

水稻花粉活力檢測方法研究

夏奇鈺¹ 游舜期² 曹進義³ 蘇永傑⁴ 李長沛^{5,*}

摘要

夏奇鈺、游舜期、曹進義、蘇永傑、李長沛。2022。水稻花粉活力檢測方法研究。台灣農業研究 71(2):123–134。

水稻是台灣最重要的糧食作物，其產量與米質會受高溫的影響而下降，在水稻的生長過程中以開花當日對高溫最為敏感，因此瞭解花粉的耐熱性是評估耐熱水稻品種的重要指標。本研究除最適化水稻花粉培養所需配方外，並比較花粉染色法、花粉培養與電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC) 3 種花粉活力檢測方法，同時以 IFC 檢測經不同溫度處理後花粉的活力變化。試驗以梗稻「台南 11 號」(‘Tainan 11’; ‘TN11’) 與耐熱籼型陸稻 (aus type) ‘Nagina 22’ (‘N22’) 為材料，針對花粉培養液中之蔗糖、硼酸及硝酸鈣逐項進行最適濃度測試，結果顯示 2 品種之花粉皆以含有 22.5% 蔗糖、60 mg L⁻¹ 硼酸與 200 mg L⁻¹ 硝酸鈣之培養液可獲得最高之花粉萌發率。比較 3 種染劑分別為二乙酸螢光素酯 (fluorescein diacetate; FDA)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; TTC) 以及碘化鉀 (I₂/KI) 對水稻花粉之染色率，結果顯示 2 品種皆以 1% I₂/KI 之染色率最高，TTC 之染色率最低，FDA 染色率居中。利用花粉培養、FDA 染色及 IFC 分析三種方法進行花粉活力檢測，在 ‘TN11’ 和 ‘N22’ 均顯示 IFC 檢測與花粉培養或 FDA 染色之結果無顯著差異，顯示 IFC 可作為花粉活力快速檢測方法。進一步利用 IFC 檢測花粉經 25–45°C 溫度處理 15 min 後之活力變化，結果顯示 ‘TN11’ 之花粉活力隨著溫度上升明顯下降；而 ‘N22’ 在溫度上升至 35°C 時才開始下降，顯示 ‘N22’ 花粉對於高溫的耐受性較 ‘TN11’ 為高。

關鍵詞：水稻、花粉發芽培養基、花粉活力、電阻抗式流式細胞儀。

前言

近百年來，人類以石化燃料為主的能源活動型態，加速了地球溫室氣體量的累積，進而導致全球氣溫持續上升以及極端天氣的頻繁發生，對農業生產系統產生直接之衝擊 (Intergovernmental Panel on Climate Change 2013)。水稻是僅次於小麥的全球最重要穀類作物，也是台灣最主要的糧食作物，台灣水稻的生產亦必須面對全球氣候暖化衝擊的挑戰 (Ho *et al.* 2013)。對抗氣候暖化，除了研發各種栽培調適

技術幫助作物度過逆境挑戰外，長期來看，選育耐高溫逆境的水稻新品種更為根本，因此如何對現有水稻遺傳資源的耐熱性作出快速有效率的評估，是育成耐熱水稻新品種的第一步，為此我們有必要瞭解高溫如何影響水稻的生長發育。

水稻在不同發育時期遭遇高溫所受到的影響並不相同，營養生長期的高溫，直接造成葉片光合作用率下降、同化產物減少、發生過氧化傷害，導致植株的生長受抑制，如分蘖減少、株高增長緩慢等。生殖期遭遇高溫，

投稿日期：2021 年 8 月 13 日；接受日期：2021 年 11 月 30 日。

* 通訊作者：charngpei@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁵ 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

則以抽穗開花期影響最大，其次是孕穗期（花粉母細胞減數分裂期），而抽穗期又以開花當日受高溫影響最大，高溫能讓花粉粒的膨脹率降低，導致花藥囊開裂比例下降，進而影響花粉粒的散出，造成雌蕊柱頭上花粉數不足，高溫同時也讓花粉管的伸長受阻，最終表現於穎花稔實率與米質的降低 (Matsui *et al.* 2000, 2001)。值得一提的是，上述生殖過程在穎花開放後約 1 h 間即可完成，所以發生於開花前 1 h 或開花後 1 h 的高溫對穎花授粉的影響力將明顯降低，也就是說高溫效應對水稻生殖影響巨大，但其最關鍵的影響在空間上僅局限於一個器官（穎花），在時間上則極為短暫（1 h），因此要瞭解高溫對生殖生長的危害必須有精確的評估方式 (Fahad *et al.* 2018)。傳統耐高溫品種的篩選多在田間或設施下進行，但要讓開花中的穎花感受到高溫，並針對受影響之穎花完成調查，在實務上有其困難度 (Julia & Dingkuhn 2013)。這也說明若能找到反應受測品種對高溫耐受性的衡量指標，例如花粉的耐熱特性，將有助提高耐熱水稻品種篩選的精確度與效率 (Coast *et al.* 2016)。

傳統上對花粉活力的評估有許多方法，依其實施處可分為 *in vivo*（體內）與 *in vitro*（體外），*in vivo* 直接於植物組織上觀察，如觀察柱頭上花粉數、花粉管伸長情形等，一般需要透過組織固定、染色或切片等技術的配合，精確度高但觀察之數量有限，因此較適合作為現象觀察而非大量篩選之用 (Shi *et al.* 2018)。*In vitro* 以細胞染色法或花粉發芽培養最為常用 (Song *et al.* 2001)，近年來則有針對單一細胞對電流之阻抗反應加以分析的電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry; IFC)，IFC 每一樣品分析之細胞數可從數千至數萬不等，需要的時間僅數十秒至數分鐘，與上述必須透過顯微鏡觀察染色之花粉粒數或計算花粉管萌發比率的傳統方法，具有節省人力與時間並提高檢測效率之優勢 (Heidmann *et al.* 2016)。

本研究以台灣栽培面積最多的梗稻「台南 11 號」（‘Tainan 11’；‘TN11’）與來自印度的耐熱粳型陸稻 ‘Nagina 22’（‘N22’）為材料，除針對花粉培養液中最重要成分蔗糖、硼酸及

硝酸鈣濃度進行最適化研究，建立適用於水稻花粉萌發之培養基作為花粉活力評估之用外，並比較 3 種花粉活力染劑，分別為二乙酸螢光素酯 (Fluorescein diacetate; FDA)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; TTC) 與碘化鉀 (I_2/KI) 對水稻花粉之染色率。此外，比較 IFC 分析、花粉培養及 FDA 染色 3 種花粉活力檢測方法，用以瞭解 IFC 檢測技術與現行花粉活力檢測方法獲得之結果是否具有差異性；並以 IFC 檢測花粉經不同溫度處理後其活力的變化，研究結果將應用於未來耐熱水稻品種篩選之用。

材料與方法

水稻材料與栽培管理

供試之水稻種子由農試所作物組水稻研究室提供，分別為耐熱粳型陸稻 ‘N22’ 與梗稻 ‘TN11’。將發芽 2 wk 後之小苗移至裝有田土之塑膠盆 ($61.7 \times 42.8 \times 8.9 \text{ cm}^3$) 內種植，每盆種 4–6 株，並於分蘗與幼穗形成期施用台肥農友牌硝磷基特 43 號肥料 ($N-P_2O_4-K_2O = 15-15-15$) 共 25 g，植株於農試所生技組裝有風扇水牆溫室內栽培，每週灌水 3 次。

花粉取樣與染劑配製

選取剛突出劍葉葉枕之稻穗加以標記，於第 2 天將標記稻穗之分蘗從植株基部剪下並插入水杯中帶回，每一品種選取 3–5 株，每株取 1 分蘗，將分蘗置於無菌操作台之日光燈下促進穎花開放。取每一穗之主枝梗上段即將開裂之穎花，以鑷子將花藥自穎花中取出，放入微量試管中加以輕壓釋出花粉，作為不同染劑染色或花粉培養試驗之用。

將 2 g 碘化鉀完全溶解水中後，再加入 1 g 碘並定量至 100 mL 配製 1% I_2/KI ，並以深色瓶保存備用。以丙酮為溶劑配製 0.2% FDA (A 液) 保存於深色瓶內，另行配製 30% 蔗糖溶液，以 A 液緩慢加入蔗糖溶液中並攪拌均勻，至液體呈現白色混濁後停止是為 B 液，取 B 液作為染色之用 (Tseng *et al.* 2013)。以磷酸緩衝液配製 1% TTC 染液，並保存於深色瓶內備用。

水稻花粉發芽培養液中 3 種成分之濃度最適化

蔗糖濃度測試：稻穗之取得同花粉取樣所述，每一穗取 5 朵穎花，將穎花中之 6 個花藥囊取出 5 個，分別置入裝有 5 種蔗糖濃度處理之 500 μL 培養液中，將分別取自 5 朵穎花之 5 個花藥粒混合擠壓釋出花粉，作為 1 重複，共 3 重複。培養液中皆含有 60 mg L^{-1} 硼酸，並分別添加蔗糖使其濃度為 20、22.5、25、27.5 及 30% 共 5 種處理。將 5 個處理之花粉培養液置入 30°C 恆溫箱中黑暗培養 10 min 後，取 50 μL 花粉培養液滴於凹槽玻片上進行顯微鏡檢測，每一重複共觀察 100 粒花粉，將花粉管長度超過花粉粒直徑者視為發芽，計算花粉發芽比率。

硼酸濃度測試：稻穗取得同上花粉取樣所述，每一花穗取 5 朵穎花，將穎花中之 6 個花藥粒取出，分別置入裝有 6 種硼酸濃度處理之 500 μL 花粉培養液中，將分別取自 5 朵穎花之 5 個花藥粒混合擠壓釋出花粉，作為 1 重複，共 3 重複。培養液含有 22.5% 蔗糖並分別添加適量之硼酸，使其濃度為 25、50、60、100、150 及 200 mg L^{-1} 共 6 種處理。培養條件以及花粉發芽率計算方式同上蔗糖處理所述。

硝酸鈣濃度測試：於含有 22.5% 蔗糖與 60 mg L^{-1} 硼酸之培養液中，分別添加適量之 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，使其濃度分別為 60、100、200、300 及 400 mg L^{-1} 共 5 種處理。花粉取樣、培養條件以及花粉發芽率計算方式同上蔗糖處理所述。

以 FDA、TTC 及 I_2/KI 染色法檢測花粉活力

稻穗取得方式同花粉取樣所述，取每穗主枝梗上段即將開裂之穎花 1 朵，以鑷子將花藥取出，將分別取自 5 朵穎花之花藥粒一起放入微量試管中輕壓釋出花粉，以混合後之花粉作為 3 種染劑試驗之材料，此為 1 重複。於凹槽玻片上滴 50 μL 之 1% I_2/KI 染色液，加入適量花粉後蓋上蓋玻片，置於 30°C 黑暗環境下培養 10 min 後進行鏡檢；FDA 染色之培養條件相同，但染色時間為 15 min；TTC 染色過程

為將花粉放入裝有 1% TTC 染液的離心管中，置於 30°C 黑暗環境下培養 3 h 後，吸取 50 μL 花粉染色液滴於凹槽玻片後進行鏡檢。每一染色處理共進行 3 重複，每一重複共調查 100 粒花粉。

以花粉培養、FDA 染色與 IFC 分析進行花粉活力檢測

花粉取樣與上述染色法相同，花粉培養試驗之操作為先於凹槽玻片上滴 50 μL 花粉培養液 (22.5% 蔗糖、60 mg L^{-1} 硼酸、200 mg L^{-1} 硝酸鈣)，再加入花粉並蓋上蓋玻片，置入裝有濕潤濾紙之保鮮盒內，於 30°C 黑暗環境下培養 10 min 後進行顯微鏡檢測。花粉培養與 FDA 染色處理，共進行 3 重複，每 1 重複調查 100 粒花粉。IFC 分析方法使用之電阻抗式流式細胞儀型號為 Ampha Z30 (Amphasys, Root, Switzerland)，將花粉材料放入裝有 500 μL AF6 buffer (Amphasys, Root, Switzerland) 的離心管中，使用 100 μm 濾網進行過濾，將濾液以 AF6 buffer 定量到 500 μL 混合均勻後上機檢測，同樣進行 3 重複。

以 IFC 檢測溫度處理對花粉活力之影響

選取稻穗突出劍葉葉枕約 5 cm 之分蘖 6 支，從基部剪下並插入水杯中帶回，置於無菌操作台之日光燈下使穎花開放，取位於花穗上段主枝梗上即將開裂之穎花，每穗取 6 朵穎花，將 2 穗共 12 朵穎花之花藥取出混合放入裝有 1.8 mL AF6 buffer 的微量試管中加以擠壓，以 100 μm 濾網過濾，將濾液分裝至 6 個微量試管並定量至 500 μL ，將裝有花粉濾液之微量試管置於不同溫度設定之乾浴器中，溫度設定分別為 25、30、35、40、45 及 100°C，經 15 min 處理後進行分析，每一溫度處理共 3 重複。IFC 分析使用 120 μm 孔徑晶片，電波頻率設定為 12 MHz、馬達轉速 35 rpm，其他檢測參數 Modulation/Amplification/Demodulation 設定為 4/6/2，trigger level: 0.1，設定分析數量為 30,000 個細胞，並透過 AmphaSoft 2.0 (Amphasys, Root, Switzerland) 軟體進行結果分析。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)。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

水稻花粉發芽培養液中 3 種主成分濃度最適化測試

本試驗針對花粉培養液中最重要之 3 種成分—蔗糖、硼酸及硝酸鈣依序逐項測試其最佳濃度。首先將培養液中硼酸濃度固定於預備試驗中之最佳濃度 60 mg L^{-1} ，以 2.5% 蔗糖為一個濃度分級，測試 20–30% 蔗糖濃度對 2 (品) 種水稻花粉萌發之影響，結果如表 1 與圖 1 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆以含有 22.5% 蔗糖之培養液獲得最高花粉萌發率，分別為 39.7% 與 34.3%，且與其他濃度間呈現顯著之差異。

將培養液之蔗糖濃度固定於 22.5%，測試 25–200 mg L^{-1} 硼酸濃度對 2 (品) 種水稻花粉萌發之影響，結果如表 2 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆於含有 60 mg L^{-1} 硼酸之培養液獲得最高之花粉萌發率，分別為 26.0% 與 32.3%，顯著高於其他濃度處理。

表 1. 花粉培養液中蔗糖濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 1. Effect of sucrose concentration on rice pollen germination^z.

Sucrose (%)	Germination (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
20.0	31.0 ± 2.1 b ^y	19.3 ± 0.6 b
22.5	39.7 ± 1.2 a	34.3 ± 1.3 a
25.0	22.3 ± 1.9 c	18.3 ± 1.5 b
27.5	19.7 ± 1.2 c	13.3 ± 1.5 c
30.0	7.7 ± 0.9 d	11.0 ± 1.2 c

^z Pollen germination medium contained various concentration of sucrose and 60 mg L^{-1} boric acid.

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

表 2. 花粉培養液中硼酸濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 2. Effect of boric acid concentration on rice pollen germination^z.

$\text{H}_3\text{BO}_3 \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Germination (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
25	8.0 ± 1.2 d ^y	11.7 ± 1.2 d
50	19.0 ± 1.7 b	24.0 ± 1.7 b
60	26.0 ± 1.7 a	32.3 ± 1.9 a
100	12.7 ± 0.3 c	18.7 ± 2.0 c
150	10.3 ± 0.9 cd	13.3 ± 2.3 d
200	7.0 ± 1.7 d	13.7 ± 0.3 cd

^z Pollen germination medium contained various concentration of boric acid and 22.2% sucrose.

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

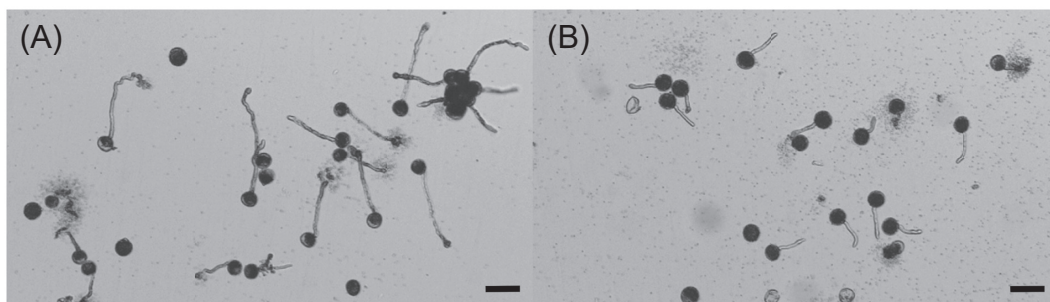


圖 1. 水稻花粉於修正後之花粉培養液中萌發之情形。水稻品種 (A) ‘Nagina 22’；(B) ‘台南 11 號’。

Fig. 1. *In vitro* pollen germination of two rice cultivars in the modified medium. Rice cultivar of (A) ‘Nagina 22’ and (B) ‘Tainan 11’. Bar = 100 μm .

將培養液中蔗糖與硼酸濃度分別固定為 22.5% 與 60 mg L⁻¹，測試 60–400 mg L⁻¹ 硝酸鈣對水稻花粉萌發之影響，結果如表 3 所示。‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種皆以含有 200 mg L⁻¹ 硝酸鈣之培養液具有最高花粉萌發率，分別為 76.0% 與 78.7%，顯著高於其他濃度處理。

綜合上述三試驗之結果，2 (品) 種水稻對 3 種成分及其最適濃度之反應具有一致性，花粉萌發率會隨 3 種成分濃度上升至最適濃度後下降，花粉培養液中之蔗糖、硼酸及硝酸鈣之最適濃度依序為 22.5%、60 mg L⁻¹ 與 200 mg L⁻¹，於此培養液中 2 (品) 種之花粉管萌發率皆可達 75% 以上 (表 3)。

以 FDA、TTC 及 I₂/KI 染色法檢測花粉活力

水稻花粉分別以 I₂/KI、FDA 與 TTC 染色法檢測活力，花粉於染色處理完成後以光學或螢光顯微鏡觀察花粉粒染色之情形。結果顯示 ‘N22’ 與 ‘TN11’ 兩 (品) 種之花粉染色率皆以 I₂/KI 最高，分別為 89.7% 與 93.7%，其次為 FDA，而以 TTC 最低，3 種染色法呈現顯著差異 (表 4、圖 2)。

以花粉培養、FDA 染色與 IFC 分析進行花粉活力檢測

比較於 30℃ 黑暗環境下，以 FDA 染劑進行 15 min 染色或於花粉培養液中培養 10 min，再以顯微鏡計算染色率與花粉萌發率，

表 3. 花粉培養液中硝酸鈣濃度對水稻花粉萌發之影響。

Table 3. Effect of calcium nitrate concentration on rice pollen germination^z.

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O (mg L ⁻¹)	Germination (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
60	68.3 ± 2.2 b ^y	62.3 ± 2.2 c
100	64.0 ± 2.3 b	70.0 ± 1.7 b
200	76.0 ± 2.1 a	78.7 ± 0.9 a
300	37.3 ± 3.1 c	48.3 ± 3.2 d
400	34.0 ± 1.2 c	40.7 ± 0.9 e

^z Pollen germination medium contained 22.2% sucrose, 60 mg L⁻¹ boric acid and various concentration of calcium nitrate.

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

表 4. 以 3 種細胞染色方法檢測水稻之花粉染色率。

Table 4. Comparison of various cell staining methods on rice pollens.

Staining Method ^z	Staining ratio (%)	
	‘Nagina 22’	‘Tainan 11’
I ₂ /KI	89.7 ± 1.5 a ^y	93.7 ± 2.9 a
FDA	78.0 ± 2.0 b	80.7 ± 1.5 b
TTC	40.3 ± 2.3 c	55.3 ± 2.5 c

^z FDA: fluorescein diacetate; TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

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

以及將花粉置入緩衝液後以 IFC 進行花粉活力分析，結果如表 5 所示。‘N22’ 花粉以 FDA 之染色率最高為 73.3%，與 IFC 分析結果差異不顯著，但卻顯著高於花粉培養之結果。‘TN11’ 則顯示 3 種檢測方法差異皆不顯著，在 65.7–73.6% 之間。除利用 ANOVA 以 LSD 比較各處理平均值間之差異外 (表 5)，並以成對 *t* 檢定進行兩兩處理組平均值差異性檢定，結果顯示在測試的 2 (品) 種中 IFC 與花粉培養或 IFC 與 FDA 染色法均顯示無明顯差異 (資料未顯示)。

以 IFC 檢測溫度對花粉活力之影響

首先將經 100℃ 處理後之花粉以 IFC 分析，將呈現之細胞族群定義為死亡細胞 (dead)，並於此細胞群右方劃一十字線，以相對 100℃ 處理死亡細胞群十字線右上方之細胞群定義為具有活力之花粉 (viable)，右下方則為尚未死亡但活力低下之細胞群 (non-viable) (圖 3)。將經不同溫度處理後之花粉以 IFC 進行分析，記錄各溫度處理之活力細胞群、低活力細胞群、死細胞群占全體細胞之比例，結果如表 6 與表 7 所示。‘N22’ 之花粉經不同溫度處理後，以 25–30℃ 具有最高之花粉活力，比率在 59.9–62.3% 之間，其次為 35–40℃ 間，花粉活力在 53.5–54.1% 之間時，溫度上升至 45℃ 時，具活力花粉之占比降至 46.5%。‘TN11’ 花粉亦以 25℃ 處理之花粉活力最高為 61.3%，溫度處理在 25–40℃ 之間時，每上升 5℃，花粉活力隨溫度上升而明顯下降，具活力之花粉由 61.3% 下降至 36.3%。

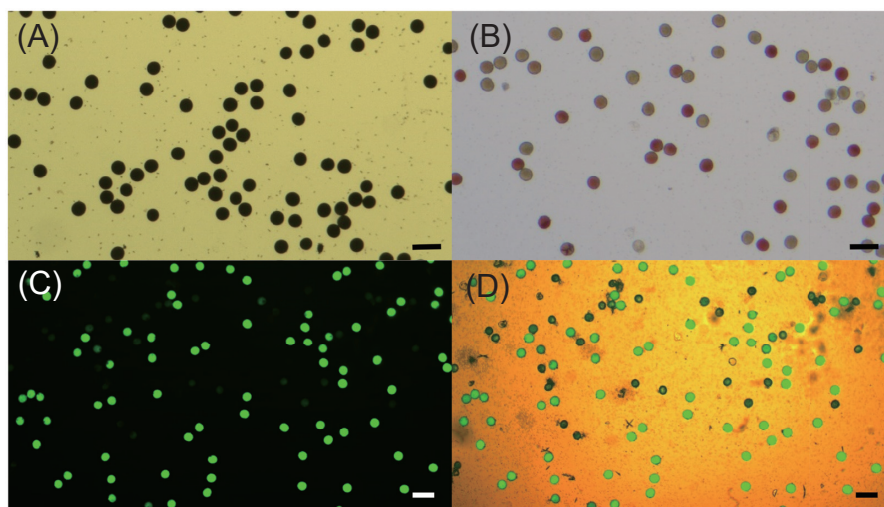


圖 2. 「台南 11 號」水稻花粉以 3 種染劑染色後花粉呈色情形。染劑為 (A) I_2/KI ; (B) TTC; (C) FDA 於螢光暗視野下; (D) FDA 於螢光明視野下觀察之情形。

Fig. 2. Pollens of 'Tainan 11' staining with (A) I_2/KI ; (B) 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC); (C) fluorescein diacetate (FDA) under fluorescence light with dark sight; and (D) FDA under fluorescence light with bright sight. Bar = 100 μm .

表 5. 以不同方法檢測水稻花粉之活力表現。

Table 5. Comparison of different methods on rice pollen viability analysis.

Method ^z	Germination rate & staining ratio (%)	
	'Nagina 22'	'Tainan 11'
Germination	62.7 $\pm$ 2.1 b ^y	65.7 $\pm$ 6.4 a
FDA staining	73.3 $\pm$ 4.2 a	71.7 $\pm$ 2.3 a
IFC viability	69.2 $\pm$ 3.4 ab	73.6 $\pm$ 1.9 a

^z FDA: fluorescein diacetate; IFC: impedance flow cytometry.

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

討論

分析花粉活力的方法眾多，其中利用 *in vitro* 花粉培養因可直接獲得花粉萌發與花粉管伸長之數據，被認為是可信度較高的方法，但因不同種植物間花粉發芽所需之環境條件並不相同，且花粉培養基所需成分在不同物種或同物種不同品種間亦不盡相同，必須針對不同植物種類加以開發 (Shivanna & Rangaswamy 1992)。Tushabe & Rosbakh (2021) 根據 1,572 篇來自 114 科 412 屬總共 816 種

植物所發表之花粉發芽培養基相關論文進行統計，針對配方中 110 個成分加以分析，結果顯示最常用之成分及其占比分別為蔗糖 (89%)、硼酸 (77%)、 Ca^{2+} (59%)、 Mg^{2+} (44%)，以及 K^+ (39%)。本研究亦以花粉培養基中最重要占比之 3 成分蔗糖、硼酸及硝酸鈣進行最佳濃度試驗。Kariya (1989) 比較 10、20 與 30% 蔗糖，以及比較 5–500 $mg L^{-1}$ 硼酸濃度對水稻花粉培養之影響，指出水稻花粉發芽最佳之配方為 20% 蔗糖、20 $mg L^{-1}$ 硼酸與 1% 洋菜，萌發芽率可達 87.3–91.6%，但蔗糖濃度提高至 30% 時，萌發芽率降至 54–59%。Coast *et al.* (2016) 使用 20% 蔗糖、40 $mg L^{-1}$ 硼酸、40–60 $mg L^{-1}$ 硝酸鈣、3 $mg L^{-1}$ Vitamin B₁ 及 10% polyethylene glycol (PEG) 作為培養基，花粉萌發率亦可達 80% 以上。上述兩研究顯示水稻花粉培養所需成分相當簡單，本研究除希望花粉培養基配方具有成分簡單之特性外，並希望其為純粹之液體培養基，其優點為不需加熱溶解洋菜或 PEG，亦不需等待培養基降溫方能使用，具有配製容易且可冷凍保存之優點；雖然成分簡單之液體培養基可能有滲透壓不理想之問題，並不適合花粉發芽

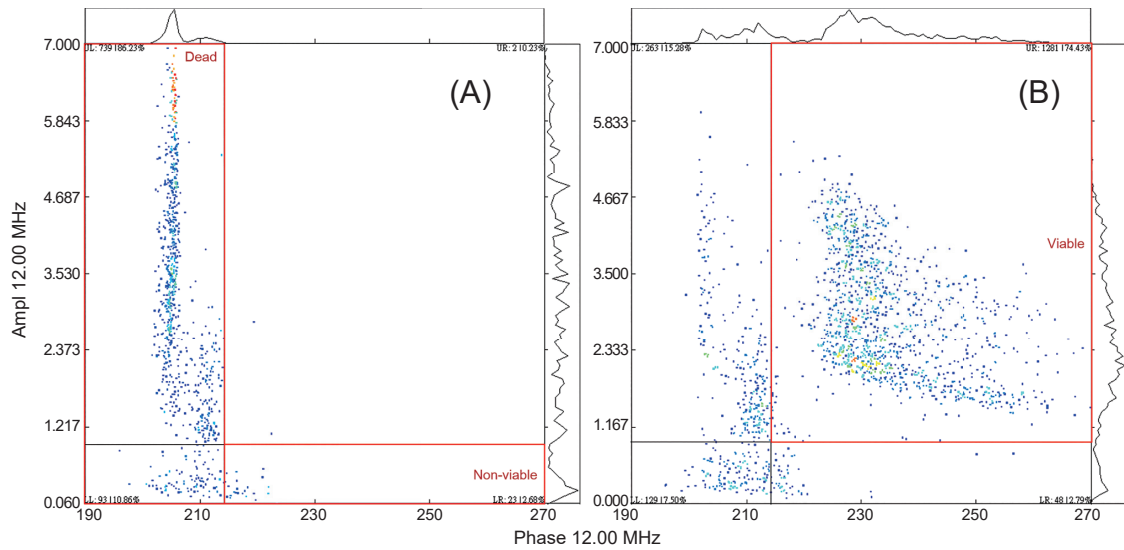


圖 3. 水稻 'Nagina 22' 花粉經溫度處理後利用電阻抗式流式細胞儀以 12 MHz 交流電檢測之花粉細胞分布圖形。花粉經 (A) 100°C 處理 15 min；(B) 25°C 處理 15 min。

Fig. 3. Dot plots of rice 'Nagina 22' analyzed by impedance flow cytometry at 12 MHz. Pollens were treated with (A) 100°C for 15 min and (B) 25°C for 15 min.

表 6. 水稻 'Nagina 22' 花粉經不同溫度處理 15 min 後以電阻抗式流式細胞儀分析之花粉活力表現。

Table 6. Pollen viability of 'Nagina 22' analyzed by impedance flow cytometry after various temperature treating for 15 min.

Temperature (°C)	'Nagina 22'			
	Dead (%)	Non-viable (%)	Viable (%)	Relative viable (%) ^z
25	33.2 ± 1.4 b	4.5 ± 0.7 b	62.3 ± 1.4 a ^y	100 ± 0.0 a
30	35.2 ± 2.1 b	4.8 ± 1.0 b	59.9 ± 1.8 a	96.2 ± 1.7 a
35	36.8 ± 3.2 b	9.1 ± 2.0 a	54.1 ± 1.3 b	86.8 ± 1.4 b
40	36.7 ± 2.2 b	9.9 ± 1.6 a	53.5 ± 0.9 b	85.9 ± 2.7 b
45	44.8 ± 1.6 a	8.7 ± 0.5 a	46.5 ± 1.7 c	74.8 ± 4.4 c
100	92.6 ± 1.5	6.4 ± 1.5	1.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1

^z Relative viable % = 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.

需時較長之植物，但水稻花粉萌發相當快速 (10–20 min) 則不受此限。本研究在預備試驗時測試 12.5、15、17.5 及 20% 蔗糖濃度對水稻花粉萌發之影響，結果顯示以 20% 蔗糖處理得到最高之萌發率，與上述兩研究之結果相同，但因尚未見到濃度效應的下降，因此本研究更進一步提高蔗糖濃度，測試花粉萌發率是否還能持續提高，結果顯示含有 22.5 % 蔗糖優於 20% 蔗糖以及其他濃度，本研究與上述 Kariya (1989) 在比較 10、20 與 30% 蔗糖濃度

試驗不同之處，為本研究使用較小之蔗糖級距 (2.5%)，推測 Kariya 所使用之蔗糖濃度級距太大 (10%) 不利得到正確之最適濃度。此外，Kariya (1989) 使用含有 20% 蔗糖、20 mg L⁻¹ 硼酸與 1% 洋菜培養基即可獲得高於 80% 之萌芽率，但本研究中若使用僅添加蔗糖與硼酸之液體培養基，其最佳發芽率僅 26.0–32.3% 之間，推測 Kariya 配方中之洋菜應亦能提供有助花粉萌發之營養元素。而本研究在含有 22.5% 蔗糖、20 mg L⁻¹ 硼酸溶液中添加 200 mg L⁻¹ 硝

表 7. 水稻「台南 11 號」花粉經不同溫度處理 15 min 後以電阻抗式流式細胞儀分析之花粉活力表現。

Table 7. Pollen viability of 'Tainan 11' analyzed by impedance flow cytometry after various temperature treating for 15 min.

Temperature (°C)	'Tainan 11'			
	Dead (%)	Non-viable (%)	Viable (%)	Relative viable (%) ^z
25	31.7 ± 1.5 d ^y	7.0 ± 1.9 b	61.3 ± 0.6 a	100 ± 0.0 a
30	35.6 ± 4.1 cd	10.1 ± 2.4 ab	54.4 ± 2.9 b	88.7 ± 4.2 b
35	39.3 ± 2.5 bc	13.3 ± 3.9 ab	47.4 ± 2.2 c	77.3 ± 3.5 c
40	42.8 ± 2.0 b	17.0 ± 2.6 a	40.2 ± 4.6 d	65.6 ± 7.2 d
45	52.1 ± 3.0 a	11.6 ± 6.0 ab	36.3 ± 4.4 d	59.1 ± 6.8 d
100	90.8 ± 1.0	8.2 ± 1.2	0.9 ± 0.3	1.5 ± 0.5

^z Relative viable % = 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.

酸鈣後花粉萌發率獲得顯著提升，‘N22’之花粉萌發率從 26.0% 提升至 76.0%，‘TN11’則從 32.3% 提升至 78.7% (表 2、表 3) 效果顯著。Steer & Steer (1989) 指出在 *in vitro* 花粉培養基中添加硝酸鈣對許多植物而言具有關鍵之作用，在本研究中亦顯示添加適當濃度之硝酸鈣，具有顯著提升水稻花粉管萌發之效果 (表 3)。

花粉利用細胞染色法鑑定其活力，雖未能直接證明花粉之發芽能力，但因具有快速簡單的優點而被廣泛採用，然而各種染劑之作用機制並不相同，因此在不同物種中所呈現之染色率是否能代表花粉活力必須先加以釐清，例如 TTC 能與正常細胞中的脫氫酶反應被還原成無法透過細胞膜的紅色酯類化合物，如果細胞死亡或活力衰退，則顯示未能染色或染色較淺，因此可以根據染色深淺程度來分析其細胞活力 (Khatun & Flowers 1995)；非螢光且非極性之 FDA 被具有活力之細胞吸收後，可藉由活細胞內之酯酶 (esterase) 將其裂解，並釋出具螢光物質，此時將細胞置於顯微鏡下以波長 495 nm 藍光照射，可觀察到黃綠色之螢光 (Khatun & Flowers 1995)；碘化鉀 (I_2/KI) 則能與細胞內之澱粉作用形成深藍色之碘化澱粉 (Song *et al.* 2001)。Khatun & Flowers (1995) 以 FDA 進行水稻花粉活力檢測，結果顯示 FDA 染色後呈現之螢光亮度介於中間者難以判定。在本研究中水稻花粉以 FDA 染色後，其黃色螢光在螢光顯微鏡暗視野下易於分辨，且可利用明視野及螢光同時開啟，將未染色之花粉細胞

區別出來 (圖 2D)，是 3 種細胞染色法中較少人為誤判與具有穩定表現之方法。Khatun & Flowers (1995) 研究結果亦顯示，以 TTC 進行水稻花粉染色，染色率可達 100%，但是觀察到加熱致死之花粉以 TTC 染色後，亦能呈現均一的紅色，因此對 TTC 作為分辨細胞活力的作用存疑。在本研究中則顯示，雖然 TTC 染色時間已延長至 3 h，但染色率仍偏低 (表 4)，且染色之花粉細胞呈現不同程度之粉紅顏色 (圖 2B)，易產生人為之誤判。水稻花粉活力檢測最常用之染劑應為 I_2/KI ，一般將染色深、粒型飽滿者視為有活性之花粉，將染色淺或部分染色以及形狀皺縮扁平花粉粒視為不具活性之花粉 (Song *et al.* 2001; Saragih *et al.* 2013; Ramesh *et al.* 2017)。Song *et al.* (2001) 以 I_2/KI 染色野生稻 (*Oryza rufipogon*)、栽培種稻 (*Oryza sativa*) 以及兩者雜交種之花粉，染色比率分別為 98.1、94.0 與 66.2%，但以相同之花粉進行培養時，花粉管萌芽率則分別為 58.4、84.9 與 33.9%，顯示被染色的花粉中有相當高比例並不具備發芽之能力。本研究中將 ‘TN11’ 與 ‘N22’ 兩 (品) 種之花粉以 I_2/KI 染色，染色比率皆接近 95%，在本研究中曾經將 60°C 或 100°C 處理 10 min 後之水稻花粉以 I_2/KI 染色，結果顯示高溫處理後之花粉經染色後亦呈現深褐色 (資料未顯示)，這與上述 Khatun & Flowers (1995) 不推薦 TTC 之原因相似，亦即以加熱致死之花粉進行染色仍可見其呈色，因此質疑此一染色法分辨細胞活力之

可信度。推測在本研究中經 60°C 或 100°C 處理之水稻花粉雖已不具發芽之活性，但因澱粉粒仍存在於花粉細胞內，因此染色後仍可呈現出深褐色，但此一呈色並不代表花粉具有活性。此外為確認 I₂/KI 對水稻花粉活力之鑑別力，在本研究中曾取雄不稔水稻品種之花粉以 I₂/KI 染色，結果花粉呈現淡褐色且呈現非圓形之不規則形狀（資料未顯示），證實 I₂/KI 染色對於雄不稔品種確有鑑別能力，但對於正常發育（非敗育型）花粉之活力之鑑別能力在本研究中則有待進一步釐清。Prasad *et al.* (2006) 研究亦指出 I₂/KI 染色代表花粉粒中澱粉粒之累積，藉此表達花粉之活力，但並不表示具有澱粉粒之花粉能於柱頭發芽或具有與胚珠結合之能力，但雄不稔品種之花粉因花粉敗育，未能正常發育之花粉通常伴隨澱粉粒無法充實之情形，故染色率低。

不同染劑對不同植物花粉活力檢測之效果並無一致性，過去的研究對於原因並未有太多探討，大多歸咎於物種本身之特性，但建議在使用染色法證明花粉活力前必須對其適當性加以確認 (Firmage & Dafni 2001)。一般可利用新鮮花粉與經過加熱花粉以同一染劑進行染色，觀察染劑是否具有區別性；或利用染色法與其他類型之花粉檢測方法如花粉培養方法交叉使用來確認其適當性。本研究將染色法中表現較為穩定之 FDA 染色法與花粉培養法以及 IFC 檢測法進行比較，3 種方法檢測所得之數據，在 ‘TN11’ 和 ‘N22’ 均顯示 IFC 分析結果與 FDA 染色或花粉培養所獲得之結果在統計上無顯著差異 (表 5)，據此推論 IFC 應可作為水稻花粉活力之檢測方法。IFC 原理為利用多頻波之交流電通過單細胞，並將各個細胞產生之電阻抗訊息加以收集，在處理數量、速度及精準度方面，較現行大量依賴人力調查之花粉活力檢測方法，除節省人力外並可提高效率 (Heidmann *et al.* 2016)。

Satake & Yoshida (1978) 研究指出開花當天對穎花稔實率影響甚鉅，而在開花前 1 d 或開花後 1 d 施以高溫處理，穎花稔實率並不會受到高溫處理的影響而下降，甚至在開花前連續 5 d 或開花後連續 5 d 處理高溫（不超過

41°C）結果亦不受影響，只要開花當日之溫度不超過臨界高溫，穎花稔實率並不會受到高溫處理的影響而下降。顯示開花期高溫對稔實率有絕對之影響，但開花前的高溫影響較小，而開花後之高溫則影響更小。水稻花粉管生長至胚囊與受精完成分別在開花後 30 min 與 1.5 h 間，亦即在高溫處理 (38°C 或 41°C) 前 1 h 所開之穎花其受精已接近完成，因此稔實率之表現為正常 (Cho 1955)。研究顯示水稻以開花過程中對高溫最為敏感，整個受精的過程約 1–1.5 h，依品種不同而有所差異，大部分品種開花落在早上 9 點到下午 2 點間，這期間的高溫將阻礙花粉粒膨脹與花藥囊開裂，進而影響花粉散落在柱頭上之數量、阻礙花粉萌發與花粉管伸長，最終造成受精率下降甚至不育。因此在水稻開花的過程中，有關穎花之開花時間、花藥基部開裂之比例和長度，以及花粉的活力、柱頭上之花粉數，皆可作為評估水稻受到高溫傷害的指標 (Matsui *et al.* 2000, 2001; Kumar *et al.* 2015)。上述研究證實花粉活力會受到溫度影響，但高溫處理之水稻植株，因每株或每穗之發育期具有差異性，且不同穗或同一穗上之穎花其發育期亦具有差異性，因此除非長時間施以高溫，否則溫度處理的影響應僅及於正在開花之穎花，但高溫試驗之調查若以整穗、整株或小區產量作為樣本單位時，容易降低其關聯性，原因在於高溫影響只及於正在開花之穎花，若能針對受影響之穎花進行調查，更能具體反應出穎花稔實率（產量）與高溫處理的實際關聯性，然而實務上在田間並不容易做到。本研究將花藥（粉）從當日將開花的穎花中取出，施以不同溫度處理後，以 IFC 檢測花粉活力之變化，結果顯示非耐熱品種 ‘TN11’ 之花粉，其活力隨著溫度上升有較明顯之下降 (表 7)，經 35°C 處理之花粉活力已降至 50% 以下 (47.4%)；而耐熱品種 ‘N22’ 之花粉活力在 30–40°C 處理後，花粉活力表現穩定未有明顯變化，在 45°C 處理後才開始明顯下降至 50% 以下 (46.5%) (表 6)。Satake & Yoshida (1978) 也指出，以 35°C 溫度處理後獲得之稔實率，可將對高溫敏感的品種區別出來，而以 38°C 高溫處理則可將耐高溫品種如 ‘N22’ 與其他不耐熱

品種區別出來。在本研究中‘TN11’在 35℃時測得之花粉活力為 47.4%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力為 77.3%，應不屬於對高溫敏感之品種，但繼續升溫至 40℃時，花粉活力持續明顯下降，顯示其亦非耐高溫品種；而‘N22’在 35℃時測得之花粉活力為 54.1%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力為 86.8%，在 40℃時測得之花粉活力為 53.5%，相對於 25℃溫度處理之花粉活力仍高達 85.9%，因此可將其歸類於耐高溫品種，此一結果與 Satake & Yoshida (1978) 對‘N22’之分類相吻合。

Rudich *et al.* (1977) 以著果率、花粉管萌發率與授粉率來區分番茄品種對高溫的敏感性，本研究嘗試將水稻花粉施以溫度梯度處理，藉由檢測花粉活力的改變來瞭解該品種花粉對溫度的敏感性，結果顯示耐熱之‘N22’之花粉活力表現符合其耐熱之特性。水稻耐熱品種對高溫之反應除表現於花粉之耐熱性外，亦可表現在其他與生殖生長過程相關的特性，例如開花時花藥相對於穎苞位置，若在開花時花藥仍處於穎苞內有利於花粉散落柱頭，若花藥已溢出穎苞則可能影響到柱頭所需之最低花粉數；又如花藥囊在高溫時的開裂程度，同樣會影響到柱頭所需之最低花粉數；又如以提早開花躲避高溫之開花型態等，以上這些特性亦有助於提高授粉率，但並非藉由提高或維持花粉活力來達成，育種人員在品種選育的過程中應該對這些特性加以觀察並記錄，用以綜合考評該品種之耐熱特性。本研究比較不同花粉活力檢測方法之適用性，並以 IFC 分析花粉經由不同溫度處理後活力之變化，藉由花粉活力變化建立不同水稻品種花粉耐溫性 (pollen thermo-tolerance) 之資料，未來將以此為基礎，針對台灣目前推廣之水稻品種建立其花粉耐溫之基本資料，作為水稻育種以及在推廣水稻品種時之重要參考。

誌謝

本研究係執行行政院農委會 109 農科-21.2.1-農-C1 計畫之成果。

引用文獻

- Cho, J. 1955. Cytological study of double fertilization in *Oryza sativa* L. Jpn. J. Breeding 5:131–148. doi:10.1270/jsbbs1951.5.131
- Coast O., A. J. Murdoch, R. H. Ellis, F. R. Hay, and K. S. V. Jagadish. 2016. Resilience of rice (*Oryza* spp.) pollen germination and tube growth to temperature stress. Plant Cell Environ. 39:26–37. doi:10.1111/pce.12475
- Fahad S., M. Z. Ihsan, A. Khaliq, I. Daur, S. Saud, S. Alzamanan, W. Nasim, M. Abdullah, I. A. Khan, C. Wu, D. Wang, and 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
- Firmage, D. H. and A. Dafni. 2001. Field tests for pollen viability; a comparative approach. Acta Hort. 561:87–94. doi:10.17660/ActaHortic.2001.561.13
- Heidmann, I., G. Schade-Kampmann, J. Lambalk, M. Ottiger, and M. Di Bernardino. 2016. Impedance flow cytometry: A novel technique in pollen analysis. PLoS One 11:e0165531. doi:10.1371/journal.pone.0165531
- Ho, C. H., C. M. Yang, C. L. Hsiao, and M. H. Lai. 2013. Changes of climatic variables during grain-filling stage affect yield and quality of rice cultivars bred from different regions in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 62:321–339. doi:10.6156/JTAR/2013.06204.03
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2013. Summary for policymakers. p.3–29. in: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Stockner, T. F., D. Qin, G. K. Plattner, M. M. B. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P. M. Midgley, eds.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. 1535 pp.
- Julia, C. and M. Dingkuhn. 2013. Predicting temperature induced sterility of rice spikelets requires simulation of crop-generated microclimate. Eur. J. Agron. 49:50–60. doi:10.1016/j.eja.2013.03.006
- Kariya, K. 1989. Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants: III. Establishment of a method of in vitro pollen germination. Jpn. J. Crop Sci. 58:96–102. doi:10.1626/jcs.58.96
- 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

- Kumar, N., N. Kumar, A. Shukla, S. C. Shankhdhar, and D. Shankhdhar. 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. Omasa, and T. Horie. 2000. High temperature at flowering inhibits swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 3:430–434. doi:10.1626/pps.3.430
- Matsui, T., K. Omasa, and T. Horie. 2001. The difference in sterility due to high temperatures during the flowering period among Japonica-rice varieties. *Plant Prod. Sci.* 4:90–93. doi:10.1626/pps.4.90
- 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
- Ramesh, R., T. Ramesh, P. R. Rao, V. G. Shankar, and M. H. V. Bhawe. 2017. Study the effect of high temperature stress on pollen viability, stigma exertion, sterility in rice. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6(4):2016–2024.
- Rudich, J., E. Zamski, and Y. Regev. 1977. Genotypic variation for sensitivity to high temperature in the tomato: Pollination and fruit set. *Bot. Gaz.* 138:448–452. doi:10.1086/336947
- Saragih, A. A., A. B. Puteh, M. R. Ismail, and M. M. A. Mondal. 2013. Pollen quality traits of cultivated (*Oryza sativa* L. ssp. indica) and weedy (*Oryza sativa* var. nivara) rice to water stress at reproductive stage. *Aust. J. Crop Sci.* 7:1106–1112.
- Satake, T. and S. Yoshida. 1978. High temperature-induced sterility in indica rices at flowering. *Jpn. J. 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. 2018. 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
- Shivanna, K. R. and N. S. Rangaswamy. 1992. Pollen biology: A laboratory manual. Springer-Verlag. New York, NY. 119 pp.
- 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. *Int. Rice Res. Notes* 26:31–32.
- Steer, M. W. and J. M. Steer. 1989. Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111:323–358. doi:10.1111/j.1469-8137.1989.tb00697.x
- Tseng, C. S., Y. R. Lin, C. P. Kuan, M. H. Lai, and M. T. Wu. 2013. Effect of buffer zones on pollen-mediated gene flow of transgenic rice. *J. Taiwan Agric. Res.* 62:259–267. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2013.06203.06
- Tushabe, D. and S. Rosbakh. 2021. A compendium of *in vitro* germination media for pollen research. *Front. Plant Sci.* 12:709945. doi:10.3389/fpls.2021.709945

Study on Detection Methods of Rice Pollen Viability

Chi-Ni Hsia¹, Shuen-Chi You², Chin-Yi Tsao³, Yong-Jie Su⁴, Charng-Pei Li^{5,*}

Abstract

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(2):123–134.

Rice is the major staple food in Taiwan, however, detrimental effects on rice grain yield and quality by the heat stress have been observed. Since anthesis is the most sensitive stage to high temperature in the rice life cycle, the viability of pollens under the heat stress will be an appropriate index for thermo-tolerance of the variety. In addition to establishing an *in vitro* pollen culture medium, a number of pollen staining methods as well as using an impedance flow cytometry (IFC) for pollen viability analysis were conducted in this study. Fresh pollens of a japonica rice cultivar ‘Tainan 11’ (‘TN11’) and a heat-tolerant aus type rice cultivar ‘Nagina 22’ (‘N22’) were used in all experiments. In order to establish a proper medium for pollen tube germination, the ultimate concentration of various important components including sucrose, boric acid and calcium nitrate was investigated in successive terms. The results showed that a medium containing 22.5% sucrose, 60 mg L⁻¹ boric acid, and 200 mg L⁻¹ calcium nitrate had the highest pollen tube germination rate of 76.0% in ‘N22’ and 78.7% in ‘TN11’. Three pollen staining methods including I₂/KI, fluorescein diacetate (FDA), and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were compared in this study. The highest staining rate was obtained from I₂/KI followed by FDA and the lowest rate was found from TTC. Three methods of *in vitro* pollen culture, FDA staining, and IFC analysis were investigated for pollen viability. Although no difference was found among these three methods on pollen viability in ‘TN11’, FDA resulted in a higher staining rate than the *in vitro* pollen culture in ‘N22’. However, there was no difference found on IFC with the other two methods in ‘N22’. It is concluded that IFC was not different from pollen staining or *in vitro* pollen culture in detecting pollen viability. Fresh pollens of the two rice cultivars were subjected to temperature from 25°C to 45°C for 15 min before analyzing by IFC. The results showed that pollen viability was significantly decreasing along with raising the temperature in ‘TN11’; however, no significant decrease was found until 35°C, and no significant changes in pollen viability between 35°C to 40°C were found in ‘N22’. The results indicated that pollens of ‘N22’ had higher thermo-tolerance than that of ‘TN11’.

Key words: *Oriza sativa* L., *In vitro* pollen germination medium, Pollen viability, Impedance flow cytometry.

Received: August 13, 2021; Accepted: November 30, 2021.

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

¹ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁵ Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.