

抽穗後高溫處理對水稻花粉活力及稔實率之影響

夏奇鈺¹ 李長沛² 蔡嫻婷³ 蔡挹恆⁴ 黃佩瑩⁴ 莊淨⁵ 游舜期^{5,*}

摘要

夏奇鈺、李長沛、蔡嫻婷、蔡挹恆、黃佩瑩、莊淨、游舜期。2024。抽穗後高溫處理對水稻花粉活力及稔實率之影響。台灣農業研究 73(4):281–291。

本研究在水稻抽穗至穀粒成熟期間於檢定圃進行高溫處理，探討高溫對花粉活力與稔實率之影響。水稻材料為耐熱早熟籼型陸稻 'Nagina 22' ('N22')、中晚熟粳稻「台南 11 號」('Tainan 11'; 'TN11') 與「台梗 9 號」('Taiken 9'; 'TK9') 以及以 'TK9' 引入 'N22' 耐熱基因育成之近同源系 (BC₄F₃) PA163 與 PA164，於 2020 年第二期作與 2021 年第一期作以水田栽培方式分別種植於田區與耐熱性檢定圃 (塑膠棚溫室)。2020 年第二期作檢定圃於 'N22' 抽穗後至穀粒成熟期間每日 08:00–15:00 以柴油加熱器加熱，設定溫度 38°C；2021 年第一期作白天加熱溫度增為 39°C，並於夜間 20:00 至隔日 06:00 設定加熱溫度為 28°C。植株於抽穗日掛牌並於 2 d 後採穗，取採穗當日即將開放穎花之花粉以電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC) 檢測花粉活力。2020 年第二期作結果顯示，同一品種 (系) 其田區與檢定圃之花粉活力相較，差異皆不顯著；稔實率相較，亦皆差異不顯著。2021 年第一期作結果顯示，PA164、'TN11' 及 'TK9' 之田區與檢定圃花粉活力相較差異顯著；稔實率方面，除上述 3 品種 (系) 外，另有 PA163 亦顯示差異顯著。此外，2021 年第一期作自田區取 5 品種 (系) 穎花之花粉以 25–45°C 溫度處理並檢測花粉活力變化，將不同溫度處理測得之花粉活力與其 25°C 處理之花粉活力 (最高值) 相較之百分比作為相對花粉活力，並依品種 (系) 相對花粉活力受溫度影響程度由小至大排序，分別為 'N22'、'TN11'、PA164、PA163 及 'TK9'。本研究結果顯示花粉活力與稔實率皆受到高溫影響而下降，但採用檢定圃高溫處理成本較高且溫度設定較不具彈性，而採用溫度處理田區花粉並檢測其活力變化，具成本低且實施簡易具彈性之優點，應可作為耐熱水稻種原快速或初級篩選之用。

關鍵詞：水稻、稔實率、花粉活力、電阻抗式流式細胞儀。

前言

水稻為熱帶與亞熱帶作物，是東亞地區最重要的主要糧食，隨著全球氣候暖化趨勢加劇，水稻受到高溫危害的情形益趨頻繁與嚴重，耐熱水稻品種的育成有其必要與重要性 (Chuang & Lur 2013)。臺灣耐熱水稻的篩選常利用一期作田間之自然高溫配合分期播種或延遲種植，達到從生長至收穫皆暴露於高溫環

境之目的，但此法受限試驗場域之自然條件對環境因子的強度無法完全掌控。因此，利用設施精準管控環境因子的策略因應而生，其中利用人工氣候室與生長箱以盆栽栽培水稻，雖然環境因子得以控制，但常受限於場域無法採行水田栽培，且盆栽數量亦受到限制 (Hsuan *et al.* 2019)。農業部農業試驗所 (農試所) 利用改良式雙拼圓頂力霸塑膠型溫室加裝柴油加熱設備，在設施內以水田方式栽培水稻，除溫度

投稿日期：2024 年 7 月 2 日；接受日期：2024 年 9 月 23 日。

* 通訊作者：yousc_l@tari.gov.tw

¹ 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組研究員。臺灣 臺中市。

² 農業部農業試驗所作物組研究員。臺灣 臺中市。

³ 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組聘用副研究員。臺灣 臺中市。

⁴ 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組計畫助理。臺灣 臺中市。

⁵ 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組助理研究員。臺灣 臺中市。

可調控外，其他栽培條件仍保持與當地田間環境最大之相似度（光強度與日照時間等），是現階段觀察高溫逆境對水稻生長、生理、生殖、產量及穀粒品質影響的較佳選擇。

Matsui *et al.* (2001a) 研究指出高溫導致稔實率降低的主因，一為柱頭之花粉數量 (pollen reception) 偏低，二為花粉在柱頭上萌發不良所致，亦即高溫對生殖過程的影響可藉由觀察花粉特性受到高溫影響的改變來評估。傳統上對花粉活力的評估方法有觀察柱頭上之花粉數或花粉管伸長情形等，這些方法大都需要藉由固定組織、染色或切片等操作 (Shi *et al.* 2017)，此外亦可利用花粉發芽培養來評估花粉活力 (Khatun & Flowers 1995; Song *et al.* 2001)。但是，上述諸法皆需較多的執行人力，且觀察數量受限，因此較適合作為現象解釋而非大量篩選之用。本研究過去利用電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC) 建立水稻花粉活力檢測方法，結果顯示與慣用之花粉培養法或 FDA 染色檢測法並無差異。惟 IFC 前置作業簡單且可檢測之花粉數量遠高於上述方法，在節省人力、時間與提高效率方面皆具優勢 (Hsia *et al.* 2022)。

本研究利用農試所建立的水稻耐熱性檢定圃以水田方式栽培水稻，並於抽穗開始至穀粒成熟期間進行高溫處理，探討不同品種 (系) 水稻之花粉活力與稔實率在高溫影響下的表現。同時以取自田區之水稻花粉進行不同溫度處理，並以 IFC 檢測花粉活力受溫度影響之變化。

材料與方法

水稻材料

供試之 5 個水稻品種 (系) 分別為耐熱早熟之秈型陸稻 (aus type) ‘Nagina 22’ (‘N22’)、中晚熟粳稻「台南 11 號」(‘Tainan 11’; ‘TN11’) 與「台梗 9 號」(‘Taiken 9’; ‘TK9’) 以及利用 ‘TK9’ 導入 ‘N22’ 耐熱基因所育成之近同源系 (BC₄F₃) PA163 與 PA164。

高溫處理

水稻種植地點位於臺中市霧峰區農試所 (經緯度為 120.6881°E, 24.0313°N 海拔高度為 90 m)，以水田栽培方式分別種植於田區及耐熱性檢定圃溫室內，溫室結構為改良式雙拼圓頂力霸塑膠型溫室。田區與檢定圃均採逢機完全區集設計 (randomized complete block design; RCBD)，每品種 4 重複，每重複種植 45 株。2020 年第二期作在早熟稻 ‘N22’ 抽穗後至穀粒成熟期間進行高溫處理，於每日 08:00 開啟柴油加熱器持續加熱至 15:00，設定加熱溫度為 38°C；2021 年第一期作白天設定高溫為 39°C 外，於 20:00 至隔日 06:00 設定夜溫為 28°C。試驗期間記錄兩期作各品種之採穗日期 (表 1)、抽穗至穀粒成熟期間 (加熱期間) 田區與檢定圃內的日均溫度變化 (圖 1)，以及田區與檢定圃在加熱時段與未加熱時段之平均溫度 (表 2)。

花粉取樣與活力檢測

選取剛突出劍葉葉枕之稻穗加以標記 (第

表 1. 5 個水稻品種 (系) 於高溫處理溫室 2 連續期作之採穗日期、採穗時溫度以及採穗當日最高溫度。

Table 1. Panicle harvesting dates, temperatures at picking time, and the highest temperatures on that day for 5 rice varieties (lines) grown in 2 consecutive cropping seasons in a heated greenhouse.

Cultivar	Second cropping season, 2020			First cropping season, 2021		
	Panicle harvesting dates	Temperature at harvesting (°C)	Highest temperature in harvesting day (°C)	Panicle harvesting dates	Temperature at harvesting (°C)	Highest temperature in harvesting day (°C)
‘N22’	10/14	39.7	42.5	4/28	39.2	38.6
PA164	10/16	38.8	42.6	5/19	42.1	44.4
‘Tainan 11’	10/20	39.2	42.0	5/24	42.1	41.1
‘Taiken 9’	10/21	39.4	40.2	5/21	42.6	45.6
PA163	10/22	38.1	39.6	5/20	42.4	44.0

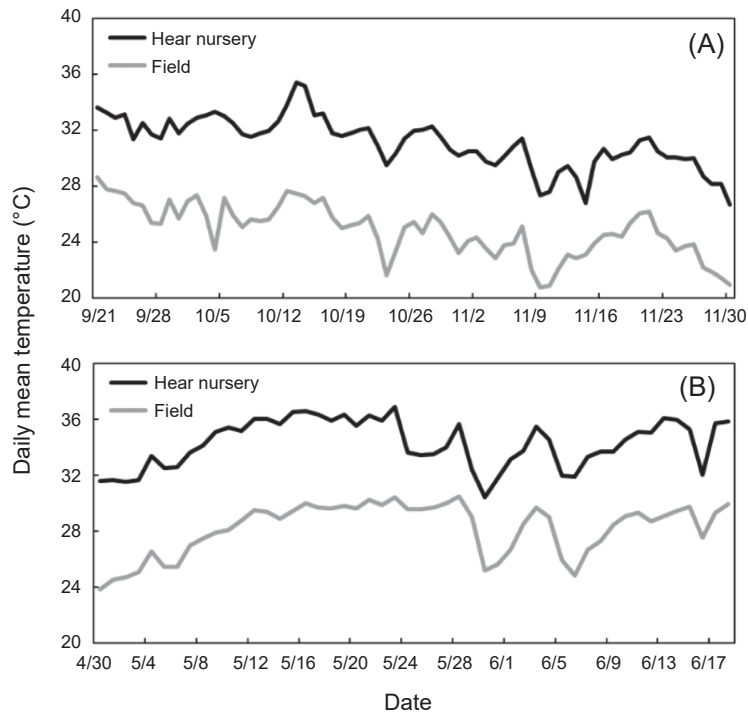


圖 1. (A) 2020 年第二期作與 (B) 2021 年第一期作於田間及高溫處理溫室之平均溫度曲線。

Fig. 1. Mean daily temperature curves of the field and the heating greenhouse in (A) the second cropping season of 2020 and (B) the first cropping season of 2021.

表 2. 田間與高溫處理溫室於 2 連續期作之日均溫以及加溫與未加溫時段的平均溫度。

Table 2. The mean temperatures of the field and the heating greenhouse in the heated and unheated periods in 2 consecutive cropping seasons of this study.

Year-crop-ping season	Treatment	Mean temperature (°C) 08/03–09/20, 2020			Mean temperature (°C) 09/21–11/30, 2020		
		00:00–24:00	08:00–15:00	15:00–08:00	00:00–24:00	08:00–15:00	15:00–08:00
2020-2	Field	28.2	31.5	27.0	24.8	28.3	23.4
	Heating greenhouse	32.8	36.0	31.5	31.1	37.0	28.6
	Difference	4.6	4.5	4.5	6.3	8.7	5.2
2021-1		03/07–04/20, 2021			04/21–06/20, 2021		
	Field	22.3	25.6	19.9	27.5	30.4	25.6
	Heating greenhouse	27.0	31.1	24.2	33.8	40.4	29.6
	Difference	4.7	5.5	4.2	6.3	10.0	4.0

0 日)，每一品種(系)共標記 10 株(1 穗/株)，於第 2 日選取其中 5 株進行採穗。2020 年第二期作採穗時間為 09:00；2021 年第一期作為 10:00。將採穗株由稻稈基部剪下並置入水杯中再次修剪，將置有稻穗之水杯攜回置於窗邊或光照下促進開穎。取主穗枝前段(約 6 cm)

將開裂之穎花 5 朵，以鑷子取出花藥放入裝有 500 μ L AF6 緩衝液 (Amphasys, Root, Switzerland) 之微量離心管中，以組織研磨棒輕壓花藥釋出花粉後，以 100 μ m 濾網過濾，取 200 μ L 花粉濾液加入 AF6 緩衝液定量至 500 μ L，作為單次分析樣品 (1 重複)，共進行 4 重

複。花粉活力以 IFC Ampha Z30 (Amphasys, Root, Switzerland) 進行檢測，使用 120 μm 孔徑晶片，電波頻率為 12 MHz、馬達轉速 35 rpm，其他檢測參數 modulation/amplification/demodulation 為 4/6/2，trigger level 為 0.1。分析顯示之 X 軸相位角設定為 180–270，Y 軸震幅設定為 0–6，並以 AmphaSoft 2.0 (Amphasys, Root, Switzerland) 軟體進行分析，花粉活力為計算具活力之花粉數占總檢測花粉數之百分比 (Hsia *et al.* 2022)。

田區花粉以不同溫度處理對花粉活力之影響

2021 年第一期作於 10:00 進行上所述 5 個品種 (系) 田區稻穗取樣，每一品種 (系) 選取 6 株，每株取 1 穗，每穗取 6 朵穎花，混合 2 穗共 12 朵穎花之花藥。花粉濾液製備同上所述，但 AF6 緩衝液使用量為 1.8 mL，之後將花粉濾液平均分成 6 份，將每份濾液再以 AF6 緩衝液定量至 500 μL 作為單次分析樣品。將 6 樣品分別置於溫度設定為 25、30、35、40、45 及 100°C 之乾浴器內處理 15 min 後，以 IFC 進行花粉活力檢測，並以 100°C 處理後花粉測得之細胞散點界定為死亡細胞與活力低下細胞。IFC 之參數設定條件同上一試驗所述，每一溫度處理共進行 3 重複。

統計分析方法

試驗水稻種植採用 RCBD，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc. 2014) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析。若處理間差異顯著 ($P < 0.05$)，則利用最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

田區與耐熱性檢定圃之水稻花粉活力表現調查

2020 年第二期作於抽穗至穀粒成熟期間，檢定圃日均溫度變化範圍在 27–35°C 間，田區溫度變化範圍在 21–28°C 間 (圖 1A)。在未加熱期間 (8/3–9/20) 檢定圃與田區於 08:00–15:00

(加熱) 或 15:00–08:00 (未加熱) 時段之溫度差異皆為 4.5°C，顯示因塑膠棚設施所造成的日均溫度差異為 4.6°C；檢定圃加熱期間 (9/21–11/30) 與田區溫度差異，在加熱時段為 8.7°C，在非加熱時段為 5.2°C，與田區之日均溫度差異為 6.3°C (表 2)。5 個水稻品種 (系) 的取穗日期介於 10/14–10/22 之間 (表 1)。以 IFC 檢測當日開放穎花之花粉活力如表 3，結果顯示取自檢定圃的花粉活力在 69.3–79.5% 間；取自田區的花粉活力在 63.1–77.7% 間，同一品種 (系) 檢定圃與田區之花粉活力相較，皆以檢定圃較田區之花粉活力稍高，但統計上均顯示無明顯差異。在稔實率方面，顯示檢定圃在 81.3–91.8% 間；田區在 82.0–92.7% 間，同一品種 (系) 在不同場域之稔實率相較，亦均無顯著差異 (表 3)。

2021 年第一期作抽穗至穀粒成熟期間的日均溫度變化，檢定圃在 31–37°C 間，田區在 24–30°C 間 (圖 1B)。在未進行加熱期間 (3/7–4/20) 檢定圃與田區之日均溫度差異為 4.7°C，與 2020 年第二期作之日均溫度差異 4.6°C 相近；加熱期間 (4/21–6/20) 檢定圃在加熱時段之均溫達 40.4°C，與田區溫度差異達 10.0°C；在非加熱時段 (15:00–8:00) 檢定圃與田區之平均溫度差異為 4.0°C，檢定圃與田區之日均溫差為 6.3°C (表 2)。5 個水稻品種 (系) 於 4/28–5/24 間進行採穗 (表 1)。以 IFC 檢測花粉活力與花粉濃度，結果顯示同一品種 (系) 採自不同場域之花粉濃度均顯示無明顯差異 (表 4)。花粉活力檢測結果顯示，取自檢定圃之花粉活力在 57.8–74.4% 間，取自田區在 62.9–76.4% 間，5 個品種 (系) 中僅 'N22' 與 PA163 在兩場域間顯示無顯著差異，其餘 3 品種 'TN11'、'TK9' 及 PA164 皆以田區花粉活力顯著高於檢定圃。稔實率方面，檢定圃以 'N22' 之 89.2% 最高，其餘 4 品種在 43.5–55.4% 間，田區組在 88.7–93.0% 間，5 個品種 (系) 中僅 'N22' 在不同場域顯示無顯著差異，其餘 4 品種 (系) 皆以田區組之稔實率顯著高於檢定圃 (表 4)。

田區花粉以不同溫度處理對花粉活力之影響

2021 年第一期作取田間當日開放穎花之

表 3. 2020 年第二期作高溫處理溫室與田間 5 個水稻品種 (系) 之花粉活力與稔實率。

Table 3. Pollen viability and spikelet fertility of 5 rice cultivars (lines) planted in the field or in a heating greenhouse in the second cropping season of 2020.

Cultivar/line	Pollen viability (%)		Spikelet fertility (%)	
	Heat nursery	Field	Heat nursery	Field
‘N22’	69.3 ± 7.6 a ^z B ^y	63.1 ± 6.3 a C	91.8 ± 4.4 a A	92.7 ± 1.5 a A
PA163	79.5 ± 3.5 a A	77.7 ± 3.6 a A	81.7 ± 3.9 a A	82.0 ± 6.2 a B
PA164	77.8 ± 5.7 a A	74.5 ± 6.3 a AB	81.3 ± 7.5 a A	82.9 ± 5.3 a AB
‘Tainan 11’	72.9 ± 6.9 a AB	71.5 ± 6.5 a ABC	86.7 ± 6.5 a A	84.2 ± 5.4 a AB
‘Taiken 9’	69.8 ± 4.3 a B	65.4 ± 11.5 a BC	86.3 ± 4.8 a A	91.9 ± 1.7 a AB

^z Means with different letters (in small letter) in the same cultivar (lines) in the same character are significantly different ($P < 0.05$) by *t*-test.

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

花粉以 25–45°C 溫度處理 15 min 後，以 IFC 檢測花粉活力之變化。結果顯示 5 個水稻品種 (系) 皆以 25°C 處理之花粉活力值最高，介於 61.3–65.9% 間 (表 5)。為顯示花粉活力受溫度處理影響之下降程度，將各溫度處理測得之花粉活力與 25°C 處理相較，計算相對 25°C 處理之花粉活力百分比 (相對花粉活力)。結果顯示在 35°C 或 40°C 處理後之相對花粉活力變化，以 ‘N22’ 保持在 85.9–86.8% 間最高；下降幅度次低者為 ‘TN11’ 與 PA164，在 40°C 處理時相對活力仍保持在 60% 以上；而以 PA163 與 ‘TK9’ 下降幅度最大，在 35°C 時相對活力皆已降至 60% 以下，其中 ‘TK9’ 隨處理溫度上升，花粉活力下降之幅度最為明顯。依照溫度處理後各品種 (系) 相對花粉活力保持程度加以排序，由高至低分別為 ‘N22’、‘TN11’、PA164、PA163 及 ‘TK9’。

討論

不同期作對檢定圃高溫處理之影響

在全球氣候持續暖化的大趨勢下，長期高溫已然成為臺灣農業必須面對的新常態。水稻是臺灣最重要的糧食作物，耐熱水稻的育成有其必要與急迫性，但如何有效篩選水稻的耐熱特性則是育種實施的第一步 (Prasad *et al.* 2006; Chuang & Lur 2013)。一般而言，植物在生殖生長階段較營養生長階段對高溫更為敏感，水稻花粉受到高溫影響會導致花粉活

力與花藥囊開裂比率降低，進而影響散粉、柱頭上的花粉數、受精率以及後續的穀粒發育，最終反應於米質與產量的降低 (Fahad *et al.* 2018)。本研究於農試所之田區設置改良式雙拼圓頂力霸塑膠型溫室作為耐熱性檢定圃，在其內以水田方式栽培水稻，於抽穗後至穀粒成熟期間進行高溫處理，並於穎花開放當日進行花粉活力檢測。2020 年第二期作加熱時段之設定溫度為 38.0°C，實際測得之平均溫度為 37.0°C (表 1)。依據 Kobayashi *et al.* (2011) 研究顯示，使用 37.5°C 可區分耐熱與高溫敏感水稻品種，本研究 2020 年二期作與 Kobayashi *et al.* (2011) 使用之溫度相近似，但本研究同一品種 (系) 檢定圃之花粉活力與田區相較，5 品種 (系) 皆顯示無顯著差異，稔實率亦同 (表 3)，據此推測本研究使用之 5 品種 (系) 應皆非高溫敏感水稻品種 (系)。

整體來說 2020 年二期作 5 品種 (系) 高溫檢定圃與田間相較，無論在花粉活力或稔實率方面皆顯示為差異不顯著，並未能將 5 品種 (系) 的耐熱特性加以區分。因此，2021 年第一期作將白天加熱溫度由 38°C 提高至 39°C 外，並增加夜間 20:00 至隔日 06:00 設定為 28°C 之加熱處理，同時也將採穗時間由早上 9:00 延後至 10:00，確保採穗時水稻植株冠內溫度已升至設定溫度。經此調整 2021 年第一期作檢定圃加熱時段實際測得之平均溫度為 40.4°C，較設定溫度 39°C 高出 1.4°C (表 2)，與 2020 年第二期作加熱時段之均溫 37.0°C 相較高出

表 4. 2021 年第一期作高溫處理溫室與田間 5 個水稻 (系) 之花粉活力與稔實率。

Table 4. Pollen viability and spikelet fertility of 5 rice cultivars (lines) planted at in the field or in a heating greenhouse in the first cropping season of 2021.

Cultivar/line	Pollen (cell mL ⁻¹)		Pollen viability (%)		Spikelet fertility (%)							
	Heat nursery	field	Heat nursery	field	Heat nursery	field						
‘N22’	4,694 ± 851 a ^z	C ^y	4,695 ± 720 a	C	57.8 ± 4.2 a	C	62.9 ± 4.6 a	C	89.2 ± 2.2 a	A	88.7 ± 1.6 a	A
PA163	7,251 ± 1,239 a	A	8,144 ± 1,004 a	A	74.4 ± 4.1 a	A	76.4 ± 3.6 a	A	43.5 ± 9.4 b	B	91.4 ± 2.0 a	A
PA164	5,016 ± 454 a	BC	6,440 ± 1,290 a	B	67.3 ± 2.6 b	B	72.3 ± 1.6 a	B	55.4 ± 23.7 b	B	90.4 ± 7.4 a	A
‘Tainan11’	6,171 ± 1,624 a	AB	7,409 ± 1,910 a	AB	69.3 ± 5.0 b	AB	75.8 ± 1.3 a	AB	53.6 ± 15.5 b	B	93.0 ± 1.3 a	A
‘Taiken 9’	6,370 ± 757 a	AB	6,296 ± 1,222 a	BC	69.5 ± 3.9 b	AB	75.9 ± 1.4 a	AB	43.9 ± 26.7 b	B	90.0 ± 1.5 a	A

^z Means with different letters (in small letter) in the same cultivars (lines) in the same character are significantly different ($P < 0.05$) by *t*-test.

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

表 5. 2021 年第一期作田間 5 個水稻品種 (系) 花粉以不同溫度處理後之花粉活力與其相對其 25°C 花粉活力之花粉相對活力表現。

Table 5. Pollen viability of 5 rice cultivars (lines) treated with various temperature and its relative viability relative to those at the treatment of 25°C. Pollens were collected from the field in the first cropping season of 2021.

Pollen/Treated (°C)	‘N22’			PA163			PA164			‘TN11’			‘TK9’		
	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	Pollen viability (%)	Relative viability (%)	
25	62.3 ± 1.4 a ^z	97.8 ± 2.2 a	67.7 ± 5.0 a	94.6 ± 7.0 a	65.9 ± 3.6 a	96.6 ± 5.3 a	61.3 ± 0.6 a	99.0 ± 0.9 a	63.9 ± 12.4 a	84.0 ± 16.3 a					
30	59.9 ± 1.8 a	96.2 ± 1.7 a	52.7 ± 6.8 b	77.7 ± 5.4 b	53.1 ± 7.6 b	80.3 ± 7.3 b	54.4 ± 2.9 b	88.7 ± 4.2 b	47.4 ± 10.5 ab	74.0 ± 2.3 ab					
35	54.1 ± 1.3 b	86.8 ± 1.4 b	38.2 ± 5.7 c	56.2 ± 4.5 c	45.9 ± 8.6 bc	69.4 ± 10.1 bc	47.4 ± 2.2 c	77.3 ± 3.5 c	37.4 ± 11.8 b	58.6 ± 15.6 b					
40	53.5 ± 0.9 b	85.9 ± 2.7 b	37.4 ± 6.9 c	55.0 ± 6.9 c	39.8 ± 4.6 cd	60.3 ± 4.0 cd	40.2 ± 4.6 d	65.6 ± 7.2 d	20.2 ± 2.4 c	32.1 ± 3.8 c					
45	46.5 ± 1.7 c	74.8 ± 4.4 c	34.6 ± 8.4 c	50.8 ± 9.5 c	33.2 ± 3.8 d	50.3 ± 3.5 d	36.3 ± 4.4 d	59.1 ± 6.8 d	13.4 ± 3.7 c	20.8 ± 3.4 c					

^z Relative viability (%) = viable % at various temperature treatment/viable % at 25°C × 100%

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

3.4°C (表 2)。Matsui *et al.* (2001b) 以 35.0、37.5 及 40.0°C 三種溫度處理 9 個栽培種水稻連續 6 d，並調查柱頭上花粉數與稔實率的關聯性，結果顯示對高溫敏感的 'Hinohikari' 在 37.5°C 處理時稔實率已低於 50%，而耐高溫的 'Akitakomachi' 需提高至 40.0°C 時方有相同效果，利用 3.0°C 差異即可區分出高溫敏感與耐高溫的品種。本研究 2021 年第一期作檢定圃在加熱時段之均溫達 40.4°C 與 Matsui *et al.* (2001b) 使用之 40.0°C 高溫情境相似，但結果只有極耐高溫之 'N22' 仍維持正常稔實率，並顯著高於其他品種 (系)，其餘 4 品種 (系) 其檢定圃之稔實率與田區相較皆差異顯著，但 4 品種 (系) 間比較則差異皆不顯著 (表 4)。據此推測，4 品種 (系) 適當之高溫篩選溫度應在 37.0°C (2020 年第二期作加熱時段均溫) 與 40.4°C (2021 年第一期作加熱時段均溫) 之間。Tenorio *et al.* (2013) 對國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 水稻種原進行耐熱篩選，指出對於高溫敏感品種如 'IR64'，在開花期進行高溫處理只要超過 37°C，即便升高僅 1°C，稔實率也會明顯下降。因此，建議以 37–38°C 進行一般水稻族群之耐熱篩選，而以 38–39°C 進行極耐熱品種之篩選。在本研究中 2020 年第二期作高溫檢定圃設定溫度為 38.0°C，實際加熱時段平均溫度為 37.0°C，亦即這樣的溫度設定在二期作之環境下並未能區別出品種之耐熱性，這點可從檢定圃花粉活力較田區為高得到佐證，雖然兩者在統計上無明顯差異 (表 3)；2021 年第一期作高溫檢定圃設定溫度為 39.0°C，實際加熱時段平均溫度為 40.4°C，一期作之環境高溫讓檢定圃的實際溫度較設定溫度高出許多，如表 1 中顯示之取穗當日最高溫度，除極耐高溫之 'N22' 外，推測已超出其餘 4 品種 (系) 之高溫臨界點。

高溫對水稻的影響並非只有溫度本身，許多環境的因素亦同時與溫度交感，加重或減弱溫度的影響力。Matsui *et al.* (2014) 在澳洲新南威爾斯的水稻試驗顯示，儘管開花期的田間溫度高達 40°C，但檢視稔實率並未受到明顯影響，推測雖然氣溫很高但因當地濕度較低 (20.7%) 植冠內蒸散作用旺盛，穗溫與氣溫之差異可達 4–6.8°C，亦即在低濕度、有風的狀

態下降低了高溫的危害。Matsui *et al.* (1997) 以 37.5°C 配合 3 種濕度處理觀察對稔實率之影響，結果顯示隨著濕度增加，高溫對稔實率的影響加劇，而降低濕度則有助蒸散作用進行，因而達到降低穗溫的效果。本研究中使用之塑膠棚溫室在加溫過程中須具一定密閉性，推測塑膠棚內伴隨水田栽培的高濕度狀態，可能加劇高溫誘導穎花不稔的影響。綜合上述建議高溫檢定圃之溫度設定須考慮與期作環境、設施種類的交感並取得平衡點，以避免高溫處理實際效果的過與不及。

影響高溫處理效果之各種因子

Satake & Yoshida (1978) 觀察造成稔實率下降的原因，指出高溫敏感品種的障礙在於花粉活力低下造成花藥囊未能正常開裂，因影響散粉而造成柱頭花粉數的不足；而耐熱品種花藥囊雖能正常開裂，柱頭上之花粉數正常但花粉在柱頭上的萌發率降低。Matsui *et al.* (2001b) 研究指出 3 種溫度與柱頭上花粉數或稔實率的關聯性，在 37.5°C 處理柱頭上花粉數大於 10 之百分比與稔實率吻合，但 40.0°C 處理其柱頭上花粉數大於 10 之百分比與稔實率相關性變低，顯示極端高溫不只影響花粉散出與萌發 (柱頭上花粉數)，同時持續影響後續花粉管的伸長與受精作用，最終反應於稔實率的下降。此外，Matsui *et al.* (2021) 以多重回歸分析高溫導致穎花不稔 (heat induced flower sterility; HIFS) 的各種影響因子，結果亦顯示 HIFS 與花粉在柱頭萌發之後的過程相關性最高。本研究 2020 年第二期作檢定圃 5 品種 (系) 高溫處理期間每日之最高溫度在 39.6–42.6°C 間 (表 1)；2021 年第一期作 'N22' 採穗前 1 wk 高溫處理期間每日最高溫度範圍在 37.8–41.5°C 間 (資料未顯示)，其餘 4 品種 (系) 則在 41.1–45.6°C 間 (表 1)。2021 年第一期作雖然高溫處理中加熱時段平均溫度為 40.4°C，但加熱時段 (亦為開花時段) 中之最高溫度則更高，推測這樣的高溫可能影響生殖或生理的層面更為深廣，在表 4 中亦可見稔實率受到高溫影響的程度較花粉活力為高。

高溫處理期程的長短亦能造成影響，Kobayashi *et al.* (2011) 研究顯示延長高溫處理

時間從 1 d 至 3 d，高溫累積效果會影響花粉膨壓進而影響花藥囊開裂，而花藥囊開裂比率又與小穗稔實率高度相關。本研究高溫處理從抽穗至穀粒成熟期，研判高溫累積效應較 Kobayashi *et al.* (2011) 之 3 d 或 Matsui *et al.* (2001b) 的 6 d 更為嚴重，高溫持續時間短時，影響包括與花粉活力高度相關的花藥囊開裂或花粉飛散能力；高溫持續時間長時，影響則包括花粉於柱頭萌發及之後的諸多生殖過程，如花粉管伸長與完成受精等功能。從實務上來看，花粉在開花時對溫度的反應敏感，但一朵花內花藥囊開裂至受精完成之時間僅約 1 h 許，而稔實率則涵蓋一個小穗上所有之花朵，因此若長時間處於高溫下，推測稔實率受到溫度累積效應之影響會較花粉活力為高。本研究檢定圃高溫處理之啟動係以最早開花的 'N22' 為準，因此較晚開花品種 (系) 接受高溫處理期程相對較長，2020 年第二期作 'N22' 因延遲採穗 (9/21 抽穗開始高溫處理，10/14 採穗)，因此 'N22' 高溫處理的期程與其他品系相近。然而 2021 年第一期作於 4/21 開始高溫處理，'N22' 於 4/28 採穗，'N22' 高溫處理期程相較其他品系約短 3–4 wk (表 1)，推測其餘 4 品種 (系) 除實際受到較高溫度外，高溫處理期程亦較 'N22' 為長，導致稔實率呈現明顯下降 (表 4)。本研究為合作計畫，另有工作目標為高溫對米質之影響，因此高溫處理從抽穗期延伸至穀粒成熟，然而花粉活力檢測最終目的用於解釋稔實率受高溫逆境的影響，因此高溫處理之期程應以含蓋小穗受精完成即可，方能正確呈現高溫處理對花粉活力與稔實率之影響以及兩者相對之關係。

耐溫性花粉活力檢測

本研究 5 品種 (系) 取自田間的花粉濃度與花粉活力本來就存在高低差異，但皆足以達成正常稔實率的要求，應視為品種基因型的特性表現 (表 3、表 4)。然而各品種花粉在經過不同溫度處理後，其花粉活力隨溫度改變之程度則呈現明顯差異，亦即同一品種的花粉活力在未達其臨界溫度前，對於溫度的反應具有一貫性 (Hsia *et al.* 2022)。本研究以取自田區水稻之花粉進行不同溫度處理後檢測其活力的變

化，結果顯示 5 個品種 (系) 花粉活力皆隨處理溫度上升而下降 (表 5)，表示提高處理溫度會造成花粉活力下降，但各品種花粉活力隨著溫度上升而下降的比例並不相同，顯示不同品種花粉對溫度處理的反應並不相同。為讓不同品種水稻在同一基準下進行比較，將各品種不同溫度處理後的花粉活力與該品種在 25°C 處理時之花粉活力 (最高值) 相比之百分比作為相對花粉活力，再以相對花粉活力進行溫度處理影響的比較 (表 5)。5 個品種 (系) 依相對花粉活力受溫度影響下降之幅度由小至大加以排序，依序為 'N22'、'TN11'、PA164、PA163 及 'TK9'，此一相對花粉活力下降幅度排序與 5 個品種 (系) 在高溫檢定圃之稔實率排序相符合，亦即 'N22' 最高、PA164 與 'TN11' 其次、PA163 與 'TK9' 最低 (表 4)。值得一提的是，本研究使用之 PA164 與 PA163 是以 'TK9' 導入 'N22' 耐熱基因 *qHTSF4.1* 所育成之近同源系 (BC₄F₅) 雜交水稻，觀察其花粉活力在高溫下表現皆較 'TK9' 有明顯提升 (表 3、表 4)，推測與導入 'N22' 耐熱基因提高了花粉的耐熱特性有關，其中 PA163 雖然在檢定圃高溫處理下有較高之花粉活力，但其稔實率表現仍然偏低 (表 4)，然而從花粉溫度處理可以看到 PA163 在 35°C 處理時相對花粉活力有較明顯之下降 (表 5)，顯示利用不同溫度處理花粉與檢定圃高溫處理相較，對花粉耐熱特性的瞭解更為清晰。Matsui *et al.* (2007) 指出高溫導致的穎花不稔與品種間的關係並不單純而是非常複雜的組合關係，建議育種者可藉由各種可視性狀如開花時間、花藥特性、植株外型 (花穗角度與高度) 等進行篩選。

結語

花粉對環境因子的改變相當敏感，除受基因型影響外，還受到陽光輻射、大氣溫度及壓差 (濕度) 共同的影響 (Kobayashi *et al.* 2010)。例如同一田區中因水稻植冠所在位置的不同，或同一植冠內不同花穗或同一花穗在不同時間開放之穎花，其受到各種環境因子影響的程度並不相同。因此，有研究報告建議此類研究應該標記高溫處理下開放之穎花並追蹤

這些穎花受到的影響，方能正確追蹤高溫所造成的影響 (Jagadish *et al.* 2007)。然而回歸執行層面，若要在育種過程中進行這樣的調查，在實施上有其困難度而且相當耗費人力。Paupière *et al.* (2014) 指出在高溫下花粉活力的表現與耐熱特性具有直接相關性，花粉耐高溫的能力直接影響花藥囊的開裂已經得到證實，且後續柱頭散粉、花粉管伸長及授精作用等生殖過程依然是花粉功能的延伸 (Zhao *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2015)。本研究證明利用 IFC 可快速檢測花粉活力與花粉在不同溫度處理活力之改變，可作為高溫檢定圃進行前的大量種源篩選或初級篩選之用，除具節省成本提高篩選效率之優點外，亦能提供育種者或農民作為選擇之參考。未來將以目前建立之花粉溫度處理方法為基礎，進行更多花粉耐溫處理與稔實率相關之研究，期能更精確瞭解各品種花粉對不同溫度之反應，並持續改進耐高溫篩選之效率，作為吾人因應氣候變遷挑戰的依據。

誌謝

本研究承蒙行政院農業部 110 農科-10.2.1-農-C1 計畫經費支持，謹此致謝。本研究工作承研究室同仁蘇永傑先生協助試驗，特一併表達感謝。

引用文獻

- Chuang, F. M. and H. S. Lur. 2013. Impacts of high temperature on rice yield and quality: From physiological level to field environment. *Crop. Environ. Bioinform.* 10:75–83. (in Chinese with English abstract) doi:10.30061/CEB.201303_10(1).0006
- Fahad S., M. Z. Ihsan, A. Khaliq, I. Daur, S. Saud, S. Alzamanan, ... J. Huang. 2018. Consequences of high temperature under changing climate optima for rice pollen characteristics-concepts and perspectives. *Arch. Agron Soil Sci.* 64:1473–1488. doi:10.1080/03650340.2018.1443213
- Hsia, C. N., S. C. You, C. Y. Tsao, Y. J. Su, and C. P. Li. 2022. Study on detection methods of rice pollen viability. *J. Taiwan Agric. Res.* 71:123–134. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.202206_71(2).0003
- Hsuan, T. P., P. R. Zhuang, W. C. Wu, and H. S. Lur. 2019. Thermotolerance evaluation of Taiwan Japonica type rice cultivars at the seedling stage. *Bot. Stud.* 60:29. doi:10.1186/s40529-019-0277-7
- Jadadish, S. V. K., P. Q. Craufurd, and T. R. Wheeler. 2007. High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 58:1627–1635. doi:10.1093/jxb/erm003
- Khatun, S. and T. J. Flowers. 1995. The estimation of pollen viability in rice. *J. Exp. Bot.* 46:151–154. doi:10.1093/jxb/46.1.151
- Kobayashi, K., T. Matsui, Y. Murata, and M. Yamamoto. 2011. Percentage of dehisced thecae and length of dehiscence control pollination stability of rice cultivars at high temperatures. *Plant Prod. Sci.* 14:89–95. doi:10.1626/pps.14.89
- Kobayashi, K., T. Matsui, M. Yoshimoto, and T. Hasegawa. 2010. Effects of temperature, solar radiation, and vapor-pressure deficit on flower opening time in rice. *Plant Prod. Sci.* 13:21–28. doi:10.1626/pps.13.21
- Kumar N., N. Kumar, A. Shukla, S. C. Shankhar, and D. Shankhdar. 2015. Impact of terminal heat stress on pollen viability and yield attributes of rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Res. Commun.* 43:616–626. doi:10.1556/0806.43.2015.023
- Matsui, T., K. Kobayashi, H. Nakagawa, M. Yoshimoto, T. Hasegawa, R. Reinke, and J. Angus. 2014. Lower-than-expected floret sterility of rice under extremely hot conditions in a flood-irrigated field in New South Wales, Australia. *Plant Prod. Sci.* 17:245–252.
- Matsui, T., K. Kobayashi, M. Yoshimoto, and T. Hasegawa. 2007. Stability of rice pollination in the field under hot and dry conditions in the Riverina region of New South Wales, Australia. *Plant Prod. Sci.* 10:57–63. doi:10.1626/pps.10.57
- Matsui, T., K. Kobayashi, M. Yoshimoto, T. Hasegawa, T. S. T. Tanaka, and X. Tian. 2021. Factors determining the occurrence of floret sterility in rice in a hot and low-wind paddy field in Jiangnan Basin, China. *Field Crops Res.* 267:108161. doi:10.1016/j.fcr.2021.108161
- Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 1997. High temperature-induced spikelet sterility of Japonica rice at flowering in relation to air temperature, humidity and wind velocity conditions. *Jpn. J. Crop Sci.* 66:449–455. doi:10.1626/jcs.66.449
- Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 2001a. Comparison between anthers of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with tolerance to high temperatures at flowering or susceptibility. *Plant Prod. Sci.* 4:36–40. doi:10.1626/pps.4.36
- Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 2001b. The differ-

- ence in sterility due to high temperatures during the flowering period among Japonica-rice varieties. *Plant Prod. Sci.* 4:90–93. doi:10.1626/pp.s.4.90
- Paupière, M. J., A. W. van Heusden, and A. G. Bovy. 2014. The metabolic basis of pollen thermo-tolerance: Perspectives for breeding. *Metabolites* 4:889–920. doi:10.3390/metabo4040889
- 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 Res.* 95:398–411. doi:10.1016/j.fcr.2005.04.008
- Satake, T. and S. Yoshida. 1978. High temperature-induced sterility in indica rices at flowering. *Japan Jour. Crop Sci.* 47:6–17. doi:10.1626/jcs.47.6
- Shi, W., X. Li, R. C. Schmidt, P. C. Struik, X. Yin, and S. V. K. Jagadish. 2017. Pollen germination and *in vivo* fertilization in response to high-temperature during flowering in hybrid and inbred rice. *Plant Cell Environ.* 41:1287–1297. doi:10.1111/pce.13146
- Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. sativa*, and their hybrids. *Intl. Rice Res. Notes* 26(2):31–32.
- Tenorio, F. A., C. Ye, E. Redoña, S. Sierra, M. Laza, and M. A. Argayoso. 2013. Screening rice genetic resources for heat tolerance. *SABRAO J. Breed. Genet.* 45:371–381.
- Zhao, L., K. Kobayashi, T. Hasegawa, C. Wang, M. Yoshimoto, J. Wan, and T. Matsui. 2010. Traits responsible for variation in pollination and seed set among six rice cultivars grown in a miniature paddy field with free air at a hot, humid spot in China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 139:110–115. doi:10.1016/j.agee.2010.07.006

Effects of High Temperature after Heading Stage on Rice Pollen Viability and Fertility

Chi-Ni Hsia¹, Charng-Pei Li², Wei-Ting Tsai³, Yi-Heng Tsai⁴, Pei-Ying Huang⁴, Ching Chuang⁵, and Shuen-Chi You^{5,*}

Abstract

Hsia, C. N., C. P. Li, W. T. Tsai, Y. H. Tsai, P. Y. Huang, C. Chuang, and S. C. You. 2024. Effects of high temperature after heading stage on rice pollen viability and fertility. *J. Taiwan Agric. Res.* 73(4):281–291.

This study conducted heating treatment beginning from rice heading to grain maturity in a greenhouse to investigate the effects of high temperature on pollen viability and spikelet fertility. Rice materials including heat-resistant early-maturing indica upland rice ‘Nagina 22’ (‘N22’), medium-late-maturing japonica rice ‘Tainan 11’ (‘TN11’) and ‘Taiken 9’ (‘TK9’), as well as PA163 and PA164, the BC₄F₅ lines bred by ‘TK9’ with ‘N22’ heat-resistant gene, were planted in the second cropping season of 2020 (2020-2) and the first cropping season of 2021 (2021-1), respectively, using paddy field cultivation methods in field and plastic greenhouse. The greenhouse was heated with a diesel heater from 08:00 to 15:00 every day after ‘N22’ heading to grain maturity, with a set temperature of 38°C; in the 2021-1 cropping season, the set temperature during the day is 39°C and at night heating treatment was performed from 20:00 to 06:00 the next day with a set temperature of 28°C. The plants were tagged on the heading day and the ears were picked 2 d later. The pollen from the spikelet that was about to open on the day of ear picking was used to test the pollen viability using impedance flow cytometry (IFC). The results of the 2020-2 cropping season showed that there was no significant difference in pollen viability or spikelet fertility between the field and the heated greenhouse in the same variety. The results of the 2021-1 cropping season showed that 3 of the 5 varieties had significant differences in pollen viability between the field and the heated greenhouse, namely, PA164, ‘TN11’ and ‘TK9’. In addition to the above 3 varieties, there was another line, PA163, that showed a significant difference in spikelet fertility. Meanwhile, in the 2021-1 cropping season, the field pollen of 5 varieties (lines) was collected and treated in the range of 25–45°C, and the changes in pollen viability were tested. The pollen viability measured at various temperature treatments was compared with the pollen viability of the 25°C treatment (the highest value) as the relative pollen viability. The degree of influence of temperature on the relative pollen viability was sorted from small to large, which were ‘N22’, ‘TN11’, PA164, PA163, and ‘TK9’, respectively. The results of this study showed that both pollen viability and spikelet fertility were affected by high temperatures. However, using greenhouse heating treatment was costly, with less flexibility on temperature settings compared to the treatment using pollen collected from the field with various temperatures and testing changes of its viability, which has the advantages of simplicity, ease of implementation, and high efficiency. Therefore, it is recommended that the impact of high temperature on pollen viability be used as a rapid or primary screening method for heat-resistant rice evaluation.

Key words: *Oryza sativa* L., Spikelet fertility, Pollen viability, Impedance flow cytometry.

Received: July 2, 2024; Accepted: September 23, 2024.

* Corresponding author, e-mail: yousc_1@tari.gov.tw

¹ Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Contract Associate Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Project Assistants, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁵ Assistant Research Fellows, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.