

國立臺灣大學生物資源暨農學院園藝學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Horticulture

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

長豇豆之生殖發育、花藥開裂時間及花粉活力
The Reproductive Development, Anther
Dehiscence and Pollen Viability of Yard-long Bean

吳佩真

Pei-Jhen Wu

指導教授：曹幸之 博士、楊雯如 博士

Advisor : Shing-Jy Tsao, Ph.D. and Wen-Ju Yang, Ph.D.

中華民國 一 百 年 八 月

August, 2011

致謝

烈陽，蟬鳴，因暑假而喧囂銳減的校園，彷彿三年前初來乍到的時節與場景，不同的是，我看著這段路的終點，以有點不真切帶點小雀躍卻又頻頻回頭的的步伐緩緩前進。終於，來到寫致謝這一刻……

研究所期間，承蒙指導教授 曹幸之老師與 楊雯如老師予以之指導與關心，不論是課業上的指點、生活上的慰問關懷、做人處事上的教導均令學生備感受用且深感溫馨。初入研究所時的暑假於農業試驗所，三太、東鴻、子凱學長與毓華學姊的指導與帶領，以及所內諸位叔叔阿姨的熱心協助，使我在那炙熱的夏天裡獲得許多寶貴經驗與體認。研究期間，感謝張有明老師、許圳塗老師、陳右人老師及台中農業改良場郭俊毅先生不吝分享專業的知識與精闢的見解，令學生在不同面向的思考中獲得相當受用的啟發。論文口試期間，感謝口試委員張有明老師及羅筱鳳老師百忙之中撥冗給予詳細的審閱與批示，並於口試時提供諸多寶貴意見，使得實驗與論文內容更臻詳實嚴謹，在此致上最衷心誠摯的感謝。

另外，特別謝謝春賓及灝正學長於實驗期間提供舒適的實驗空間、儀器設備與資源，並熱心且不厭其煩地指導與協助，使我實驗得以順利進行且更驅縝密。非常開心在研究所認識了婉君和唯昭這兩位同窗好夥伴，以及實驗室金燕、瓊儀、芝蓉、亦中、瑜筑、新穎、佩潔學姊以及賜福與奕成學長，感謝你們為平凡的日子增添許多歡笑，也總是適時提供相當實用的建議與加油打氣，因為有你們的相伴與砥礪使我在徬徨時不至於無措、失敗時不感到氣餒，不論高興或難過時有人可以分享與宣洩，這段共同奮鬥的情誼畢生難忘，是我研究所生涯中最精彩的篇章。

而好朋友苡萱、伊婷、之穎、徐瑾、宛純、屬容、夢羽、宇晨、妤珊以及諸多好友們，雖然上大學或研究所後大家各奔前程，但謝謝你們在為各自的生活、研究打拼時，還是不時予以關心、幫助與鼓舞，還有可貴的意見及有趣的點子供我參考，更樂於分享生活的喜怒哀樂與經驗，再再點綴了我的每一天，使我的生活不致於被限縮在實驗與課業上。此外，非常謝謝奕成總是不分晝夜協助我實驗的進行、感謝你及你家人予我的支持與勉勵陪我度過許多難關。而最要感謝的莫過於我親愛的家人，謝謝親愛的爸爸、媽媽、哥哥和妹妹這段期間予以的支持、鼓勵、包容與體諒，使我無後顧之憂安心求學，沒有你們就無法成就現在的我，內心的感激與感動無限，豈是三言兩語可以言盡，我只能說：我好愛你們！如今此本論文得以付梓成冊，其背後所需要感謝的人太多太多，倘有遺漏未提及之處望請海涵，在此獻上最誠摯的感謝與敬意！

末了，回想這一路走來出現的人物、發生的事件、激發的感動及堆砌出來的喜怒哀樂與現在的我，期間所承載的記憶與感謝龐大到我終於理解，為何論文寫到最後會以致謝完結，但它總是被置於一本論文的開頭，就如同要再把這趟路再重新省視一回，然後每每翻開就先由衷感謝成就這本論文的每個要角一次、又一次……

中文摘要

長豇豆 (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc) 性喜溫、耐旱又耐濕，對環境適應範圍廣，是臺灣重要夏季蔬菜之一。但栽培上常有種傳病毒病為害，以及近年來環境變遷導致產量、品質受影響。長豇豆為自花授粉作物，雜交育種有授粉效率低、結籽數少的限制。有關於長豇豆之生殖特性，包括開花、花藥開裂時間及花粉壽命與活力的報告甚少。本研究以‘三尺青皮’與‘麗人’兩蔓性品種，以及‘矮長豆’與‘農友矮生’兩矮性品種為試驗材料，分別栽種於台灣大學試驗田區及人工氣候室日/夜溫 30/25 °C 與 25/20 °C 條件。植株進入抽蔓期所需之時間以 25/20 °C 處理最久，‘三尺青皮’、‘麗人’分別需要 22.6 與 21.6 日（自播種算起）。植株在 25/20 °C 處理也最慢進入生殖生長；但各品種第一花苞出現之節位在三個環境下，均無明顯差異。其中‘三尺青皮’花苞出現節位最高 (8.3–8.7 節)，其他三個品種花苞出現節位平均為第 3.0–3.7 節。各品種於進入生殖生長期後分成 30/25 °C、25/20 °C 兩處理，分別調查其花藥開裂時間，自花開前一天 7:00 pm 起每整點取樣觀察，並與田間結果相比較。供試長豇豆於花開前一天 7:00–8:00 pm 開始花藥開裂，於凌晨零時全數開裂完畢。以 Alexander、TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride) 及 FDA (fluorescein diacetate) 三種染色方法評估花粉活力，前兩種染色法之染色值較高，FDA 檢測之染色率偏低 (<30%)、較不易用以評估花粉活力。以 TTC 染色法較能反映出長豇豆花粉活力隨時間之變化；栽培於人候室之植株花粉可染率、由花開前一日晚上 8:00 之 96.98% 隨時間遞降，至花開當日 4:00 pm 降至 53.29%。於花開前一日 4:00 pm 去雄並進行品種內之授粉，在 25/20 °C 環境下‘三尺青皮’與‘矮長豆’分別有 70% 及 15% 的成功率，顯示長豇豆柱頭在花開前一日傍晚，已具可授性。此時花藥尚未開裂，人工除雄及授粉作業可於此時間一併進行。以 B&K 培養基為基礎配方，蔗糖濃度 50% 才能維持長豇豆花粉不破裂，但花粉不能萌發。培養基添加其他物質，如：聚乙二醇 (polyethylene glycol)、小牛血清蛋白 (bovine serum albumin)、激勃素 (gibberellin acid) 或長豇豆柱頭組織、調整 pH 值或其他鹽類濃度與種類，改變培養基型態及培養方式都無法使長豇豆花粉管伸長超過花粉直徑，顯示長豇豆花粉屬於難離體發芽的種類。

英文摘要

Yard-long bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) thrives in warm weather with good tolerance to drought and to moisture. It has a wide range of soil adaptation and is an important summer vegetable in Taiwan. However, the crop succumbs to seed borne viral diseases and abrupt environmental changes often result in reduced pod yield and quality. Being a self-pollinated legume, yard-long bean usually has low seed set upon manual crossing. There is few report on the reproductive biology of the yard-long bean and it is essential to know the flowering and the pollen behavior of the plant in order to ensure the success in commercial production and the seed set in breeding work. Four yard-long bean cultivars, including two viny (cvs. 'Green-pod Kaohsiung' and 'Milady') and two dwarf types (cvs. 'Bush' and 'K.Y. Bush') were grown in the open field of experimental farm and the phytotron with day and night temperature regimes of 30/25 °C and 25/20 °C at National Taiwan University. It took 22.6 and 21.6 days after sowing for cvs. 'Green-pod Kaohsiung' and 'Milady', respectively to start vining under 25/20 °C. Plants grown in the field and 30/25 °C of phytotrons were earlier to vine and to develop reproductive structures than plants under 25/20 °C, however, the node position of the first flower bud remained same in three environments, i.e. node 8.3 - 8.7 for 'Green-pod Kaohsiung' and node 3.0 - 3.7 for the other three varieties. All plants were grown in 25/20 °C till visible inflorescence shown and then they were either moved to 30/25 °C or kept at 25/20 °C. Flower buds due to bloom or open the next day were collected at 7:00 pm and thereafter at 4-hr intervals to examine the timing of anther dehiscence. The results showed that flowers of yard-long beans completed the anther dehiscence at 0:00 am of the day of anthesis. Pollen viability was tested by three staining methods. Both Alexander and TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) methods gave higher staining rate than FDA (fluorescein diacetate) test which showed less than 30% of staining. TTC staining results may indicate the temporal change in pollen viability, the staining rate was 96.98% from pollens collected at 8 pm of the day before anthesis and it decreased to 53.29% at 4:00 pm of day of anthesis. The pod set rates were 70% and 15% for cvs. 'Green-pod Kaohsiung' and 'Bush', respectively from pollinated buds due to bloom the next day under temperature of 25/20 °C. To make a hybridization cross, both emasculation and pollination can be carried out for yard-long bean in the afternoon of day before anthesis. All pollens failed to germinate in vitro on B&K or other modified culture medium tested. Sucrose as high as 50% was needed to prevent pollen from burst, supplements such as polyethylene glycol, bovine serum albumin, GA and crushed yard-long bean stigma were added with no success. Other modification included pH and formulations, no pollen germinated in excess of its diameter. Yard-long bean pollen is difficult species to germinate in vitro.

目錄

口試委員會審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	iv
目錄	v
圖表目錄	vi
第一章、前言	1
第二章、前人研究	3
一、豇豆植物特性與溫度影響	3
二、花藥開裂與花粉釋出	6
三、花粉活力	9
第三章、材料與方法	20
一、試驗材料	20
二、栽培環境與植株生長	20
三、花藥開裂與花粉萌發	21
四、花粉活力檢測	22
第四章、結果	30
一、環境對長豇豆生長之影響	30
二、長豇豆花藥開裂時間	31
三、花粉活力檢測	32
第五章、討論	59
結論	65
參考文獻	66
附錄	74

圖表目錄

表 1. 長豇豆花粉體外萌發試驗用之培養基配方。.....	26
表 2. 長豇豆進行人工授粉之去雄及授粉時間。.....	29
表 3. 長豇豆各項試驗參試品種及栽培環境一覽表。.....	29
表 4. 四種長豇豆於不同栽培環境下之生長發育比較。.....	36
表 5. 長豇豆花粉以不同培養基培養之萌發率。.....	37
圖 1. 長豇豆植株生長發育階段。.....	45
圖 2. 裸眼觀察長豇豆花藥。.....	45
圖 3. 人工授粉長豇豆後成功之結莢。.....	46
圖 4. 長豇豆栽培於田間、30/25 °C 及 25/20 °C 之花苞發育曲線。.....	47
圖 5. 長豇豆於不同栽培環境下之花藥開裂時間比較。.....	48
圖 6. 長豇豆自然授粉之花粉萌發、伸長及胚珠受精情形。.....	49
圖 7. 以 Alexander 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。.....	50
圖 8. 以 TTC 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。.....	51
圖 9. 以 FDA 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。.....	52
圖 10. 長豇豆栽培於田間環境下以三種染色法檢測花粉染色率。.....	53
圖 11. 長豇豆栽培於 30/25 °C 環境下以三種染色法檢測花粉染色率。.....	54
圖 12. 長豇豆栽培於 25/20 °C 環境下以三種染色法檢測花粉染色率。.....	55
圖 13. 長豇豆花粉體外萌發試驗結果。.....	56
圖 14. 長豇豆‘三尺青皮’於不同時間進行人工授粉之結果。.....	57
圖 15. 長豇豆‘矮長豆’於不同時間進行人工授粉之結果。.....	57
圖 16. 長豇豆‘三尺青皮’與‘矮長豆’雜交授粉之結果。.....	58

第一章、前言

豇豆 (*Vigna unguiculata* L.Walp.) 性喜溫、耐旱又耐濕，是熱帶與亞熱帶地區重要糧食、蔬菜及飼料作物，在非洲貧窮地區更是重要的蛋白質來源與經濟收入之一 (Fery, 2002; Singh et al., 2002; Taiwo and Akinjogunla, 2006)。其食用部位包括植株嫩梢、葉片、嫩莢、豆仁及乾種子。分類上豇豆有 3 個栽培群：(1) 普通豇豆 (*unguiculata* group, cowpea) 為 *Vigna* 屬栽培最廣、研究最多的一群。位在非洲奈及利亞的國際熱帶農業研究所 (International Institute of Tropical Agriculture, IITA) 即以此為主要研究作物。(2) 角豆 (*catjang* group, catjang) 為矮性、豆莢短小而直立向上的種類。因耐旱，在較惡劣的栽培環境下，可做為一種食物來源，食用風味不佳。(3) 長豇豆 (*sesquipedalis* group, yard-long bean 或 asparagus bean) 多為蔓性、豆莢長，可達 45-75 cm，嫩莢做鮮食蔬菜用外，尚可供作冷凍加工、豆莢乾使用 (Fery, 2002; Hall et al., 1997)。

長豇豆普遍栽培於東南亞、台灣及中國大陸南方，與四季豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 親緣相近，但有較廣的環境適應範圍，是臺灣夏季重要蔬菜之一 (郭，2007; Sarutayophat, 2008; Tantasawat et al., 2010)。長豇豆在臺灣栽培面積最高曾於 1998 年達 2,122 ha，但自 2001 年以後逐漸減少，在 2008 年栽培面積 1,342 ha，總生產量 14,909 t (農業統計年報，2008; 林等，2010)。由於種子會傳遞黑眼豇豆嵌紋病毒 (blackeye cowpea mosaic virus, BICMV)、胡瓜嵌紋病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 及豇豆蚜媒嵌紋病毒 (cowpea aphid-borne mosaic virus, CABMV) 等種媒病害，無病毒豇豆種子的生產及推廣受到較多注重，並已發展出實用之繁殖制度，但單位面積平均產量近年來仍逐年下滑，至 2008 年只有 11.0 – 11.5 t · ha⁻¹。

農業試驗所曾針對長豇豆易罹病、且種子帶病毒的問題，進行抗病毒病育種，雖得到具有抗病性的組合及選出抗性強的品系，要再進一步改善豆莢品質性狀，受限於人工授粉往往僅能獲得幾粒種子，導致 F₂、F₃ 世代數量受到限制，育種效率低，其生殖特性有待研究 (郭，2007)。由於豆類作物之生殖發育與授粉著莢率受環境之溫度顯著影響 (Ahmed et al., 1992; Stewart and Summerfield, 1978)，長豇豆產量下降除了病害因素外，也可能與環境變遷有關。然而有關長豇豆之開花結莢、花粉活力變化及生殖生長發育適溫範圍的研究甚少。此外，植物授粉受精是

著果之前提，其花粉活力及花粉發育為授粉受精的關鍵因子。許多豆科植物的花粉在人工培養基上發芽困難 (Jayaprakash and Sarla, 2001) ；李 (1987) 測定臺灣 134 種園藝作物花粉活力，長豇豆發芽率即為零，但因使用相同的培養基，長豇豆花粉離體壽命及活力檢測有待進一步研究。

本研究以矮性及蔓性長豇豆各兩品種探討其生殖發育、花藥開裂、花粉活力之變化與結莢率等特性，以及比較品種間的表現差異，期能對長豇豆的適當生長環境、授粉結莢時機與效率提供資訊與依據，供產業及育種工作之參考。



第二章、前人研究

一、豇豆植物特性與溫度影響

豇豆 (*Vigna unguiculata* L.Walp.) 為豆科 (Fabaceae)、蝶形花亞科 (Faboideae) 之一年生作物。早期因亞洲、非洲的豇豆都有很大的形態變異，認為亞洲、非洲都是豇豆的起源中心，近年來許多證據顯示豇豆應起源自非洲 (Sarutayophat, 2008; Timko and Singh, 2008)。分類上豇豆有 3 個栽培群，分別為普通豇豆 (unguiculata group, cowpea)、角豆 (catjang group, catjang) 以及長豇豆 (sesquipedalis group, yard-long bean) (Fery, 2002)。長豇豆 (*V. unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc) 又稱籐豆、豆角，閩南語則稱菜豆，故易與國語稱菜豆的四季豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 混淆。長豇豆係在亞洲選出，很少出現於非洲 (Timko and Singh, 2008)。民國 97 年，長豇豆在臺灣種植面積達 1,342 ha，產量為 14,909 t (農業統計年報, 2008)。

長豇豆廣泛栽培於東南亞、中國南方與非洲中西部等熱帶與亞熱帶地區，採未成熟嫩莢作為蔬菜食用。豆莢品質依莢色與長度為評定標準。各地區所偏好的不同，例如泰國及香港喜歡長而淺綠色的豆莢，汶萊喜歡深綠但短的豆莢，而歐洲與加拿大市場則以深綠色、莢長適中的品種為主 (Sarutayophat, 2008)。長豇豆性喜溫暖且日照充足的氣候，耐熱性強，耐寒性弱，生育適溫為 20 - 30 °C。生殖生長期易因陰雨造成落花、落莢數增加，而導致減產。其根部相當耐濕亦耐旱，對土壤適應性廣，從砂質壤土、壤土至粘土皆可生長良好，但土壤 pH 值以 6.2 - 7.0 最佳，pH 5.0 以下的強酸性土壤會使根部發育不良，根瘤菌活動也不旺盛 (郭, 2005)。

豇豆營養價值極高，國際熱帶農業研究所 (IITA) 與美國 Bill & Melinda Gates 基金會分別進行及贊助普通豇豆 (cowpea) 育種，選育品質及抗逆境更好的品種，且已有相當大的進展 (Timko and Singh, 2008)。分析豇豆蛋白質和微量元素含量，約含有 21% - 30.7% 蛋白質、545 - 1300 ppm 鈣、48 - 79 ppm 鐵、23 - 48 ppm 鋅以及 12,750 - 16,150 ppm 鉀，整體而言其營養價值較其他作物為高。在已開發國家，消費者期待更多低脂肪及高纖維的食物，而豇豆被認為是可替代大豆且符合低脂高纖條件的作物。豇豆種子脂肪含量介於 1.4% 至 2.7%，纖維含量約 6%。自豇豆分離出來的蛋白質具有良好的溶解性、乳化和發泡力等特性，可做為對大豆

蛋白過敏者的替代食物 (尤其是嬰兒) (Timko and Singh, 2008)。

豇豆為高度自交作物，自然雜交率 < 1% (Pasquet, 1998)。特殊之蝶形花構造將雌蕊及雄蕊包覆在龍骨瓣中，柱頭於花藥開裂前約 12 小時即成熟可以授粉 (Ehlers and Hall, 1997)。花藥於花開前數小時開裂並釋出花粉，故於花朵開放前即已完成授粉 (Hall et al., 1997; Timko and Singh, 2008)。普通豇豆 'K2809' 以栽培於 27/19 °C 環境下有最佳種子產量，其他栽培在 33/19、33/24、27/24 °C 下花朵敗育及落花率較高 (Stewart and Summerfield, 1978)。花苞發育早期若遇過高之溫度與長日照，其發育受抑制而敗育；在花苞發育後期給以夜間高溫 (30 °C) 處理導致雄不稔而無法結莢。其雄不稔乃因花粉活力低或花藥無法正常開裂所致 (Ahmed et al., 1992; El-Madina and Hall, 1986; Warraga and Hall, 1984a; Warraga and Hall, 1984b)。適當之栽培環境才能確保植株正常生長發育，以獲得最佳產量及品質，或符合生產目的。

植物進入生殖生長的時間，除了受內在因子如植物的年齡影響，也受外在生長環境調控。當植物感應外在環境而於適合其生長的溫度、光照與溼度等條件下，發生花芽創始，進行花苞發育、開花及種子的成熟 (El-Madina and Hall, 1986)。一般植物生殖發育階段對外在環境之變化較營養生長期敏感，如普通豇豆在開花後自 27/19 °C 移至 33/19 °C 或自 33/24 °C 移至 33/19 °C 都會造成 90% 花朵異常，花瓣收縮、柱頭突出龍骨瓣，而包覆於龍骨瓣內之花藥倒彎，無法自花授粉而多數落花 (Stewart and Summerfield, 1978)。

豆類作物如大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill)、豇豆、綠豆 (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) 及紅豆 (*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi) 等暖季作物大部分屬短日植物 (short day plants, SDP)。延長日照或降低溫度會延遲大豆、綠豆、豇豆及四季豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 之始花時間。但對日中性 (day-neutral plant, DNP) 的品種而言，其開花生理對光週期並不敏感，花芽創始與開花主要取決於溫度 (Aggarwal and Poehlman, 1977; Lawn and Byth, 1973; Wallace et al., 1991)。在生育適溫範圍內，提高溫度會增加綠豆及四季豆營養生長速率而使植株較快進入生殖生長，提早始花期；然而溫度過高或過低則會延遲其開花，甚至無花產生 (Aggarwal and Poehlman, 1977; Wallace et al., 1991)。此外，高夜溫 (27 °C) 造成四季豆側芽萌

發，分枝數多而營養生長旺盛，與花、莢相互競爭養分，或因內生荷爾蒙平衡改變，造成更多落花落莢 (Konsens et al., 1991)。



二、花藥開裂與花粉釋出

在高等植物的有性繁殖過程中，雄配子以花粉粒的型式存在於花藥中，待花藥開裂釋出而傳達到柱頭，萌發出花粉管進而與雌配子結合而完成受精作用。一般花藥開裂受環境因子影響甚大，關係到果實及種子的生產（李，1992; Keijzer and Cresti., 1987; Stanley and Linskens, 1974）。

（一）花藥開裂之機制

除了少數蟲媒花、閉合花及花藥結構特殊的蘭科植物外，植物花藥開裂分成兩種方式。以孔裂 (poricidal dehiscence) 方式有野牡丹科 (Melastomaceae)、杜鵑花科 (Ericaceae) 及冷地木科 (Epacridaceae) 植物。其他植物則以縱裂 (longitudinal dehiscence) 方式開裂 (Stanley and Linskens, 1974)。

花藥從成熟後期至開裂釋出花粉間之變化有一定的規則與順序，大致可分為下列數個階段：1. 表皮細胞 (epidermal cell) 及內壁細胞 (endothecium) 之擴大，及內壁細胞壁的增厚。2. 相鄰藥室 (locules) 間的隔膜組織 (septum) 分解使藥室相連通。3. 藥室周圍絨氈層細胞 (tapetum) 退化。4. 相鄰藥室之間裂孔 (stomium) 打開。5. 花藥壁向外彎曲使花藥開裂釋出花粉，花開時雄蕊老化 (senescence) (Keijzer and Cresti., 1987)。

裂孔為二相鄰藥室之花藥壁相接之處，裂孔打開係因此部位的內壁細胞通常顯得較小而無加厚的細胞壁，甚至僅存有表皮細胞而無內壁細胞。早期研究認為內壁細胞因失水乾燥產生向外彎曲的力量而使花藥壁於相接處分開形成裂孔。然而 Keijzer (1987) 指出，花藥往往於花朵未開放時裂孔部分即已打開，而認為表皮細胞及內壁細胞擴展時，由於內壁細胞進行輻射方向的大幅伸長，使花藥壁產生內向彎曲的力量，導致裂孔打開。並且此一內向的彎曲亦可以防止花粉粒於花朵未開放時即散出。

花藥壁的向外彎曲為花藥開裂的最後階段，亦是肉眼可以直接觀察到的過程。花藥壁因乾燥而向外彎曲，使花粉粒曝露而可藉由風、蟲等媒介散布。在花藥因乾燥失水而開裂的同時，花器其他部位通常仍保持膨潤狀態，所以造成此種差異有不同的說法。早期研究認為花藥中的水分經由花絲運移至花朵的其他部位，特

別是蜜腺等分泌細胞，但目前已少有人認同此說法 (Schmid, 1976)。從花藥形態及結構觀察，許多植物花藥表面具有無功能而永久保持開放狀態的氣孔；加上表皮細胞之表面角質層呈波浪狀突起的不均勻分布 (Keijzer, 1987; Schmid, 1976; Shaanker and Ganeshaiah, 1984; Westwood and Challice, 1978)，使花藥組織快速失水，故多數報告指出花藥乾燥的主要途徑是經由快速的蒸散作用所致 (Keijzer, 1983; Keijzer and Cresti., 1987)。但有研究認為開花過程中，許多植物的花藥開裂常伴隨花絲伸長，造成其內的導管組織遭受破壞，導致水分無法傳送至花藥 (Schmid and Alpert, 1977; Vasil, 1933)。Keijzer (1983) 觀察百合、洋蔥 (*Allium cepa* L.) 及白星龍 (*Gasteria verrucosa*) 三种植物，它們的花絲在開花及花藥開裂過程中各有不同的表現，因此花絲對花藥開裂的影響不一定同樣存在各植物中。以上關於花藥開裂過程中花藥壁脫水的方式以上三種說法皆有人支持或反對，真正開裂的機制仍待研究。這些觀察研究的結果似乎說明各種植物可能利用不同的途徑使花藥在適當的時機失水乾燥，使花藥開裂並達到傳播花粉的目的。

(二) 授粉型態

開花植物依其授粉時花朵開放與否可分為開花授粉 (chasmogamous) 及閉花授粉 (cleistogamous) 兩類。多數物種屬開花授粉，花藥開裂與花冠綻放同步或較晚，雌蕊與雄蕊顯露於外，可藉由風、昆蟲及動物等媒介傳播花粉，多為異交作物；反之，花藥開裂、釋出花粉時，花朵並未開放的自花授粉植物則屬閉花授粉，多數豆科植物如豌豆、四季豆及豇豆等即屬之，其雌、雄蕊包覆在龍骨瓣內，而龍骨瓣並未隨花開而開張，屬於高度自交之作物 (Lord, 1981)。與開花授粉植物相比，閉花授粉植物之花冠一般較小、色彩較不鮮艷且花粉數少 (Ram and Rao, 1984)。

(三) 影響花藥開裂之環境因子

花藥開裂的最後階段是一種失水乾燥的生理過程，花藥壁的快速脫水與蒸散作用有關，影響蒸散作用之環境因子對花藥開裂的影響廣被探討。其中大氣溫度及相對濕度被認為對花藥開裂有直接影響 (Foster and Gifford, 1974; Stanley and Linskens, 1974)。除去百合未開花朵的花被或加熱花藥可促進其花藥開裂，而在高相對濕度下則花藥無法打開 (Keijzer, 1987)；在水稻 (*Oryza sativa* L.) (Satake and

Yoshida, 1978; Suzuki, 1978) 及酪梨 (*Persea americana* Mill.) (Sedgley, 1977), 研究結果均支持溫度影響花藥的開裂。但閉花授粉植物之花藥在開裂前後均處於被花瓣保護的空間內, 未與外界環境直接接觸, 這類植物之花藥開裂較不受環境變化之影響, 如澳洲胡桃花藥於花朵開放前即已開裂, 不受外界環境影響 (Sedgley et al., 1985)。另有些植物, 如小豇豆 (*Vigna minima*) 具有開花授粉與閉花授粉兩種型態, 當環境變化較大或較不適其開花授粉時, 花朵有趨於分化成閉花授粉之現象 (Ram and Rao, 1984)。從以上研究及自然界中各種植物花藥開裂時間的差異性, 環境中溫度、濕度甚至光線等因子或可影響花藥開裂, 還要看花藥花粉的發育階段是否在敏感時期, 且各種植物花藥對環境之感受性與反應可能不同。



三、花粉活力

進行育種時不論自交或雜交授粉，花粉活力是影響受精作用與結實率的重要關鍵，影響育種的效率。而花粉的活力受到許多因素影響，大致可分為內在因素像是物種、花粉細胞學型態、花齡 (Rosell et al., 2006)；外在環境因素有溫度 (Issarakraisila and Considine, 1994; Rong-Yan and Niimi, 2008)、溼度 (Lansac et al., 1994; Shivanna et al., 1991) 等。

(一) 影響花粉活力之因素

1. 內在因素

(1) 物種特性

各物種花粉自花粉囊釋放後，維持活力的時間有很大的差異。根據花粉壽命長短及植物科別分為長壽花粉 (Long-lived pollen)、中壽花粉 (Medium-lived pollen) 及短壽花粉 (Short-lived pollen) 三大類 (Barnabas and Kovacs, 1997)：長壽花粉—花粉壽命 6 個月至 1 年，如棕櫚科 (Palmae, Arecaceae)、銀杏科 (Ginkgoaceae)、虎尾草科 (Saxifragaceae)、松科 (Pinaceae)、薔薇科 (Rosaceae)、豆科 (Leguminosae, Fabaceae)、漆樹科 (Anacardiaceae)、葡萄科 (Vitaceae) 及報春花科 (Primulaceae) 等。中壽花粉 (Medium-lived pollen) —花粉壽命約 1 - 3 個月，有百合科 (Liliaceae)、石蒜科 (Amaryllidaceae)、楊柳科 (Salicaceae)、毛茛科 (Ranunculaceae)、芸香科 (Rutaceae)、十字花科 (Cruciferae, Brassicaceae)、玄參科 (Scrophulariaceae) 及茄科 (Solanaceae) 等。短壽花粉 (Short-lived pollen) —花粉活力只能維持幾分鐘至數天，有澤瀉科 (Alismataceae)、禾本科 (Gramineae, Poaceae)、莎草科 (Cyperaceae)、鴨跖草科 (Commelinaceae) 及燈心草科 (Juncaceae) 等。造成物種間花粉壽命的差異，可能有花粉的細胞型態、細胞膜耐乾燥程度以及內容物的差異等因素。

(2) 花粉細胞型態

花粉依釋放時的細胞型態，分為雙胞 (binucleate) 花粉和三胞 (trinucleate) 花粉。約 70% 開花植物花粉釋出時停留在雙細胞時期，含有一個營養細胞和一個生殖細胞，稱為雙胞花粉。雙胞花粉於適當環境萌發花粉管時，

生殖細胞再分裂成兩個精細胞。少部分植物的花粉釋放時，生殖細胞已分裂成兩個精細胞，稱為三胞花粉 (Brewbaker, 1967)。通常雙胞花粉活力較三胞花粉維持較久，三胞花粉呼吸速率比雙胞花粉高 2 - 3 倍 (Hoekstra, 1979)，高呼吸率使花粉中的呼吸基質快速消耗。另外三胞花粉含水量高，細胞膜對乾燥敏感，以上因素可能為三胞花粉快速失去活力的原因 (Barnabas and Kovacs, 1997; Fonseca and Westgate, 2005)。豆科植物的花粉多為雙胞花粉 (Heslop-Harrison, 1977)，且被歸類於長壽花粉 (Barnabas and Kovacs, 1997)。長豇豆之花粉亦屬於雙胞型的花粉 (樊和席, 1994)。

營養細胞的細胞膜狀態與花粉活力有密切關係，細胞膜的完整性影響其通透性及外界水分的進入，發芽前的預水化處理 (prehydration) 通常可以提高花粉活力表現，其原理在於恢復細胞膜完整性，維持良好的通透性，並防止離子滲漏 (李, 1992)。

(3) 花齡

不同花齡的花朵，其花粉成熟度、乾燥程度有所差異，影響花粉的活力。日本紫花鼠尾草 (*Salvia japonica* Thunb. ex Murray.) 花粉以花藥開裂前活力較高，平均約 78.17%，花藥開裂後花粉活力下降至 21.93% (李, 2003)。冷子番荔枝 (*Annona cherimola*) 則以花藥剛開裂時花粉萌發率最高，約 50%，花藥開裂前 30 hr 花粉萌芽率約 14%，花藥開裂 20 hr 後花粉萌芽率低於 10% (Rosell et al., 2006)。

2. 外在因素

(1) 溫度

花粉發育時外在環境溫度會影響花粉活力，植物在生殖生長階段對環境逆境 (如：高溫、低溫、乾燥等) 比在營養生長期更為敏感，若遭遇逆境，植株結果、結籽率會顯著降低。花粉發育及花粉活力是否正常，關係著授粉與受精作用而影響著果率。植物種類與品種的差異，造成對溫度的不同敏感度與敏感期。超過或低於適溫通常會造成著果不良，降低作物生產力與繁殖率。普通豇豆在花粉母細胞 (pollen mother cell, PMC) 減數分裂的四分子期之後對高溫

最為敏感 (Ahmed et al., 1992)。在花開前高夜溫 (33/30°C) 處理會有高達 78% 的花粉失去活力，其外表皺縮，無法被螢光染色且觀察不到萌發孔。花藥內絨氈層提早退化，可能為花粉粒發育異常、花粉活力下降之主因。此外，花藥囊無裂孔出現、花藥無法開裂，造成結莢率的下降 (Ahmed et al., 1992; Warraga and Hall, 1984b)。大麥 (*Hordeum vulgare* L.) 花穗在開花前 10 - 20 天遭受 30°C 高溫時，可在花藥上觀察到發育異常之花粉粒，也觀察到花藥腔內絨氈層不正常之退化 (Sakata et al., 2000)。以高溫處理 (33 °C, 0、6、48 與 120 hr) 甜椒 (*Capsicum annuum* L.) 不同發育階段之花蕾，以發育第一與第四階段花蕾對高溫較敏感。此兩發育階段分別是小孢子減數分裂期與小孢子成熟期，即分別為開花前 14 - 17 天與開花前 3 - 5 天。在此兩階段經高溫處理 120 hr 後著果率分別降至 14% 與 8% (Erickson and Markhart, 2002)。

溫度不僅影響花藥、花粉發育，也會影響花粉萌芽率及花粉管的生長。溫度對模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 花粉的萌發扮演著決定性影響，其花粉萌發最適溫度為 22°C，低於 20°C 或高於 24°C 花粉萌發率都會降低許多，且容易產生花粉管變形、破裂的現象 (Boavida and McCormick, 2007)。樹豆 (*Cajanus cajan* (L.) Millsp., pigeonpea) 花粉萌發之最適溫度介於 22 - 27°C，低於 17°C 時萌發率低、甚至不萌發。高於 32°C 則花粉破裂情形顯著提升，而花粉萌發率與花粉管伸長之長度具正相關性 (Singh et al., 1992)。小麥 (*Triticum aestivum* L.) 花穗遇 30°C 高溫逆境時，授粉後雌蕊上之花粉數與花粉萌芽率皆與未遭受高溫逆境之植株相似，但到達子房之花粉管數量顯著減少，花粉管異常生長 (Saini et al., 1983)。花生 (*Arachis hypogaea*) 在開花前三天與開花期暴露於 33°C 以上的高溫下 1 天，即顯著降低著果率。若於開花前暴露於 39°C 的高溫下，植株著果率、花粉活力、花粉萌發率與花粉管長度皆會大為降低，並且開花前 3 - 4 天與開花期之高溫對花粉活力的影響最大 (Vara-Prasad et al., 2001)。Kakani 等 (2002) 研究 21 種花生，各品種花生之生長最適溫雖有差異，但高溫皆會迅速減低其花粉萌發率與花粉管之伸長。

(2) 溼度

部分雙胞花粉在乾燥環境下，能忍受高溫。菸草 (*Nicotiana rustica* L.) 花

粉分別置放在高溫 (38°C 或 45°C) 乾燥的環境、或在常溫 (20°C) 但高溼的環境下 4 小時，花粉活力都與剛從花藥釋出的新鮮花粉相當，體外 (in vitro) 萌發率可達 80% 以上。而經高溫 (45°C) 且高濕處理的花粉，其萌發率降到 0%。顯示單獨高溫或高濕不會影響菸草花粉活力，但高溫且高濕的環境則使菸草花粉活力快速下降 (Shivanna et al., 1991)。有些花粉含水量高且不耐乾燥，例如未經乾燥的三胞高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 花粉萌發率約 50%，乾燥 30 分鐘花粉即失去活力 (Lansac et al., 1994)。一般認為降低溫度、水分含量或氧氣可延長花粉儲藏壽命 (Barnabas and Kovacs, 1997; Ganeshan et al., 2008; Hong et al., 1999)。

(二) 花粉活力檢測方法

許多與花粉相關之研究，都要測定花粉的活力，尤其在花粉保存、植物生殖學研究以及雜交育種等方面，測定花粉活力甚為重要 (Dafni and Firmage, 2000; Heslop-Harrison et al., 1984; Stone et al., 1995)。為進行人工輔助授粉或雜交授粉，需要採集和儲藏花粉，常藉助一些指標以清楚快速得悉花粉的活力與壽命。建立各類作物簡易、可靠且能實際利用的花粉活力檢定方法，對於育種及採種都極有助益 (Shivanna and Rangaswamy, 1992)。常使用的檢測方式有：

1. 花粉離體 (in vitro) 培養

將花粉置於培養基上，計算花粉發芽率及花粉管生長以評估花粉活力。此法簡單易行且便於觀察花粉發芽與花粉管生長，瞭解花粉生理與生化上之變化，並可探討物理及化學因子對於花粉之影響，是花粉生理學上最常使用的一種技術 (Steer and Steer., 1989)。以此法檢測花粉活力通常與結實數據具高相關性，故為最被接受的花粉活力測試方法 (Dafni and Firmage, 2000; Janssen and Hermsen, 1976; Visser, 1955)。

植物種類影響所需培養基配方，大部分植物的花粉需有合適的培養基組成，包括糖、硼酸、鈣離子等及適當 pH 值、溫度溼度等環境下，才能順利發芽。因此需先篩選最適合的培養基成分和培養條件，使大部分有活力之花粉得以萌芽 (DeGraaf et al., 2001; Ferri et al., 2008; Johri and Vasil, 1961; Stanley and Linskens, 1974)。有些作物之花粉在人工培養基上無法發芽或發芽率很低，即不

適合用此方法評估正確之花粉活力 (李等, 1989)。培養基影響花粉發芽之主要因素有培養基型態、蔗糖濃度與滲透壓的維持、無機鹽分以及培養基 pH 值等 (Chagas et al., 2008; Shivanna and Rangaswamy, 1992)。

(1) 培養基型態

依培養方式及培養基型態，花粉離體培養可分成下列幾種：(1) 液態 (liquid) 培養，如懸滴 (hanging drop)、點滴 (spot test) 及穴滴 (well test) 法；(2) 半固態 (semi-solid) 或稱半液態 (semi-liquid) 培養，如膠體 (agar or gelatin) 培養法；(3) 固態 (solid) 培養，如薄膜培養 (membrane supports) 等，選用方式依花粉物種不同而異 (Stanley and Linskens, 1974)。植物的柱頭型態可分為乾柱頭 (dry-stigma) 及濕柱頭 (wet-stigma) 兩類。濕柱頭表面會產生柱頭分泌物，而乾柱頭表面則無。雙胞花粉植物多為濕柱頭，一般可於液態或半液態培養基中發芽；但大部分三胞花粉植物屬於乾柱頭，在離體培養不易發芽 (Heslop-Harrison, 1977)。豆科、蝶形花亞科植物多為雙胞花粉，柱頭為濕柱頭，如豬屎豆屬 (*Crotalaria*)、山羊豆屬 (*Galega*)、岩黃耆屬 (*Hedysarum*)、香豌豆屬 (*Lathyrus*)、百脈根屬 (*Lotus*)、羽扇豆屬 (*Lupinus*)、苜蓿屬 (*Medicago*)、草木犀屬 (*Melilotus*)、驢食豆屬 (*Onobrychis*)、芒柄花屬 (*Ononis*)、四棱豆屬 (*Psoralea*)、槐屬 (*Sophora*)、苦馬豆屬 (*Strongylodon*)、三葉草屬 (*Trifolium*) 及蠶豆屬 (*Vicia*) 等 (Heslop-Harrison, 1977)。

目前花粉離體發芽試驗多以液態或半液態 (膠體) 培養為主，吸取配置好的溶液滴於凹槽載玻片上，再將花粉均勻撒播於其上，置於放有潮濕濾紙之培養皿中防止水分蒸散，在適當時間觀察花粉萌發情形。但有些植物如棉花花粉在以上各種液態、半液態培養法測試均不理想 (Stanley and Linskens, 1974)。

Alexander and Ganeshan (1989) 利用前人 (La Cour and Faberge, 1943; Narasimhan, 1963) 提出之玻璃紙 (cellophane) 培養方法，可使無法在懸滴培養的茄子 (*Solanum melongena*)、甜椒 (*Capsicum annuum*)、普通豇豆、關華豆 (*Cyamopsis tetragonoloba*) 及芒果 (*Mangifera indica*) 花粉成功萌發。並提高翼豆 (*Psophocarpus tetragonolobus*)、鵲豆 (*Dolichos lab lab*)、絲瓜 (*Luffa cylindrical*)、茶香玫瑰 (hybrid tea rose) 和人心果 (*Achras zapota*) 的花粉萌發

率至 50% - 60% (懸滴培養之萌發率僅約 10%)。

(2) 蔗糖濃度與滲透壓的維持

糖類在花粉離體培養基中主要有兩項主要功能，其一是滲透壓的調節，其二則是提供花粉代謝所需之養分。通常，花粉本身的養分可以作為發芽和花粉管早期生長所需。若長時間培養，外加的糖可提供花粉管後期繼續生長所需的養分。故須有適當的糖類濃度以利花粉發芽與花粉管生長 (Johri and Vasil, 1961)。通常雙醣比三醣及四醣更有利於花粉萌發，而蔗糖是雙醣中效果最好也最被廣泛使用的糖類。少數植物使用果糖 (fructose)、葡萄糖 (glucose) 或棉子糖 (raffinose) 有促進花粉萌發和花粉管生長的效果 (Chiang, 1974)。B&K 培養基使用 10% 蔗糖，可適用於 86 種不同植物，且多數植物花粉均可在此濃度下發芽 (Brewbaker and Kwack, 1963)。不同作物花粉萌發培養基最適的蔗糖濃度不同，如甜椒為 5 - 10% (Mercado et al., 1994)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 為 10% (張, 2006)、扁蒲 (*Lagenaria siceraria*) 為 35% (Vasil, 1960) 等。

四季豆花粉以 15% 蔗糖濃度最適合 (Farlow et al., 1979)，亦有使用高達 40% 蔗糖濃度之報告 (Gurusamy et al., 2007)。可能為培養基其他組成分不同所致，前者硝酸鈣 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 濃度高 (1200 ppm) 且另外添加 0.1% Vegemite (濃縮酵母菌萃取物)，pH 7.3，並以 2% agar 調製成固態培養基；後者硝酸鈣濃度較低 (600 ppm)，並加上 H_3BO_3 、 MgSO_4 及 KNO_3 各 400 ppm，pH 8.3 - 8.5，不添加 agar 以液態培養花粉；此外，試驗所選用之品種不同也可能造成差異。大豆花粉則於 5% 蔗糖濃度下即發芽良好 (Gwata et al., 2003)。

一般固態培養基較毋須做滲透調節，然而有些植物花粉較適於在液態環境下培養，或是液態培養基之配製與操作上較固態培養簡易，液態培養越來越常被應用。但花粉在液態環境中對培養基的滲透壓高低反應快而敏感，故調節培養基滲透壓有其必要。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一種無活性 (inert)、不易被植物代謝、非離子性的中性長鏈聚合物，有許多不同的分子量 (200 - 20000)，易溶於水，對哺乳類動物有輕微毒性。在植物生理方面的研究常做生長物質的攜帶者及當滲透調節劑。PEG 與蔗糖具協同作用，兩者可能藉由調整細胞膜的滲透性和物理狀態來影響花粉發芽，與甘露醇 (mannitol)、山

梨糖醇 (sorbitol) 及異戊四醇 (pentaerythritol) 等均常被用來做培養基的滲透調節 (李等, 1989; Shivanna, 2003)。Dickinson (1968) 使用 PEG 於百合花粉發芽試驗, 結果並不理想。然而 Ferrari 和 Wallace (1975) 指出, 難發芽的十字花科作物, 如甘藍可藉 PEG 處理而促進花粉發芽。其他作物如矮牽牛 (*Petunia hybrida* Vilm.)、介壽果 (*Anacardium occidentale* L.), 發芽情形皆可藉由 PEG 改善。PEG 並非生長基質, 其改善發芽可能因調節培養基滲透壓及影響膜的通透性。李等人 (1989) 添加 PEG 於百香果花粉體外培養基, 除了提高花粉發芽率之外, 同時增進花粉管之伸長, 與在介壽果與矮牽牛同樣效果, 顯示 PEG 會影響生長中的花粉管胞壁之伸展性 (extensibility)。PEG 不同於蔗糖並不會被花粉吸收而影響細胞代謝, 故其改變培養基物理條件遠比化學條件為重要, 且可降低離體培養基所需之蔗糖濃度 (Shivanna, 2003)。但單以高濃度 PEG 當滲透調節劑, 不足以提供花粉發芽基質, 同時 PEG 合成純度問題易造成毒性或抑制作用 (Lagerwerff et al., 1961)。

甘露醇與山梨糖醇雖和 PEG 同為滲透調節劑, 但並不如 PEG 般地促進花粉發芽; 或因其分子量較小, 容易進入花粉內干擾花粉代謝活動和滲透狀況。因此, 相較於 PEG, 甘露醇及山梨糖醇較不適合當外在滲透調節劑 (李等, 1989)。

(3) 培養基 pH 值

培養基之 pH 值對花粉萌發與花粉管生長相當重要, 適合花粉體外發芽與花粉管生長之 pH 值與柱頭之 pH 值相近 (Adhikari and Campbell, 1998; Sharma and Shivanna., 1983)。不同物種或品種花粉所能耐受之 pH 值範圍有差異, 低 pH 值下花粉會大量吸收氫離子使細胞膨壓上升, 致使花粉細胞質滲出 (Johri and Vasil, 1961); 高 pH 值下則可能會形成硼離子毒害, 影響花粉萌發 (Kim et al., 1985)。一般以弱酸性至中性的培養基花粉發芽率較佳, 而 pH 4 以下多半難以發芽 (Calzoni et al., 1979; Nygaard, 1969; Sidhu, 1983)。

Farlow 等人 (1979) 指出四季豆花粉離體培養以 pH 7.3 有較佳之花粉萌發率, 而 Gurusamy 等人 (2007) 為增進菜豆屬種間雜交成功率, 以 pH 8.5 - 8.8 之培養基進行花粉培養, 可獲 74.9% 的發芽率。甜豌豆 (*Lathyrus odoratus*) 最

適培養基 pH 值介於 6 - 8 間，而 pH 7 時花粉發芽率最高 (Brink, 1925)。

(4) 培養基其他組成分

鈣 (Ca)：花粉在培養基上之發芽率往往與花粉密度成正相關，即所謂花粉群體效應 (pollen population effect; crowding effect)，而鈣離子濃度為群體效應產生之影響因子 (Brewbaker and Kwack, 1963)。Luza 與 Polito (1985) 將培養基中鈣離子濃度提高至 1 mM，能有效增加英國胡桃 50% 的花粉萌芽率。此外，鈣離子直接參與花粉管頂端的生長，且是調控細胞膜代謝的重要陽離子，維持細胞膜的結構與功能，是花粉萌芽必需的元素，但過高的鈣濃度會抑制花粉管的生長 (Derksen et al., 1995; Steer and Steer, 1989)。

硼 (B)：許多研究花粉離體培養之報告指出，培養基中添加濃度適合之硼離子可促進花粉體外發芽與花粉管伸長 (Luza and Polito, 1985; Rosell et al., 1999; Viti et al., 1990)。硼對花粉生長的影響主要在於花粉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及花粉內部滲透壓調節等生理作用，促進花粉發芽與花粉管生長 (Taylor and Hepler, 1997)。在無硼的培養基中，花粉管型態畸形短小，生長異常、緩慢，花粉發芽率明顯降低。

柱頭分泌物與花柱組織：植物柱頭型態依柱頭分泌物有無可分為乾柱頭及濕柱頭。而花柱組織富含糖、多糖、糖蛋白、脂質等，這些成分被認為與花粉管生長 (如黏合、營養、方向指引、訊號等) 有關。柱頭分泌物及花柱組織之作用依植物種類而異，有些幫助花粉的萌發及引導花粉管伸長，有些則有抑制作用，如番茄花柱組織中的阿拉伯糖蛋白 (Arabinogalacton proteins, AGPS) 具有調節花粉管生長的功能，能夠刺激花粉管生長 (Cheung, 1996)。苦瓜授粉時，柱頭上乳突組織會分泌物質與花粉進行辨識，使花粉快速發芽 (張等, 1999)。但具孢子體型自交不親合性之作物如甘藍、百香果，花柱組織對花粉發芽可能促進或抑制作用，端看柱頭與花粉基因型而定 (李等, 1989; Ferrari and Wallace, 1975)。

2. 植體內 (in vivo) 發芽測定

一般將待測花粉直接授於植株柱頭上，經一定時間後再使用苯胺藍 (aniline

blue) 染色，觀察花粉於柱頭上的萌發與花粉管在花柱內伸長及達到子房、胚珠的情形，以判斷花粉之活性。花粉內壁含大量胼胝質 (callose)，萌發時胼胝質會圍繞花粉管內壁。而胼胝質會吸收苯胺藍，於藍光或紫外光照射下發出螢光。花柱組織沒有胼胝質，因此可清楚觀察花粉管於花柱內的生長情形 (Kho and Baër, 1968)。此方法直接且可信度高，但是無法處理大量樣品、耗時，實用性有限。此外，受精結實率還受其他因素如柱頭接受性、受精後子房是否敗育或不親合及溫度等影響；也不容易定量柱頭上花粉的萌發率與花粉管在雌蕊中生長的數量 (Abdul-Baki, 1992; Rosell et al., 1999)。

3. 組織化學 (histochemical) 染色法

組織化學染色法常被用來檢測花粉活力。主要係利用不同染劑對花粉粒之特定成分或組織進行染色，或測定花粉內特定酵素的活性，間接評估花粉活力。其優點是快速簡便，可處理之樣品數更多。常用的染色法有：Alexander 染色法、四唑鹽類測試法 (tetrazolium test)、雙醋黃螢光 (Fluorescein diacetate, FDA) 染色法、碘化鉀 (KI) 染色法、醋酸洋紅 (Carmino acetic acid, CAA) 染色法、p-Phenylenediamine 試劑法以及 X-Gal 測試等 (Brewbaker and Kwack, 1963; Cerovic et al., 1998; Dafni and Firmage, 2000; Issarakraisila and Considine, 1994)。

(1) Alexander 染色法

此由 Alexander (1969) 提出，染劑溶液中主要含孔雀石綠 (malachite green) 及品紅酸 (acid fuchsin) 兩種染劑。孔雀石綠可將花粉壁染成綠色，品紅酸則將成熟花粉之原生質及粒線體染成深紅色，不成熟花粉因無原生質而只有花粉壁被染成綠色。另外以橙 G (orange G) 作為背景染色劑，可增進區分度。三種染劑以適當比例調配，再依花粉壁厚度調整 pH 值，可將稔實花粉染成紅色，不稔實花粉染成綠色 (Alexander, 1969; Alexander, 1980)。

(2) 四唑鹽類測試法 (tetrazolium test)

四唑鹽類測試法是早期常使用的花粉活力測試方法之一。其中三苯基氯化四氮唑 (TTC, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 是最常使用的四唑鹽類 (Shivanna and Rangaswamy, 1992; Stanley and Linskens, 1974)。其原理是利用花

粉內呼吸作用中具活性的脫氫酶 (dehydrogenase) 和原本無色氧化態的四唑鹽反應，將之還原成無法透過細胞膜的紅色化合物 triphenyl formazan，而使花粉呈現紅色。在許多植物花粉活力以此法檢測，但有研究表示 TTC 測試結果常和花粉離體萌芽測試與授粉結實結果不相關 (Heslop-Harrison et al., 1984; Stanley and Linskens, 1974)。

TTC 染劑溶液之調配依作物種類不同而異，一般是將 0.2% - 0.5% 的 TTC 溶於適當濃度的蔗糖溶液中冷藏備用。以滴管取適量 TTC 溶液滴於載玻片上再將花粉均勻撒播上去，花粉培養於 TTC 溶液中 30 - 60 分鐘後觀察，將呈現均勻且鮮紅色的花粉判定為有活力，淡紅或無色者為無活力。由於花粉呈色從無色、淡紅到深紅為漸進式變化，界定有活力花粉較困難且主觀，必須有相當經驗 (Ak and Kaska, 1998; Cook and Stanley, 1960; Huang et al., 2004; Shivanna and Rangaswamy, 1992)。

(3) 雙醋黃螢光 (fluorescein diacetate, FDA) 染色法

雙醋黃螢光 (FDA) 染色法或稱螢光反應 (fluorochromatic reaction, FCR) 測定法，是由 Heslop-Harrison 與 Heslop-Harrison (1970) 所提出的花粉活力評估法。螢光染劑 (fluorescein diacetate, FDA) 本身不具極性和螢光，可自由進出花粉細胞膜，FDA 進入細胞內被脂酶 (esterase) 水解後形成會釋出螢光的螢光素 (fluorescein)。螢光素因具極性、不能通過完整細胞膜，累積在花粉細胞質中，可以螢光顯微鏡觀察到花粉發出黃色螢光，若花粉細胞膜不完整則螢光素擴散出花粉粒，故以發出螢光的花粉數目評估花粉活力。若花粉粒中的脂酶失去活性，花粉也不會產生螢光。故此法可評估花粉營養細胞原生質膜的完整性，以及花粉細胞質中脂酶的活性 (Shivanna and Rangaswamy, 1992)。

(4) 其他化學染色法

醋酸洋紅 (Carmino acetic acid, CAA) 染色法係對完整細胞的染色體及核酸進行染色 (Cerovic et al., 1998)。碘化鉀 (KI) 染色法為根據花粉粒中的澱粉含量，評估花粉粒活性。X-Gal 測試是使用 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside 試劑偵測 β -半乳糖糖苷酵素，花粉粒轉為藍色則視為有活力。p-Phenylenediamine 試劑法為測試花粉中過氧化氫酵素 Myeloperoxidase 的存在，

有活力的花粉會轉變為黑色 (Rodriguez-Riano and Dafni, 2000)。

許多報告顯示化學檢測結果與實際花粉活力有高度相關性。但亦有研究顯示化學染色法會染到其它不具生命或不正常花粉，而可能高估花粉活力，因此以上常使用的 Alexander 染色法、TTC 染色法、醋酸洋紅 (CAA) 染色法與 X-Gal 等酵素染色結果不能真正代表花粉活性 (Dafni and Firmage, 2000; Sedgley and Harbard, 1993; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)。一般仍會與離體培養萌發結果進行相關性比對。許多植物花粉在最佳培養基的萌發率與 FDA 染色結果具高相關性，證實花粉螢光反應是可行的花粉活力測試法。在缺乏適當的花粉離體培養基時，FDA 染色法可做為花粉活力的指標。此法反應快，操作方便，估計花粉活力準確性高，是相當普遍使用的花粉活力測試方法 (Heslop-Harrison et al., 1984; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)。

4. 花粉授粉結實檢測法

花粉活力是指花粉在柱頭上發芽、傳遞雄配子到胚囊完成受精，進而產生果實與種子的能力。因此，最可靠的檢測方式是藉由控制授粉，觀察著果與結實情形來評估花粉活力 (Heslop-Harrison et al., 1984; Shivanna and Rangaswamy, 1992)。但此法需要較多時間，只能在植物開花期進行，柱頭之接受能力以及它與花粉的親和性會影響結果。另外，還有受精後其他因素影響種子發育與結果，不適用於會無融合生殖 (apomixes) 的植物。因此，以授粉觀察結實的方法較偏向質的測試而難以定量，不適用於需要大量快速的花粉檢測，但可用來確定其他花粉活力測試的結果 (Shivanna and Rangaswamy, 1992)。

以上各花粉活力檢測方式各有優缺點，適用性亦因作物種類而有差異。染色法一般被認為會高估花粉活力，需與體外萌發法之結果進行比較，以確認染色法的相關性。如 Ferreira 等人 (2009) 分別以 Alexander、TTC 及 FDA 檢測三種豆科、野百合屬 (*Crotalaria*) 植物之花粉活力，並與體外萌發法相比較，其中以 5% TTC 添加於 50% 之蔗糖溶液中之 TTC 染色法，以及 FDA 染色法之結果與體外萌發結果最為接近，而可利用此兩種方法快速評估這些植物的花粉活力。

第三章、材料與方法

一、試驗材料

參試材料選用長豇豆‘三尺青皮’(購自屏東縣里港農會)與‘麗人’(購自農友種苗公司)兩蔓性品種,以及‘矮長豆’(購自桃園新社種子行)與‘農友矮生’(購自農友種苗公司)兩矮性品種。‘三尺青皮’莢色青綠,莢尖紫色,種皮為黑色,熟期晚。‘麗人’莢色白綠,種皮紅褐色,特早生,分枝少。‘矮長豆’及‘農友矮生’豆莢淺綠,種皮紅褐色,節間短分枝性強,其中‘農友矮生’抗病毒病。

二、栽培環境與植株生長

於2010年3月至8月種植長豇豆於台灣大學生農學院人工氣候室,同年5至8月種植另批於園藝分場。種子播種前以漂白水1000倍溶液浸種20分鐘進行消毒,再播種於72格穴盤,待第一對本葉完全展開時定植。

園藝分場:試驗田區高架泥磚植槽(長x寬x高=296x78x52cm)3個,種植前先拌入台肥43號(15-15-15-4)及過磷酸鈣為基肥。長豇豆苗每品種各定植16株,但‘三尺青皮’在2個植槽各種16株,共32株。定植兩週後,每週以台肥活力生技營養劑1號(5-5-5-1)稀釋500倍、作為追肥,灌施兩次。蔓性品種於抽蔓時立人字型支架供豆蔓攀爬,矮性品種則不立支架。依慣行法管理,必要時噴施農藥防治田間蚜蟲、夜盜蛾、豆莢螟等蟲害。田間5-8月之日/夜均溫分別介於20.5-34.1°C/18.9-29.1°C,日/夜平均相對溼度介於47.9-84.7%/51.2-85.8%(資料來源:台灣大學大氣科學系測計實驗室)。

人工氣候室:植株定植於直徑16.5cm塑膠盆,每盆兩株。介質為滿地王三號(農友種苗公司),基肥與追肥之施用與園藝分場田間相同。蔓性品種每盆立支柱供豆蔓攀爬,矮性品種不立支柱。視情況噴施農藥防治溫室內粉蝨、蟎類等蟲害。

調查各品種於園藝分場及人工氣候室不同環境下之抽蔓日期(僅蔓性品種)、第一花苞出現節位、時間、始花日期及花苞發育時間。抽蔓日期、花苞出現時間與始花日均以播種後天數表示。抽蔓以主莖節間抽長、頂梢開始發生纏繞呈現彎曲為標準(圖1-A);花苞出現之判斷係以花梗抽出且第一花苞長>0.5cm為準

(圖 1 - B)。節位以子葉以上之節位計數 (不包含子葉節)；花苞大小是每日 8 -9 am 以尺量測、自花萼基部至花苞頂部的長度 (圖 1 - C)。以上各調查項目均隨機採自三株不同植株，每株一朵花。

三、花藥開裂與花粉萌發

花藥開裂時間調查分成花藥外觀觀察與花粉在花柱體內 (in vivo) 萌發兩部分。

(一) 花藥外觀觀察：

長豇豆植株種植於人工氣候室日/夜溫 30/25 °C，待第一花苞出現、植株進入生殖生長期時，分成日/夜溫 30/25 °C 及 25/20 °C 兩處理，以比較不同栽培溫度之花部發育與花藥開裂時間。於花開前一天晚上 7 點至凌晨零時 (19:00 - 00:00) 每整點各品種取樣，每重複取 5 個花苞，共二重複。以鑷子小心劃開花瓣，經肉眼觀察顯露出來之花藥及柱頭，依花藥外和柱頭上有無花粉判斷花藥開裂與否 (圖 2)，並計算花藥開裂率，比較不同栽培環境、品種間之差異。

(二) 體內 (in vivo) 萌發觀察：

觀察‘矮長豆’與‘三尺青皮’兩個品種之花粉萌發情形。於花開前一天晚上 8 點 (20:00)、12 點 (00:00)、花開當天凌晨 4 點 (4:00) 及早上 8 點 (8:00) 連續四次取樣。每次採 3 朵，置於墊有潮濕濾紙之取樣盒，以防止花朵失水並立即帶回實驗室依 Kho 和 Baer (1968) 之方法循下列步驟進行樣品製備。

1. 樣品固定：將雌蕊浸於 F.A.A. 固定液 (福馬林：醋酸：50% 酒精 = 1：1：18 v/v) 24 hr 以上再以蒸餾水清洗三次。
2. 樣品軟化：固定後之樣品浸於 3N NaOH 溶液中，置於 60 °C 烘箱 2 hr 使組織軟化，再以蒸餾水小心清洗三次。
3. 樣品染色：將組織軟化樣品浸於含 0.1 % 苯胺藍 (aniline blue) 之 0.1 N 磷酸鉀溶液中進行染色 24 hr 以上。
4. 製片觀察：樣品染色取出後置於載玻片上，滴加甘油後以蓋玻片將之壓平，以螢光顯微鏡觀察花粉發芽及花粉管伸長情形。以數位相機拍照記錄並比較不同時間的花粉管生長情形。

四、花粉活力檢測

(一) 長豇豆花粉採集

於花開前一天晚上8點起至花開當日下午4點，每4小時取樣花苞或花 (20:00、00:00、4:00、8:00、12:00、16:00)，每次各品種分別取3朵花，置於墊有潮濕濾紙之取樣盒中以防止花朵失水，立即帶回實驗室進行活力檢測。

(二) 化學染色法檢測

分別以 Alexander、三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 與螢光染劑 (fluorescein diacetate, FDA) 三種染劑染色、檢測長豇豆花粉活力。

1. Alexander stain :

使用 Alexander (1969) 所提之染劑配方 (ethanol, 10 ml; 1% malachite green in 95% ethanol, 1 ml; Dist. H₂O, 50 ml; glycerol 25 ml; phenol, 5 gm; chloral hydrate, 5 gm; acid fuchsin 1% in water, 5 ml; orange G, 1% in water, 0.5 ml; and glacial acetic acid, 1-4 ml.) 進行花粉染色，配製好之染劑以鋁箔紙包覆，放置於室溫陰涼處備用。染色後以花粉能被染成紫紅色視為有活力之花粉。

2. TTC stain :

TTC 為白色粉末，參考 Singh 等人 (2008) 所提之最適合普通豇豆 (cowpea) 花粉染色之 TTC 染劑配法。將 3% 之 TTC 粉末溶於 20% 蔗糖溶液，配製好之染劑以鋁箔紙包覆並存放於 4°C 冷藏備用。染色後以花粉能被染成鮮紅色為有活力之花粉，而粉紅色、色淡或無色則視為無活力之花粉。

Alexander 及 TTC 染色操作與觀察步驟：將花粉置於載玻片上，滴入一滴 Alexander 或 TTC 染劑，以鑷子將花粉均勻散布於染劑溶液中，待花粉和染劑反應約 1 小時後，蓋上蓋玻片置於光學顯微鏡下進行鏡檢。每次各品種取三朵花，每朵花至少計數 300 粒花粉為一重複，計算花粉可染率作為花粉活力之參考。

3. FDA stain :

FDA 為黃色粉末。母液配製：取 5 mg FDA 溶於 1 mL 丙酮，貯存於 -20°C

冰箱備用。使用前，將 FDA 母液自冰箱取出，待回溫達室溫後取一滴 FDA 母液稀釋於 40 % 蔗糖溶液中 (FDA 母液 : 40 % sucrose = 1 : 49 v/v)。因 FDA 與水反應後易產生白色沉澱而失去功能，稀釋後之 FDA 溶液儘快使用完畢。

FDA 染色操作與觀察步驟：將花粉置於載玻片上，滴入一滴 FDA 溶液，以鑷子將花粉均勻散布於 FDA 溶液中。待花粉和 FDA 溶液反應約 15 分鐘，蓋上蓋玻片並於螢光顯微鏡下觀察，具有強烈且均勻螢光反應的花粉視為有活力花粉，利用計數器計數總花粉數及具有活力之花粉數，共三重複，每一重複至少計數 300 顆花粉。

(三) 體外 (in vitro) 發芽培養

1. 培養基型態

(1) 液態：配製好之培養基不添加 agarose powder，直接以滴管吸取，滴於載玻片上，再將花粉均勻撒至其上；或置於 -20°C 冰箱保存備用，使用前先回溫至室溫。

(2) 固態：分別有下列兩種

A. 洋菜固體培養：

培養基分別添加 0.9%、1%、1.3%、1.6% 及 1.9% 之洋菜粉 (agar)，製成固態培養基，取尚未凝固之培養液滴於載玻片上待其冷卻凝固，撒上剛釋放之花粉，放於有濕潤濾紙之培養皿中並加上蓋子 (或將煮好的培養基直接倒入小培養皿中約 1/3 高度，待其凝固後撒上花粉並加蓋)。

B. 玻璃紙 (cellophane paper) 固體培養：

參考 Alexander 和 Ganeshan (1989)，將濾紙裁切成每邊長 2 cm 之正方形，取 7 張疊成一冊，以釘書機將之固定。於最上方一張濾紙之下置一 1 cm 見方的可透水性透明玻璃紙，將此浸於受試培養基中 15 分鐘。之後取出並撕去最上方一張濾紙，使玻璃紙顯露於最上方。以乾淨濾紙將玻璃紙上之液體略為吸乾，撒上初釋放的花粉，放於小培養皿中並蓋上蓋子，置於室溫下培養。

2. 培養基之滲透壓調整

花粉體外萌發試驗採用 B&K (Brewbaker and Kwack, 1963) 液態培養基為基礎配方 (100 ppm H_3BO_3 、300 ppm $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 、200 ppm $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 ppm KNO_3 ，以 0.1 M HCl、NaOH 將 pH 值調至 7.0)。並調整蔗糖濃度，分別為 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55% 及 60%。

添加聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 4000：參考 Gurusamy 等人 (2007)、Jayaprakash and Sarla (2001) 與張 (私人連繫)，試驗濃度分別為 6%、6.8%、10%、15%、16%、16.7%、22.5%、24% 及 25%。搭配洋菜固體培養基時，因 PEG 對熱敏感，培養基煮製完成後、溫度降至 60–70 °C 以下時，將 PEG 加入攪拌溶解。

3. 培養基 pH 值

以酸鹼試紙檢測長豇豆柱頭酸鹼性，介於 pH 6 - 8 之間，故推測長豇豆花粉較適合於 pH 6 - 8 下萌發。而參試培養基之 pH 值先依照各參考文獻進行調整，若參考文獻未特別指出則暫不調整。受試後若花粉無法萌發，再以 0.1 M HCl 及 0.1 M KOH 將培養基 pH 值分別調整為酸性 (pH 5-6)、中性 (pH 7) (張, 2006) 或鹼性 (pH 8.5-8.8) (Gurusamy et al., 2007) 三種，進行試驗。

4. 其他添加物質

選用試驗後能控制長豇豆花粉不破裂之培養基 G2 與 BK2 (其組成如表 1)，分別加入長豇豆之柱頭組織 (切取柱頭前端約 0.2 cm 組織搗碎後加至培養基中)、或 50 ppm GA_3 (參考 Alexander and Ganeshan, 1989)、或 0.2% 小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (參考張, 1997) 進行試驗。

5. 花粉取樣時間

參考 Chijioke et al. (2010)，取下花苞後 5 分鐘內即將花粉撒播於製備好的培養基中。取樣有花開當天早上之花粉 (9:00 am 以前)，花藥剛開裂釋出之花粉 (約花開前一天晚上 9-10 點)。若花苞取下，其花藥尚未開裂，小心置於日光燈下，待花藥開裂後、撒播花粉至培養基。

以上各種培養基之花粉培養溫度均為室溫，培養及觀察時間至少為 24 小時，以花粉管長度超過花粉粒直徑兩倍者視為發芽，為有活力花粉。花粉管短於花粉粒直徑兩倍、花粉破裂細胞質滲出者都不視為發芽。各參試培養基之配方及其參

考來源列於表 1。

(四) 人工授粉

選用栽培於人工氣候室 30/25°C 及 25/20°C 兩種溫度處理之植株，分別進行‘矮長豆’與‘三尺青皮’兩品種、品種內之人工授粉，並檢測花粉活力。在人候室 25/20°C 處理中另增加兩品種間的雜交授粉。進行去雄及授粉時間如表 2。

1. 品種內人工授粉

- (1) 去雄：以鑷子劃開母本次日開花之花苞旗瓣、翼瓣及龍骨瓣，花瓣盡量保持完整並避免脫落。將花藥全數剪除，儘量不碰觸柱頭，並在龍骨瓣內塞進一小球濕棉球，避免柱頭接觸乾燥空氣，最後套上硫酸紙袋並予以標記。
- (2) 授粉：於花開前一天 20:00 起至花開當日 16:00，每隔 4 小時 (即 20:00、0:00、4:00、8:00、12:00、16:00) 進行取樣授粉，每時段各授粉至少十個柱頭。取同一品種之花粉授於已除雄柱頭。再塞進一新的濕棉球，套回硫酸紙袋。
- (3) 調查：授粉 2 天後取下硫酸紙袋，以花冠脫落 (圖 3-A)、幼莢長度 (為自花萼基部至豆莢頂端的長度 (圖 3-B) 大於 3 cm 且三天內不落莢視為結莢，記錄結莢與否。豆莢發育成熟後採摘，計算莢內成熟種子數，以授粉成功率與成熟種子數做為花粉活力之參考。

2. 雜交授粉

操作步驟同前述，但株數及花朵數有限，僅於花開當日 8:00、12:00 及 16:00 三個時間取兩個品種之花粉相互授粉，每時段各授粉至少十個柱頭，調查結莢率、成熟種子數。

以上各項試驗之參試品種及栽培環境整理成表 3。

表 1. 長豇豆花粉體外萌發試驗用之培養基配方。

Table. The medium tested and their composition for pollen in vitro germination of yard-long bean.

Medium	Sucrose (%)	HBO ₃ (ppm)	Ca(NO ₃) ₂ (ppm)	CaCl ₂ (ppm)	MgSO ₄ (ppm)	KNO ₃ (ppm)	PEG (%)	Agar (%)	Tris (ppm)	pH -	GA ₃ (ppm)	BSA (%)
B&K	10	100	300	-	200	100	-	- / 1	-	5.5	-	-
(Brewbaker and Kwack, 1963)												
G1	40	200	300	-	200	100	15	1	-	-	-	-
G2	40	250	300	-	200	100	15	1	-	-	-	-
G3	40	300	300	-	200	100	15	1	-	-	-	-
G4	40	250	200	-	200	100	15	1	-	-	-	-
G5	40	250	400	-	200	100	15	1	-	-	-	-
樹豆 (Jayaprakash and Sarla, 2001)												
BK2	30 / 40	400	600	-	400	400	- / 10 / 15	-	-	8.5-8.8	-	-
BK3	40	500	600	-	400	200	15	-	-	8.5-8.8	-	-
BK4	40	300	500	-	400	400	15	-	-	8.5-8.8	-	-
四季豆 (Gurusamy et al., 2007)												
張 01	30	100	-	150	-	-	-	1	-	-	-	-
張 02	15	67	-	100	-	-	16.7	1	-	-	-	-
張 03	20	50	-	75	-	-	25	1	-	-	-	-
苦瓜 (張, 1997)												

表 1. 續

Table 1. Continued

Medium	Sucrose (%)	HBO ₃ (ppm)	Ca(NO ₃) ₂ (ppm)	CaCl ₂ (ppm)	MgSO ₄ (ppm)	KNO ₃ (ppm)	PEG (%)	Agar (%)	Tris (ppm)	pH	GA ₃ (ppm)	BSA (%)
張 04	20	150	-	150	-	-	10	(- / 0.9 / 1	-	-	-	-
張 05	20	150	-	300	-	-	10	/ 1.3 / 1.6	-	-	-	-
張 06	20	300	-	150	-	-	10	/ 1.9)	-	-	-	-
張 07	20	300	-	300	-	-	10		-	-	-	-
(張有明，私人連繫)												
Robert's	20	100	-	362	-	100	-	1	95	-	-	-
藝苔屬 (Roberts et al., 1983)												
Chijioko's	10	100	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
班巴拉花生 (Chijioko et al., 2010)												
李 01	15	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-
李 02	15	20	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-
李 04	20	100	300	-	200	100	15	-	-	6.0	-	-
李 05	40	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(李，1987)												
Alexander's	15	100	300	-	200	100	-	-	-	-	50	-
(Alexander and Ganeshan, 1989)												

表 1. 續

Table 1. Continued

Medium	Sucrose (%)	HBO ₃ (ppm)	Ca(NO ₃) ₂ (ppm)	CaCl ₂ (ppm)	MgSO ₄ (ppm)	KNO ₃ (ppm)	PEG (%)	Agar (%)	Tris (ppm)	pH -	GA ₃ (ppm)	BSA (%)
A	40	200	-	200	-	-	10	- / 1	-	-	-	-
B	40	200	-	200	-	-	16	- / 1	-	-	-	-
C	30	250	-	250	-	-	15	- / 1	-	-	-	-
D	30	250	-	250	-	-	22.5	- / 1	-	-	-	-
E	20	350	-	350	-	-	24	- / 1	-	-	-	-
F	20	350	-	350	-	-	6.8	- / 1	-	-	-	-
G	40	400	-	400	-	-	6	- / 1	-	-	-	-
H	35	350	-	350	-	-	6	- / 1	-	-	-	0.2
G2-BSA	40	250	300	-	200	100	15	- / 1	-	-	-	0.2
G2-GA ₃	40	250	300	-	200	100	15	- / 1	-	-	50	-
G2-柱頭	40	250	300	-	200	100	15	- / 1	-	-	-	-
BK2-BSA	40	400	600	-	400	400	- / 15	- / 1	-	8.5-8.8	-	0.2
BK2-GA ₃	40	400	600	-	400	400	- / 15	- / 1	-	8.5-8.8	50	-
BK2-柱頭	40	400	600	-	400	400	- / 15	- / 1	-	-	-	-

(本研究設計配方)

表 2. 長豇豆進行人工授粉之去雄及授粉時間。

Table 2. Timing of emasculation and manual pollination for various yard-long bean crossing.

授粉組合 Cross	母本花苞 (授粉柱頭) 去雄時間 Emasculation time	花粉取樣及授粉時間 Pollen sampling & pollination time
品種內	花開前一日傍晚	花開前一天晚上 8 點 (20:00)
品種內	花開前一日傍晚	凌晨零時 (0:00)
品種內	花開前一日傍晚	花開當日清晨 4 點 (4:00)
品種內 & 品種間	花開前一日傍晚	花開當日早上 8 點 (8:00)
品種內 & 品種間	花開前一日之成熟花苞，去雄後直接授粉。	花開當日中午 12 點 (12:00)
品種內 & 品種間	花開前一日之成熟花苞，去雄後直接授粉。	花開當日下午 4 點 (16:00)

表 3. 長豇豆各項試驗參試品種及栽培環境一覽表。

Table 3. Test items and yard-long bean varieties used in the study.

試驗項目、參試品種與栽培條件		蔓性						矮性					
		‘三尺青皮’			‘麗人’			‘矮長豆’			‘農友矮生’		
		30/25 °C	25/20 °C	田間	30/25 °C	25/20 °C	田間	30/25 °C	25/20 °C	田間	30/25 °C	25/20 °C	田間
花藥開裂時間調查		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
花粉活力檢測	化學染色	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	體外萌發	V	V	V	V	V	-	V	V	V	V	V	-
	人工授粉	同品種	V	V	-	-	-	-	V	V	-	-	-
異品種		-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-

第四章、結果

一、環境對長豇豆生長之影響

長豇豆‘三尺青皮’和‘麗人’兩個蔓性品種及‘矮長豆’和‘農友矮生’兩個矮性品種分別定植於田間（田間 5-8 月日/夜均溫介於 20.5-34.1 / 18.9-29.1 °C 間，日/夜平均相對溼度介於 47.9% - 84.7% / 51.2% - 85.8%）、人工氣候室日/夜溫 30/25 °C 與 25/20 °C 三種環境下。田間與人候室均採自然光源。

兩種蔓性品種抽蔓都以田間最早，‘三尺青皮’平均播種後 19.6 天、‘麗人’在播種後 17.6 天進入抽蔓期（表 4）‘麗人’抽蔓時間在三種栽培環境下具顯著差異；‘三尺青皮’在田間與 30/25 °C 處理差異不顯著，但明顯較 25/20 °C 早約 3 天抽蔓。兩品種都以 25/20 °C 處理最晚抽蔓。除‘三尺青皮’外，第一花苞出現及始花日期均以 25/20 °C 之處理最晚（表 4）。

除‘三尺青皮’外，第一花苞出現及始花日期均以 25/20 °C 之處理最晚。‘麗人’、‘矮長豆’、和‘農友矮生’在 25/20 °C 處理分別於播種後 25.3、30.6、及 33.3 d 有可見花苞，於播種後 34.3、41.6 及 42.6 d 始花開放。在田間與 30/25 °C 處理，它們都於播種後 23.3-31.0 d 出現第一花苞，並較快開花，於播種後 28.3-36.6 d 始花，兩個環境的日期差異不顯著。‘三尺青皮’第一花苞出現及始花日期分別為播種後 39.3-42.3 d 及 48.3-50.0 d；第一花苞出現以 25/20 °C 處理最早，始花日期以田間最早。

四個品種之花苞發育、至花開所需時間均以 25/20 °C 處理最長，其中蔓性的‘三尺青皮’及矮性的‘矮長豆’長達 11 天，‘麗人’和‘農友矮生’需時約 9 天，和栽培在田間與 30/25 °C 處理有顯著差異。‘麗人’的花苞發育最快，在 30/25 °C 與田間花開需時約 5.0-5.3 d；其它三種約需 5.6-7.6 d，田間與人候室 30/25 °C 處理差異不顯著（表 4；圖 4）。三個栽培環境對四個品種的第一花苞出現節位沒有顯著影響，但品種間有差異。‘三尺青皮’之始花節位最高，平均達 8 節以上，而其餘三個品種平均節位都在第 3 節左右（表 4）。

二、長豇豆花藥開裂時間

以肉眼觀察四個品種之花藥開裂，花藥均於花開前一天晚上7點起陸續開裂，至當晚12點全數開裂完畢。各品種表現有些不同：‘三尺青皮’不論栽培於人候室日夜溫30/25、25/20°C或田間，其花藥開裂時間較其他三個品種一致。‘麗人’於田間花藥最快全數開裂，於人候室日夜溫30/25°C次之，以25/20°C最慢。‘矮長豆’亦於田間最快完成花藥開裂，在30/25°C及25/20°C下皆於晚上11時已完成開裂。‘農友矮生’在30/25°C及25/20°C下皆於晚上10時已全數開裂；而於田間較晚（晚上11時）達到全數開裂（圖5）。

以aniline blue將花柱染色並透過螢光顯微鏡觀察花粉於柱頭上著生及花粉管萌發之情形（圖6）。開花前一天晚上八點，‘三尺青皮’和‘矮長豆’柱頭上，未見花粉著落。晚上12點之樣本，有花粉於柱頭上萌發；凌晨4點之樣本，柱頭上有許多花粉著生並萌發，也有深入的花粉管進入胚珠（圖6）。

由裸眼觀察花藥開裂與顯微鏡觀察花粉結果均可確定長豇豆花藥於花開前即已開裂，於清晨4點受精，而花苞於凌晨3點半之後才陸續開放。



三、花粉活力檢測

(一) 化學染色檢測

1. Alexander stain

各長豇豆品種於不同栽培環境下之花粉以 Alexander 染色結果如圖 7 所示。‘三尺青皮’在 30/25、25/20 °C 或田間，於 00:00、4:00 及 8:00 所採之花粉，染色率都在 95.82% 以上，並無顯著差異。到開花當日 12:00，田間植株花粉之可染率略降，在人候室 (30/25 °C 及 25/20 °C) 的花粉染色率延至 16:00 時降低，但仍維持在 86.5% 以上。‘麗人’於 25/20 °C 環境 8:00 後之樣本花粉染色率略降，到 12:00 時另兩個環境之花粉活力都有些下降，三個環境的花粉活力差異不大，介於 88.4% - 90.4%。‘矮長豆’花粉可染率以栽培在 30/25 °C 之植株較低，但隨著時間在三個栽培條件下之植株花粉可染率都逐漸降低，以 25/20 °C 條件下的花粉活力降低較少。‘農友矮生’在最早取樣 (20:00) 之花粉以 30/25 °C 環境有最高可染率 (94.72%)，其後花粉到次日早上 8:00 可染率降低，在三個環境下沒有顯著差異 (圖 7)。

2. TTC stain

長豇豆花粉以 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 染色，各品種染色結果都顯示開花當日中午之花粉活力降低 (圖 8)。「三尺青皮」植株花粉染色結果與 Alexander 染色法結果一致，染色率為四個品種中最高，田間植株花粉活力降低幅度最大，在開花當日 12:00 及 16:00 時染色率分別為 69.2% 及 28.9%，顯著低於人候室之植株花粉。各環境下‘麗人’於開花當日 8:00 之花粉染色率已由前一晚的 89.7% - 92.7% 降低為 77.4% - 85.9%；之後持續下降，種於田間的植株花粉可染率在 16:00 僅 19.6%。兩個矮性品種‘矮長豆’和‘農友矮生’的花粉活力表現也大致相似，都在 16:00 以田間樣本最低，分別為 24.8% 及 28.6%。又‘矮長豆’之花粉活力降低速率比‘農友矮生’顯著 (圖 8)。

3. FDA stain

長豇豆花粉以 FDA (fluorescein diacetate) 染色，染色率明顯較 Alexander 或 TTC 染色法低 (圖 9)。「三尺青皮」於清晨 4:00 以前，各栽培環境之花粉螢光染色率介於

16.79% - 25.45%，8:00 時的花粉活力降到 1.59% - 5.38%，至 16:00 時田間植株花粉降低。‘麗人’於三個栽培環境下，花粉螢光反應無明顯差異，皆於 8:00 顯著性下降。兩個矮性品種之花粉染色率在開花前一晚 20:00 為 4.63% - 6.58%，到 00:00 時‘矮長豆’可達最高染色率 (18.97% - 22.83%)；而‘農友矮生’在 4:00 時，花粉才有最高染色率 (25.29% - 26.42%)。四個品種都在 8:00、12:00 和 16:00 時花粉活力隨時間快速下降 (圖 9)。

(二) 花粉體外 (in vitro) 發芽與發芽培養基條件

長豇豆花粉體外萌發檢測最先採用 B&K 培養基進行花粉培養，蔗糖濃度為 10%，結果各品種的花粉均破裂 (圖 13 - A)，花粉細胞質滲出。將培養基蔗糖濃度調配成 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55% 及 60%，隨著濃度的上升，花粉發生破裂的速度減緩，但低於 50% 蔗糖濃度，花粉細胞質仍因花粉破裂而最後滲出。蔗糖濃度達 50% 以上才能抑制花粉破裂 (圖 13 - B)。高於 60% 之蔗糖濃度則導致花粉失水皺縮，故適合長豇豆花粉之蔗糖濃度介於 50 - 60%。但 B&K 培養基搭配以上不同蔗糖濃度均未能使長豇豆花粉萌發。

添加聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 做為培養基的滲透調節物質，並降低蔗糖濃度 (20-40%) 而添加不同濃度之 PEG (6%、6.8%、10%、15%、16%、16.7%、22.5%、24% 及 25%)。只有在蔗糖濃度降至 40% + 15% PEG 可維持花粉不破裂，再低蔗糖濃度即使添加 PEG 對長豇豆花粉滲透壓的調節並不理想。雖然能使花粉不破裂，但所試培養基仍未使花粉成功萌發。培養基中 PEG 的添加並未抑制長豇豆花粉於培養基中破裂，顯示未能維持滲透壓的平衡。

長豇豆花粉培養於液態培養基，當蔗糖濃度低於 50%，花粉破裂、花粉細胞質滲漏速度較在固態培養基快。使用洋菜固態培養基進行培養，花粉滲漏情形於顯微鏡下較不易觀察。嘗試不同濃度之 agar 濃度 (0.9%、1%、1.3%、1.6% 及 1.9%)，或使用玻璃紙 (cellophane paper) 為培養介質，均無法使長豇豆花粉萌發。

調整培養基 pH 值，添加植物生長調節劑如 50 ppm GA₃、0.2% 小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 或長豇豆柱頭組織等，同樣無法使長豇豆花粉成功發芽 (表 5)。全試驗最佳培養結果為使用 BK2 (蔗糖濃度 40%) 培養基 (表 1)，但僅止於花粉有些許

萌發，花粉管並不能持續伸長至超過花粉直徑 (圖 13 - C)，不能判定為萌發。調整花粉採樣時間，初始選用花開當日早上 9:00 以前之花粉，後來選用花開前一日 21:00 - 22:00 花藥剛開裂、花粉初釋放之花粉，並於取樣後 5 分鐘內立即播撒於培養基，均未能使長豇豆花粉發芽。

(三) 人工授粉

1. 品種內授粉

(1) 授粉成功率

以栽培於人工氣候室 30/25 °C 及 25/20 °C 兩個環境之‘矮長豆’與‘三尺青皮’供試。於 30/25 °C 下，‘三尺青皮’在 0:00、4:00 及 8:00 取花粉進行授粉可有 60% 以上的成功率；而花開前一日 20:00、開花日中午 12:00 及 16:00 則有 40% - 50% 的成功率。栽培在 25/20 °C 之植株，於花開前一日 20:00、開花當日 0:00、4:00 進行授粉，可有 80% 以上的成功率。取開花當日 8:00 花粉進行授粉，成功率更達 100%。中午 12 點及下午 4 點授粉成功率分別為 50% 及 70% (圖 14 - A)。比較兩個栽培溫度下之授粉結果，在相同時間取樣授粉，以 25/20 °C 下之成功率高於 30/25 °C。

比較兩個栽培溫度下之授粉結果，在相同時間取樣授粉，以 25/20 °C 下之成功率高於 30/25 °C。相較於‘三尺青皮’在六個授粉時間均有 40% 以上成功率，‘矮長豆’在 30/25 °C 下之授粉結果，僅有凌晨零時及早上 8 點有 10% 的成功率，其餘時間均未成功。在 25/20 °C 下之授粉，除中午 12 點授粉未成功，其他時間授粉成功率介於 7% - 15% (圖 15 - A)。

(2) 種子數

計算授粉成功之豆莢內成熟種子數，與自然結莢之種子數相比，‘三尺青皮’人工授粉所獲之種子數以花開前一日 20:00、花開當日 0:00、4:00 及 8:00 授粉可得最多種子，達自然組的 80% 以上。花開當日 12:00 及 16:00 人工授粉所獲之種子數減少。除花開前一日 20:00 授粉、以 30/25 °C 環境結莢種子數較少外，長豇豆栽培在 30/25 °C 或 25/20 °C，人工授粉結莢種子數差異小 (圖 14 - B)。

‘矮長豆’人工授粉除成功率低外，所得豆莢內成熟種子數有隨授粉時間增加情形，以清晨 4 點最多。凌晨零點及 8:00 授粉所得的種子數分別為自然組的 70.20% 及 89.3%，開花前日 20:00 和花開當日 16:00 量最少，為自然組的 57.4%。不論栽培在 30/25 °C 或 25/20 °C，人工授粉成功的豆莢種子數相近 (圖 15 - B)。

2. 雜交授粉

同樣以‘三尺青皮’與‘矮長豆’為雜交材料，栽培於人工氣候室 25/20 °C 條件。以‘三尺青皮’為母本、‘矮長豆’為父本，於開花當日 8:00 授粉，成功率最高、80%。下午 4 點授粉成功率 70%，次之，中午 12 時成功率最低、40% (圖 16 - A)。但反交，以‘矮長豆’為母本、‘三尺青皮’為父本，於早上 8 點、中午 12 點或下午 4 點取花粉進行授粉，結莢率均為零。

‘三尺青皮’x ‘矮長豆’之雜交豆莢內成熟種子數與自然結莢的種子數相比，以花開當日 8:00、16:00 授粉所獲之平均種子數最高，分別為自然組的 82.0%、90.2%，中午 12 點授粉的種子數最低，為自然組的 73.3% (圖 16 - B)。



表 4. 四種長豇豆於不同栽培環境下之生長發育比較。

Table 4. Growth and development of four yard-long bean cultivars under different cultural conditions.

品種	栽培環境	播種至抽蔓日數 (天)	播種至第一 花苞出現日數 ^z (天)	第一花苞節位 ^y (節)	播種至始花日數 (天)	由花苞出現 至花開需時 (天)
‘三尺青皮’	Field	19.67 ± 0.57 b ^x	41.33 ± 0.57 a	8.33 ± 0.57 a	48.33 ± 0.57 b	7.00 ± 0.00 b
	30/25°C	21.67 ± 1.15 ab	42.33 ± 1.15 a	8.67 ± 0.57 a	50.00 ± 1.00 a	7.67 ± 0.57 b
	25/20°C	22.67 ± 1.52 a	39.33 ± 0.57 b	8.33 ± 0.57 a	50.33 ± 0.57 a	11.00 ± 1.00 a
‘麗人’	Field	17.67 ± 0.57 c	23.33 ± 0.57 b	3.67 ± 0.57 a	28.33 ± 0.57 b	5.00 ± 1.00 b
	30/25°C	19.33 ± 0.57 b	24.00 ± 1.00 ab	3.33 ± 0.57 a	29.33 ± 0.57 b	5.33 ± 0.57 b
	25/20°C	21.67 ± 0.57 a	25.33 ± 0.57 a	3.67 ± 0.57 a	34.33 ± 0.57 a	9.00 ± 1.00 a
‘矮長豆’	Field	-	27.67 ± 0.57 c	3.33 ± 0.57 a	34.33 ± 0.57 c	6.67 ± 0.57 b
	30/25°C	-	29.33 ± 0.57 b	3.33 ± 0.57 a	36.33 ± 0.57 b	7.33 ± 0.57 b
	25/20°C	-	30.67 ± 0.57 a	3.00 ± 0.00 a	41.67 ± 0.57 a	11.00 ± 1.00 a
‘農友矮生’	Field	-	28.67 ± 0.57 c	3.33 ± 0.57 a	35.33 ± 0.57 c	6.67 ± 0.57 b
	30/25°C	-	31.00 ± 1.00 b	3.67 ± 0.57 a	36.67 ± 0.57 b	5.67 ± 0.57 b
	25/20°C	-	33.33 ± 0.57 a	3.67 ± 0.57 a	42.67 ± 0.57 a	9.33 ± 0.57 a

^z 花苞節位以子葉以上之節位計數 (不包含子葉節)。

^y 花苞出現以花苞長度達 0.5 cm 為標準。

^x : Means in each column followed by the different letters are significantly different (p=0.05) as determined by Least Significant Difference (LSD).

表 5. 長豇豆花粉以不同培養基培養之萌發率。

Table 5. The tested medium and pollen germination of yard-long bean.

培養基		萌發率 (%)			培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)			
B&K		0			B&K	液態	+PEG	5-6	0			
G1-G5		0						7	0			
BK2-BK4		0						8.5-8.8	0			
張 01-張 07		0					+GA ₃	5-6	0			
Chijioke's		0						7	0			
李 01		0						8.5-8.8	0			
李 02		0					+BSA	5-6	0			
李 04		0						7	-			
李 05		0						8.5-8.8	-			
Alexander's		0					+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		
A		0				7			0			
B		0				8.5-8.8			0			
C		0				+GA ₃		5-6	0			
D		0						7	0			
E		0						8.5-8.8	0			
F		0				+BSA		5-6	0			
G		0						7	-			
H		0					8.5-8.8	-				
臺灣 國立 交通 大學		臺灣 國立 交通 大學				玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0			
								7	-			
					8.5-8.8			-				
					+GA ₃		5-6	0				
							7	-				
							8.5-8.8	-				
					+BSA	5-6	0					
						7	-					
						8.5-8.8	-					
					培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物
G1	液態	+PEG	5-6	0	G2	液態 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0			
			7	0				7	0			
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0			
		+GA ₃	5-6	0			+GA ₃	5-6	0			
			7	-				7	0			
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0			
			+BSA	5-6				-	+BSA	5-6	0	
				7				-		7	0	
				8.5-8.8				-		8.5-8.8	0	
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態) 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0			
			7	0				7	0			
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0			
			+GA ₃	5-6			-	+GA ₃	5-6	0		
				7			-		7	0		
				8.5-8.8			-		8.5-8.8	0		
		+BSA	5-6	-		+BSA	5-6	0				
			7	-			7	0				
			8.5-8.8	-			8.5-8.8	0				
			玻璃紙 (固態)	+PEG			5-6	0	玻璃紙 (固態) 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0
							7	0			7	0
							8.5-8.8	0			8.5-8.8	0
		+GA ₃		5-6		-	+GA ₃	5-6		0		
				7		-		7		0		
				8.5-8.8		-		8.5-8.8		0		
+BSA	5-6			-	+BSA	5-6		0				
	7			-		7		0				
	8.5-8.8			-		8.5-8.8		0				

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
G3	液態	+PEG	5-6	0	G4	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
G5	液態	+PEG	5-6	0	BK2	液態 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	0			+GA ₃	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態) 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態) 或再添加 柱頭組織	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		0		
		7	-		7		0		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		0		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
BK3	液態	+PEG	5-6	0	BK4	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
張 01	液態	+PEG	5-6	0	張 02	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
張 03	液態	+PEG	5-6	0	張 04	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
張 05	液態	+PEG	5-6	0	張 06	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
張 07	液態	+PEG	5-6	0	Robert's	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
Chijioko's	液態	+PEG	5-6	0	李 01	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
李 02	液態	+PEG	5-6	0	李 04	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
李 05	液態	+PEG	5-6	0	Alexander's	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	0			+GA ₃	5-6	-
			7	0				7	-
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	0			+BSA	5-6	-
			7	0				7	-
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
A	液態	+PEG	5-6	0	B	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
C	液態	+PEG	5-6	0	D	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		

表 5. 續

Table 5. Continued.

培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
E	液態	+PEG	5-6	0	F	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		-		
		7	-		7		-		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		-		
培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)	培養基	培養基形態	添加物	pH 值	萌發率 (%)
G	液態	+PEG	5-6	0	H	液態	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
	+Agar (固態)	+PEG	5-6	0		+Agar (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
		+BSA	5-6	-			+BSA	5-6	0
			7	-				7	0
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	0
	玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0		玻璃紙 (固態)	+PEG	5-6	0
			7	0				7	0
			8.5-8.8	0				8.5-8.8	0
		+GA ₃	5-6	-			+GA ₃	5-6	-
			7	-				7	-
			8.5-8.8	-				8.5-8.8	-
+BSA		5-6	-	+BSA	5-6		0		
		7	-		7		0		
		8.5-8.8	-		8.5-8.8		0		

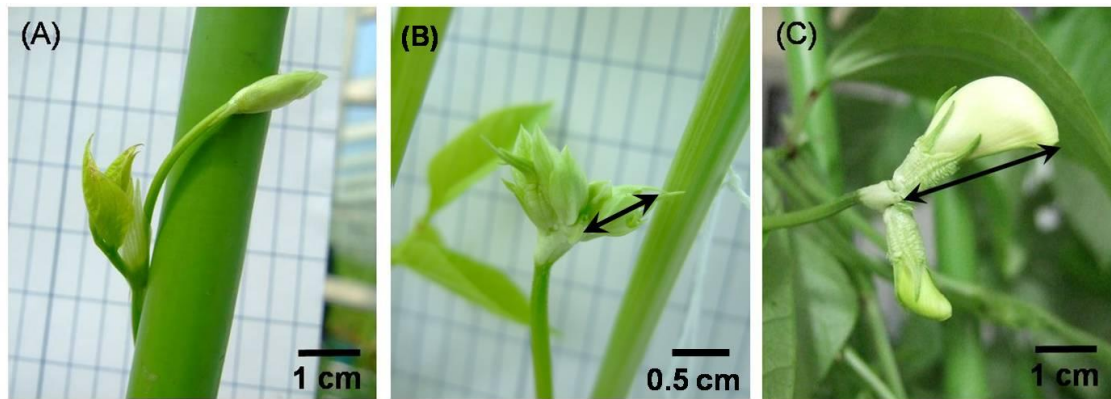


圖 1. 長豇豆植株生長發育階段。(A) 抽蔓；(B) 花苞出現，以花芽長度達 0.5 cm 為準；(C) 花苞大小係自花萼基部量至花苞頂端之長度 (如箭號所示)。

Fig 1. Developmental stages of yard-long bean plants. (A) start to vine; (B) visible floral bud at length of 0.5 cm; (C) floral bud size measurement from the base of the calyx to the tip of the bud (as arrow shows)

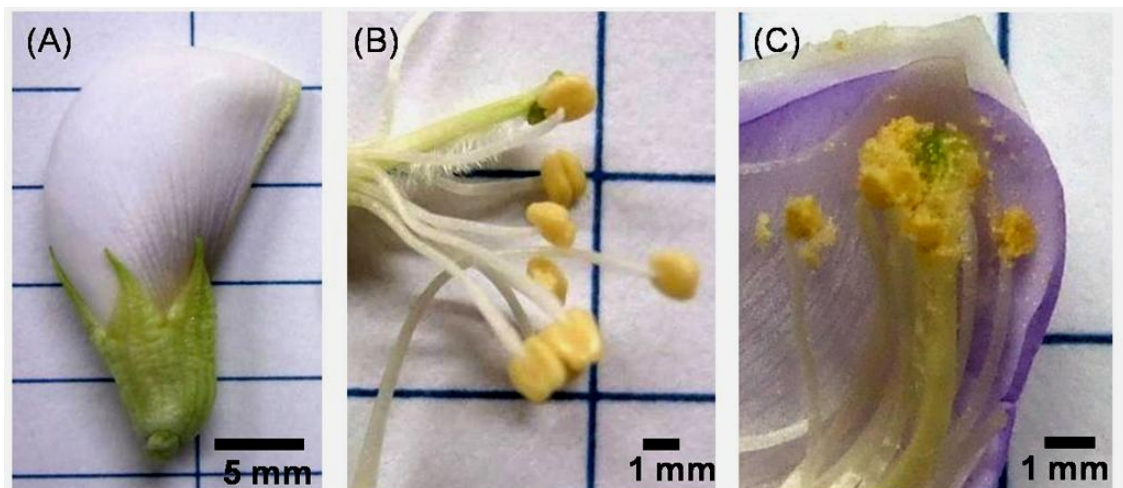


圖 2. 裸眼觀察長豇豆花藥。(A) 花開前一天之成熟花苞；(B) 未開裂之花藥；(C) 已開裂之花藥。

Fig 2. The anther of yard-long bean. (A) one day prior to anthesis flower bud. (B) anther before dehiscence. (C) anther after dehiscence.

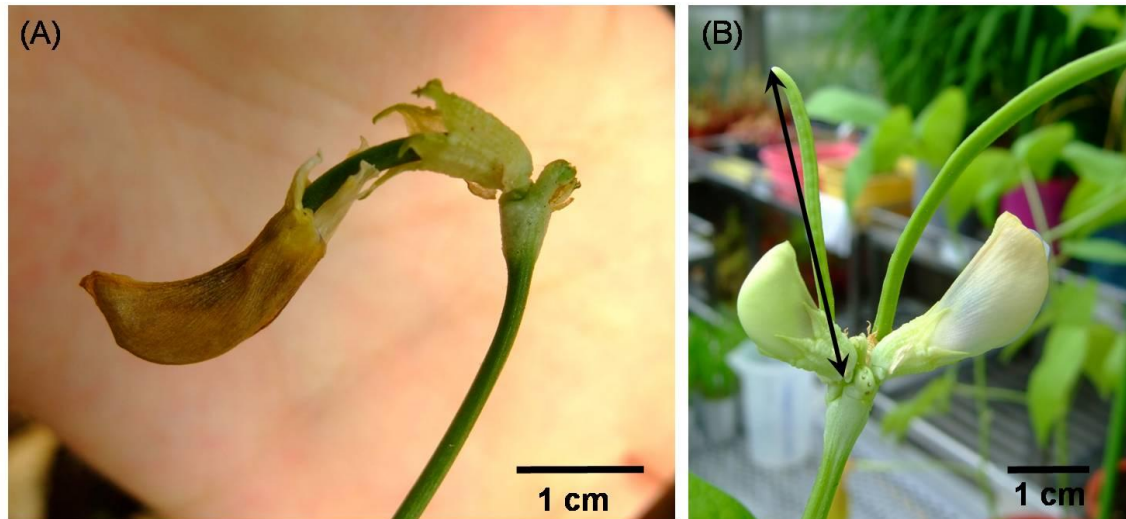


圖 3. 長豇豆人工授粉成功之結莢。(A) 授粉成功後花冠脫落；(B) 幼莢長度量測自花萼基部至豆莢頂端 (如箭號所示)，大於 3 cm 且三天內不落莢者視為結莢。

Fig 3. Pod set of Yard-long bean after successful manual pollination. (A) corolla drops as pod sets. (B) pod length is measured between the base of the calyx and the pod tip (as arrow shows). Success is based on pod length over 3 cm in 3 days of pollination.

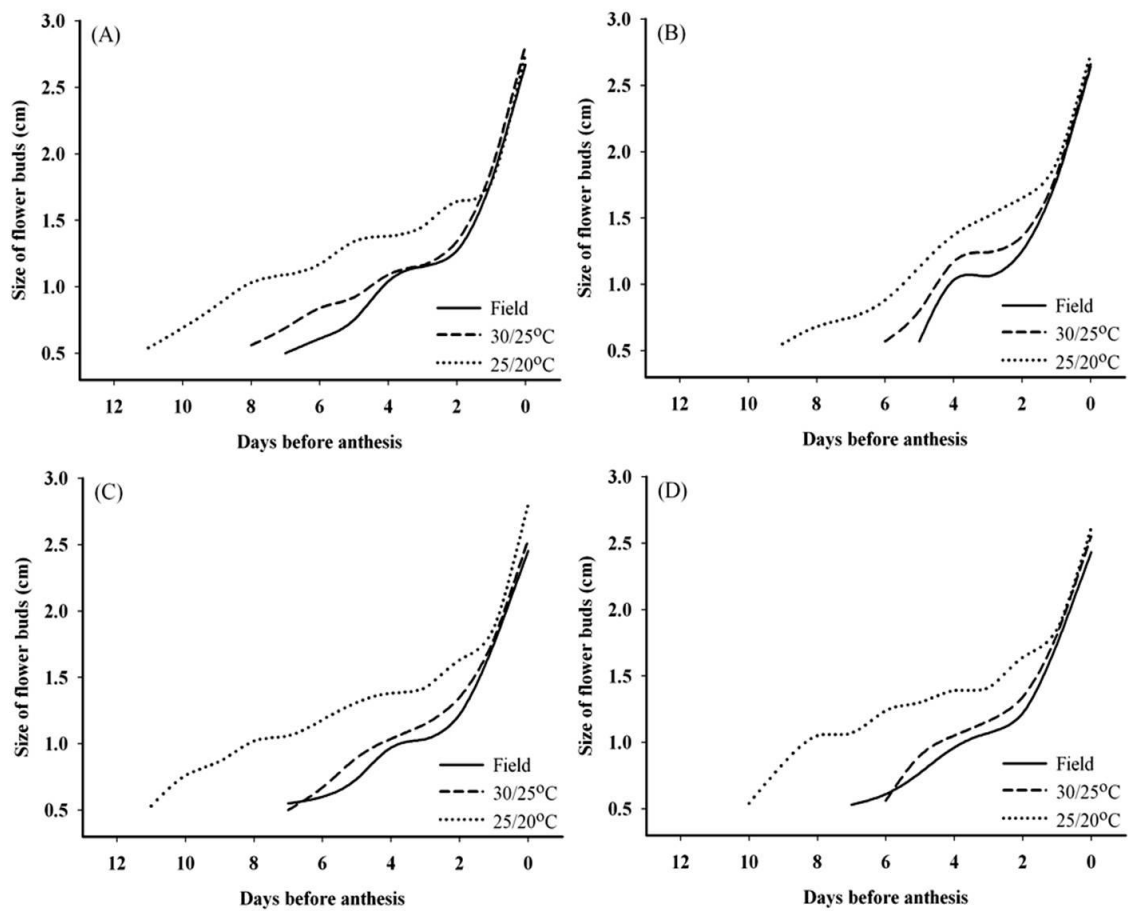


圖 4. 長豇豆栽培於田間、30/25 °C 及 25/20 °C 之花苞發育曲線。(A) ‘三尺青皮’；(B) ‘麗人’；(C) ‘矮長豆’；(D) ‘農友矮生’。

Fig 4. The growth curve of yard-long bean floral buds in the field, 30/25 °C and 25/20 °C. (A) cv. ‘Green-pod Kaohsiung’, (B) cv. ‘Milady’, (C) cv. ‘Bush’, (D) cv. ‘KY Bush’.

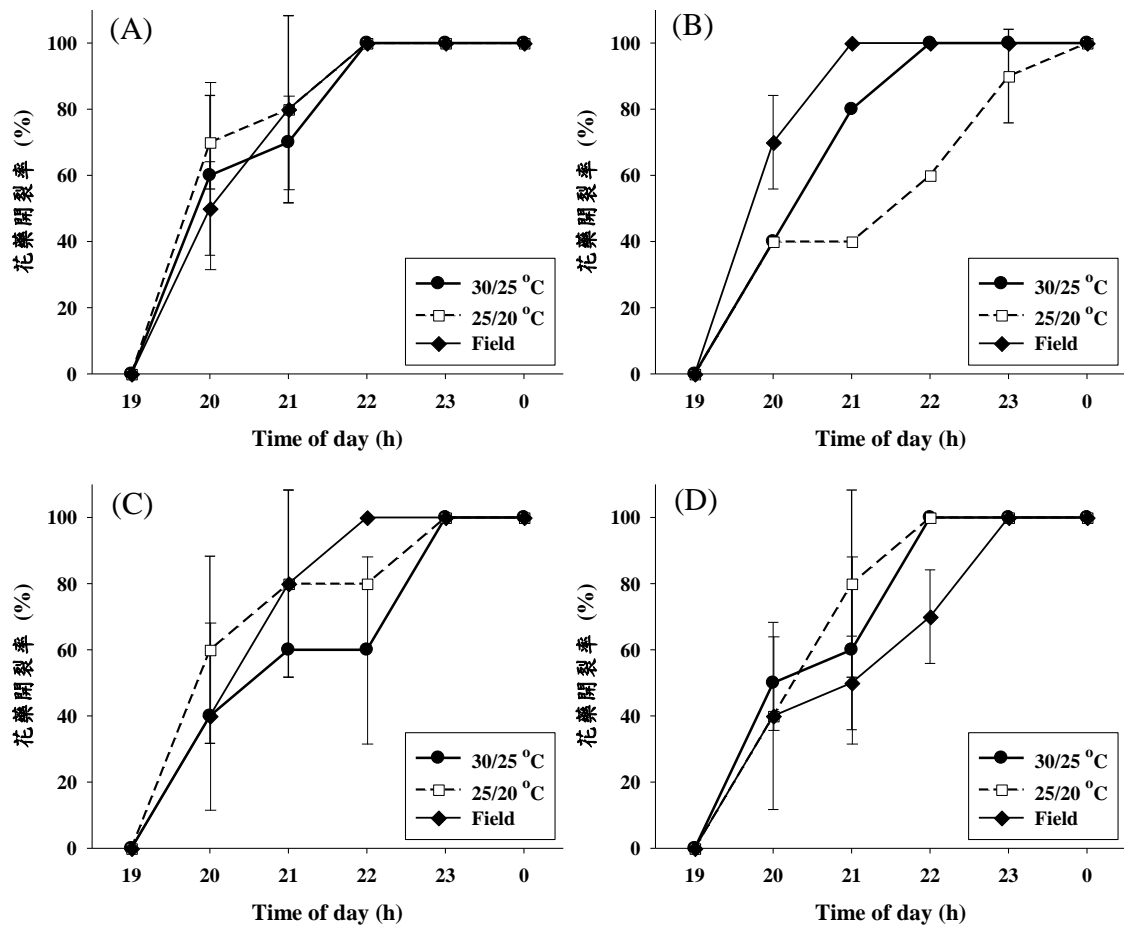


圖 5. 長豇豆於不同栽培環境下之花藥開裂時間比較。(A) '三尺青皮'; (B) '麗人'; (C) '矮長豆'; (D) '農友矮生'。

Fig 5. Anther dehiscence rate of yard-long bean grown under different cultural conditions. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

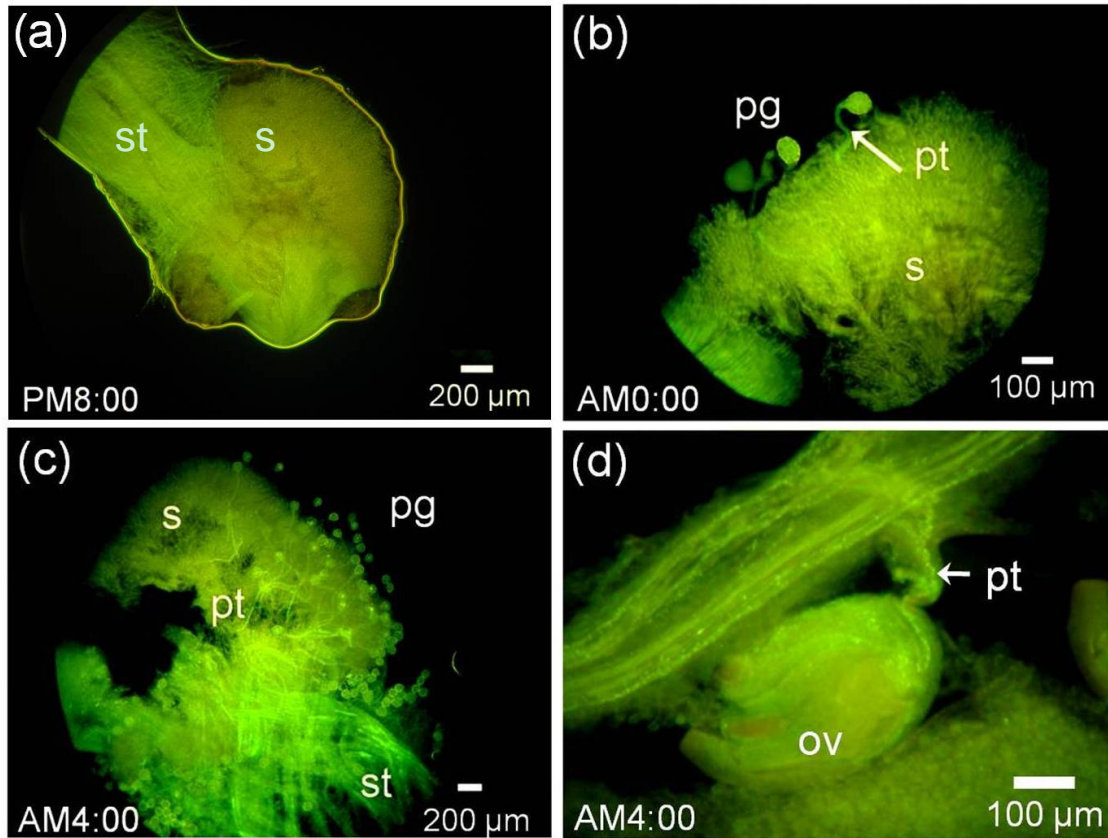


圖 6. 長豇豆自然授粉之花粉萌發、伸長及胚珠受精情形。

pg：花粉粒；pt：花粉管；s：柱頭；st：花柱；ov：胚珠。

Fig 6. In vivo pollen germination, elongation, and fertilization of naturally pollinated yard-long bean. pg: pollen grain. pt: pollen tube. s: stigma. st: style. ov: ovary.

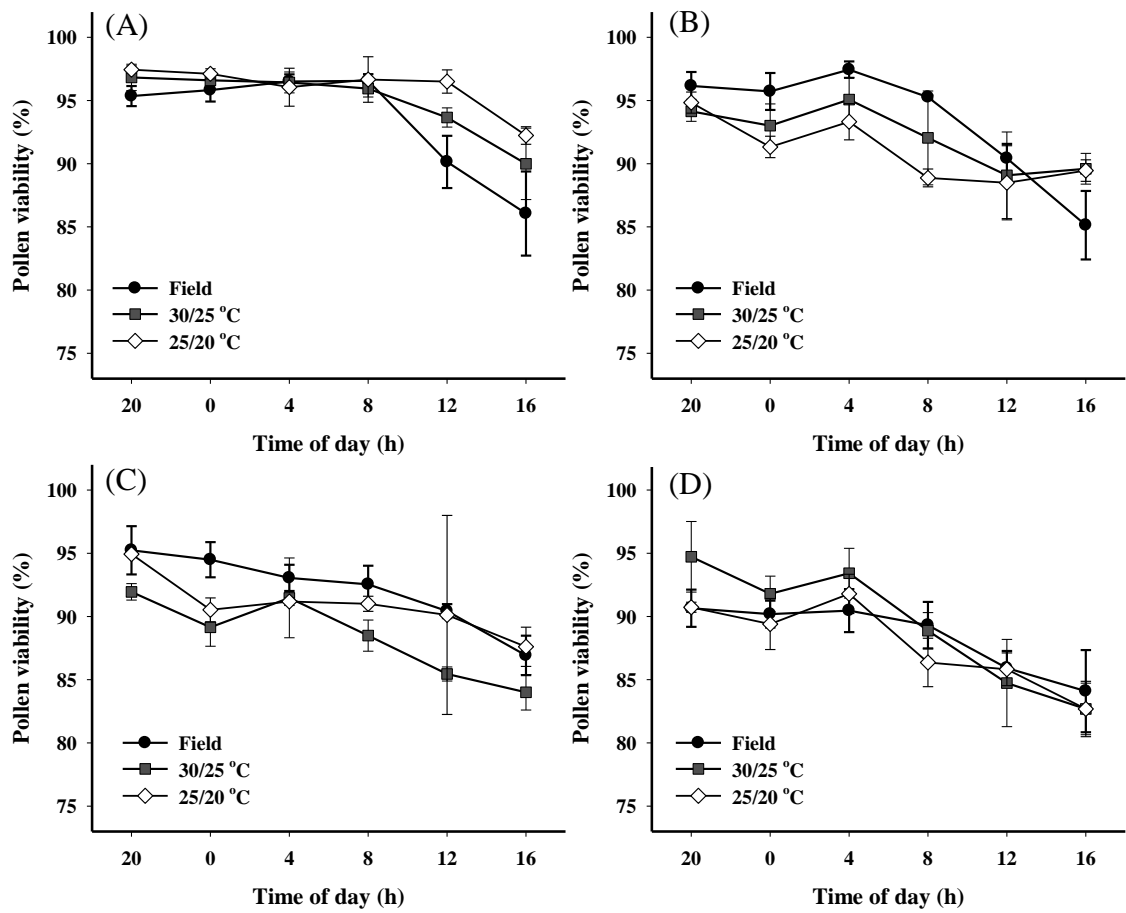


圖 7. 以 Alexander 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。(A) '三尺青皮'；(B) '麗人'；(C) '矮長豆'；(D) '農友矮生'。

Fig 7. Pollen viability in Alexander stain test of yard long bean grown under three different environments. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

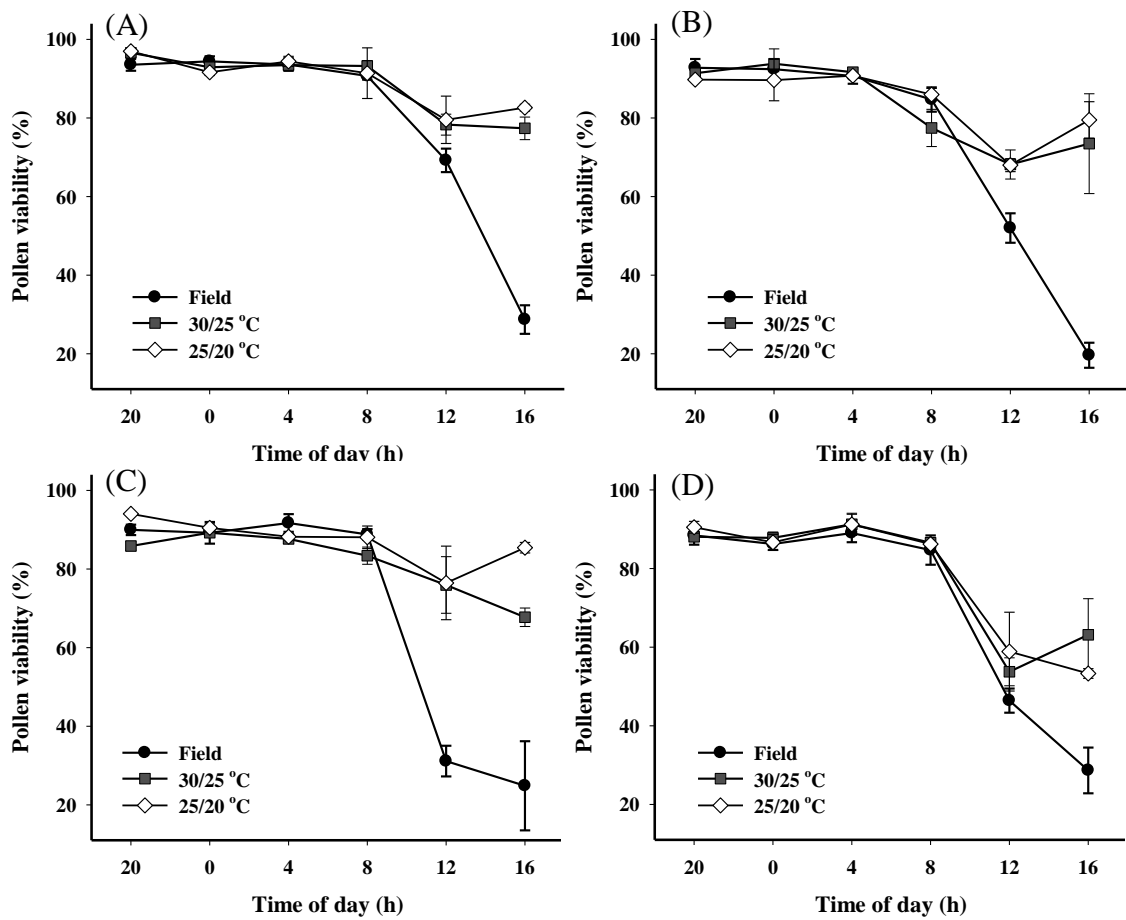


圖 8. 以 TTC 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。(A) ‘三尺青皮’；(B) ‘麗人’；(C) ‘矮長豆’；(D) ‘農友矮生’。

Fig 8. Pollen viability in TTC stain test of yard long bean grown under three different environments. (A) cv. ‘Green pod Kaohsiung’, (B) cv. ‘Milady’, (C) cv. ‘Bush’, (D) cv. ‘KY Bush’.

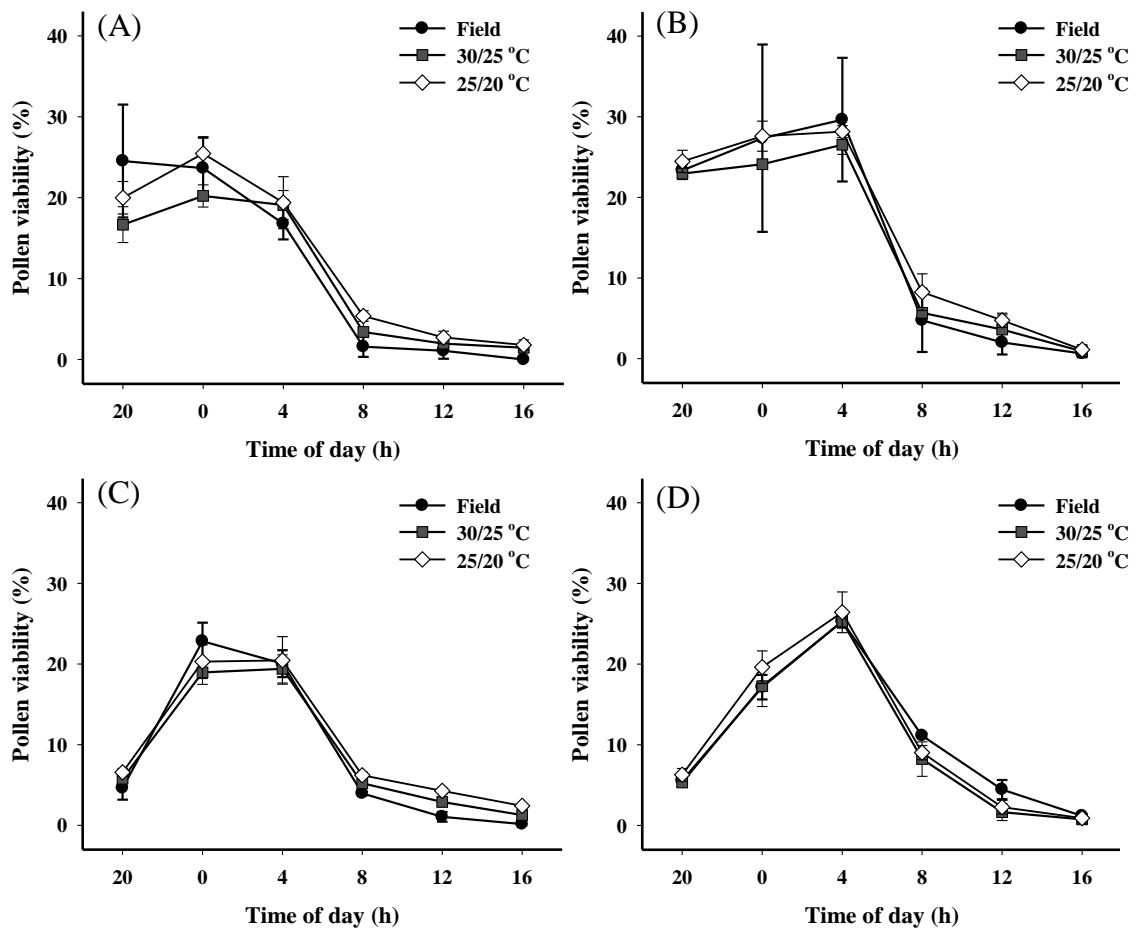


圖 9. 以 FDA 染色法比較長豇豆於三種栽培環境下之花粉活力變化。(A) '三尺青皮'；(B) '麗人'；(C) '矮長豆'；(D) '農友矮生'。

Fig 9. Pollen viability in FDA stain test of yard long bean grown under three different environments. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

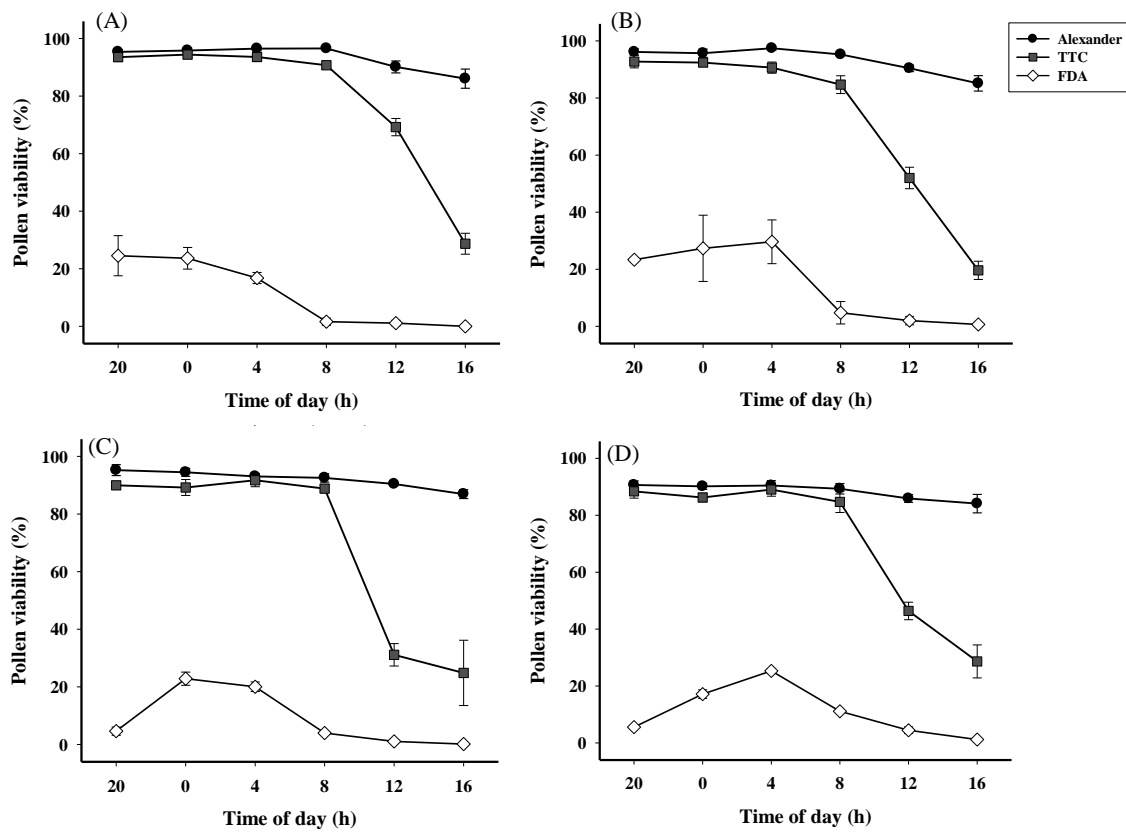


圖 10. 長缸豆栽培於田間環境下以三種染色法檢測花粉染色率。(A) '三尺青皮'；(B) '麗人'；(C) '矮長豆'；(D) '農友矮生'。

Fig 10. Pollen viability in three stain tests of four yard-long bean cultivars grown under field environment. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

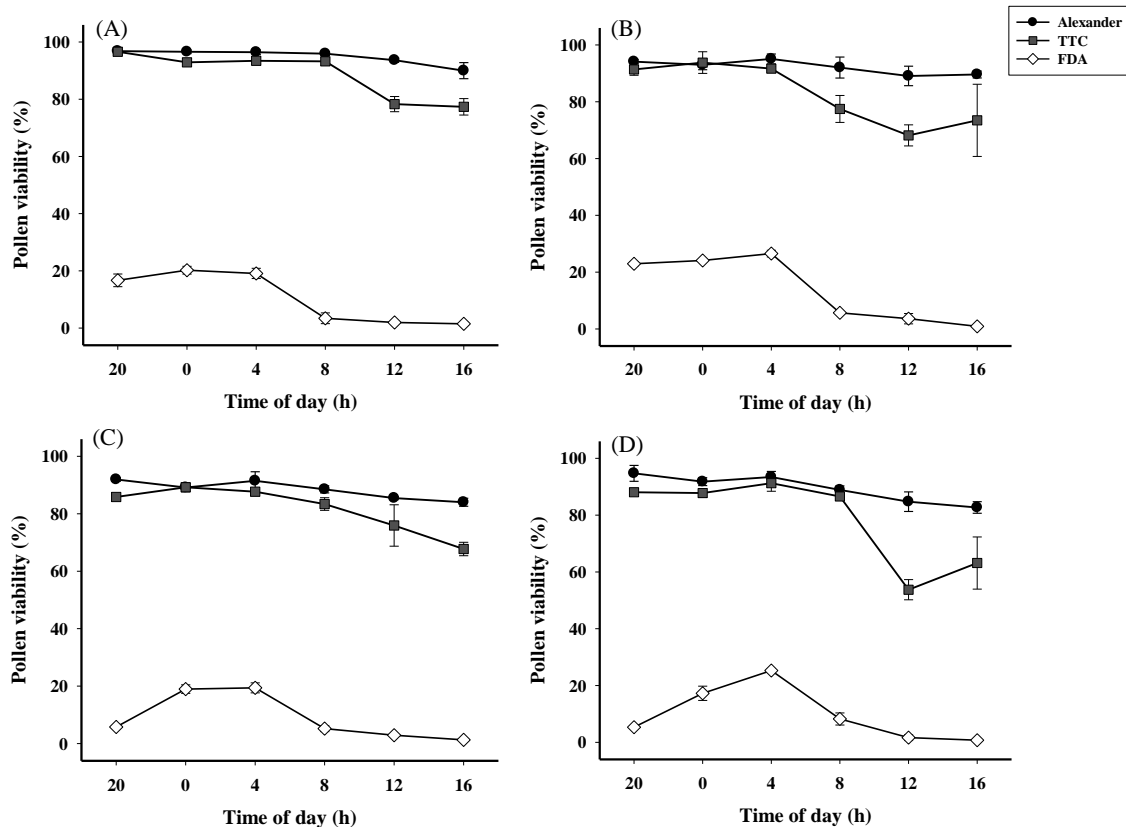


圖 11. 長豇豆栽培於 30/25 °C 環境下以三種染色法檢測花粉染色率。(A) '三尺青皮'; (B) '麗人'; (C) '矮長豆'; (D) '農友矮生'。

Fig 11. Pollen viability in three stain tests of four yard-long bean cultivars grown under 30/25 °C environment. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

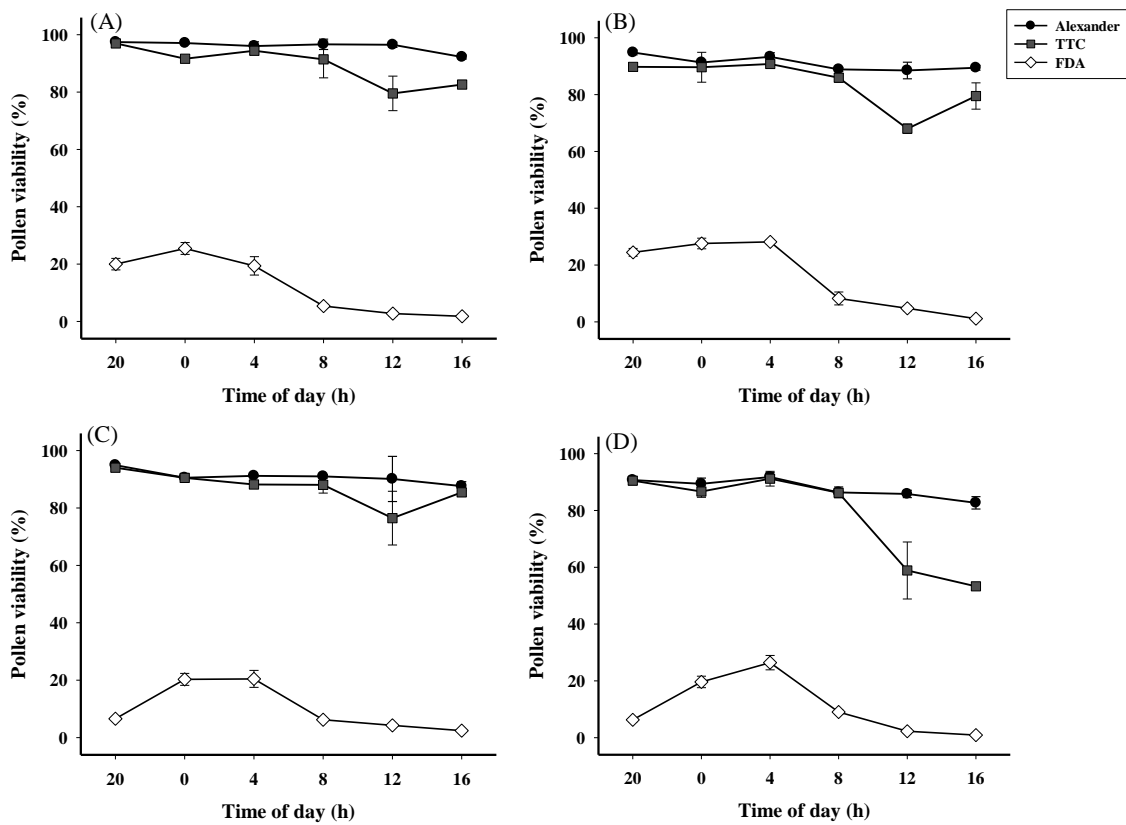


圖 12. 長豇豆栽培於 25/20°C 環境下以三種染色法檢測花粉染色率。(A) '三尺青皮'；(B) '麗人'；(C) '矮長豆'；(D) '農友矮生'。

Fig 12. Pollen viability in three stain tests of four yard-long bean cultivars grown under 25/20°C environment. (A) cv. 'Green pod Kaohsiung', (B) cv. 'Milady', (C) cv. 'Bush', (D) cv. 'KY Bush'.

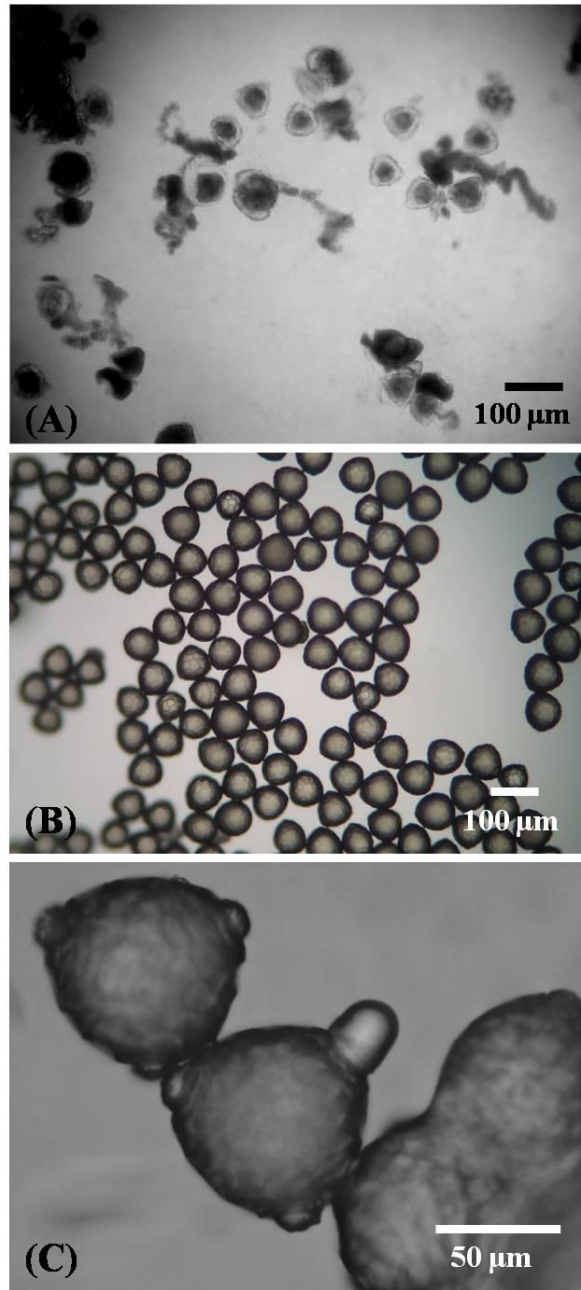


圖 13. 長豇豆花粉體外萌發試驗結果。(A) 花粉以 B&K 培養基培養；(B) 花粉培養於蔗糖濃度 50%；(C) 花粉以 BK2 培養 12 h 後。

Fig 13. In vitro pollen germination test of yard-long bean. (A) in B&K medium; (B) in 50% sucrose; (C) 12 h after in BK2 medium.

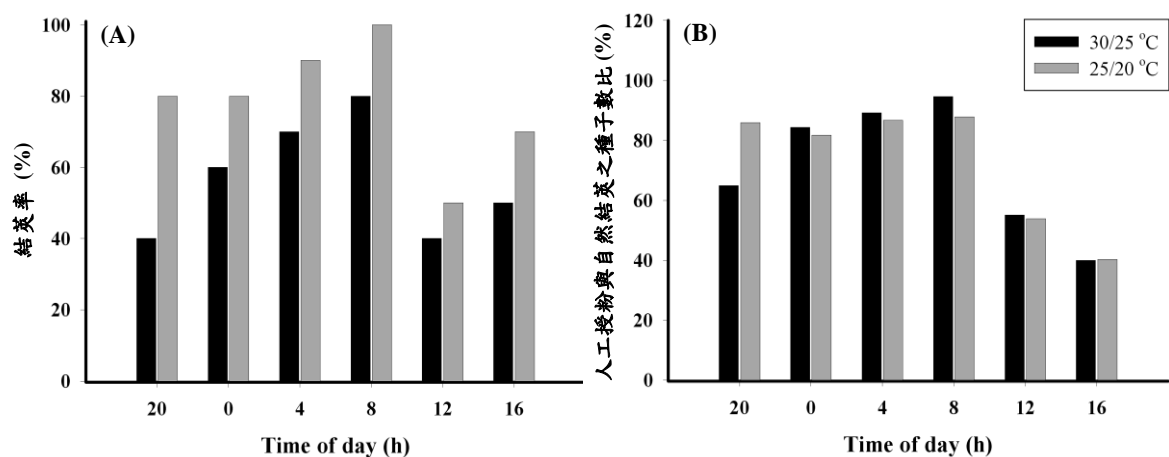


圖 14. 長豇豆‘三尺青皮’於不同時間進行人工授粉之結果。(A) 結莢率；(B) 人工授粉所得種子數與自然結莢種子數比。

Fig 14. Results of manual pollination at different time in yard-long bean ‘Green-pod Kaohsiung’. (A) Percentage of pod set, (B) percentage of seed number from manual pollination to that of natural pollination.

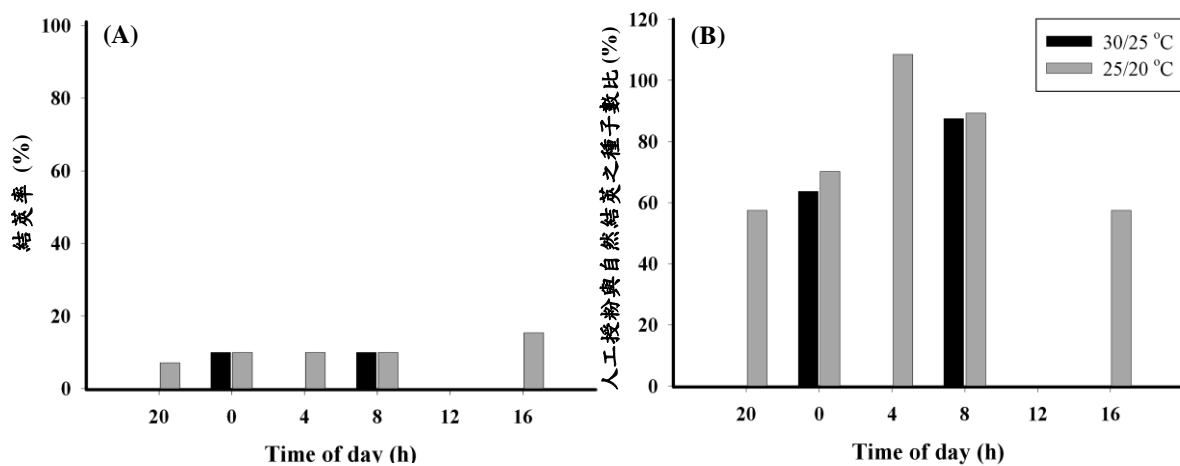


圖 15. 長豇豆‘矮長豆’於不同時間進行人工授粉之結果。(A) 結莢率；(B) 人工授粉所得種子數與自然結莢種子數比。

Fig 15. Results of manual pollination at different time in yard-long bean ‘Bush’. (A) Percentage of pod set, (B) percentage of seed number from manual pollination to that of natural pollination..

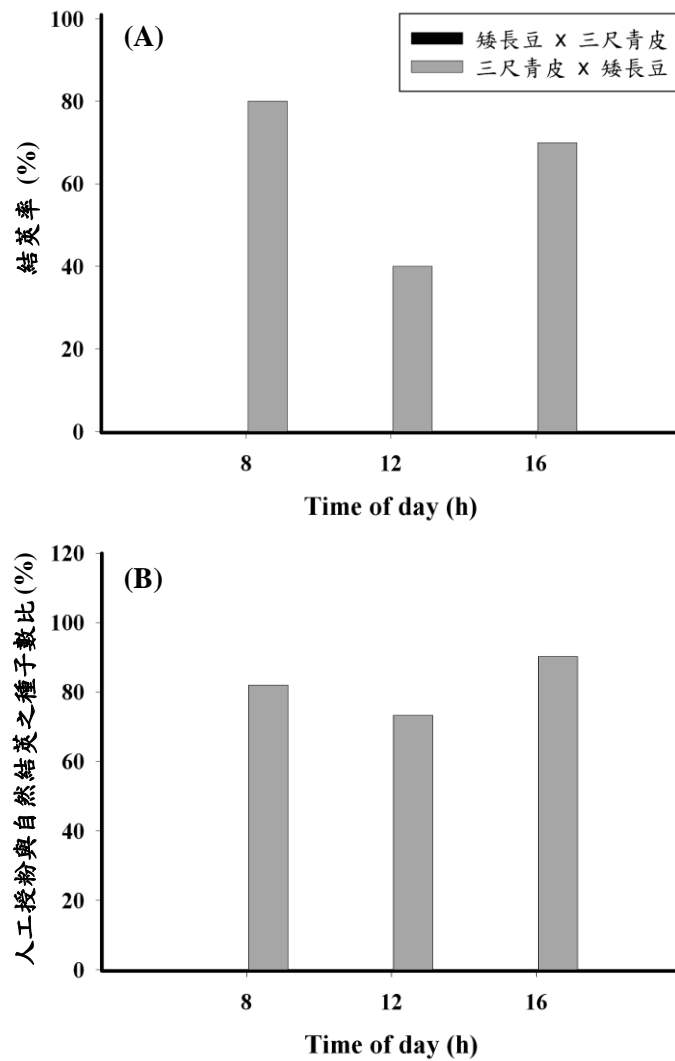


圖 16. 長豇豆‘三尺青皮’與‘矮長豆’雜交授粉之結果。(A) 結莢率；(B) 人工授粉種子數與自然結莢種子數比。

Fig 16. Cross-pollination between yard-long bean cvs. ‘Green-pod Kaohsiung’ and ‘Bush’. (A) Percentage of pod set, (B) percentage of seed number from manual pollination to that of natural pollination.

第五章、討論

植物進入生殖生長階段的早晚受外在環境因素影響；對於一年生作物最主要的環境因素是日長及溫度。對光週敏感之植株感應日照長短的變化，在適當的季節進入生殖發育。如四季豆的短日品種在生長適溫條件下，其始花期不受日長影響，即使延長光照並不影響花苞出現的時間 (Wallace et al., 1991)。在高於生長適溫的環境下，植株因日照延長而晚開花，甚至無花產生。但日中性的品種第一朵花出現的節位及開花時間通常不受溫度影響。在普通豇豆也有相似的情形，高夜溫及長日 (14 hr) 使敏感品種雖然有花，但不結莢 (Ahmed et al., 1992; El-Madina and Hall, 1986)。掌握作物授粉與受精過程為育種計劃成功的關鍵 (Lord and Kohorn, 1986)。長豇豆因耐熱、耐濕、是熱帶亞洲地區重要蔬菜之一，雖然它是重要豆類作物，但對它的研究遠少於菜豆、豌豆或綠豆，甚至也少於普通豇豆。

豆類蔬菜的花為蝶形花，花瓣由旗瓣、翼瓣及龍骨瓣組成，雌蕊與雄蕊被包圍於龍骨瓣中，一般於花開前花藥已開裂並完成授粉 (郭, 2007; Lord, 1981; Pasquet, 1998)。四季豆於花開前兩天柱頭即已成熟，花開前一天晚上花藥開裂；豌豆 (*Pisum sativum* L.) 於花粉釋出後 24 小時花才開 (Wiel, 2007)。同為豇豆屬的米豆 (*Vigna umbellata*) 及小豇豆 (*V. minima*) 於花開前 10-15 小時花藥開裂 (Gopinathan et al., 1986)，即豆類花藥開裂時間早於花朵開放，其授粉行為屬高度自交。普通豇豆花開時，花朵長、寬均約 2 cm，紫色或白色。柱頭在花藥開裂前 12 hr 即有受精能力，可以進行人為雜交授粉 (Ehlers and Hall, 1997)。不論進行自交或雜交授粉，花粉活力是決定受精成功與結實率的重要關鍵，也影響育種效率。花藥的正常開裂方能使花粉釋出以完成授粉、受精與著果 (Sanders et al., 2000)。

本研究以四個長豇豆品種探討其生殖特性，包括開花、花藥開裂時間及花粉壽命與活力。在台大生農學院實驗田區栽培之植株與種在人工氣候室 30/25 °C 之植株，其可見花苞發育至花開所需日數相同；而種在人工候室 25/20 °C 之植株在各項生殖性狀的發育都較慢，包括第一花苞出現所需日數及始花日 (表 4)。台北 5 至 8 月平均溫度為 26.0 - 30.7 °C / 23.2 - 27.0 °C (日/夜)，在七月初有數日最高日均溫達 33-34 °C，但夜均溫都在 30 °C 以下，溫度與人工候室 30/25 °C 較為相近。故兩個環境下之植株生殖生長及開花表現相似，花苞自 0.5 cm 之大小發育至花開需時

只 5-7 日。25/20 °C 處理之植株較晚進入生殖生長，且花苞發育也較慢，需 9-11 日；在此溫度下植株抽蔓也較晚，對豇豆生長略低。但植株第一花苞出現節位在三種環境條件下均相同，依 El-Madina and Hall (1986) 之推論這些品種可能均為對日長不敏感之日中性品種，這也符合一般商業早生品種都是日中性。綠豆及四季豆在生育適溫範圍內，溫度提升會加快植株營養生長，使植株較快進入生殖生長，始花期出現早；而溫度過高或過低則會延遲其開花，甚至無花產生 (Aggarwal and Poehlman, 1977; Wallace et al., 1991)。人候室 30/25、25/20 °C 與夏季田間三個環境溫度應都適合豇豆品種生長，在相對較高的溫度下可較早進入生殖生長並開花。此與 Ahmed 等人 (1992) 在普通豇豆調查結果相同，但普通豇豆自出現花苞 (0.5 cm) 到花開需時 14 日，比長豇豆需時長。此外，該研究也顯示普通豇豆花苞在兩個溫度處理下，雖大小、長度相同，但高夜溫下的花苞較輕，本研究並未比較之。

四個長豇豆品種不論在人工氣候室或試驗田區環境，其花藥均於花開前一天 7:00 pm 起陸續開裂，至凌晨零點全部開裂。此與普通豇豆於適溫下 (33/20 °C) 栽培，於花開前已有約 80 % 花藥開裂，至花開時已全數開裂 (Ahmed et al., 1992)，都是花藥開裂早於花開放。但長豇豆於清晨 3:30 即開始開花，而 Ahmed 等人報告普通豇豆於 8:00 am 開花。雖然郭 (2007) 報導長豇豆花藥開裂時間與花瓣之展開同步或略晚，經個人諮詢求證，其試驗係於田間進行，僅每日清晨開始調查，並未追蹤花藥開裂之確實時間。而各試驗所用栽培品種不同也可能造成一些結果的差異 (Ahmed et al., 1992; Ehlers and Hall, 1997; Warraga and Hall, 1984b)。

花藥開裂的最後階段係失水乾燥的過程，花藥壁的快速脫水與蒸散作用有關，故影響蒸散作用之各項環境因子常被探討其對花藥開裂的影響。其中，溫度與相對濕度對花藥開裂有直接影響 (Foster and Gifford, 1974; Stanley and Linskens, 1974)。但閉花授粉植物之花藥未與外界環境直接接觸，其花藥開裂較不受環境變化之影響 (Sedgley et al., 1985)。本研究中三種栽培環境對長豇豆花藥開始及完成開裂時間並未造成顯著影響，但品種間表現有差異；‘三尺青皮’於三個栽培環境下花藥開裂速度最一致，開裂率從花開前一晚 7:00 pm 以後呈 S 形上升。‘麗人’栽培在田間之植株僅兩小時即完成花藥全數開裂，比人候室 30/25 °C、25/20 °C 植株分別快 1-3 hr (圖 5)。兩個矮性品種花藥開裂分別以田間或人候室 30/25 °C 處理較慢，‘農友矮生’以人候室 25/20 °C 處理株最快完成花藥開裂。比較兩間人候室與田

間之相對濕度變化，30/25 °C 室於晚上 7 時以後相對濕度緩降，RH 介於 90.2% - 82.6%；而 25/20 °C 室 RH 較高且穩定維持在 93.5% - 94.1%。田間夜晚 RH 值較人候室低，介於 72.4% - 77.7%，並且七、八月田間晚上平均溫度為 27.0 °C，比人候室高。‘麗人’與‘矮長豆’之花藥開裂都以田間速率較快，可能是較高的蒸散作用加快花藥壁脫水而使花藥較快開裂。但田間的較高夜溫並沒有加快‘農友矮生’之花藥開裂；可能樣本數量少，三個栽培環境的差異不顯著。

花粉活力是指花粉傳遞雄配子到胚囊完成受精，進而產生果實與種子的能力。廣義即包括花粉的發芽力 (germinability) 及受精力 (fertility) (Abdul-Baki, 1992)，會隨花齡而改變。進行育種雜交授粉、人工授粉時，採用有活力的花粉提升著果率或採種量。研究多針對花開後的花粉活力變化與花粉壽命探討 (Dafni and Firmage, 2000; Pacini et al., 1997)，有關花開前花粉活力的文獻相對較少。夏南瓜 (*Cucurbita pepo*) 在花朵剛開放時花粉活力最佳，六小時後花粉活力急劇下降。Nepi and Pacini (1993) 認為可能因夏南瓜花粉發育後期未經脫水過程，且為三胞花粉，花粉含水量高、代謝快、對乾燥敏感。甜椒‘Latino’花粉活力以花瓣剛開放時最佳，花盛開時花粉活力已低 (Mercado et al., 1994)；青椒‘Tosajishi’在低溫下以花開後一天花粉活力最佳 (Kato, 1989)。冷子番荔枝 (*Annona cherimola*) 在花藥開裂前 30 小時，花粉即有些許活力，但以花藥開裂時花粉活力最佳，表示花粉在花藥中的最後幾個小時對花粉發育之完整性相當重要 (Rosell et al., 2006)。紅茄 (*Solanum integrifolium*) 在花開前一天與花開當天花粉活力最佳 (Baksh et al., 1978)。日本鼠尾草 (*Salvia japonica*) 以花藥開裂前有較佳的花粉活力，花藥開裂後花粉活力大幅下降，可能因為花粉為三細胞，花藥開裂後，花粉不耐乾燥 (李, 2003)。長豇豆花粉活力以 Alexander 與 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 檢測，由花開前一天晚上至開花當天中午的花粉均有相當高的染色率 (圖 7, 8)；而 FDA (fluorescein diacetate) 檢測也顯示花粉可染率以花開前一天晚上最高，花開當日 8:00 am 已顯著下降。到中午至 16:00，殘留在花藥的花粉量少且染色率很低，TTC 與 FDA 檢測均如此 (圖 8, 9)。矮性長豇豆花藥剛開裂 (花開前一天 8:00 pm) 時的花粉活力 FDA 檢測值較低 (圖 9)，可能此時花粉尚未全面成熟，部分花粉內能水解螢光染劑的脂酶 (esterase) 活性低，或是花粉細胞膜不完整 (Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)，使觀察到的螢光反應較低。

比較栽培於田間及人候室 30/25 °C、25/20 °C 之植株，花粉活力在花開當日早上 8:00 以後 TTC 染色率開始下降，以田間樣品降幅較大 (圖 8)，可能是田間相對濕度較低造成。中午 12:00 各品種除‘三尺青皮’外，染色率都降低，高溫及乾燥可能是影響因素。花粉 FDA 染色率之結果更在花開當日 8:00 時即低，兩個蔓性品種花粉活力還低於花開前一日 20:00 時。雖然 FDA 之花粉染色率顯著低於 Alexander 與 TTC 染色率 (圖 10, 11, 12)，各品種花粉活力變化在三種環境下趨勢相似，並且在 25/20 °C 的花粉活力降低速率比在 30/25 °C 慢 (圖 7A; 8B; 14A)。許多研究認為化學染色法容易染到無生命或不正常之花粉，而有高估花粉活力的可能，一般會再與離體培養萌發之結果對照，以進一步評估由染色法檢測到的花粉活力及各染色法之適用性。許多植物花粉離體培養與 FDA 染色法結果比對都顯示具高相關性，且由於 FDA 法簡便快速，近年被認為較具可信度，被普遍用來評估花粉活力 (Heslop-Harrison et al., 1984; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)。長豇豆花粉活力以 Alexander 染色法測得之可染率偏高，也無法反映出隨時間之變化；TTC 檢測結果與 FDA 染色率較能顯現出花粉活力變化。其中 TTC 染色法又較 FDA 染色法簡便且易辨識，但因本研究另以花粉體外培養方式都未成功，不能進行與染色法的相關性比對。人為授粉的結果可以顯示質性花粉活力。

花粉離體培養是最方便可靠的一種量性花粉活力的檢測方法，但所需之培養基、培養方法與取樣時間因不同物種而異，如豆類作物的花粉一般不易在人工培養基上萌發，而且顯示有品種差異 (Jayaprakash and Sarla, 2001)。與豇豆同屬的班巴拉花生 (*Vigna subterrenea* L.) 之花粉，採樣後立即培養才有僅 30.1% 的花粉萌發率，花粉離體僅 5 分鐘，萌發率降至 3%，超過 5 分鐘即無法發芽 (Chijioke et al., 2010)。本研究雖於花苞取下後 5 分鐘內即將花粉撒播於製備好的培養基中，長豇豆花粉仍無萌發。雖然豆科植物多為雙胞花粉 (Heslop-Harrison, 1977)，但班巴拉花生之花粉卻屬於三胞花粉，於乾燥高溫下快速失水，導致花粉細胞膜發生不可逆的改變，可能為花粉活力驟降之因素 (Chijioke et al., 2010)。

一般雙胞花粉需要的蔗糖濃度較低，約 10% 至 15%；三胞花粉則需高於 20% 的蔗糖濃度 (Shivanna, 2003)。以 B&K 配方 (10% sucrose) 進行長豇豆花粉培養時，即因出現花粉破裂情形，提高蔗糖濃度，由 15% - 60% 範圍測試。蔗糖需高達 50% 才能抑制長豇豆花粉破裂。然而蔗糖濃度過高可能會使花粉失水，或降低發芽所

須酵素之活性，而抑制花粉萌發 (李等, 1989)。大部分花粉粒成熟釋放時處於脫水狀態，較其他細胞的滲透潛勢高。而花粉萌芽後，花粉管是完全水合狀態，滲透壓比花粉粒低，和花柱中的輸導組織細胞相當。因此，培養基中的高蔗糖濃度，也許抑制花粉吸水的傷害，預防花粉破裂，但它可能不適合花粉管生長 (Shivanna, 2003)。如荔枝 (李, 1992) 與杏 (Luza and Polito, 1985) 花粉發芽與花粉管生長所需之蔗糖濃度不同，可能是花粉萌發後花粉管生長對糖之利用及代謝需求不同 (李, 1992)。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 不易被植物代謝，用在生理研究做為生長物質的攜帶者及當滲透調節劑。它與蔗糖具協同作用，兩者可能藉由調整細胞膜的滲透性和物理狀態來影響花粉發芽。它常與甘露醇 (mannitol)、山梨糖醇 (sorbitol) 及異戊四醇 (pentaerythritol) 等常被用於培養基的滲透調節 (李等, 1989; Shivanna, 2003)。本研究參考文獻中的配方，用較低的蔗糖濃度 (20% - 40%) 輔以 6% - 25% 之 PEG 配製培養基，結果只有 40% sucrose + 15% PEG 的組合可使花粉維持不破裂。低於 40% 的蔗糖濃度即使添加 PEG，對長豇豆花粉滲透壓的調節仍不理想，未能使花粉成功萌發。添加 PEG 對花粉離體培養的效果因物種而異，Dickinson (1968) 應用於百合花粉發芽試驗，結果無萌發。應用於樹豆 (*Cajanus cajan* (L.) Millsp., Pigeonpea) 及雞兒豆 (*Cicer arietinum*, chickpea) 可增進花粉萌發及花粉管伸長 (Jayaprakash and Sarla, 2001)，但四季豆用 PEG 反而抑制花粉的萌發 (Gurusamy et al., 2007)。由於豇豆與四季豆親緣相近，推測其花粉對 PEG 之反應可能與四季豆同，皆不適合以 PEG 來調節培養基的滲透壓。而 PEG 對花粉造成的抑制可能來自 PEG 合成純度問題，造成毒性或抑制作用 (Lagerwerff et al., 1961)。

花粉粒成熟脫水釋放時滲透潛勢高，細胞膜滲透調節的能力低，若將此時花粉培養於液態培養基或含水量高的潮濕介質下，花粉細胞膜在未及時恢復其雙層磷脂膜的滲透調節功能前，快速吸收水分造成細胞傷害，導致離子滲漏，花粉萌發率因此降低 (Hoekstra and Wal, 1988; Taylor and Hepler, 1997)。本研究也選用初釋放之長豇豆花粉立即進行培養，並未萌發。由 FDA 染色結果，可能是花粉細胞膜之水分調節能力尚未恢復，短時間內花粉吸收過多水分而造成離子滲漏，導致花粉無法萌發。FDA 染色法除了可以比較花粉的脂酶活性，也可以檢測細胞膜之

完整性。四個長豇豆品種在花粉初釋放時（花開前一天 8:00 pm），花粉 FDA 螢光反應未達最高，而是到 0:00 及 4:00 am 才有最高的活力表現，就可能是起初花粉滲透潛勢高，細胞膜滲透調節的能力低 (Hoekstra and Wal, 1988)。一般花粉於培養前先進進行預水化 (prehydration) 處理，可提高花粉活力表現，其原理在於花粉細胞膜在緩慢的吸水過程中恢復細胞膜完整性，維持良好的通透性，並防止離子滲漏 (李, 1992; Hoekstra and Wal, 1988)。長豇豆花粉為雙胞花粉，卻難以離體培養的因素及方法仍待探討與克服。至少目前尚不能以離體培養來評估長豇豆花粉活力。

花粉自花藥釋出後，其萌發到完成受精所需時間也依物種而有差異。四季豆與大豆等豆類作物之花粉萌發至完成受精需時 4-8 小時 (Gross and Kigel, 1994; Gurusamy et al., 2007; Inoue and Suzuki, 1959; Song et al., 2007)。以 aniline blue 將長豇豆柱頭染色後鏡檢，花開前一天 8:00 pm 未見柱頭上有花粉著落 (圖 6 - a)，凌晨零時、4:00 am 所取之樣本，均可見花粉於柱頭上及花粉管已萌發 (圖 6 - b, c)，4:00 am 已見花粉管伸長至子房與胚珠完成受精 (圖 6 - d)。證明長豇豆之花藥確實於花開前已開裂一段時間，而依花藥開裂時間、體內萌發鏡檢推算，花粉自柱頭萌發至花粉管伸長、進入胚珠完成受精需時 4-8 hr，與前述豆類作物相同。

普通豇豆花於清晨開放，只開放數小時，但其柱頭於花藥開裂前 12 小時即已成熟，此特性對人工授粉相當有用 (Ehlers and Hall, 1997)。本研究於長豇豆花開前一日下午 4:00 進行去雄並授粉，在 25/20 °C 環境下‘三尺青皮’與‘矮長豆’分別可有 70% 及 15% 的成功率 (圖 14 - A, 15 - A)，顯示長豇豆在花開前一日傍晚，柱頭確實已具有可授性，而此時花藥尚未開裂，人工除雄及授粉作業可於此時間一併進行。雖然樣本數少，但‘矮長豆’結莢率普遍偏低，中午授粉且零結莢，並不是它的花粉活力低。當它做花粉親授粉在‘三尺青皮’上，能有 40% (中午) 及以上的結莢率及頗高種子數 (圖 16)。反之，以‘三尺青皮’花粉授在‘矮長豆’上沒有結莢，顯示‘矮長豆’柱頭的可授性在取樣的花苞期可能較低。進行雜交育種時可重新考慮人工除雄及授粉作業時間，並且授粉成功率還有品種因素。

結論

長豇豆 (*Vigna. unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc) 之蔓性 (‘三尺青皮’、‘麗人’) 與矮性 (‘矮長豆’、‘農友矮生’) 品種栽培於人候室兩種溫度條件 (30/25 °C、25/20 °C) 及夏季田間，植株抽蔓速度隨溫度升高而增快。‘麗人’與‘三尺青皮’都和田間栽培最快抽蔓。而 25/20 °C 對豇豆生長可能略低，抽蔓、始花日及花苞發育到花開放都比 30/25 °C 處理慢數日。植株在播種後 28 - 50 天開第一朵花，進入生殖生長階段。兩個矮性品種都比蔓性‘三尺青皮’早出現花苞，並且隨溫度高而較快；‘麗人’雖是蔓性品種，但極早生，比矮性品種還快出現花苞及早花。但各品種的始花節位不受溫度條件影響。矮性品種與‘麗人’平均始花節位在主蔓第 3.0 - 3.7 節，‘三尺青皮’始花節位為第 8.3 - 8.7 節。

長豇豆花粉體外培養不易，所試過的培養基均不能使之發芽，不能以此法檢測其花粉活力。藉由 TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride) 染色法可快速評估長豇豆花粉由花開前一天 20:00 至花開當日 16:00 之活力變化。花開當日 8:00 以後花粉 TTC 染色率開始下降，以田間樣品降幅最大，中午 12:00 各品種除‘三尺青皮’外，染色率都低。長豇豆花藥開裂時間始於花開前一日晚上，早於花開時間；‘三尺青皮’花藥剛開裂至花開當日 8:00，甚至到 16:00 進行除雄及人為授粉都能結莢及產生種子，以花開當日 8:00 成功率最高，‘矮長豆’則結莢率低。在人候室 25/20 °C 環境，以兩品種於開花當日進行人為雜交授粉，只有‘矮長豆’為花粉親可結莢，‘三尺青皮’為花粉親未能結莢。下午 4:00 取樣之花粉授在待開花苞之柱頭，可成功結莢且獲得成熟種子，顯示長豇豆在花開前一日傍晚，柱頭已具有可授性，但程度上有品種差異，而此時花藥尚未開裂。進行雜交育種時可依品種重新考慮人工除雄及授粉作業時間，以提高作業效率。

參考文獻

- 李宜玲. 2003. 日本鼠尾草花部發育、小孢子形成和花粉發育之研究. 國立臺灣大學植物學研究所碩士論文.
- 李金龍. 1987. 園藝作物花粉活力測定與貯藏之研究. 科學農業 35:347-356.
- 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 35:121-130.
- 李國譚. 1992. 愛文檸檬小花開放習性及花粉形態與活力之研究&荔枝花藥與花粉型態及花粉生體外發芽特性之研究. 國立臺灣大學園藝學研究所碩士論文.
- 林上湖、鍾文全、楊左琦、姚士源. 2010. 台灣豇豆產業現況. 台灣之種苗 112:7-11.
- 張正桓. 2006. 苦瓜花粉形態、花粉活力、授粉及果實生長之研究. 國立中興大學園藝學研究所碩士論文.
- 張有明. 1997. 苦瓜組織培養再生、農桿菌媒介法及花粉電穿孔法之基因轉殖研究. 國立臺灣大學園藝學研究所博士論文.
- 張有明、劉邦基、蕭吉雄、許圳塗. 1999. 苦瓜果實構造及發育之研究 I. 苦瓜果實構造與受精過程. 中華農學研究 48:23-31.
- 郭俊毅. 2005. 豇豆. p56-64. 刊於: 台灣農家要覽增修訂三版策劃委員會編著. 臺灣農家要覽 農作篇(二). 行政院農業委員會. 台北.
- 郭俊毅. 2007. 台灣豆類蔬菜育種成果與研究心得. 蔬菜品種改良及栽培技術改進計畫成果研討會專刊 國立中興大學編印. p. 31-51.
- 樊繼蓮、席湘媛. 1994. 長豇豆花藥和花粉的發育. 西北植物學報:178-182.
- Abdul-Baki, A.A. 1992. Determination of pollen viability in tomatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117:473-476.
- Adhikari, K.N. and C.G. Campbell. 1998. In vitro germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. Euphytica 102:87-92.
- Aggarwal, V.D. and J.M. Poehlman. 1977. Effects of photoperiod and temperature on flowering in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Euphytica 26:207-219.
- Ahmed, F.E., A.E. Hall, and D.A. DeMason. 1992. Heat injury during floral development in cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae). Amer. J. Bot. 79:784-791.
- 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.
- Alexander, M.P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Technol. 44:117-122.
- Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. Stain Technol.

55:13-18.

- Alexander, M.P. and S. Ganeshan. 1989. An improved cellophane method for in vitro germination of recalcitrant pollen. *Stain Technol.* 64:225-227.
- Baksh, S., M. Iqbal, and A. Jamal. 1978. Breeding system of *Solanum integrifolium* Poir. with an emphasis on sex potential and intercrossability. *Euphytica* 27:811-815.
- Barnabas, B. and M. Kovacs. 1997. Storage of pollen p. 293-314. In: K. R. Shivanna and V. K. Sawhney (eds.). *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge Univ. Press, New York. USA.
- Boavida, L.C. and S. McCormick. 2007. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 52:570-582.
- Brewbaker, J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Amer. J. Bot.* 54:1069-1083.
- 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.
- Brink, R.A. 1925. The influence of hydrogen-ion concentration on the development of the pollen tube of the sweet pea (*Lathyrus odoratus*). *Amer. J. Bot.* 12:149-162
- Calzoni, G.L., A. Speranza, and N. Bagni. 1979. In vitro germination of apple pollens. *Sci. Hort.* 10:49-55.
- Cerovic, R., N. Micic, G. Djuric, and M. Nikolic. 1998. Determination of pollen viability in sweet cherry. *Acta Hort.* 468:556-565.
- Chagas, E.A., W. Barbosa, A. Saito, R. Pio, and N.P. Feldberg. 2008. Temperature, pH and development period on in vitro pollen germination in *Pyrus calleryana*. *Acta Hort.* 800:521-526.
- Cheung, A.Y. 1996. Pollen—pistil interactions during pollen-tube growth. *Trends Plant Sci.* 1:45-51
- Chiang, M.S. 1974. Cabbage pollen germination and longevity. *Euphytica* 23:579-584.
- Chijioke, O.B., U.M. Ifeanyi, and A.C. Blessing. 2010. Pollen behaviour and fertilization impairment in bambara groundnut (*Vigna subterrenea* [L.] Verdc.). *J. Plant Breeding Crop Sci.* 2:12-23.
- Cook, S.A. and R.G. Stanley. 1960. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. *Silvae Genet* 9:134-136.
- Dafni, A. and D. Firmage. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst. Evol.* 222:113-132.
- DeGraaf, B.H.J., J.W.M. Derksen, and C. Mariani. 2001. Pollen and pistil in the progamic phase. *Sex. Plant Reprod.* 14:41-55.
- Derksen, J., T. Rutten, T. Vanamstel, A. Dewin, F. Doris, and M. Steer. 1995. Regulation of

- pollen-tube growth. *Acta Bot. Netherl.* 44:93-119.
- Dickinson, D.B. 1968. Rapid starch synthesis associated with increased respiration in germinating lily pollen. *Plant Physiol.* 43:1-8.
- Ehlers, J.D. and A.E. Hall. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Res.* 53:187-204.
- El-Madina, I.M.D. and A.E. Hall. 1986. Flowering of contrasting cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) genotypes under different temperatures and photoperiods. *Field Crops Res.* 14:87-104.
- Erickson, A.N. and A.H. Markhart. 2002. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell Environ.* 25:123-130.
- Farlow, P.J., D.E. Byth, and N.S. Kruger. 1979. Effect of temperature on seed set and in vitro pollen germination in french beans (*Phaseolus vulgaris*). *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 19:725-731.
- Ferrari, T.E. and D.H. Wallace. 1975. Germination of *Brassica* pollen and expression of incompatibility in vitro. *Euphytica* 24:757-765.
- Ferreira, K., G.A. Torres, I.V.d. Carvalho, and L.C. Davide. 2009. Abnormal meiotic behavior in three species of *Crotalaria*. *Pesq. Agropec. Bras.* 44:1641-1646.
- Ferri, A., E. Giordani, G. Padula, and E. Bellini. 2008. Viability and in vitro germinability of pollen grains of olive cultivars and advanced selections obtained in Italy. *Advances in Hort. Sci.* 22:116-122.
- Fery, F.L. 2002. New Opportunities in *Vigna*, p. 424-428. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.). *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA. USA.
- Fonseca, A.E. and M.E. Westgate. 2005. Relationship between desiccation and viability of maize pollen. *Field Crops Res.* 94:114-125.
- Foster, A.S. and E.M. Gifford. 1974. *Comparative morphology of vascular plants*. 2nd ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco. USA.
- Ganeshan, S., P.E. Rajasekharan, S. Shashikumar, and W. Decruze. 2008. Cryopreservation of pollen, p. 443-464. In: B. M. Reed (eds.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York. USA.
- Gopinathan, M.C., C.R. Babu, and K.R. Shivanna. 1986. Interspecific hybridization between rice bean (*Vigna umbellata*) and its wild relative (*V. minima*): Fertility-sterility relationships *Euphytica* 35:1017-1022.
- Gross, Y. and J. Kigel. 1994. Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 36:201-212.
- Gurusamy, V., A. Vandenberg, and K.E. Bett. 2007. Manipulation of in vivo pollination techniques to improve the fertilization efficiency of interspecies crosses in the genus

- Phaseolus*. Plant Breeding 126:120-124.
- Gwata, E.T., D.S. Wofford, P.L. Pfahler, and K.J. Boote. 2003. Pollen morphology and in vitro germination characteristics of nodulating and nonnodulating soybean (*Glycine max* L.) genotypes. Theor. Appl. Genet. 106:837-839.
- Hall, A.E., B.B. Singh, and J.D. Ehlers. 1997. Cowpea breeding. Plant Breeding Rev. 15:215-274.
- Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technol. 45:115-120.
- Heslop-Harrison, J., Y. Heslop-Harrison, and K.R. Shivanna. 1984. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theor. Appl. Genet. 67:367-375.
- Heslop-Harrison, Y. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. Ann. Bot. 41:1233-1258.
- Hoekstra, F.A. 1979. Mitochondrial development and activity of binucleate and trinucleate pollen during germination in vitro. Planta 145:25-36.
- Hoekstra, F.A. and E.W.v.d. Wal. 1988. Initial moisture content and temperature of imbibition determine extent of imbibitional injury in pollen. J. Plant Physiol. 133:257-262.
- Hong, T.D., R.H. Ellis, J. Buitink, C. Walters, F.A. Hoekstra, and J. Crane. 1999. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in air-dry storage environments. Ann. Bot. 83:167-173.
- Huang, Z.H., J.M. Zhu, X.J. Mu, and J.X. Lin. 2004. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. Ann. Bot. 93:295-301.
- Inoue, Y. and H. Suzuki. 1959. Studies on the reproductive physiology of common beans. VII. The effect of temperature on the function of pollen and pistil. J. Hort. Assn. Jpn. 28:19-22.
- Issarakraisila, M. and J.A. Considine. 1994. Effects of temperature on pollen viability in mango cv. 'Kansington'. Ann. Bot. 73:231-240.
- Janssen, A.W.B. and J.G.T. Hermsen. 1976. Estimating pollen fertility in *Solanum* species and haploids. Euphytica 25:577-586.
- Jayaprakash, P. and N. Sarla. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen in vitro. J. Expt. Bot. 52:851-855.
- Johri, B.M. and I.K. Vasil. 1961. Physiology of pollen. Bot. Rev. 27:325-381.
- Kakani, V.G., P.V. Vara-Prasad, P.Q. Craufurd, and T.R. Wheeler. 2002. Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. Plant, Cell Environ. 25:1651-1661.
- Kato, K. 1989. Flowering and fertility of forced green peppers at lower temperatures. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 58:113-121.

- Keijzer, C.J. 1983. Hydration changes during anther development., p. 197-201. In: D. L. Mulcahy and E. Ottaviano (eds.). Pollen: Biology and implications for plant breeding. Elsevier Biomedical., New York. USA.
- Keijzer, C.J. 1987. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytol.* 105:487-498.
- Keijzer, C.J. and M. Cresti. 1987. A comparison of anther tissue development in male sterile *Aloe vera* and male fertile *Aloe ciliaris*. *Ann. Bot.* 59:533-542.
- Kho, Y.O. and J. Baër. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17:298-302.
- Kim, S.K., H.B. Lagerstedt, and L.S. Daley. 1985. Germination responses of filbert pollen to pH, temperature, glucose, fructose, and sucrose. *HortScience* 20:944-946.
- Konsens, I., M. Ofir, and J. Kigel. 1991. The effect of temperature on the production and abscission of flowers and pods in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 67:391-399.
- Lagerwerff, J.V., G. Ogata, and H.E. Eagle. 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science* 133:1486-1487.
- Lansac, A.R., C.Y. Sullivan, B.E. Johnson, and K.W. Lee. 1994. Viability and germination of the pollen of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Ann. Bot.* 74:27-33.
- Lawn, R.J. and D.E. Byth. 1973. Response of soya beans to planting date in south-eastern Queensland. i. influence of photoperiod and temperature on phasic developmental patterns. *Aust. J. Agric. Res.* 24:67-80.
- Lord, E.M. 1981. Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev.* 47:421-449.
- Lord, E.M. and L.U. Kohorn. 1986. Gynecial development , pollination, and the path of pollen-tube growth in the terparry bean, *Phaseolus acutifolius*. *Amer. J. Bot.* 73:70-78.
- Luza, J.G. and V.S. Polito. 1985. In vitro germination and storage of English walnut pollen. *Sci. Hort.* 27:303-316.
- Mercado, J.A., R. Fernández-Muñoz, and M.A. Quesada. 1994. In vitro germination of pepper pollen in liquid medium. *Sci. Hort.* 57:273-281.
- Nepi, M. and E. Pacini. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Ann. Bot.* 72:527-536.
- Nygaard, P. 1969. Studies on the germination of pine pollen (*Pinus mugo*) in vitro. I. Growth conditions and effects of pH and temperature on germination, tube growth and respiration. *Physiol. Plant.* 22:338-346.
- Pacini, E., G.G. Franchi, M. Lisci, and M. Nepi. 1997. Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann. Bot.* 80:83-87.
- Pasquet, R.S. 1998. Morphological study of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Importance of ovule number and definition of cv gr *Melanophthalmus*. *Agronomie*

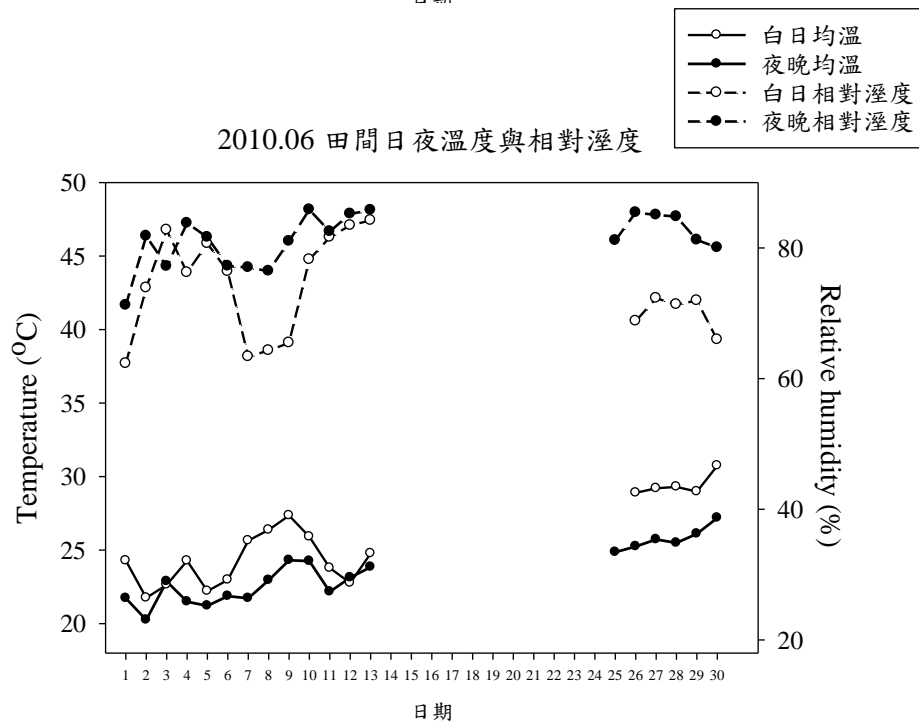
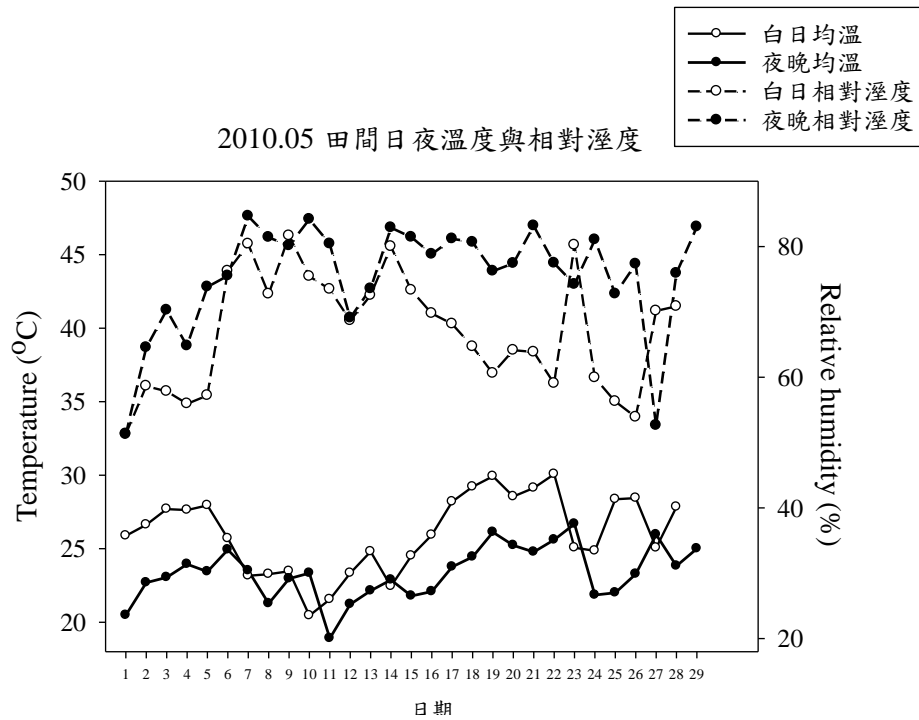
18:61-70.

- Ram, H.Y.M. and I.V.R. Rao. 1984. Physiology of flower bud growth and opening. *Plant Sci.* 93:253-274.
- Roberts, I.N., T.C. Gaude, G. Harrod, and H.G. Dickinson. 1983. Pollen-stigma interactions in *braassica oleracea*; a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 65:231-238.
- Rodriguez-Riano, T. and A. Dafni. 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sex. Plant Reprod.* 12:241-244.
- Rong-Yan, X. and Y. Niimi. 2008. Cold treatment affects microspore development and induces IAA production in pollen sacs in tulip. *Sci. Hort.* 115:168-175.
- 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.
- Rosell, P., V.G. Sauco, and M. Herrero. 2006. Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Sci. Hort.* 109:97-100.
- Saini, H.S., M. Sedgley, and D. Aspinall. 1983. Effect of heat stress during floral development on pollen tube growth and ovary anatomy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust. J. Plant Physiol.* 10:137-144.
- Sakata, T., H. Takahashi, I. Nishiyama, and A. Higashitani. 2000. Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Res.* 113:395-402.
- Sanders, P.M., P.Y. Lee, C. Biesgen, J.D. Boone, T.P. Beals, E.W. Weiler, and R.B. Goldberg. 2000. The Arabidopsis delayed dehiscence1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Amer. Soc. Plant Physiol.* 12:1041-1061.
- Sarutayophat, T. 2008. Evaluation of germplasm and comparison between pedigree and single seed descent methods in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* (L.) Verdc). Prince of Songkla University., Doctor of Philosophy in Plant Science.
- Satake, T. and S. Yoshida. 1978. High temperature-induced sterility in Indica rices at flowering. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 47:6-17.
- Schmid, B.R. and P.H. Alpert. 1977. A test of burck's hypothesis relating anther dehiscence to nectar secretion. *New Phytol.* 78:487-498.
- Schmid, R.F.L.S. 1976. Filament histology and anther dehiscence. *Bot. J. Linn. Soc.* 73:303-315.
- Sedgley, M. 1977. The effect of temperature on floral behaviour, pollen tube growth and fruit set in the avocado. *J. Hort. Sci.* 52:135-141.
- Sedgley, M., M.A. Blesing, and H. Vithanage. 1985. A developmental study of the structure and pollen receptivity of the macadamia pistil in relation to protandry and self-incompatibility. *Bot. Gaz.* 146:6-14.

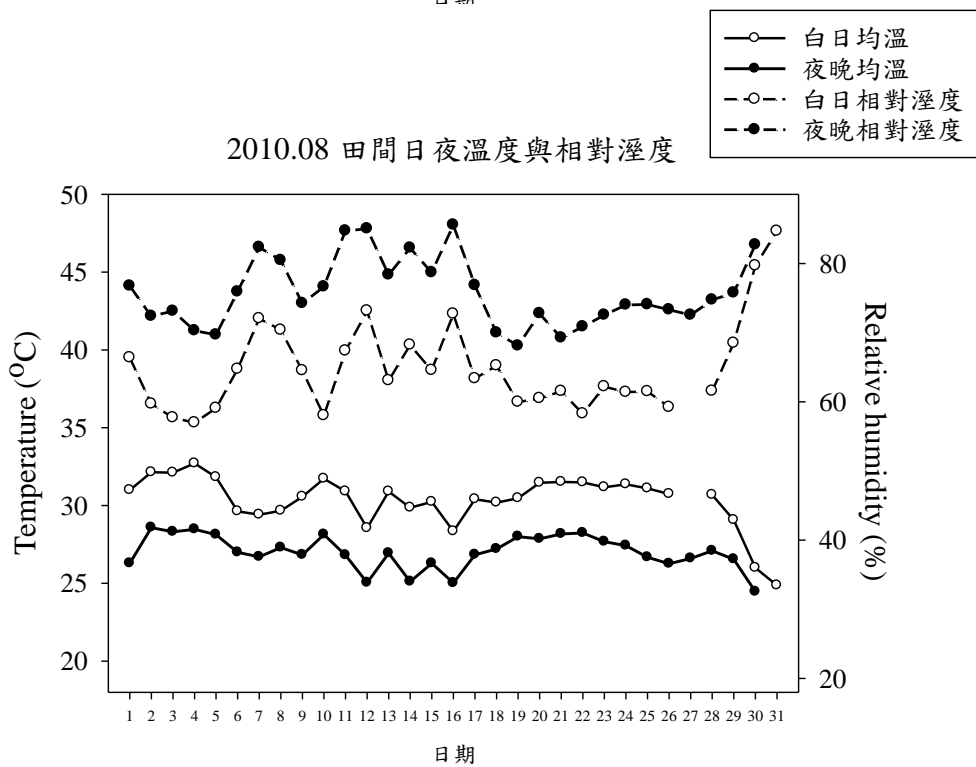
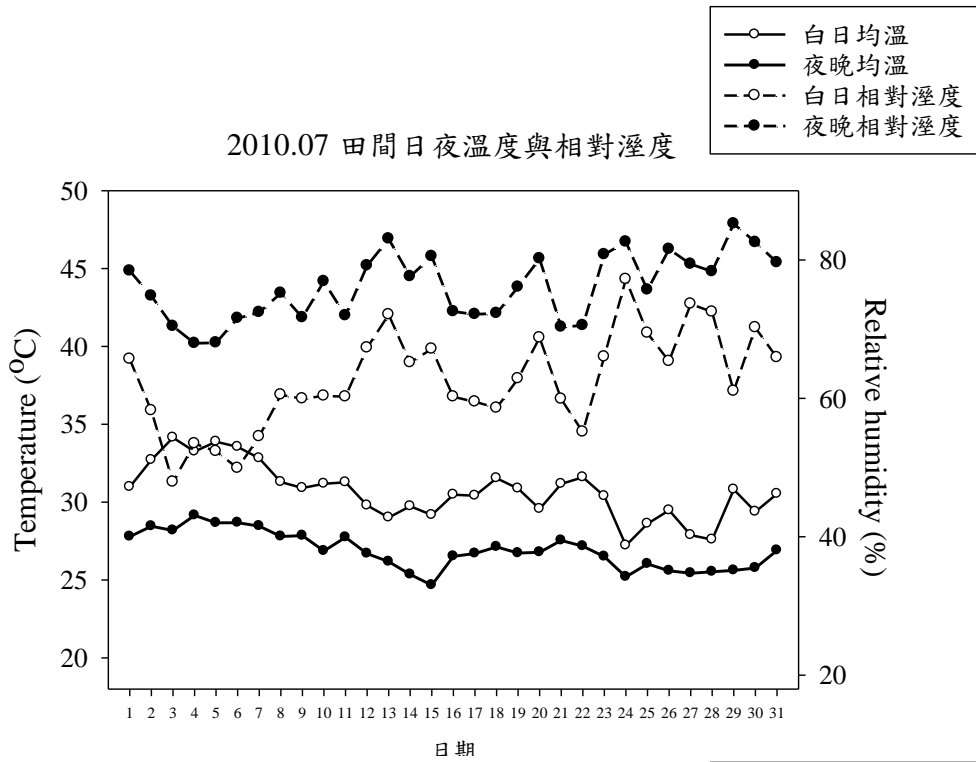
- Sedgley, M. and J. Harbard. 1993. Pollen storage and breeding system in relation to controlled pollination of four species of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Aust. J. Bot.* 41:601-609.
- Shaanker, R.U. and K.N. Ganeshaiyah. 1984. Age-specific sex ratio in a monoecious species *Croton bonplandianum* Baill. *New Phytol.* 97:523-531.
- 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. 2003. *Pollen biology and biotechnology*. ed. Science, Enfield, NH. USA.
- Shivanna, K.R. and J. Heslop-Harrison. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47:759-770.
- Shivanna, K.R., H.F. Linskens, and M. Cresti. 1991. Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability in vitro and in vivo. *Sex. Plant Reprod.* 4:104-109.
- Shivanna, K.R. and N.S. Rangaswamy. 1992. *Pollen biology: a laboratory manual*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York. USA.
- Sidhu, S.S. 1983. Effect of simulated acid rain on pollen germination and pollen tube growth of white spruce (*Picea glauca*). *Can. J. Bot.* 61:3095-3099.
- Singh, B.B., J.D. Ehlers, B. Sharma, and F.R.F. Filho. 2002. Recent progress in cowpea breeding, p. 22-40. In: C. A. Fatokun, S. A. Tarawali, B. B. Singh, P. M. Kormawa and M. Tamò (eds.). *Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production*. IITA., Ibadan. Nigeria.
- Singh, I., S. Bharti, A.S. Nandwal, C.L. Goswami, and S.K. Varma. 1992. Effect of temperature on in vitro pollen germination in pigeonpea. *Biol. Plant.* 34:461-464.
- Singh, S.K., G.K. Surabhi, W. Gao, and K.R. Reddy. 2008. Assessing genotypic variability of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) to current and projected ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol., B* 93:71-81.
- Song, X., Y. Gu, and G. Qin. 2007. Application of a transformation method via the pollen-tube pathway in agriculture molecular breeding. *Life Sci. J.* 4:77-79.
- Stanley, R.G. and H.F. Linskens. 1974. *Pollen: biology, biochemistry, management*. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Steer, M.W. and N.A. Steer. 1989. Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111:323-358.
- Stewart, K.A. and R.J. Summerfield. 1978. Effect of root temperature on floral morphology in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cv K 2809. *Plant Soil* 49:443-448.
- Stone, J.L., J.D. Thomson, and S.J. Dentacosta. 1995. Assessment of pollen viability in hand pollination experiments-a review. *Amer. J. Bot.* 82:1186-1197.
- Suzuki, S. 1978. Anther and pollen abnormalities induced by cold treatment and their varietal difference in rice plants. *Jpn. J. Breeding* 28:21-32.

- Taiwo, M.A. and O.J. Akinjogunla. 2006. Cowpea viruses: Quantitative and qualitative effects of single and mixed viral infections. *Afr. J. Biotechnol.* 5:1749-1756.
- Tantasawat, P., J. Trongchuen, T. Prajongjai, W. Seehalak, and Y. Jittayasothorn. 2010. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. *Sci. Hort.* 124:204-216.
- Taylor, L.P. and P.K. Hepler. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48:461-91.
- Timko, M.P. and B.B. Singh. 2008. Cowpea, a multifunctional legume, p. 227-258. In: P. H. Moore and R. Ming (eds.). *Genomics of tropical crop plants. Plant genetics and genomics: crops and models. Vol. 1*, Springer, New York. USA.
- Vara-Prasad, P.V., P.Q. Craufurd, V.G. Kakani, T.R. Wheeler, and K.J. Boote. 2001. Influence of high temperature during pre- and post-anthesis stages of floral development on fruit-set and pollen germination in peanut. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:233-240.
- Vasil, I.K. 1933. Some notes on carabao mango flower. *Philippine. J. Agri.* 2:395-398.
- Vasil, I.K. 1960. Studies on pollen germination of certain cucurbitaceae. *Amer. J. Bot.* 47:239-247.
- Visser, T. 1955. Germination and storage of pollen. *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 55:1-68.
- Viti, R., S. Bartolini, and C. Vitagliano. 1990. Growth regulators on pollen germination in olive. *Acta Hort.* 286:227-230.
- Wallace, D.H., P.A. Gniffke, P.N. Masaya, and R.W. Zobel. 1991. Photoperiod, temperature, and genotype interaction effects on days and nodes required for flowering of bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:534-543.
- Warraga, M.O.A. and A.E. Hall. 1984a. Reproductive responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to heat stress. I. Responses to soil and day air temperatures. *Field Crops Res.* 8:3-16.
- Warraga, M.O.A. and A.E. Hall. 1984b. Reproductive responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to heat stress. II. Responses to night air temperature. *Field Crops Res.* 8:17-33.
- Westwood, M.N. and J.S. Challice. 1978. Morphology and surface topography of pollen and anthers of *Pyrus* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103:28-37.
- Wiel, C.V.d. 2007. Outcrossing frequency in selfing and apomictic plant species subject to containment measures in GMO development regulation.ed., Netherlands.

附錄



附錄 1. 長豇豆栽培期間白天、夜晚田間溫度與相對濕度變化圖。空缺部分為資料來源有缺值。
(資料來源：台灣大學大氣科學系測計實驗室)



附錄 1. 續.

附錄 2. 長豇豆栽培期間 5 - 8 月田間白天、夜晚最高與最低平均溫度及月均溫。

	白天均溫 (°C)		晚上均溫 (°C)		月均溫 (°C)
	最高	最低	最高	最低	
5 月	30.1	20.5	26.7	18.9	24.8
6 月	30.7	21.7	27.2	20.3	24.5
7 月	34.1	27.2	29.1	24.7	28.9
8 月	32.7	24.9	28.6	24.5	28.8

(資料來源：台灣大學大氣科學系測計實驗室)

附錄 2. 長豇豆栽培期間 5 - 8 月田間白天、夜晚最高與最低平均相對濕度及月平均相對濕度。

	白天平均相對濕度 (%)		晚上平均相對濕度 (%)		月平均相對濕度 (%)
	最高	最低	最高	最低	
5 月	81.6	51.3	84.6	51.2	71.4
6 月	84.2	64.3	85.8	71.2	77.5
7 月	77.2	47.9	85.2	67.9	69.4
8 月	84.7	57.0	85.6	68.1	70.3

(資料來源：台灣大學大氣科學系測計實驗室)