

# 溫度對高粱花粉活力與授粉的影響

宋濟民 陳宗禮

國立中興大學農藝學系

## 摘 要

為探討低溫逆境對高粱生殖生理的影響，本研究調查不同溫度對花粉活力以及開花行為的表現，花粉活力係以碘染劑 ( $I_2/KI$ )、FDA (fluorescein diacetate) 螢光染劑、TTC 或體外 (in vitro) 發芽率作為評估指標。不同溫度對花粉活性的試驗結果顯示，正常的花粉在不同溫度下的發芽率有顯著差異，其中 35°C 下花粉的發芽率約為 15°C 的二倍，同時不同品種的花粉其體外發芽率亦有顯著的差別。此外參試的所有品系穎花在日常 20°C 以上皆可正常開花，唯在 15°C 以下皆不開花。由於小穗花無法正常開花，因此花粉粒雖具有正常的活性，但無法完成正常授粉，因此影響種子收量。

關鍵詞：高粱、花粉活力、低溫逆境。

## 前 言

作物的生長發育除受本身基因的控制外，亦直接或間接受環境的影響。在各種環境因子中，溫度是決定作物生長與發育的一項重要因子。一般穀類作物的生產主要以收取種子為目的，禾穀類種子的形成與產生必須經幼穗分化以至開花授粉，因此溫度對種子生產影響的研究主要針對幼穗分化期、孕穗期及開花授粉期。穀類作物生殖生長的階段若遭受溫度異常，則種子的收穫量將明顯減少。

高粱係人類栽培的主要禾穀作物之一，屬熱帶原產，故一般栽培多在乾旱或半乾旱地區的高溫季節進行，因此溫度對其種子生

產影響之研究多半針對缺水或高溫之效應 (Peacock, 1982)。本省高粱的生產亦多集中於溫度較高的季節，唯高粱雜交種的採種業務，為了避開雨季與風災所帶來的風險，大部份在秋天種植，因此其生長季節的溫度由高變低。高粱從種植至幼穗分化期約 30 天，幼穗分化至開花期約再需 30-40 天 (House, 1985; Quiby et al., 1973; Vanderlip and Reeves, 1972)。秋天種植之高粱植株進入幼穗分化期時，遭受不正常低溫的機率不大，但其孕穗開花期已近十一月下旬或十二月，在此季節台灣地區受大陸冷氣團南移的機會較多，所以本省高粱採種之種子量收成往往受低溫的影響。高粱之孕穗期即為配子體形成期，包括減數分裂、四分子期、小孢子期

至花粉期，而開花期指花粉成熟飛散至完成受粉期間 (Christense and Horner, 1974 ; Christense et al., 1972) 低溫對孕穗開花期所造成的障害在水稻有詳細之研究報告 (Hayase et al., 1969 ; Ito et al., 1970 ; Satake, 1974 ; Yang and Chu, 1994)，但低溫對高粱生殖生理影響的報告相當少。Chen 與 Chen (1993) 提出高粱在花粉形成期有二階段對低溫敏感，唯尚未有低溫對高粱授粉期開花及花粉活力影響之報導。本研究主要目的在探討低溫對花粉活力的影響以及不同溫度下的開花行為，以了解授粉期對溫度的反應，作為採種之參考。

## 材料與方法

以高粱花粉親 2R、80B、Tx435 及台中區農業改良場所提供代號 TCR 的父本材料 62 個為材料，於民國 80 年及 81 年之 8 至 11 月份，每隔半個月播種於中興大學試驗圃或盆栽，俟植株開花時，取其花粉或花穗作為試驗材料。另外 2R、TCR-431、2793、2815、2833、2840、2850 及 7078 等八個材料亦種植於 30×60 cm 之不織布網袋中，在自然環境下按慣行方法管理，俟孕穗開花期後，於下午將當日已開之穎花雄蕊清除乾淨，植株移入 30、25、20、15 或 10°C 之生長箱內，翌日在光度 100  $\mu$  E/m<sup>2</sup> 處理 5 小時後，調查其開花數，隨後將溫度調升為 32°C，經四小時後再調查當日該植株應開的花數，開花數至少調查 300 個以上，由此可以獲得不同溫度對小穗花開花授粉的影響。

在花粉活力檢定方面，將欲測定花粉活力之花藥或花粉分別以 I<sub>2</sub>-KI、FDA (fluorescein diacetate) 及 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 等染劑染色，花藥數達機取十個，調查之花粉數至少 3,000 粒以上。

各染劑配法及判斷方式如下：

1. 碘染劑：以 1 份 Lugol solution (內含 I<sub>2</sub>/KI) 加 2 份去離子水溶解而成，裝於有色玻璃瓶中。可檢查花粉粒內澱粉累積情形，染色藍黑至紫黑色判定正常，有效花粉率以百分率表示。

2. FDA 螢光染劑：將 FDA 50 mg 溶於 10 ml 丙酮，使用時以 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 5.8) 稀釋為 0.05% 溶液使用，染色 5 分鐘後以螢光顯微鏡觀察，呈現螢光反應之花粉為正常，以百分率表示 (Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)。

3. TTC：將 TTC 溶於 1/15 M 的磷酸緩衝液 (pH 6.5)，配成 0.5% 使用，呈紅色者為正常花粉。

In vitro 花粉發芽率測試係以蠟紙收集欲測定之花粉，放置在載玻片上，在不同定溫且含飽和水份的密閉容器中進行測試，經 20-30 分鐘，取出於解剖顯微鏡下檢查花粉是否發芽，發芽的標準係以花粉管突出長度超過其直徑 1/3 者。另外花粉發芽率亦以液體培養基進行，培養基的主要成份為 42% sucrose (w/v)，100ppm H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>，300 ppm Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O，200 ppm MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O，100 ppm KNO<sub>3</sub>。花粉粒在液體培養基中置於不同溫度，經 30 分鐘以光學顯微鏡檢查其發芽率。In situ 發芽率係將花粉沾在柱頭上，經 1 小時後，柱頭以 Farmer's solution 固定，鏡檢時柱頭先以 5 N NaOH 清洗浸漬，在玻片上加 1% aniline blue，壓片以螢光顯微鏡檢查花粉管的伸長情形。

## 結 果

檢討不同溫度對花粉活性及發芽率的影響，參試三個花粉親 2R、80B 及 Tx435 在進行溫度對花粉發芽影響之前先以 1/3X 之

Lugol 溶液 (含  $I_2/KI$ ) 檢定花粉粒是否含有足夠的澱粉累積，同時以 0.5% TTC 溶液 (pH 6.5) 作花粉粒之生化活力檢定，澱粉含量的檢定情形顯示含有足夠澱粉之花粉呈紫黑色。生化活力的檢定情形顯示，紅色者表示生化活力較強。三個花粉親所產生的不正常

花粉粒比二項特性所佔的百分率如表一所示。由表一之結果顯示，花粉粒生化活力較高者所佔的百分比，依次為 Tx435>80B>2R，花粉粒填充澱粉較多者所佔的百分比次序也是 Tx435>80B>2R。由此結果顯示至少該三品種所產生的花粉粒 80-90% 皆屬正常。

Table 1. Percentage of aborted pollens in three sorghum genotypes tested with  $I_2$ -KI and TTC stains.

Viability test	Genotype		
	2R	80B	Tx435
$I_2 / KI$	22.12 ± 7.65	17.83 ± 4.16	15.17 ± 1.12
TTC	16.78 ± 3.57	11.43 ± 3.35	8.70 ± 2.52

將三品種在正常生長條件下所形成的花粉置於載玻片上，放置於 80-85% 相對溫度之梯溫生長箱 (15-30°C)，經 20-30 分鐘後，計算其發芽率，花粉發芽係以花粉管伸出長度超過其花粉粒直徑 1/3 者為準。經鏡檢計算其 *in vitro* 發芽率，結果如圖一所示。高粱正常形成的花粉，在不同的溫度條件下 (15-35°C)，其 *in vitro* 的發芽率隨溫度下降逐漸下降，35°C 下的發芽率係 15°C 下的二倍，三品種表現大致相同。品種之間花粉的 *in vitro* 發芽率有極顯著的差異，其中以 2R 的發芽率最高，在 35°C 下可高達 43%，15°C 時尚有 23.5%。其次為 80B，在 35°C 下發芽率為 36%，15°C 下降至 16%。發芽率較差的 Tx435 在 35°C 下為 24%，15°C 時已降至 10%。根據觀察 2R 的花粉量，較其它二品種多，而且其花粉在各測定的溫度下比較其它二品種高，以此特性而言係較佳的花粉親。

在探討溫度對授粉期開花行為及花粉活

力的影響方面，因高粱屬常異交作物，在形成種子時必須經正常的授粉與授精作用。在正常的生長環境下，高粱的穎花大部份在早晨開放，花粉散落在羽狀柱頭上進行授粉作用。但是在溫度較低的季節，實際上在田間可觀察到高粱穎花的開花時間延後，甚至於閉穎不開花。為了解溫度的高低對穎花開花程度的影響，試驗中將即將開花的穗置於特定的溫度下，調查在該溫度環境下的開花數，由於每穗一天中能開的穎花數並不相同，但若將該穗置於較高的溫度 (32°C)，則當天會開的成熟穎花必然全數開放。因此先調查在各特定溫度下當天所開的穎花數，隨後立即將同一穗移至 32°C，再調查其開花總數，如此可以得到不同溫度對開花數的影響百分比，試驗調查 2R 等八個花粉親品系，其結果列於表二中。表中的資料顯示，各品系在 30°C 的環境下，當天所能開的穎花幾乎全部開花，隨著溫度降低，每一穗能開的穎花數比例漸漸下降，唯在 15°C 以下，所有品系完全不開

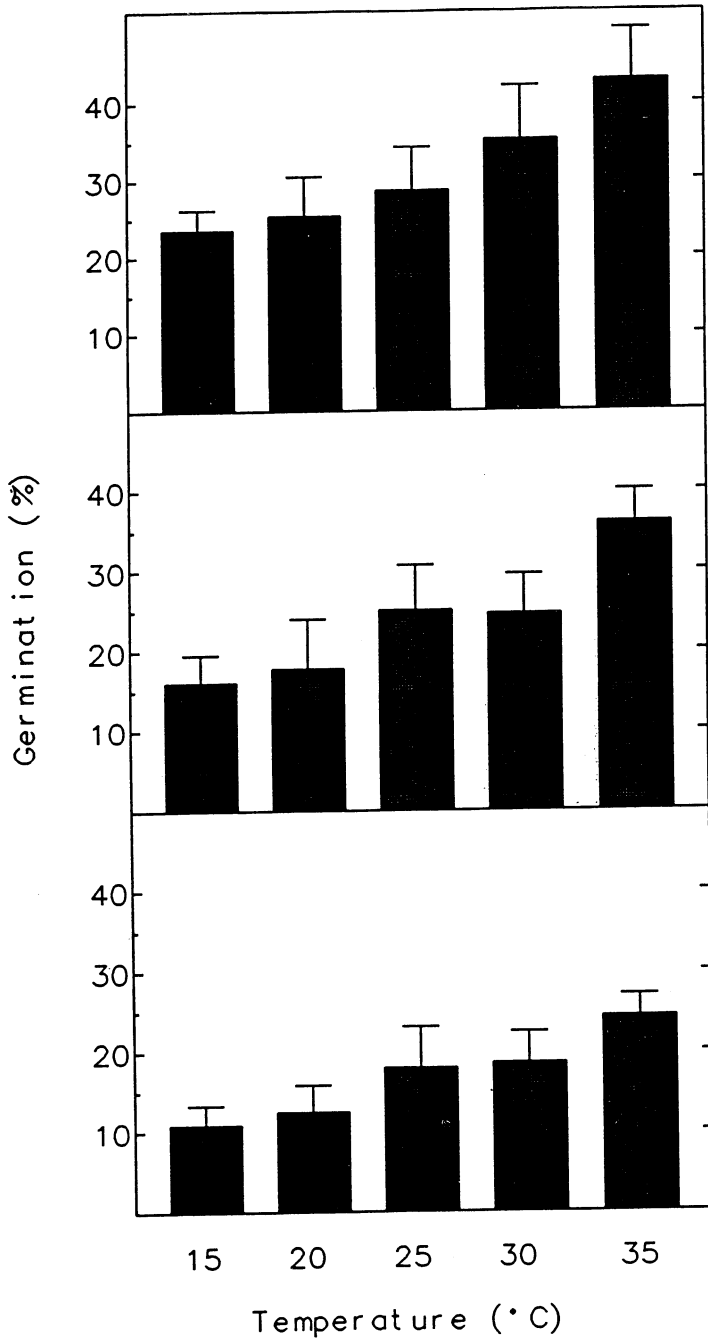


Fig. 1 Effect of temperature on in vitro pollen germination in three sorghum varieties. Bars represent the standard deviation.

花，當然在此種情形下，就不可能有授粉的機會。由此部份之資料顯示在 15-20°C 之間的溫度可能是決定高粱穎花是否開花的臨界溫度。

Table 2. Relative inflorescent rate of eight grain sorghums under different day-time temperature as compared with normal (32°C) day-time temperature.

Genotype	Treatment of day-time temperature(°C)				
	10/32	15/32	20/32	25/32	30/32
2R	0±0	0±0	83.0±5.3	88.1±5.6	99.8±0.3
TCR-431	0±0	0±0	84.5±2.1	90.0±4.8	98.0±5.6
TCR-2793	0±0	0±0	74.5±4.7	86.5±3.5	100.0±0
TCR-2815	0±0	0±0	82.5±6.7	92.0±8.4	100.0±0
TCR-2833	0±0	0±0	72.0±2.8	86.5±7.1	98.0±5.2
TCR-2840	0±0	0±0	81.0±4.4	89.5±5.2	100.0±0
TCR-2850	0±0	0±0	78.5±2.1	88.0±4.2	100.0±0
TCR-7078	0±0	0±0	79.0±3.7	90.2±2.8	100.0±0

進一步將不同溫度下開花的百分比資料作變方分析，其結果如表三所列。由變方分析的結果可知，溫度對開花數的影響百分比在各品系之間有顯著差異，在 20°C 以上參試各品系皆能維持 70% 以上的穎花開放，25°C 以上則有 85% 以上，而在 30°C 之下幾乎當天會開的花全部開花。不同溫度對開花

數的影響有顯著的差異，10 及 15°C 以下穎花都不會開，各品系的表現都相同。由此結果可配合解釋—高粱在冬季之開花期若遭遇 15°C 以下之冷氣團，由於穎花不張開，因而阻隔了授粉作用，這可能是導致種子收量減少的一項主因。

Table 3. ANOVA for relative inflorescent rate of eight grain sorghums.

Source of variation	df	SS	MS	F value
Genotype	7	76.9687	10.9955	4.4638**
Temperature	32	109305.6090	3415.8003	1386.6765**
Error	40	98.5303	2.4633	

低溫對小穗花開花有明顯的抑制現象，由於小穗花之內外穎不能張開，花藥亦不能裂開，花粉粒沒有機會散佈在柱頭，因而沒有受精行為產生。為了解在低溫下沒有開放之穎花的配子體活力，以盆栽之2R為材料，以15°C處理，當日下午將未裂開花藥內的花粉粒取出，以I<sub>2</sub>/KI、TTC及FDA染色，檢定其花粉的活性，其結果列於圖二中，由於配子體形成期中，植株發育正常，僅在開花期接受15°C低溫8小時，開花前一天花粉粒已累積足夠澱粉，所以以I<sub>2</sub>/KI檢定顯示僅

11.28% 未含有充足澱粉累積，88%之花粉粒皆累積足夠之澱粉，故以碘液檢定並不能反映此時花粉的活性，以FDA螢光染色可顯示有18%之花粉粒其膜系的完整性不佳。TTC染劑所呈現的結果表示花粉粒內脫氫酵素活性在較低溫度下較低，約22%不正常，由上述三種花粉活力的檢定顯示，此時留在花藥內的花粉粒至少有80%屬正常，此結果和正常植株所產生之花粉飛散時的花粉活力(表一)並沒有顯著的差別。

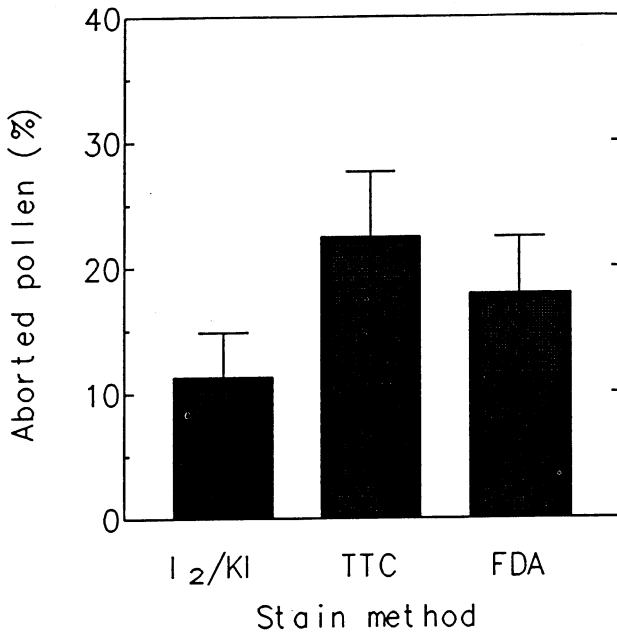


Fig. 2 Percentage of aborted pollen in anther treated with 15°C/8 hours estimated by I<sub>2</sub>/KI、TTC and FDA stains respectively. Bars represent the standard deviation.

將上述之花粉粒置於載玻片上，放置在80-85%相對濕度的條件下，以不同溫度(15-35°C)處理，經20-30分鐘後，檢查花粉的體外(in vitro)發芽率，其結果如圖三所示，雖然花粉的活力檢定有80%以上屬於正常，但其體外發芽率低於10%，在不同溫度

下的發芽率並無顯著差異。可能在低溫下花粉發育延遲尚未達到最大發芽能力，若將這部份材料隔天移至正常30°C的環境下，則其開花正常，柱頭可正常展開，花藥裂開，花粉可自然散落，植株的結實正常。

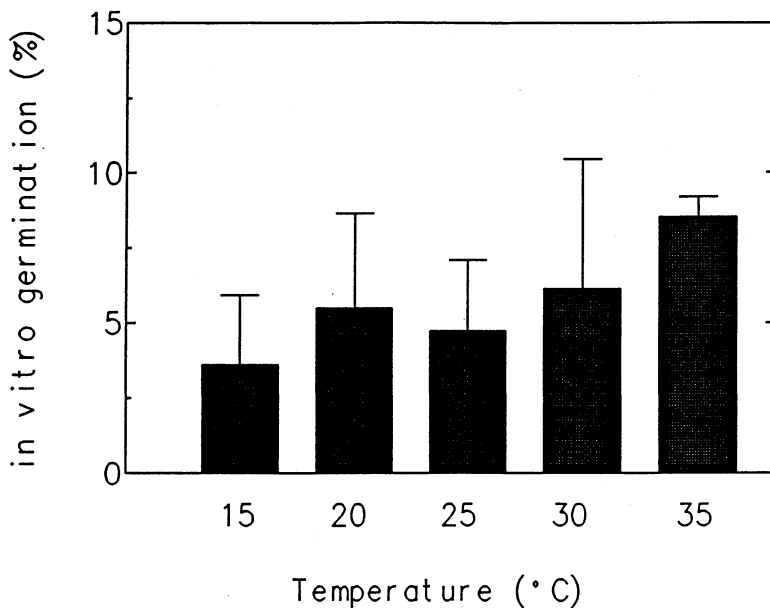


Fig. 3 Germination of pollen extracted from undehesive anther treated with 15°C/8 hours under different germinating temperature condition.

## 討 論

高等植物種子的產生必須透過雌雄配子的結合，因此雌雄配子是否具有功能或活性對授粉、授精作用相當重要。一般低溫降低所有生物的代謝活性，對花粉的發芽能力而言，隨著溫度下降而降低(圖一)，甚至於連花穗內雄蕊的發育速率皆減慢(表二)。高粱雌蕊對環境變動具有較大穩定性，雌蕊接受花粉的能力與壽命可長達5天以上(Doggett, 1988; Patil and Goud, 1980)，因此一般認為雌蕊對低溫的敏感性較低(Hayase et al., 1969)。花粉的壽命則較短，飛散後之壽命短至數十分鐘或數小時而已(Doggett, 1988; Patil and Goud, 1980; Sanchez and Smeltzer, 1965)，壽命長短視溫度、相對濕

度而異。若花粉飛散後不能附著在柱頭上吸收水份，則花粉粒失水速率相當快，隨著水份喪失，花粉的活力及發芽率急速下降(Barnabas, 1985; Chen and Chen, 1993; Lansac et al., 1994; Shivanna and Heslop-Harrison, 1981)。冬季大陸冷氣團下降，不但溫度降低，往往伴隨乾冷氣候，當相對濕度下降時，對花粉的發芽更不利，因而影響種子的生產量。

由高粱授粉期對溫度反應之結果顯示，低溫下花粉的發芽率降低，但只要有足夠量的花粉可正常授粉於柱頭上，還是可以成功的授精結實，因此吾人並不認為低溫對花粉活力的降低是導致種子產量大幅下降的主因。由表二之結果顯示，低溫對種子生產的最大障礙在於穎花不開，如此將隔絕花粉粒散落

在柱頭上的機會，由此結果推測授粉期溫度逆境所造成的稔實率下降，花粉的散播才是主要原因，此點結論和造成水稻在高溫及低溫稔實率下降的現象一致(Ito et al., 1970；Lin, 1974；Mackill et al., 1982)。開花授粉期短期的低溫造成開花延遲或閉穎不開花，閉穎的主要原因係因為低溫下蒸散量降低，穎花內鱗被不能維持適當的水分潛勢，膨壓不夠，因此穎花不能順利張開，有關此現象之改善尚待進一步研究證實。至於短期低溫對留存在花藥內的花粉活力並沒有顯著的影響(圖二)，由於低溫花粉發育延遲，故檢定未飛散花粉的發芽率偏低(圖三)，唯若隔天氣溫回升，則授粉現象又回復正常。但假使持續低溫，最後花絲敗壞，縱然氣溫回升，授粉作用亦不能恢復正常，結果不稔實率增加。本文主要針對開花授粉期對低溫逆境的反應，另外，低溫對較早之幼穗分化期及孕穗期的影響，根據 Satake (1974) 及 Yang 與 Chu (1994) 以水稻的研究顯示，低溫造成水稻不稔的最敏感時期是減數分裂至四分子期。Chen 與 Chen (1993) 以高粱為材料，發現高粱生殖生長期間對低溫最敏感的時期為開花前 9-12 及 1-3 天，高粱花粉發育在這二階段正值減數分裂至四分子期及花粉粒內容物累積期(Christense et al., 1972)。綜合這些結果可解釋為何高粱在生殖生長期間遭受低溫逆境時，花穗上會有整段不稔。

## 誌 謝

本研究試驗經費承蒙行政院農委會補助，謹此致謝。

## 引用文獻

1. Barnabas, B. 1985. Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.* 55:201-204.
2. Chen, C. S. and C. Chen. 1993. The effect of gametophytic selection for temperature tolerance in sorghum. I. Comparison of gametophytic viability measurement methods and response of gametophytic viability to temperature. *J. Agric. Assoc. China* 161:11-26.
3. Christense, J. E., H. T. Horner, and N. R. Lersten. 1972. Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 59:43-58.
4. Doggett, H. 1988. *Sorghum*. 2nd ed., Longman Group, UK.
5. Hayase, H., T. Satake., I. Nishiyama, and N. Ito. 1969. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. II. The most sensitive stage to cooling and fertilizing ability of pistils. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 38:706-711.
6. House, L. R. 1985. A guide to sorghum breeding. ICRISAT, Patancheru PO, A.P., India.
7. Ito, N., H. Hayase, T. Satake, and I. Nishiyama. 1970. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. III. Male abnormalities at anthesis. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 39:60-64.
8. 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.
9. Lin, S. S. 1974. The physiological effects of low temperature on the abortion in rice. *Sci. Agric.* 22:342-345.
10. Mackill, D. J., W. R. Coffman, and J. N.



- Rutger. 1982. Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice. *Crop Sci.* 22:730-732.
11. Patil, R. C. and J. V. Goud. 1980. Viability of pollen and receptivity of stigma in sorghum. *Indian J. Agric. Sci.* 50:522-526.
12. Peacock, J. M. 1982. Response and tolerance of sorghum to temperature stress. In: *Sorghum in the Eighties* (L. R. House, L. K. Mughogho, and J. M. Peacock, eds.). p.143. ICRISAT, Patancheru PO, A.P., India.
13. Quiby, J. R., J. D. Helsket, and R. L. Voigh. 1973. Influence of temperature and photoperiod on floral initiation and leaf number in sorghum. *Crop Sci.* 13:243-246.
14. Sanchez, R. L. and D. G. Smeltzer. 1965. Sorghum pollen viability. *Crop Sci.* 5:11-113.
15. Satake, T. 1974. Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants. IX. Revision of the classification and terminology of pollen developmental stages. *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 43:31-35.
16. Shivanna, K. R. and J. Heslop-Harrison. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47:759-770.
17. Verderlip, R. L. and H. E. Reeves. 1972. Growth stages of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Agron. J.* 64:13-16.
18. Yang, S. S. and C. Chu. 1994. The stage sensitive to low temperature during panicle development in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Agron. J.* 4:157-166.

## Effect of Temperature on Pollen Viability and Fertilization of Grain Sorghum

Jih-Min Sung and Chung-Li Chen

Department of Agronomy, National Chung-Hsing University.

Taichung, Taiwan 402, R.O.C.

The objective of this study was designed to investigate the effect of low temperature on reproductive physiology of sorghum plant. The viability of pollens and flowering response to low temperature were evaluated. Pollen viability was determined using the iodine, fluorescein diacetate and tetrazolium chloride staining technique and in vitro germination test. The results indicated that significant differences existed among temperature treatments for pollen viability. The germination percentage of pollen at 35°C was 2 times higher than that of 15°C. Cultivar differences also existed for in vitro germination. On the other hand, all the cultivars were

capable of flowering at or above 20°C. Low temperature of 15°C was inhibitory to flowering. The poor seed setting of sorghum might be linked to the incapability of flowering for spikelets although pollen were viable under low temperature.

**Key words:** Sorghum, Pollen viability, Low-temperature stress.