.5a
	2 W	67.4a	125.1a	12.7a	3.1a	72.9a	92.8a
	4 W	66.9a	125.0a	12.5a	3.1a	75.5a	91.5a
	12 W	68.9a	126.0a	12.6a	3.1a	74.5a	90.8a

[z] Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P<0.05$).

[y] Pollen was collected after 2-day pre-dehydration of flower bud one day before anthesis during full blossom period in low temperature desiccators(15 ℃/ RH 8%).

[x] W: week.

（二）回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉採種之影響

參試辣椒品系 hp27 之花粉於 4 ℃、-20 ℃及液態氮中保存不同時間，再授粉於品系 C 後所得之果實及種子生育情形如表一。在 4 ℃下，花粉發芽率由新鮮花粉之 65.3 %，隨著保存時間增加而下降，至第 12 週時已無法測得發芽率。以新鮮、保存 1 週及保存 2 週花粉授粉所得果實之單果種子數(65.6-70.3 粒)，顯著高於保存 4 週之處理組(9.2 粒)；種子發芽率同樣以新鮮、保存 1 週及保存 2 週處理組(90.3-91.5 %)顯著高於保存 4 週之處理組(70.8 %)。

在-20 ℃下，以新鮮、保存 1 週、保存 2 週及保存 4 週之花粉發芽率最高(62.3-65.3 %)，顯著高於保存 12 週之處理組(55.1 %)；以不同處理所得果實之果長(124.8-125.3 mm)、果寬(12.3-12.5 mm)、果肉厚(3.1-3.2 mm)、單果種子數(68.4-70.9 粒)及種子發芽率(89.8-92.5%)，均與新鮮花粉處組無顯著差異。

在液態氮條件下，保存 1 週、2 週、4 週及 12 週之花粉發芽率(68.3-68.9 %)與新鮮花粉(65.3 %)無顯著差異。以不同保存時間花粉授粉所得果實之果長(125.0-126.0 mm)、果寬(12.5-12.7 mm)、果肉厚(3.1-3.2 mm)、單果種子數(72.9-75.5 粒)及種子發芽率(91.5-92.8%)，均與新鮮花粉處理組無顯著差異。

利用螢光顯微鏡觀察辣椒品系 hp27 之新鮮及保存後之花粉授粉於品系 C 柱頭上 4 小時後之花粉管生長情形如圖 2。新鮮花粉授粉後之花粉管生長情形如圖 2A。當花粉於 4 ℃條件下保存 1 個月後，花粉發芽率明顯較低，同時花粉管生長速率較慢(圖 2B)。於-20 ℃及液態氮中保存 1 個月後，花粉發芽率及花粉管生長速率相近(圖 2C、D)，而保存 3 個月後之結果亦相近(圖 2E、F)，但優於新鮮花粉之表現。

二、回溫條件對液態氮保存花粉活力及授粉後種子數之影響

將辣椒品系 hp27 之花粉於液態氮保存 1 星期後，以 A、B、C 處理之花粉活力及授粉於品系 C 後之種子數結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 73.5-74.9 %之間，單果種子數在 72.3-75.1 粒之間，種子發芽率在 90.5-93.1 %之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 I)。

以 D、E、F、G 處理之花粉活力及授粉後種子數之結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 68.7-69.9 %之間，單果種子數在 72.8-76.7 粒之間，種子發芽率在 90.5-93.8 %之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 II)。

以 H、I、J、K 處理之花粉活力及授粉後種子數之結果顯示，三種回溫處理後之花粉發芽率在 74.4-77.3 %之間，單果種子數在 76.5-79.3 粒之間，種子發芽率在 85.9-92.4 %之間，均與對照組(新鮮花粉)無顯著差異(表二 III)。

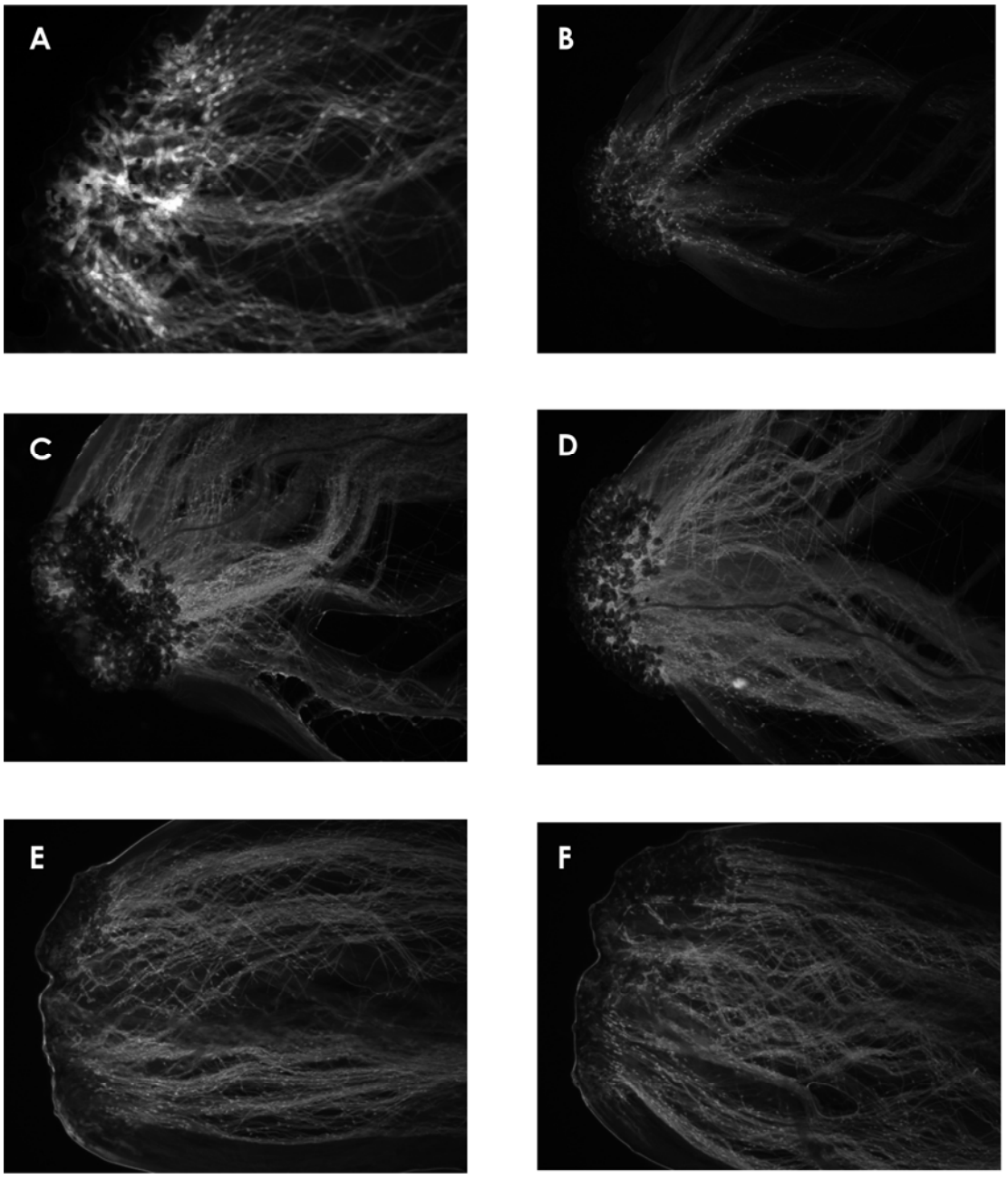


圖 2、辣椒品系 hp27 花粉於不同保存處理後授粉於品系 C 柱頭上 4 小時後之花粉管生長情形，新鮮花粉(A)、4 ℃/1 個月(B)、-20 ℃/1 個月(C)、液態氮/1 個月(D)、-20 ℃/3 個月(E)、液態氮/3 個月(F)。

表二、回溫處理對液態氮保存後辣椒品系 hp27 之花粉活力及授粉後對品系 C 果實及種子性狀之影響

回溫處理 Warming treatment	花粉發芽率 Pollen germination (%)	果長 Fruit length (mm)	果寬 Fruit width (mm)	果肉厚 Flesh thickness (mm)	種子數/果 Seed number/fruit	種子發芽率 Seed germination (%)
第一次(I)						
Fresh	70.3a	124.8a	12.5a	3.1a	71.3a	90.2a
A	73.5a	125.3a	12.4a	3.2a	72.3a	93.1a
B	75.4a	125.5a	12.6a	3.2a	74.5a	92.9a
C	74.9a	125.6a	12.4a	3.2a	75.1a	90.5a
第二次(II)						
Fresh	65.3a	125.1a	12.4a	3.2a	70.6a	89.5a
D	69.1a	124.6a	12.5a	3.0a	72.8a	91.20a
E	68.7a	124.3a	12.6a	3.1a	74.6a	90.5a
F	69.9a	125.0a	12.4a	3.0a	76.7a	93.8a
G	69.5a	125.1a	12.5a	3.1a	75.5a	92.8a
第三次(III)						
Fresh	75.2a	125.2a	12.7a	3.2a	77.6a	90.5a
H	75.3a	125.4a	12.6a	3.2a	77.9a	85.9a
I	77.3a	125.3a	12.7a	3.2a	76.5a	92.4a
J	76.1a	124.9a	12.7a	3.1a	79.3a	90.9a
K	74.4a	125.0a	12.6a	3.2a	76.8a	86.9a

[z] Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test ($P<0.05$).

三、液態氮保存花粉對遺傳穩定性之影響

本試驗所採收之辣椒品系 hp27 新鮮花粉發芽率為 68.4 %，經液態氮保存後之花粉發芽率約在 69.8-72.1 %之間，保存 12 個月後之花粉發芽率(71.9 %)仍與新鮮花粉之表現近似(表三)。辣椒品系 hp27 與 C 之 8 個雜交組合後代共 48 個植株的 AFLP 電泳圖如圖 3 及 4，使用之選擇性聯合引子組分別為 M-CAT/E-ACG 及 M-CTA/E-AGC，AFLP 分析共使用 6 組選擇性聯合引子組。AFLP 電泳圖經 LI-COR Saga generation 2 軟體標定條帶及判讀後，6 組 Mse 1/Eco R1 選擇性聯合引子組對 8 組雜交後代材料共分析出 281 個片段，大小介於 25-660 bp，止讀於 570-660 bp，其中，以 M-CAG/E-ACT 表現最多 DNA 片段數(73 個)，以 M-CAT/E-AGC 表現最少 DNA 片段數(32 個)，8 組材料所產生之共同片段均為 281 個，且無多型性條帶(表四)。分析 8 組材料彼此間的 Jaccard 相似性係數，新鮮及各處理組均為 1.00(表五)。

從授粉後所得之 F1 種子外觀及植株生育過程中，各處理間之種子均為淡黃色、子葉大小約 2.7-2.9×1.0 mm、胚軸無呈現紫色、莖色為紫綠混色-紫色不明、節色為紫色、葉色為綠色、植株生長習性為中間型、株高約 70-75 公分、株寬約 71-75 公分、花色為白色、花藥色為紫色、未成熟果綠色、成熟果紅色、果長約 10.2-10.5 公分、果寬約 1.5-1.6 公分、果實縱切面為長方形、橫切面為圓形，彼此間在外表型態上並無差異(表六)。

表三、以液態氮保存不同時間後對辣椒品系 hp27 花粉發芽率之影響

保存時間 Preservation period	花粉發芽率 Pollen germination (%)
fresh	68.4±1.0a
1 week	69.8±0.9a
2 weeks	69.5±0.9a
1 month	68.1±1.2a
2 months	71.3±1.1a
3 months	70.2±0.6a
6 months	69.9±0.9a
12 months	71.9±1.1a

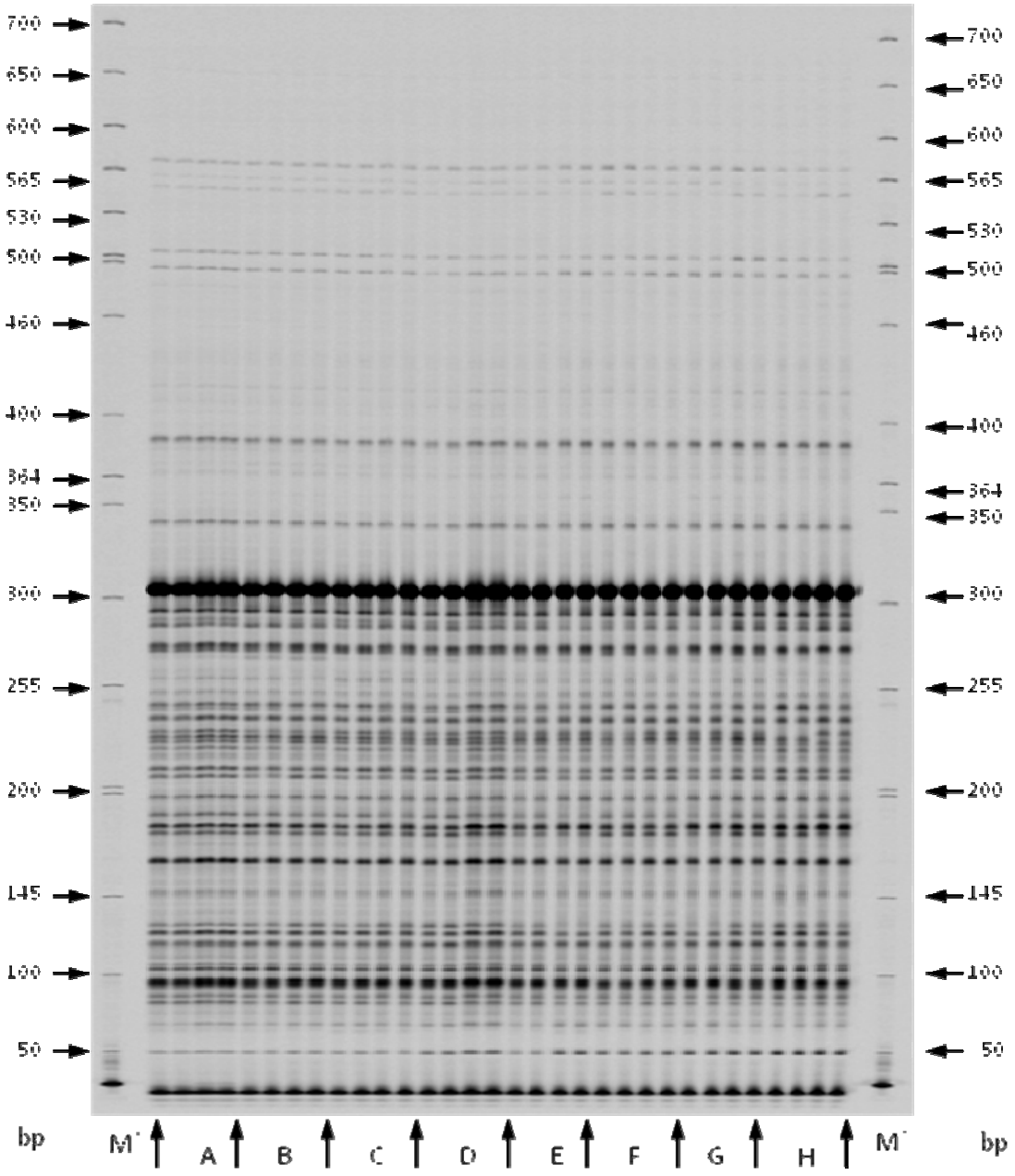


圖 3. 花粉液態氮保存不同時間後授粉之辣椒雜交一代植株以 M-CAT/E-ACG 選擇性聯合引子組進行 AFLP 分析之電泳圖。

*In A to H: Samples were collected from hybrids produced by pollen cryopreserved for 0 week (A), 1 week (B), 2 week (C), 1 month (D), 2 month (E), 3 month (F), 6 month (G) and 12 month (H), respectively, four PCR replicates.

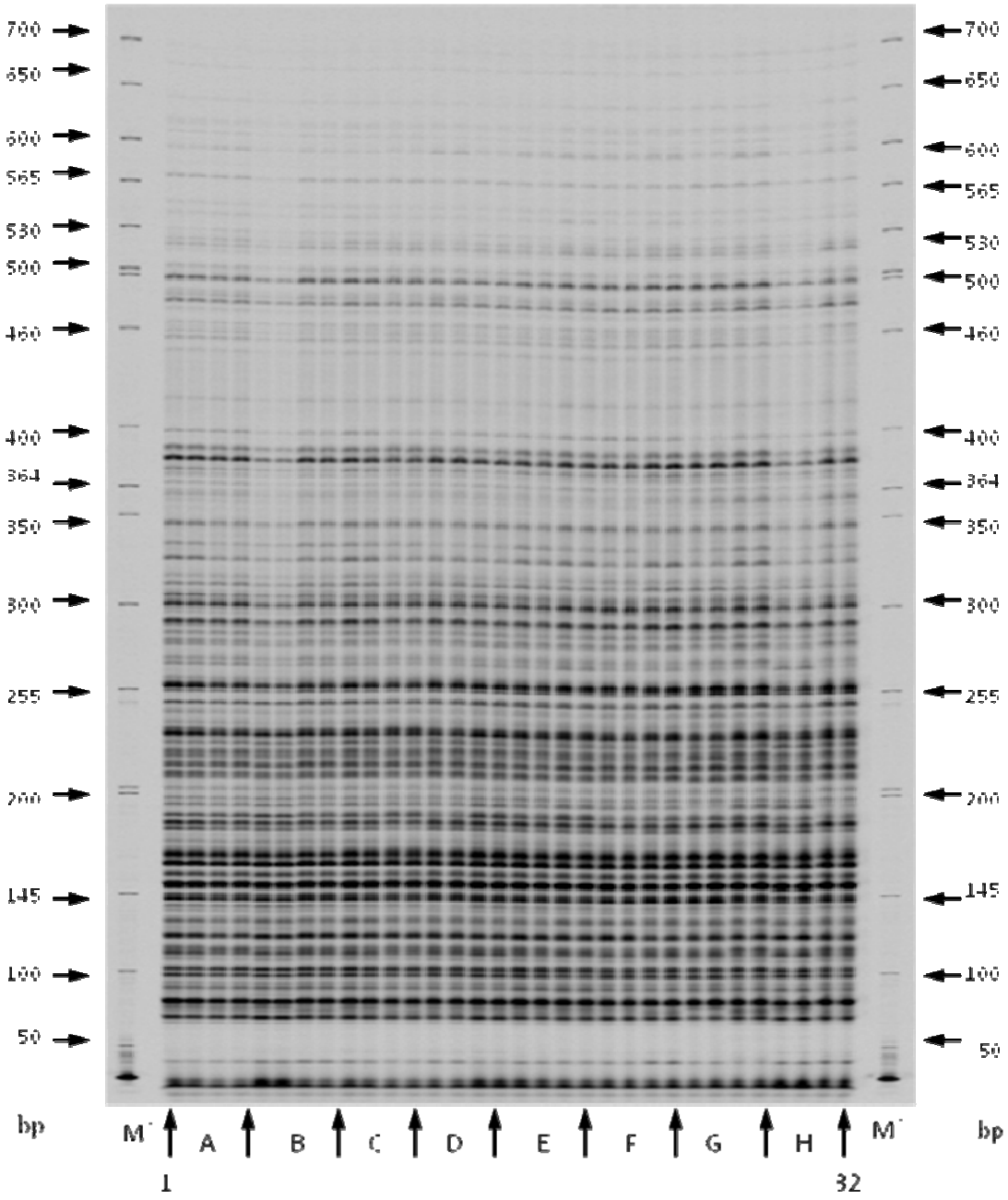


圖 4. 花粉液態氮保存不同時間後授粉之辣椒雜交一代植株以 M-CTA/E-AGC 選擇性聯合引子組進行 AFLP 分析之電泳圖。

*In A to H: Samples were collected from hybrids produced by pollen cryopreserved for 0 week(A), 1 week (B), 2 week (C), 1 month (D), 2 month (E), 3 month (F), 6 month (G) and 12 month (H), respectively, four PCR replicates.

表四、以 AFLP 分析花粉液態氮保存不同時間後授粉對辣椒雜交一代植株葉片之 DNA 片段表現情形

引子對 Mse 1/Eco R1 Primer pair Mse 1/Eco R1	總條帶數/多型性條帶數[z] No. of total / polymorphic fragments								總數 Total
	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month	
CAA/AGG	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	48/0	384/0
CAC/ACG	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	296/0
CAG/ACT	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	73/0	584/0
CAT/ACG	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	32/0	256/0
CTA/AGC	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	54/0	432/0
CTC/ACG	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	37/0	296/0
總數 Total	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	281/0	2248/0

[z] The fragments were obtained from hybrids produced by pollen cryopreserved for different period.

表五、以花粉液態氮保存不同時間後授粉對辣椒雜交一代植株間之 Jaccard 相似性係數

取樣植株[z] Sampled plants	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month
fresh	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 week	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 weeks	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 month	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
6 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
12 months	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

[z] The sampled hybrids were produced by pollen cryopreserved for different period.

表六、花粉液態氮保存不同時間後之花粉活力及授粉對辣椒雜交一代植株[z]外觀性狀之影響

花粉活力與植株性狀 Pollen viability and plant characteristics	液態氮保存時間 Cryopreserved period							
	新鮮 fresh	1 星期 1 week	2 星期 2 week	1 個月 1 month	2 個月 2 month	3 個月 3 month	6 個月 6 month	12 個月 12 month
花粉發芽率(%)	68.4	70.2	71.3	69.8	70.9	71.5	72.1	71.9
種子顏色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色	淡黃色
子葉大小(cm)	2.9 x 1.0	2.9 x 1.0	2.8 x 1.0	2.7 x 1.0	2.8 x1.0	2.8 x 1.0	2.9 x 1.0	2.7x 1.0
胚軸顏色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色	無紫色
莖色	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯	紫綠混色-紫色不明顯
節色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色
葉色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色
植株生長習性	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型	中間型
株高(cm)	72	72	75	74	70	72	71	75
株寬(cm)	71	71	75	73	72	73	72	75
花色	白	白	白	白	白	白	白	白
花藥色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色	紫色
未成熟果色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色	綠色
成熟果色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色	紅色
果長(cm)	10.4	10.4	10.2	10.3	10.3	10.4	10.2	10.5
果寬(cm)	1.6	1.6	1.6	1.5	1.6	1.5	1.6	1.6
果形(縱切面)	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形	長方形
果形(橫切面)	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形	圓形

[z] The hybrids were crossed by female line (line C) and male line (line hp27) after different periods of liquid nitrogen storage of male line's pollen

四、液態氮保存對花粉活力之影響

（一）花粉採收時期對液態氮保存後之活力影響

參試材料為辣椒品系 hp27，在春季、夏季及秋季分別種植三批植株進行新鮮及液態氮保存花粉之花粉發芽表現結果如表七，試驗結果顯示，在相同株齡條件下，春季採收之花粉活力為 78.8 %，明顯高於秋季收之花粉活力(60.3 %)及夏季採收花粉之活力(29.5 %)。而經液態氮保存 1 週後，同樣以春季採收之花粉活力為 82.1 %，明顯高於秋季收之花粉活力(62.4 %)及夏季採收花粉之活力(31.6 %)。而經液態氮保存 1 週後，以春季花粉之花粉管長為 0.376 mm，明顯高於秋季花粉之 0.321 mm 及夏季花粉之 0.300 mm。

表七、採粉季節對辣椒品系 hp27 新鮮及液態氮保存花粉發芽之影響

採粉時間 [z] Season of pollen harvested	新鮮花粉 Fresh pollen			液態氮保存花粉 Cryopreserved pollen [y]		
	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長 Pollen tube length (mm)	花粉管寬 Pollen tube width (mm)	花粉發芽率 Pollen germination (%)	花粉管長 Pollen tube length (mm)	花粉管寬 Pollen tube width (mm)
spring	78.8±3.5a[x]	0.370±0.010a	0.014±0.006a	82.1±3.3a	0.376±0.008a	0.014±0.006a
summer	29.5±5.1c	0.290±0.009c	0.013±0.007a	31.6±4.5c	0.300±0.009b	0.014±0.007a
fall	60.3±4.2b	0.302±0.008b	0.014±0.005a	62.4±4.1b	0.321±0.009b	0.014±0.007a

z Pollen was harvested in spring(4/25),summer(7/22)and fall(10/30), respectively.

[y] Pollen was cryopreserved in liquid nitrogen for 1 week.

[x] Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test (P<0.05).

（二）花粉液態氮保存對發芽時 ATP 生合成之影響

以辣椒品系 hp27 之新鮮及液態氮保存 1 週花粉，進行花粉發芽時 ATP 生合成量分析結果如表八。試驗結果顯示，新鮮花粉於 B&K 液體培養基培養 15 分鐘時所測得之 ATP 含量達 6.69×10^{-10} mM，明顯高於其他處理組，而 45 分鐘處理組顯著最低，僅有 1.92×10^{-10} mM。當花粉經液態氮保存 1 週後進行培養時，培養 45 及 60 分鐘時所測得之 ATP 含量達 5.30×10^{-10} mM 及 5.29×10^{-10}mM，明顯高於其他處理組。

表八、辣椒品系 hp27 新鮮及液態氮保存花粉於培養後之 ATP 生成量

培養時間 Cultured period	ATP 生成量 [y] ATP content ($\times 10^{-10}$ mM)	
	新鮮花粉 Fresh pollen	液態氮保存花粉 Pollen cryopreserved[z]
15 min	6.69±0.23a[x]	4.00±0.22b
30 min	2.71±0.29b	3.72±0.24c
45 min	1.92±0.25c	5.30±0.21a
60 min	2.47±0.26b	5.29±0.24a

[z] Pollen cryopreserved in liquid nitrogen for 1 week

[y] Pollen cultured in liquid medium for 15, 30, 45 and 60 min, respectively, and measured for its ATP synthesis content.

[x] Means within column followed by the same letter(s) are not significantly different by Fisher's protected LSD test (P<0.05).

（三）花粉液態氮保存對花粉粒外表與內部形態之影響

辣椒品系 hp27 之新鮮及液態氮保存 1 星期花粉，以掃描式電子顯微鏡、穿透式電子顯微鏡進行花粉粒外觀及超薄切片之結果分別如圖 5 及圖 6。由花粉外觀觀察可知，辣椒花粉為紡錘形、具三孔溝(圖 5A)、外壁具點狀突起(圖 5B)。新鮮花粉(圖 5C)與液態氮保存 1 星期後花粉(圖 5D)之外觀無差異，以超薄切片觀察其花粉粒可知，兩者之花粉外壁之構造如圖 6A 及圖 6B，內部之胞器分布如圖 6C 及圖 6D，並無明顯差異。花粉壁橫切面構造如圖 6E。

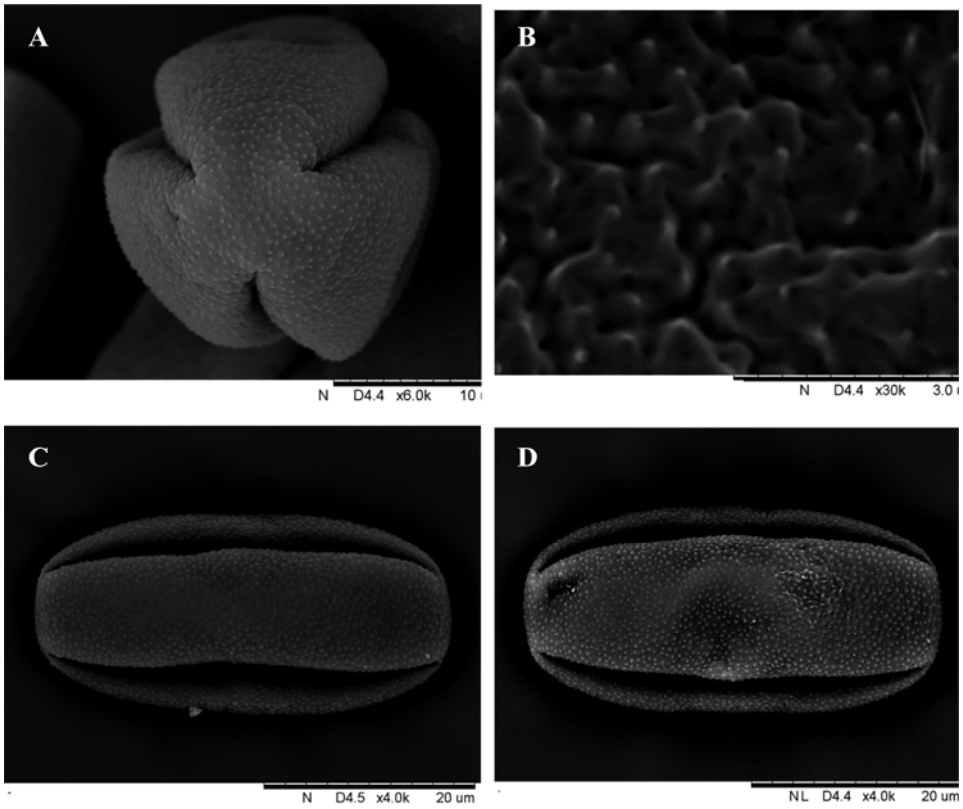


圖 5. 掃描式電子顯微鏡辣椒觀察辣椒花粉粒外觀。具三孔溝，6000 倍(A)、外壁細部構造，30000 倍(B)、新鮮花粉，4000 倍(C)、液態氮保存花粉，4000 倍(D)。

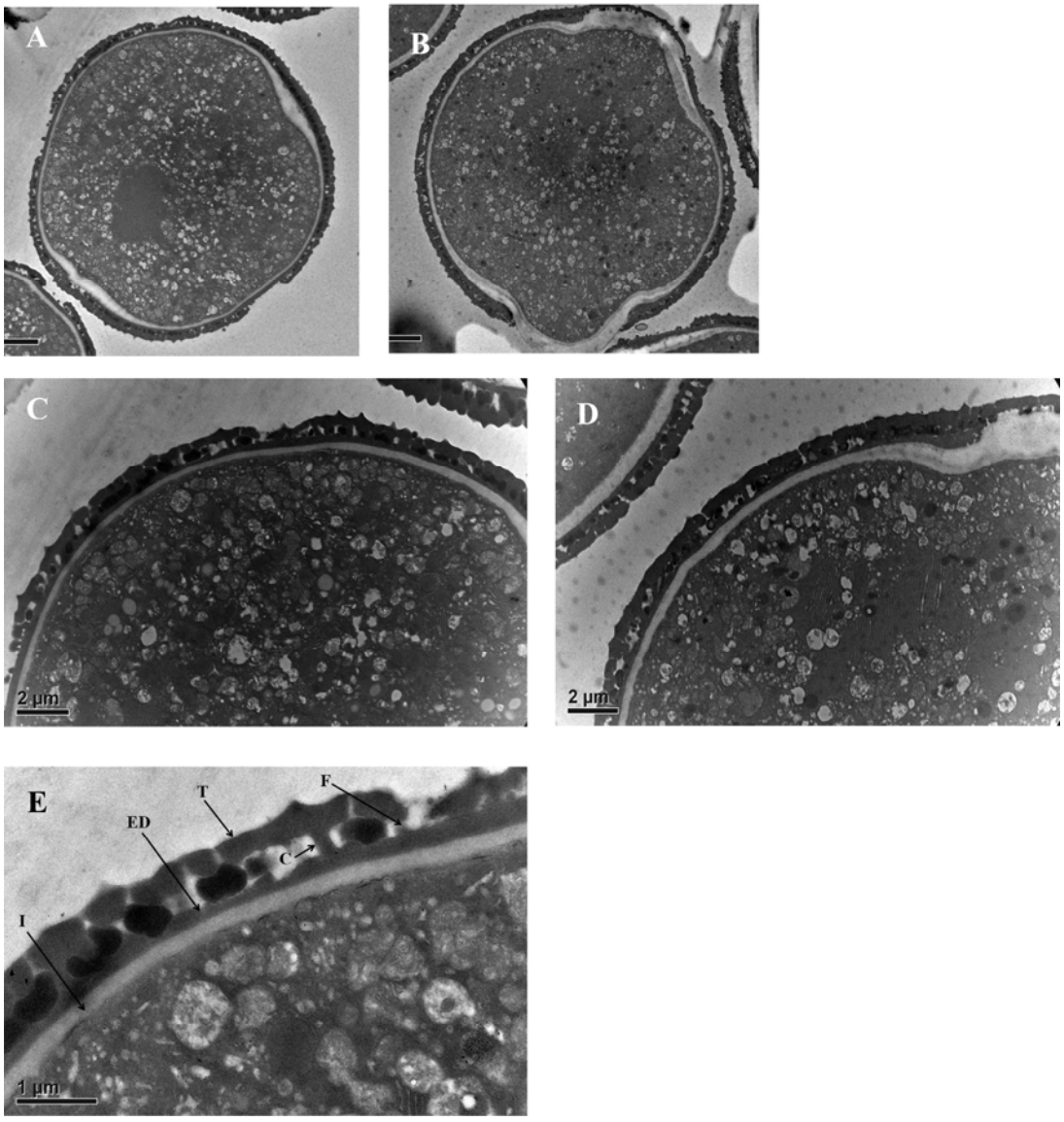


圖 6. 穿透式電子顯微鏡觀察辣椒花粉粒超薄切片構造。完整新鮮花粉，4000 倍(A)、完整液態氮保存花粉，4000 倍(B)、新鮮花粉細部，10000 倍(C)、液態氮保存花粉細部，10000 倍(D)、細胞壁橫切面構造(E)，頂蓋(T, tectum)、柱狀物(C, columella)、底層(F, foot layer)、外壁內層(ED, endexine)、內壁(I, intin), 30000 倍。

討　論

花粉保存如同種子保存一般，可依需求進行短、中、長期之保存。一般而言，雙核型的花粉多具耐乾燥性（desiccation-tolerance），壽命較長，辣椒即屬於此類之花粉，因此可以進行保存以延長可利用之時間。而花粉具有體積小、處理方便的優點，若能配合溫度控制，可於-20℃的低溫或-196℃的液態氮中進行超低溫

保存（Stushnoff, 1991）。由試驗得知，辣椒花粉於室溫下保存時，花粉活力會迅速下降，至第四天後即完全失去發芽率(圖 1A)，因此新鮮採集之花粉若不置於冷藏或低溫保存設施內，便應立即使用，以免其活力喪失，而在雜交授粉的實務操作時，若能採粉後立即授粉，則無此問題發生。在 4 ℃的條件下能短暫維持花粉發芽率，從對採種之種子產量及發芽率來看，至少能維持 2 週之活力，所得之結果與新鮮花粉相近，可作短期之保存。在-20 ℃及液態氮條件下，保存 12 週後授粉後所得果實之單果種子數及種子發芽率均與新鮮花粉無顯著差異(表一)，表示兩方式至少能維持 12 週之花粉活力。本研究亦利用螢光顯微鏡觀察授粉 4 小時後之花粉管發育情形，試驗結果顯示，花粉於 4 ℃條件下保存 4 週後，花粉發芽率較低且發芽管生長速率慢，其餘以-20 ℃及液態氮保存 4 週及 12 週之花粉發芽表現均相近，並優於新鮮花粉(圖 2)，表示利用低溫及超低溫保存之花粉，其實際發芽率均至少能維持 12 週，此與表一所得數據之各時間處理間單果種子數無顯著差異之結果相符合。

花粉於液態氮保存後，需經過回溫解凍之過程方能利用，解凍過程中需快速經過冰晶形成區，以避免產生冰晶而破壞細胞膜，導致細胞死亡(Tisserat *et al*., 1983)，通常以溫水水浴方式為常用之回溫解凍方式(Crisp and Grout, 1984; Rajasekharan *et al*., 1994; Tandon *et al*., 2007)。本試驗為嘗試找出合適之回溫條件，先以 A、B、C 處理，結果顯示花粉解凍後所測得之花粉發芽率在 73.5 %-75.4 %之間，略高於新鮮花粉之 70.3 %，但彼此間無顯著差異，同時將其授粉後所得果實之果實大小、種子數及種子發芽率亦與新鮮花粉無顯著差異，其中單果種子數仍略高於新鮮花粉之對照組(表二 I)，因此該三種時間均可採用於回溫解凍之處理，進一步以 D、E、F、G 處理，結果同樣顯示不同回溫時間處理後之花粉發芽率及單果種子數均略高於新鮮花粉之對照組，但彼此間無顯著差異，而果實大小及種子發芽率亦與對照組相同(表二 II)，此表示該四種時間處理亦能用於回溫。而為了解其他溫度與時間之組合是否合適於回溫處理，本試驗設計以 H、I、J、K 處理，結果同樣顯示各處理間之各項調查項目均與對照組無顯著差異，因此亦能適用於回溫之處理。由此可知，花粉於液態氮保存後，利用上述之溫度及時間進行水浴回溫處理均能達到維持花粉發芽率與授粉後所得單果種子數及種子發芽率與新鮮花粉相近之目的，此外，經由掃描式電子顯微鏡及穿透式電子顯微鏡之觀察發現，液態氮保存花粉之外觀、細胞壁及胞器於 D 處理後均與新鮮花粉近似(圖 5 和圖 6)，此亦表示之快速降溫正確的回溫解凍方式可保持細胞的完整性而維持其活力。若從節省能源及操作之便利性來考量，以 D、E 處理為簡便可行之方法，同時在本試驗中亦發現花粉經由液態氮保存回溫後有發芽率提升之現象，此與王等學者(2003)在馬鈴薯花粉液態氮保存試驗中之結果相同。

為進一步探討液態氮保存花粉後所產生之花粉發芽率提升之現象，本研究先嘗試從不同採粉季節來分析新鮮及保存後花粉之發芽率及發芽管生長情形，結果顯示在相同株齡條件下，不同採粉季節之花粉發芽率不同，此結果應與該品系特性及不同季節之溫度有關，而將上述季節採收之花粉經液態氮保存後，均出現花粉發芽率略高於新鮮花粉之現象，表示確實存在某種因素導致其活力提升。近年來，開始有學者研究關於 extracellular ATP(eATP)控制植物生長之議題(Demidchik *et al*., 2003; Jeter *et al*., 2004)，其中亦證實 ATP 會影響花粉發芽(Steinebrunner *et al*., 2003; Wolf *et al*., 2007)，本試驗中比較新鮮與液態氮保存花粉於液體培養基內發芽時之 ATP 生成量，新鮮花粉以培養 15 分鐘後之生成量最高(6.69×10^{-10} mM)，遠高於其他時間，推測可能與新鮮花粉之粒線體功能正常，因此一開始之 ATP 生成量便較高，之後又迅速下降；而液態氮則在 15 分鐘時低於新鮮花粉之含量，推測可能因液態氮低溫貯藏後，對粒線體造成非外觀之功能傷害，因此花粉吸水後進行胞器修復的工作，而使初期之 ATP 產生量低，經功能恢復後，再逐漸升高，於 45 及 60 分鐘時生成量最高(分別為 5.30×10^{-10} mM 及 5.29×10-^{10} mM)。若以花粉管於培養後 30 分鐘開始萌發來看，液態氮保存之花粉於 30、45 及 60 分鐘時之 ATP 生成量均高於新鮮花粉者(表七)。Roux 和 Steinebrunner (2007)曾指出在適當的濃度範圍內，eATP 以濃度方式調控植物生長，而過高或過低之濃度也會對生長不利，Bernard 等人(2011)的研究則顯示阿拉伯芥突變種(ENT1-RNAi)之花粉發芽率隨 eATP 含量下降而降低，綜合上述試驗及前人研究結果，可從 eATP 含量之觀點解釋液態氮保存後之能維持花粉活力，甚至略有升高之原因。

為了解花粉經液態氮保存後能否維持遺傳穩定性，利用不同保存時間解凍後之父本花粉授粉於母本柱頭上所得之雜交一代植株進行外表型及遺傳質穩定性之分析。經由植株外表形態之觀察得知，種子及植株外表重要性狀之表現無目視可區別之差異(表六)，因此可證實將父本花粉以液態氮保存一年後再行授粉，對雜交一代植株之外表型態無影響，此可符合以外觀來區別之雜交種子純度之標準。若進一步探討液態氮保存對遺傳質穩定性之影響，因 AFLP 兼具高度專一性及再現性之特性(Powell *et al*., 1996; Vos *et al*., 1995)，本試驗以此法進行分析，採混合 DNA 模板(bulk DNA template)之方式(Yu and Pauls, 1993)，將多個單株的基因組 DNA 等量混合後，以其作為 PCR 反應的模板 DNA，再以 6 組 Mse 1/Eco R1 選擇性聯合引子組進行後續之遺傳穩定性分析，其電泳圖(圖 3、4)均顯示清晰而易辨識之條帶，經判讀均無多型性條帶發生(表四)，該法屬於逢機產生之條帶，條帶數多於 RAPD 法，本次亦使用 6 組選擇性聯合引子組，共產生 281 個條帶，故產生之條帶均位於母本植株之機率極低，應不失判斷保存後花粉遺傳質穩定性之可信度，且 8 個保存時間處理間之 Jaccard 相似性係數均為 1.00(表五)，此亦

證明經不同時間液態氮保存後之花粉雜交之後代，能維持其遺傳質之穩定性，以此回推，經液態氮保存後之花粉亦應維持其遺傳質之穩定性，此與胡等人(2003)在小麥種子、莊(2008)在紫錐菊組培苗及 Schaefer-Menuhr 等人(1996)在馬鈴薯組培苗所得之結果相符。

綜上所述，室溫下不利於辣椒花粉保存，在此環境下花粉活力迅速下降，3 天後即喪失活力，4 ℃下只適合短時間之保存，授粉後之單果種子數及種子發芽率則在 4 週後就明顯下降，故在無適當保存條件之環境下，所採集之花粉必須立刻儘快使用，以免影響其活力。而花粉發芽率在-20 ℃下及液態氮保存 12 週後仍無降低，同時該兩處理對授粉後之單果種子數及種子發芽率均無影響，故兩者可作為較長時間之保存。若以蔬菜採種觀之，因應異地採收花粉及雜交授粉所需，花粉最多保存一年即可，當加入運輸便利性之考量時，則以液態氮桶保存攜帶之方式為首選；而若從種原保存及利用觀之，則儘量採簡單方便且能維持長時間活力之方式，即應採取液態氮保存之策略。理論上，花粉於液態氮內能作長期之保存，經試驗後亦得知辣椒花粉經液態氮保存後有略為提升其活力之效果，且至少於一年內不影響其活力及遺傳穩定度，因此在花粉活力最佳之時期採收花粉後進入液態氮保存，將有利於蔬菜育種及採種上之應用。

參考文獻

1. 王玉萍、張峰、王蒂。2003。馬鈴薯花粉的超低溫保存研究。園藝學報 30: 683-686。
2. Amarech, C. 2007. Bulk genomic DNA PCR analysis- A rapid method to estimate genetic relatedness among heterogeneous Lecerne (*Medicago sativa* L.) cultivars. Cytologia 72: 363-368.
3. Bajaj, Y. P. S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. Euphytica 28: 267-285.
4. Barnabás, B. and G. Kovács. 1997. Storage of pollen, p. 293-314. In: K.R. Shivanna and V. K. Sawhney(eds.). Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge, UK.
5. Bernard, C., M. Traub, H. H. Kunz, S. Hach, O. trentmann, and T. Mohlmann. 2011. Equilibrative nucleoside transporter 1(ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 62: 4627-4637.
6. Boughediri, L. and N. Bounaga. 1987. *In vitro* germination of date pollen and its

relation to fruit set. Date Palm J. 5: 120-127.

7. Brewbaker, J. L. and B. H. Kwack. 1963. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bet. 50: 859-865.
8. Chinnusamy, V., J. Zhu, and J.-K. Zhu. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci. 12: 444-451.
9. Crisp, P. and B. W. W. Grout. 1984. Storage of Broccoli pollen in liquid nitrogen. Euphytica 33: 819-823.
10. Demidchik, V., C. Nichols, M. Oliynyk, A. Dark, B. J. Glover, and J. M. Davies. 2003. Is ATP a signaling agent in plants? Plant physiol. 133: 456-461.
11. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
12. Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: process and prospects. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 40: 427-433.
13. Gibbs, R. A. 1990. DNA amplification by polymerase chain reation. Anal. Chem. 62: 1201-1214.
14. Hanna, W. W. 1994. Pollen storage in frostless and conventional frostforming freezers. Crop Sci. 34: 1681-1682.
15. Hanna, W. W. and L. E. Towill. 1995. Long-term pollen storage. Plant Breed. Rev. 13: 197-207.
16. Haunold, A. and P. C. Standwood. 1985. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen. Crop Science 25:194-196.
17. Hecker, R. J., P. C. Stanwood, and C. A. Soulis. 1986. Storage of sugarbeet pollen. Euphytica 35: 777-783.
18. Imani, Ali, K. Barzegar, S. Piripireivatlou, and S. H. Masomi. 2011. Storage of apple pollen and in vitro germination. Afri. J. Agri. Res. 6: 624-629.
19. Jeter, C. R, W. Tang, E. Henaff, T. Butterfield, and S. J. Roux. 2004. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triposphates and diphosphates in Arabidopsis. The Plant Cell 16: 2652-2664.
20. Kartha, K. K., N. Leung, B. Baudet-Lapreirie, and F. Constabel. 1982. Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells culture *in vitro*. Plant Cell Rep. 1: 135-138.
21. Kidwell, K. K., D. F. Austin, and T. C. Osborn. 1994. RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars. Crop Sci. 34: 230-236.

22. Kozlowski, T. T. and S. G. Pallardy. 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. Bot. Rev. 68(2): 270-334.
23. Lutz, C. 2010. Cell physiology of plants growing in cold environment. Protoplasma 244: 53-73.
24. 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.
25. Ouellet, F. 2007. Cold acclimation and freezing tolerance in plants. Encycl. life Sci. John Wiley & Sons, Ltd. <http://www.els.net/>.
26. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafae, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. The comparison of RFLP, RAPD, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.
27. Rajasekharan, P. E., T. M. Rao, T. Janakiram, and S. Ganeshan. 1994. Freeze preservation of gladiolus pollen. Euphytica 80: 105-109.
28. Reed, B. M., J. Denoma, J. Luo, Y. Chang, and L. Towill. 1998. Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm. In Vitro Cell. & Devel. Biol. Plant 34: 256-260.
29. Rodriguez-Riano, T. and A. Dafni. 2000. A new procedure to assess pollen viability. Sex. Plant Reprod. 12: 241–244.
30. Roux, S. J. and I. Steinebrunner. 2007. Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. Trends in Plant Science 12: 522-527.
31. Shivanna, K. R., H. F. Linkens, and M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigor. Theor. Appl. Gen. 81: 38-42.
32. Sparks, D., and I. E. Yates. 2002. Pecan pollen stored over a decade retains viability. HortScience 37: 176-177.
33. Steinebrunner I., J.Wu, Y. Sun, A.Corbett, and S. J. Roux. 2003 Disruption of apyrases inhibits pollen tube-specific monosaccharide transporter in Arabidopsis. Plant Physiol. 131: 1638-1647.
34. Stushnoff, C. 1991. Cryopreservation of fruit crop genetic resources - implications for maintenance and diversity during conservation. HortScience 26: 518-522.
35. Tandon, R., R. Chaudhury, and K. R. Shivanna. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. Curr. Sci. 92: 182-183.
36. Tisserat, B., J. M. Ulrich, and B. J. Finkle. 1983. Survival of Phoenix pollen

grains under cryogenic conditions. Crop Sci. 23: 254-256.

37. Vos. P, R. Hogers, M. Bleeker, T. van de Lee, M. Hornes, A. Ferijters, J. Pot, J. Peleman, M Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a review technique for DNA fingerprintering. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
38. Wolf, C., M. Hennig, D. Romanovicz, and I. Steinebrunner. 2007. Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants. Plant Mol. Biol. 64: 657-672.
39. Yu, K. and K. P. Pauls. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulk genomic DNA samples. CIP Program Rep. 1997-1998: 303-310.
40. Zietkiewics, E., A. Ralfalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.
41. resistance in walnut (*Juglans regia* L.). BMC Genomics 16: 614.