

利用花粉活力檢測技術 篩選耐高溫水稻品種簡介

農試所生技組 夏奇鈺 游舜期 曹進義

農試所作物組 李長沛

一、全球暖化對水稻產業之影響

根據聯合國「政府間氣候變化專門委員會」(IPCC) 資料顯示，20世紀全球平均溫度增加了 $0.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ，並預測至公元2100年，全球平均氣溫將升高 $1.1 \sim 6.4^{\circ}\text{C}$ (IPCC 2007)。由於全球氣候暖化的趨勢日益嚴重，未來的作物生產勢必面臨長期高溫與極端氣候各種逆境之衝擊。水稻為世界前三大之重要糧食作物，全球約有1/3人口以稻米為主食，同時也是我國栽培面積最大的農糧作物，水稻產量的穩定對民生安定具有一定之作用。根據研究，水稻生育期間溫度高於 35°C 時，每增加 1°C ，稻穀產量將減少約10%。此外，穀粒充實期的高溫逆境將造成米粒白垩質率的增加，且千粒重亦有減輕的趨勢，亦即高溫不僅影響水稻的產量並導致米質下降。因此如何在全球持續暖化環境下，確保水稻產業之永續經營，是產官學三方必須及早因應的課題。以學研之角度來看，短期對策為研發各種對抗逆境的栽培調適技術，以便即時因應環境逆境；長期來看，選育耐高溫逆境之水稻新品種則是根本解決之道，然而如何對現有水稻遺傳資源的耐熱性作出快速且正確的評估，則是育成耐高溫水稻新品種之第一步。

本篇以水稻花粉活力的檢測為例，並簡介利用流式細胞儀原理檢測花粉活力的新方法，由於此法之應用並無作物別的限制，而花粉活性對於以收穫種子或果實為標的之作物而言，重要性不可言喻，為及早因應氣候長期暖化對花粉產生之影響，育種人員對於花粉活力或其耐熱性表現必須加以重視。

二、溫度對水稻花粉與穎花稔實率之影響

在建立耐熱品種篩選指標之前，必須先了解溫度是如何影響水稻產量的表現。水稻屬熱帶及亞熱帶作物，植株在不同發育時期遭遇高溫受影響之程度並不相同。在

作者：夏奇鈺 研究員
連絡電話：04-23317327

營養生長期遇高溫，生理上之表現為葉片光合作用率下降、同化產物減少、發生過氧化傷害，在外觀上可觀察到生長受抑制、分蘖減少、株高增長緩慢等現象。在生殖生長期遭遇高溫受到的影響遠大於營養生長期，其中又以抽穗開花期對溫度最為敏感，其次是孕穗期（花粉母細胞減數分裂期）。探究開花期受到高溫的影響，包括花粉發育、花藥開裂、花粉在柱頭散落之數量以及花粉管伸長等方面。細看花粉受到之影響，則包括花粉活力、花粉發芽率或花粉管伸長功能降低等，高溫使花粉粒的膨脹程度降低，導致花藥囊開裂比例下降，從而影響花粉粒的散佈，使得柱頭上花粉數不足，造成穎花稔實率的降低 (Matsui *et al.* 2000)。觀察水稻花粉萌發及花粉管的生長動態顯示，水稻花粉粒在授粉2分鐘後開始萌發，5~10分鐘後穿過柱頭進入花柱生長，30分鐘到達子房基部，40分鐘後花粉管頂部已接近胚囊。此外，藉由在授粉後不同時間剪除柱頭來觀察穎花結實率變化，結果顯示在授粉後10~15分鐘剪除柱頭，只有極少量穎花結實，授粉後20~50分鐘剪除柱頭，穎花結實率會隨剪除時間的延遲而升高，而在授粉後50分鐘剪除柱頭，穎花結實率達60%以上，已接近正常之結實率 (Chen *et al.* 2007)。綜上所述，水稻的生殖過程於開花後1小時間即完成，過程中包括花粉粒膨脹、花藥囊開裂、花粉粒散落柱頭、花粉於柱頭髮芽、花粉管伸長與受精，此一過程在日溫超過33℃、夜溫超

過29℃時即受到影響，最後反應於穎花稔實率的降低。更精確一點來說，高溫主要對正在開花的穎花產生影響，高溫對於1小時前開的花或1小時後才開花的穎花影響明顯降低，亦即高溫效應侷限在一個器官且時間極為短暫，這也是為什麼許多高溫處理試驗的結果往往不容易正確反應其影響程度的原因 (Satake & Yoshida 1978)。相對於雄配子體對高溫的敏感，研究顯示雌蕊的受精能力在41℃以下時並不會受到高溫影響。Prasad *et al.* (2006) 的研究顯示，高溫對每穗稔實率與每穗粒重之影響，與對穎花稔實率之影響具有相似性，因此建議生殖期間高溫之影響可藉由觀察穎花之稔實率作為篩選耐熱品種之用，並指出高溫導致穎化稔實率降低，主要是受到花粉量與柱頭上之花粉數量降低所致，且此二因子具有高度相關性。傳統耐高溫品種之篩選主要以田間高溫處理為主，首先在自然環境下難以精確調控溫度，其次在設施下雖可提供高溫但成本高昂，尤其在田間或溫室環境下，要讓穎花實際感受之溫度與處理溫度相符有其難度，這也說明高溫適應性的篩選需有更精確的衡量指標，作為種原評估與品種改良之用。

三、花粉耐熱性篩選指標之建立

基於上述研究之觀察，高溫對花粉活力之影響攸關該品種之穎花稔實率，傳統上對於花粉活力的評估，一般

以細胞染色法、花粉在人工培養基上的萌發率最為常用 (Song 2001)，近年來則有分析細胞電阻抗表現之流式細胞儀 (impedance flow cytometry, IFC) 出現，IFC每一樣品之檢測僅需數分鐘，檢測之細胞數從數千至數萬不等。一般而言，花粉觀察數若超過數百應已具代表性，因此從檢測數量上來看，並非IFC之主要優勢；但從檢測效率來看，IFC無疑是大量、快速篩選花粉活力之利器 (Heidmann *et al.* 2016)。利用IFC分析花粉活力雖然快速方便，但初期必須負擔較高的儀器設備投資，這也是使用者必須考量的因素。本研究以台南11號 (TN11) 稻與耐熱之Nagina 22 (N22) 陸稻為材料，比較3種細胞染劑 Fluorescein diacetate (FDA)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC) 與碘化鉀 (I2-KI) 溶液對水稻花粉之染色率，結果顯示3種細胞染劑中1% I2-KI具有偏高之染色率，TTC之染色率最

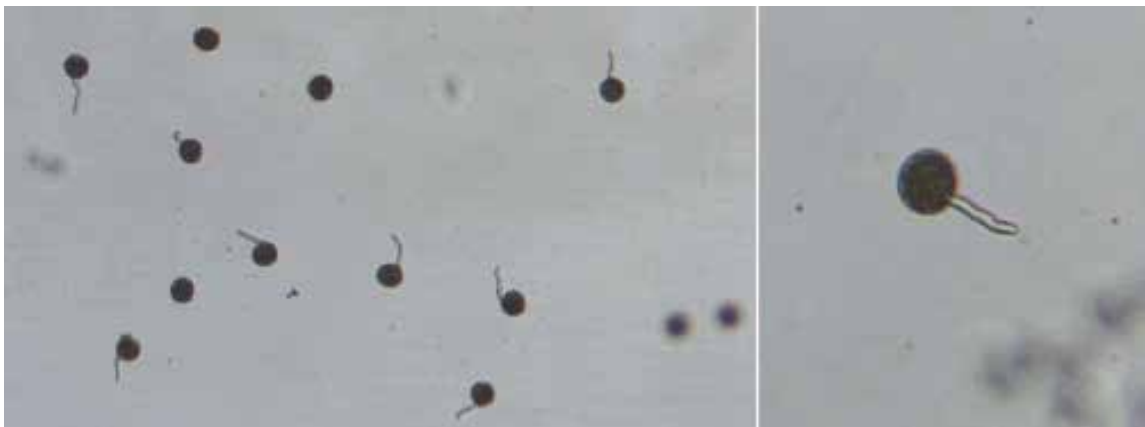
低，而以FDA之染色率與花粉萌發率較接近 (圖一為TN11之花粉於培養基中萌發之情形)。更進一步以N22與TN11兩品種比較花粉萌發培養、FDA染色及IFC花粉活力分析，結果顯示花粉萌發率、FDA染色率與IFC檢測結果在統計上並無明顯差異 (表一)。此試驗證明了IFC作為替代細胞染色法或花粉萌發培養法的可行性。續以IFC檢測上述2品種之花粉在25℃至45℃間花粉活力的變化，結果顯示TN11隨著處理溫度上升，其花粉活力快速下降，在 35℃時花粉活力僅剩

表一、水稻花粉以三種檢測方法測得之花粉活力比較^z

檢測方法 (%)	品種	
	Nagina 22	台南11號
花粉培養之萌發率	62.7 ± 2.1 b ^y	65.7 ± 6.4 a
FDA染色率	73.3 ± 4.2 a	71.7 ± 2.3 a
IFC花粉活性比率	69.2 ± 3.4 ab	73.6 ± 1.9 a

^z Each treatment had three replicates, and 2 spikelets were used for each replicates.

^y Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.



圖一、水稻「台南11號」於室溫之發芽培養基中培養7分鐘後發芽之情形。

32.3%；而N22在25°C~30°C間，花粉活力並無明顯變化，在40°C時其花粉活力仍有42.0%，顯示出兩品種花粉對於高溫的耐受性有明顯差異，這個結果給我們信心將繼續以IFC進行更多水稻品種花粉的耐溫性篩選。

四、結語

水稻開花期遇高溫導致穎花稃實率降低，因高溫影響僅限於當日或即將開放之穎花，調查之標的必須是直接受影響之穎花，在大面積的田間實施並不容易，必須尋求相關性高且易於實施的篩選指標。水稻花粉之耐熱性篩選符合相關性高、快速且經濟成本低等要求，因此若能以花粉進行耐溫性檢測，再與田間高溫篩選之結果兩相對照，應具有相輔相成之效果，對耐高溫水稻育種在篩選種原、選種以及評估栽培調適方法評估上皆有助益。本研究目前仍持續進行中，將針對國內水稻推廣品種之花粉，在不同溫度下之活力表現加以調查，了解各品種花粉在不同溫度處理下之活力表現提供育種者參考。然而我們也必須了解水稻品種在耐熱特性上存在多樣性，亦即不同水稻品種對高溫逆境可能採取不同之對應模式，花粉耐熱性只為其一，其他如提早開花躲避高溫以及花藥囊結構易於開裂等特性亦為類型，如何將這些特性逐一探明並整合利用，將對抗逆境之資源效益發揮至最大，則是研究人員未來持續努力之目標。

五、參考文獻

- Chen, S. Q., Z. Wang, M. X. Liu, and Z. W. Xie. 2007. Germination of pollen and growth dynamic of pollen tube in rice. *Chinese J. Rice Sci.* 21:513-517.
- Heidmann, I., G. Schade-Kampmann, J. Lambalk, M. Ottiger, and M. Di Berardino. 2016. Impedance flow cytometry: a novel technique in pollen analysis. *Plos one* 11:1-15.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) Climate Change 2007: Synthesis Report. IPCC Press, Geneva. 104 pp.
- Matsui T., K. Omasa and T. Horie. 2000. High temperature at flowering inhibits swelling of pollen grains, a driving force for the dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 3: 430434.
- Prasad P. V. V., K. J. Boote, L. H. Allen Jr., J. E. Sheehy, and J. M. G. Thomas. 2006. Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress. *Field Crops Research* 95:398-411.
- Satake T, and S. Yoshida. 1978. High temperature induced sterility in indica rices at flowering. *Japanese J. of Crop Sci.* 47:6-17.
- Song Z. P. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. sativa*, and their hybrids. *Genetic resources* 26:31-32.