

電阻抗式流式細胞儀 於茄科作物耐熱性評估之應用

農試所生技組 杜元凱 陳涵葳 紀銘坤 王昭月

一、前言

花粉在作物有性生殖的過程中扮演傳遞遺傳物質的角色，具有活力的花粉方能於柱頭上萌發，並於完成受精後產生種子與果實，因此花粉活力是影響作物產量與品質的重要因素之一。茄科作物是台灣重要的經濟作物，包含數種重要的果菜類蔬菜如番茄、番椒等，根據農業統計年報108年番茄總種植面積達4,326公頃，番椒種植面積亦達到2,498公頃，產區主要集中在嘉義與南投等地。近年由於氣候暖化日趨嚴重，每年的高溫時數與最高溫度均顯著上升，若開花期遭逢高溫逆境，花粉易因蛋白質變性與熱休克蛋白質的形成而降低花粉的萌芽能力，導致授粉率低，種子與果實的形成與發育受阻，嚴重影響作物的產量與品質，因此育成耐熱品種是茄科作物現階段最重要的育種目標之一。研究報告指出，作物的耐熱性與花粉在高溫下的活力變化有關，高溫逆境下花粉活力的表現可以做為評估其耐熱特性的指標之一 (Paupière *et al.* 2014)，亦有學者實際利用花粉活力表現針對小麥種原進行高通量耐熱種原篩選 (Anowarul *et al.* 2019)，因此，若能建立一快速評估高溫逆境下花粉活力與數量之檢測方法，將有效節省耐熱育種所需的人力與時間成本，提高我國茄科作物的產業競爭力。

二、常用的花粉活力測定法

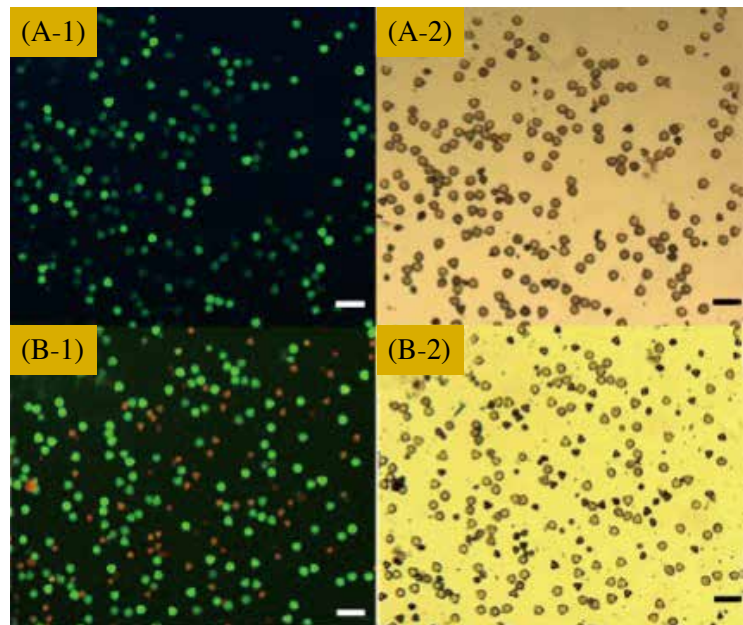
常用的花粉活力檢測法大致可分為兩大類型，其一為萌芽測定法包括活體 (*in vivo*)、半活體 (*semi in vivo*)、離體 (*in vitro*) 萌芽測定法；另外一種則為組織化學染色法 (*histochemical staining method*)。活體萌芽法是將花粉置於花的柱頭上後，使用苯胺藍 (*aniline blue*) 染色，再以螢光顯微鏡觀察花粉發芽情形；而半活體發芽測定法是將授粉後的柱頭切下，以顯微鏡觀察花粉管穿過柱頭的生長情況，上述兩種檢測法的可信度高，缺點為耗時費力，且無法處理大量樣品。離體發芽測定法則是將花粉置於固

作者：杜元凱助理研究員
連絡電話：04-23317321

體或液體培養基上培養一定時間後，計算花粉發芽率及花粉管生長情形，其優點為可處理較多之樣品，但缺點為可能因為作物品種特性的不同，需要事先對培養基成分、萌芽條件與時間進行最佳化調整。

組織化學染色法是利用染劑對花粉的核酸、澱粉等成分進行染色反應，或藉由花粉細胞內之脫氫酶 (dehydrogenase)、酯酶 (esterase) 等酵素與螢光受質作用產生螢光，藉由產生之顏色或螢光來檢測花粉活力。組織化學染色法的優點在於檢測速度快，可處理大量樣品，常用的染劑有碘化鉀、氯化三苯基四氮唑 (2,3,5- triphenyltetrazolium chloride, TTC) 和雙醋酸螢光素 (fluorescein diacetate, FDA) 等，其中FDA為螢光染劑，具有容易操作與判讀的優點，最常被用來檢測花粉活力。FDA在進入具有活力的花粉細胞後，會被細胞內的酯酶水解為螢光素 (fluorescein)，螢光素在螢光顯微鏡下會呈現黃綠色螢光 (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1970)。使用FDA的缺點在於敗育或完整發育但活力不佳的花粉也可能呈現弱螢光反應，且不具活力的花粉也可能因為螢光素的蓄積而有螢光反應，因此FDA

法有可能會高估花粉活力。以番椒「北極星」之花粉為例，花粉經過FDA染色後，在螢光顯微鏡下會呈現明暗度不一的黃綠色螢光，比對明視野下鏡檢之花粉型態，顯示具明亮螢光的花粉其型態通常正常飽滿，而呈現較弱螢光的花粉其型態則較為萎縮甚至有破裂情形 (圖一A-1、A-2)。此類花粉通常已不具萌芽能力，研究者若僅依據FDA螢光觀察結果，容易造成高估的狀況。為修正FDA易錯估花粉活力之情形，後續有學者提出同時使用FDA和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 提高對花粉細胞活力的區分能力 (Ascari *et al.* 2020; Greissl 1989)。PI是一種螢光嵌入劑，當PI進入細胞後，會嵌入DNA或RNA分子結構，在螢光顯



圖一、番椒「北極星」花粉以FDA、FDA-PI染色處理檢測花粉活性之結果。花粉經FDA處理後 (A-1) 以螢光顯微鏡觀察；(A-2) 以顯微鏡於明視野觀察；花粉經FDA-PI雙重染色處理後 (B-1) 以螢光顯微鏡觀察；(B-2) 以顯微鏡於明視野觀察 (bars = 100 μ m)。

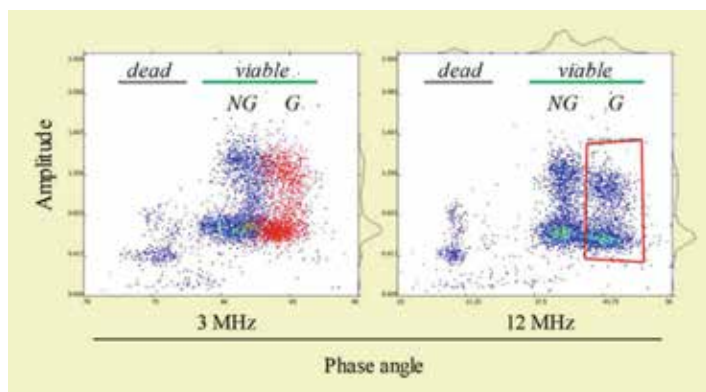
微鏡下產生紅色螢光，由於PI無法通過完整細胞膜，因此只有在細胞膜破損、瓦解等不具活力的花粉中才會呈現出紅色螢光反應。以番椒為例，將「北極星」的花粉進行FDA與PI共同染色，當花粉細胞處於具有活力、細胞膜完整狀態時，PI無法進入花粉細胞，FDA因進入細胞被水解後形成螢光素，因此完整之活細胞會呈現黃綠色螢光，而細胞膜破損、瓦解等情形之細胞，則因PI的染

色呈現紅色螢光。將FDA-PI共同染色法結果比對明視野下鏡檢的花粉型態，結果相當一致，證實此法可降低單純使用FDA染色高估花粉活力的缺點 (圖一B-1、B-2)。

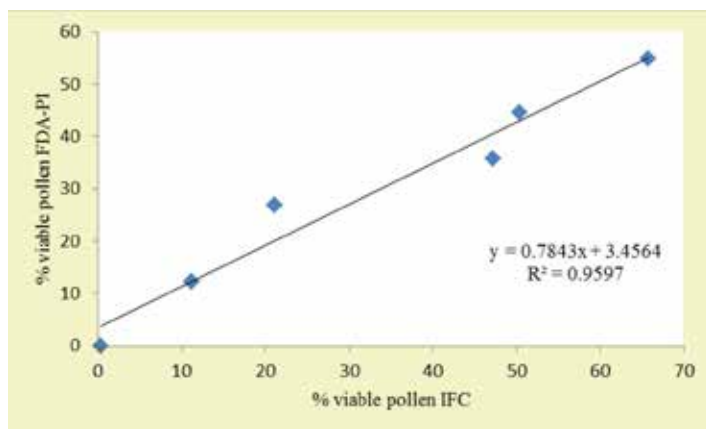
三、應用IFC進行花粉活力快速檢測

電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry, IFC) 是基於流式細胞分

析技術 (flow cytometry) 所發展的分析方法，其原理是以多頻波之交流電通過單細胞，並將各個細胞產生的電阻抗訊息加以收集、分析並轉換成具生物意義數據。IFC可高通量進行花粉活力的測定，分析過程快速且不需染劑，分析結果可提供花粉數量、粒徑大小、活力和染色體倍體數等生物資訊 (杜等2019)。研究報告指出，使用IFC檢測經37℃熱處理與未經熱處理之番椒花粉，可將花粉區分出為不具活力、具活力但無法萌芽以及具活力且可萌芽3個類別 (圖二)，同時可計算上述3類花粉的數量與比例關係 (Heidmann & Berardino 2017)。另外，使用經60℃熱處理後之番椒「北極星」滅活花粉，與正常花粉依下列比例0：5、1：4、2



圖二、IFC檢測法分析番椒花粉活力結果。dead: 不具活力的花粉；viable: 具活力的花粉；NG: 具活力但無法萌芽的花粉；G: 具活力、萌芽的花粉 (Heidmann & Berardino 2017)。



圖三、番椒「北極星」之滅活花粉與正常花粉以0：5、1：4、2：3、3：2、4：1和5：0體積比例混合之樣本，分別以FDA-PI和IFC法檢測花粉活力，將所得數值進行相關性分析之結果。

: 3、3 : 2、4 : 1和5 : 0混合後，再以FDA-PI與IFC檢測法分析花粉活力並計算兩種檢測結果的相關性，結果顯示兩者的相關係數 (R^2) 為0.9597，意指FDA-PI和IFC在番椒花粉活力的檢測結果具有高度相關性 (圖三)。上述2例說明IFC在茄科作物花粉活力檢測方面具備有實際應用之效果，具有取代組織化學染色法的潛力。

四、結語

IFC檢測技術利用偵測個別花粉細胞在通過交流電場所產生的電阻抗訊號，可快速大量分析樣品的花粉活力與花粉粒徑大小，相較於花粉萌芽測定法與組織化學染色法，可減輕檢測花粉活力過程所需耗費的時間與人力成本。此外，在耐熱性育種應用方面，利用IFC檢測技術可快速鑑別茄科作物花粉在高溫逆境的活力表現，可作為品種耐熱特性篩選指標之一，為評估茄科作物耐熱特性可使用的嶄新技術。本所除已利用IFC進行十字花科小孢子培養研究之應用外，業已開展應用IFC快速檢測花粉活力進行番椒耐熱育種相關研究，期待未來可建立一穩定、可靠之耐熱篩選模式，提供種苗業者作為加速茄科作物耐熱品種育成的有效工具。

五、參考文獻

杜元凱、陳涵葳、林新祐。2019。電阻抗式流式細胞儀 (Impedance flow cytometry) 在農業上的應用。技術服務季刊，120:20-24。

Anowarul, I. B., K.Y.T. Daniel, and M. T. Richard. 2019. A robust and rapid pollen viability test using impedance flow cytometry for high throughput screening of heat tolerant wheat (*Triticum aestivum*) germplasm. Proceedings of the 19th Australian Society of Agronomy Conference, Wagga Wagga, NSW.

Ascari, L., C. Novara, V. Dusio, L. Oddi, and C. Siniscalco. 2020. Quantitative methods in microscopy to assess pollen viability in different plant taxa. Plant Reprod. 33: 205-219.

Greissl, R. 1989. Vitality analysis of monadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. Sci. Tech. Info. 15:180-184.

Heidmann, I. and M. Di Berardino. 2017. Impedance flow cytometry as a tool to analyze microspore and pollen quality. p. 339-354. in: Plant Germline Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1669. (A. Schmidt, ed.) 422 pp.

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.

Paupière, M. J., A. W. Van Heusden, and A. G. Bovy. 2014. The metabolic basis of pollen thermo-tolerance: perspectives for breeding. Metabolites 4(4):889-920.