應用電阻抗式流式細胞儀於甜瓜花粉活力檢測

農試所遺傳生技組 莊淨 蔡媚婷 林思妤 游舜期 夏奇鈱

一、前言

在全球暖化的影響下，溫度逆境與極端氣候事件之發生日益頻繁，對作物生殖生長構成之挑戰尤為嚴峻，相較於營養生長，生殖階段對環境變化的感知更為敏感，除了直接影響授粉外，更關係到果實發育與產量。若作物本身缺乏對溫度逆境的耐受力，將直接衝擊其生產穩定性，其中花粉作為授粉與繁殖的要角，對於環境逆境表現的韌性更應加以重視。研究顯示，花粉在花朵開放前的 1-2 天內對溫度變化極為敏感，若於此時遭遇逆境，可能導致授粉失敗、落花、落果或果實發育不良等一連串問題，但過往對於花粉活力受到逆境影響的程度卻缺乏足夠的了解。

傳統的花粉活力檢測方式大多仰賴細胞染色法，例如使用氯化三苯基四唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 藉由觀察並記錄染色細胞之比例加以判斷，或透過體外培養 (*in vitro*) 觀察花粉發芽情形。儘管這些方法具參考價值，但在效率與數量方面仍有所侷限，除此之外，上述方法還受到染色程度不易判讀，以及花粉培養基配方是否適當等問題的影響。本篇旨在向讀者介紹一項更快速、高效且準確的花粉活力檢測技術。研究中所使用之「花粉活力（pollen viability）」係指花粉細胞具生理活性的比例，需特別說明的是，本篇所稱之「花粉活力」不直接等同於花粉之發芽能力 (germinability) 或授粉能力(fertility)，而是作為活細胞比例 (proportion of viable pollen cells) 之指標用語。本文延續相關文獻之用詞慣例，採「花粉活力」統稱此一量測結果，並於此釐清其特定意涵，以避免混淆。

二、電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry, IFC)

過去由於技術門檻與分析工具的限制，花粉相關的研究多聚焦於少量之基礎觀察，較難進行大規模分析或深入的探討。隨著近年來細胞分析技術的快速進展，尤其是無須染劑、即時分析等新方法的出現，讓過往難以大量進行檢測的花粉活力研究，開始具備高通量、高解析檢測的可行性。

作　　者：莊淨聘用助理研究員
連絡電話：04-23317325

DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005

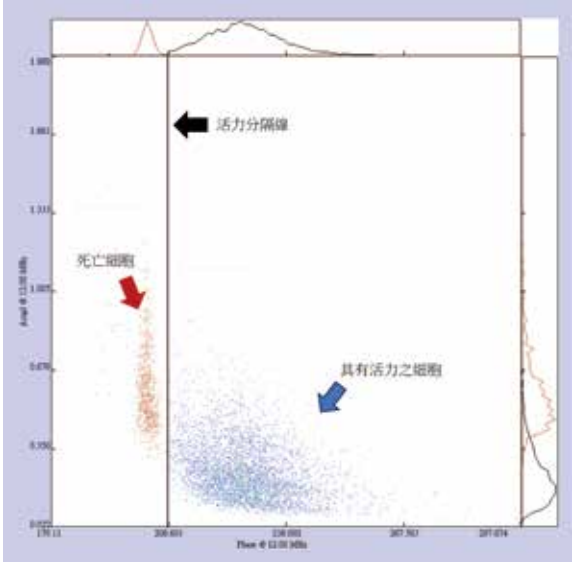
農業試驗所於民國106年購入電阻抗式流式細胞儀(圖一)，開始對作物花粉展開系列的研究。一般流式細胞儀根據之原理源自庫爾特計數器 (coulter counter)，是基於感知單細胞電阻抗訊號變化的分析系統，目前已被廣泛應用於各類細胞與微粒大小量測及其計數之用。然而，過去受限於儀器的靈敏度與解析度，較難應用於細胞表現型或功能性等進階層面的分析，補救之道則是利用具高度靈敏度的螢光標記技術 (fluorescence-activated flow cytometers, FACS)，但因螢光偵測需搭配精密之雷射與光學系統，因此也提高了儀器的售價。然而隨著近年來微機電技術 (microtechnology) 於生命科學領域的快速發展，依據電訊號變化的檢測技術其靈敏度與解析度已大幅提升，加上具備毋須染劑標記 (label-free)、操作簡便且售價更為合理等優點，讓此一技術在細胞分析的應用前景重新受到重視，IFC即是此一技術改進下的產品。

IFC之工作原理大致如下，當單細胞或單顆微粒通過晶片中以多頻波交流電產生電場的微通道時，系統即可偵測到其中電阻抗之變化，收集這些數據再轉換後得以提取粒徑、數量、活力及染色體倍體數等生物資訊，實現對單個細胞的多參數測量。此外，透過儀器專用軟體亦可將這些資訊轉換為視覺化圖形 (圖二)，提高吾人對這些生物資訊的理解，方便分析與比較。

為深化作物花粉耐溫性的研究，本研究團隊在過去數年間利用IFC分析了多種作物之花粉活力，雖然儀器本身的操作並不困難，但為達到最佳化之檢



圖一、電阻抗式流式細胞儀 (impedance flow cytometry, IFC)。



圖二、以電阻抗式流式細胞儀 (IFC) **檢測花粉活力之視覺化點圖，圖中垂直之活力分隔線為藉由失活處理樣品** (**死亡細胞**) **之點圖與正常樣品重疊後所畫出。**

DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005

測結果，仍必須在檢測前就各項條件進行個別調整，如晶片通道大小、花粉篩網大小、導電液的選擇、檢測參數的設定、樣本流速以及細胞濃度等，這些條件的設定若不適當，將影響檢測之效能。目前已利用IFC成功建立數種不同作物花粉檢測的標準流程，如蝴蝶蘭、文心蘭、水稻、桃、甜瓜等作物，並持續建立更多作物花粉的耐溫性評估平台。未來在氣候條件日益嚴峻的環境下，如何即時且客觀地掌握花粉品質的變化，不僅育種者應該重視，許多以收成果實與種子為標的之作物更是不可忽視的一環，而IFC技術的導入，為這項長久以來難以深入或量化的研究課題，提供了一條新的解方。以下就利用IFC建立甜瓜花粉活力檢測過程為例加以介紹。

三、甜瓜花粉活力快速檢測技術之建立

以具耐熱性且品質優良之甜瓜(*Cucumis melo* L.)品種—'臺南13號'作為模式品種，建立適用於甜瓜花粉活力之IFC快速檢測技術。為確立最佳檢測條件，首先採集甜瓜不同發育階段花朵的花粉進行顯微鏡鏡檢，四個不同發育階段花朵 (圖三A)，分別為花瓣尚未突出花萼的花朵 (stage 1)、花瓣突出花萼約0.2 cm (stage 2)、當天開放之花朵 (stage 3)、完全開放後一天的花朵 (stage 4)。觀察發現甜瓜第1階段至第3階段花朵發育時間通常不超過1天。顯微鏡觀察第1至第3階段花朵的花粉外觀變化不大，直徑約為60 μm (圖三B)，第4階段 (stage 4) 花粉直徑則略為縮小。此外，鏡檢觀察亦顯示甜瓜花粉並無明顯之長、短軸之分，屬近似球體之花粉粒，據此本研究選擇微通道為120 μm之晶片，並以儀器所推薦之導電液、參數設定進行IFC檢測。於此同時，亦利用TTC染色法對同批花粉進行活力檢測，操作程序為將花粉置於含有1% TTC之磷酸緩衝液中，於35℃進行4小時染色，完成後予以拍照，再依照片以人工進行計數 (圖三C)。

比較IFC與TTC兩種方法檢測甜瓜'臺南13號'不同發育階段花朵內之花粉活力，顯示在花朵尚未開放的第1與第2階段，兩種檢測方法所測得之花粉活力皆較高 (圖四)。第1階段花朵之花粉活力，以IFC之81.7%較TTC染色法之62.6%為高；在第2階段花朵，顯示兩者測得之結果相近，分別為81.9%與83.4%。隨著花朵開放到第3階段，兩種方法測得之花粉活力產生顯著差異，IFC檢測值尚有62.6%，但TTC染色率卻驟降至僅5.7%。至於開花超過一日之花朵，花粉活力持續降低，此時IFC檢測仍有53.2%，但TTC染色率已降至近乎為0%。綜合上述結果可知，甜瓜花粉在花朵未開放前具有較高之活力，建議未來若欲進行甜瓜花粉活力評估，宜擇第二階段花朵之花粉做為檢測樣本，可提升檢測結果的準確性與一致性。

比較兩種方法的操作流程，顯示兩者皆需經過花粉的分離與過濾等前處理程序，但TTC染色法在花粉與染劑混合

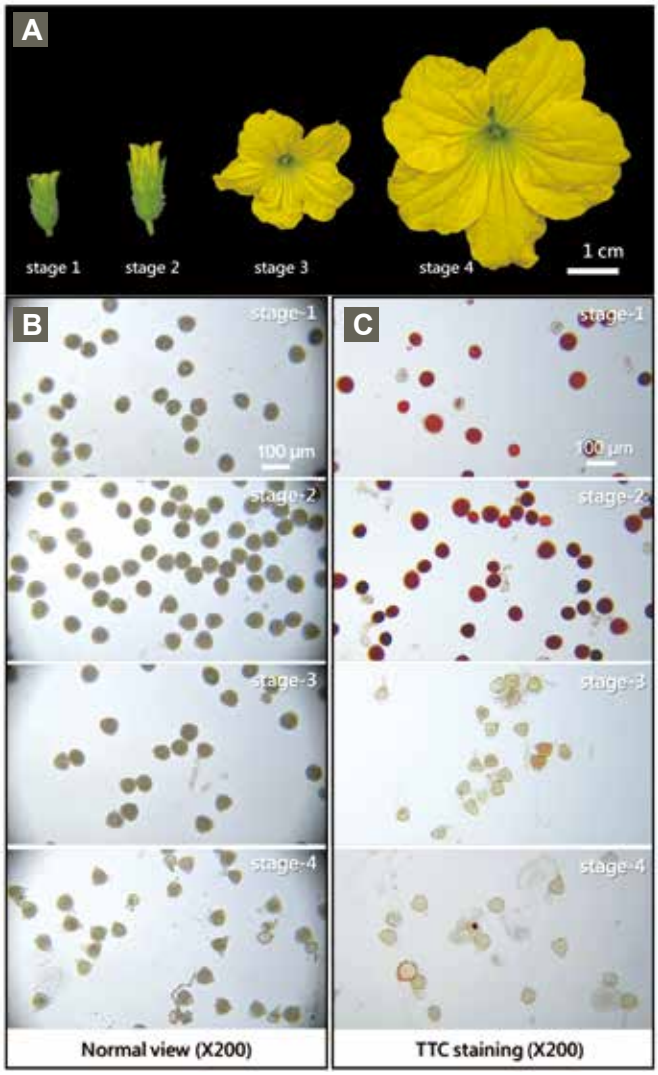
—農業試驗所技術服務季刊．2025年12月．144期—
DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005

後必須經過一段作用時間 (4小時)，之後再以顯微鏡觀察、拍照及仰賴人工從圖像中進行數十至數百之細胞數據判讀與計數；相較之下，IFC在晶片與導電液與各項參數選定後，每一樣品之檢測分析，約在1分鐘內即可完成，計數量在數千至數萬之間。

綜合來說，IFC不僅在即時性與操作效率上遠優於傳統細胞染色法，儀器自動偵測的功能也降低了人為誤差，在偵測數量上更遠勝於染色法。研究顯示，以IFC偵測甜瓜花粉活力具有更高的靈敏度與穩定性，特別是在花粉活力下降的階段，推測因IFC檢測之花粉數量較大，或是活性訊號的偵測較為靈敏，而TTC染色法則因觀察數量少且染色程度難以判定，導致顯著低估或無法反應花粉活力的實際狀態，除此之外，根據胡瓜 (*Cucumis sativus* L.) 相關文獻指出，若花粉細胞中之脫氫酶活性小於40%或不足時，在使用TTC染色法時則會遇到染色不良的情形，使花粉活力的估算更加困難。

四、IFC花粉活力檢測法之延伸應用

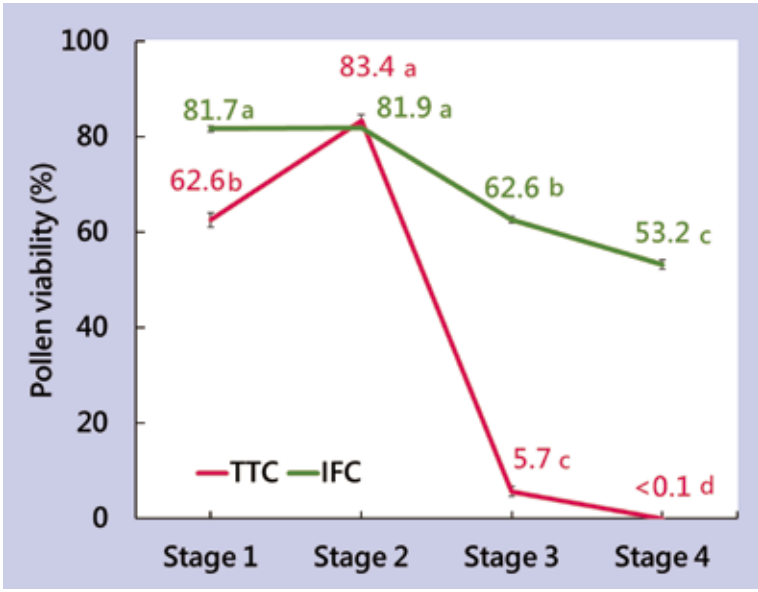
在利用IFC建立甜瓜花粉活力快速檢測技術後，其快速且穩定的特性，可成為輔助育種選拔或作為栽培改進的重要工具。例如，根據專業栽培者經驗，陰雨天授粉成功率低下，因此本團隊也針對於相同溫室環境下生長之不同甜瓜品種(系)比較其於陰雨天之花粉活力表現。圖五為在農試所溫室中進行回交育種種植之6個甜瓜品系，在陰雨天時採集如前述試驗中第二階段之花粉進行活力檢測之結



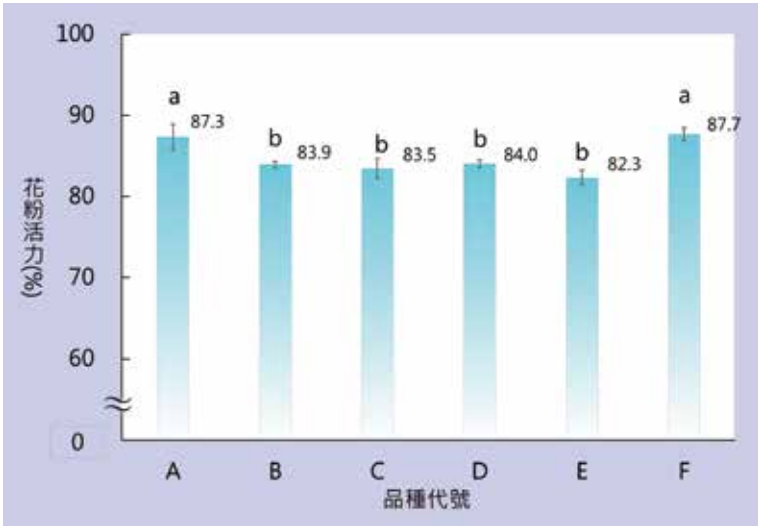
圖三、甜瓜 ' 臺南13號 ' 不同發育階段之花朵 (A)，花粉在顯微鏡下之形態 (B)，以及花粉經TTC染色後之形態 (C)。

DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005

果。透過IFC檢測結果可明顯觀察到品系間活力表現之差異，其中A與F品系的花粉活力較高，其餘4品系較低，且兩群花粉活力在統計上具有顯著性差異。此一資訊對育種者或甜瓜果實生產者而言，將是品系選拔或作為生產決策的重要依據。本研究團隊亦已成功建立蘭科作物 (如蝴蝶蘭) 之耐溫性篩選評估模式，由於目前蝴蝶蘭品種繁多，且商業育種多以觀賞性為主，尚缺乏對種苗耐熱性或廣域溫度適應性之明確評定標準。因此，本團隊運用IFC技術，針對經過不同溫度處理後之花粉進行活力檢測，作為快速、定量篩選具潛力親本的重要依據。此方式不僅大幅提升初期育種材料選拔效率，亦能避免以往過度依賴田間觀察或後代培養結果所造成的時間與空間資源浪費。在此基礎上，後續再透過原球體培養階段加入溫度篩選，以確認並強化耐溫特性之遺傳表現，最終取得具備實質耐熱能力的子代品系。此雙階段策略成功將IFC導入實際育種流程中，展現其作為早期選拔工具在熱逆境育種上的實用性與前瞻性。另外，利用小孢子 (未成熟之花粉) 培養獲得雙單倍體



圖四、甜瓜‘臺南13號’不同發育階段花朵內之花粉以IFC檢測或TTC染色之結果。數據標記之相同英文字母表示組別之間無顯著差異。



圖五、在相同環境中栽培之不同品系甜瓜，於陰天條件下採集之花粉並以IFC檢測花粉活力。數據標記之相同英文字母表示組別之間無顯著差異。

—農業試驗所技術服務季刊 · 2025年12月 · 144期—
DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005

(doubled haploid, DH)，是快速取得同質純系的育種捷徑，而利用特定發育階段之小孢子進行培養，則是影響小孢子培養成功的重要關鍵。得益於IFC檢測結果之視覺化圖形，小孢子發育階段之鑑別可借助花粉點圖分布呈現之模式加以確認，可替代傳統使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 螢光染色細胞核作為判斷發育階段的方法，提高雙單倍體培養之效率，加速作物純系的取得，大幅縮短育種時程。以上皆為本研究團隊利用IFC檢測花粉活力進行的多種應用，展現出此技術應用於多種作物育種工作之可行性與實用價值。

由於花粉對環境反應的高敏感性，花粉活力亦可作為環境毒性、空氣污染及農藥殘留等環境壓力評估的指標，因此IFC快速檢測花粉之技術未來也具有應用於生態環境研究之潛力。

五、結語

本研究應用IFC建立甜瓜花粉活力的快速檢測技術，此技術具備靈敏、穩定、無需染劑等優勢，不僅能有效區分花粉活力之差異，在節省人力方面更顯著優於TTC染色法，為甜瓜育種在篩選花粉活力方面提供一項高效能之工具。

花粉易受各種環境逆境影響而降低活力，進而影響授粉成功率，最終反應在產量與果實品質的降低。在過去由於對花粉研究缺乏有效之方法或工具，有關花粉對產量與品質的影響無法如實的呈現。透過IFC做為檢測花粉活力變化之工具，提供給育種者或生產者更多不同品種(系)其花粉活力的相關資訊，有助育種者育成具有氣候韌性之品種，也讓生產者可以避開因花粉活力不佳而遭遇的生產風險。未來結合表型體、大數據與機器學習等技術，可望進一步打造智慧育種系統，加速氣候調適型作物的開發。

六、參考文獻

王毓華、黃晉興、鄧汀欽、吳錫家。2011。瓜類蔬菜品種改良與栽培技術改進之研究－以甜瓜育種及栽培技術研發為例。農業生技產業季刊，25: 38-45。

沈盟倪、蔣永正。2018。殺菌劑對胡瓜花粉活力影響之初探。臺灣農藥科學，4: 69-82。

夏奇鈱、陳威臣、曹進義。2018。流式細胞儀在蔓苔屬小孢子培養研究之應用。農業試驗所技術服務季刊，116: 1-4。

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(11): e0165531.

Yuan, B., Bie, Z., & Sun, J. 2021. Bibliometric analysis of global research on muskmelon (*Cucumis melo* L.) based on web of science. HortScience, 56: 867-874.

DOI：10.30248/TSQBTARI.202512_(144).0005