

以氣孔長度早期鑑定水稻花藥培養小株之倍數性¹

陳治官 陳駿季 黃真生²

摘要：為辨別花藥培養第一代 (AC_1S_0) 幼株的倍數性，以便早期行染色體倍加處理，取兩個水稻雜交組合之 F_1 ，經花藥培養後所得 AC_1S_0 幼苗，以丙醯甙快速印模展開葉下表面，並觀察測量氣孔保衛細胞之長度。觀察氣孔的長度總共有 16.86 至 31.36 μm 之變域，平均長度為 22.64 μm 。然後以印模氣孔長度與 AC_1S_0 成株之倍數性相對照，發現單倍體株的氣孔長度有 16.86 至 28.44 μm 之變域，平均為 20.22 μm ，雙倍體有 17.67 至 31.36 μm 之變域，平均為 26.17 μm ，兩者差異極顯著，證實以剛移出試管硬化後的 AC_1S_0 小株的氣孔保衛細胞長度，可以簡便而有效地辨出小株的倍數性，使單倍體小株可於早期倍加處理，以提高其在育種上的效率。

水稻花藥培養產生之單倍體在育種上的利用，近年來已有相當的進展^(2,3)。理論上，利用花藥培養可迅速獲得同質的雙倍體，而縮短育種年限、節省人力、勞力及金錢⁽⁴⁾。花藥培養在育種年限上，若與譜系法比較，僅有一至三期作的縮短效果。若兩親遺傳背景較近且育種目標性狀的遺傳簡單，而譜系法選拔順利時，依本省「水稻品種改良長程計畫研討會」對「稻作育種程序之改進」的決議⁽¹⁾，可於 F_4 成立品系與花藥培養在 AC_1S_0 順利獲得足量自然倍加之同質雙倍體進行選拔比較，也不過多花一期作。若以 AC_1S_0 無法獲得足量自然倍加之同質雙倍體，必須以人工倍加單倍體植株，且若 AC_1S_0 植株的倍數性無法早期辨認，必須延至下世代才能施以倍加處理，將使花藥培養在縮短育種年限上的功效大為降低。目前本省水稻花藥培養在 AC_1S_0 獲得同質雙倍體小株佔全體成活小株之 37.52%，其餘佔多數 (60.76%) 的單倍體⁽²⁾，棄之可惜，欲倍加處理却增加作業的繁雜及困難。解決此一問題最佳的方法是在不減少誘導成活小株的比例下提高 AC_1S_0 雙倍體的比例。其次是在 AC_1S_0 早期，甚至是試管內尚未移出時，以簡便的技術判定其倍數性，以便即時倍加處理，爭取時效。

多數植物的性狀常隨其染色體之倍數性而有顯著的差異^(14,15)，水稻的雙倍體與四倍體在株高、葉長、葉寬、葉厚、穎花長、穎花寬、氣孔細胞之縱徑及橫徑，花藥表皮細胞長與寬、花粉半徑、花粉母細胞大小、細胞核直徑及核仁直徑皆隨倍數增加而增加，但穗數、一穗穎花數、穗長、氣孔頻度則相反⁽⁹⁾。單倍體與雙倍體的比較，在 *Oenothera rubricalyx*⁽⁵⁾，*Lycopersicum esculentum*⁽⁸⁾，*Hordeum distichum*⁽¹⁶⁾，*Nicotiana rustica*⁽⁶⁾，*Triticum monococcum*⁽¹⁰⁾ 等之外表性狀或各種細胞之大小亦與倍數性呈正相關。水稻單倍體一般較雙倍體株矮、穗小、穎花小、葉小、不結實 (田間觀察)，但花藥培養所得 AC_1S_0 之小株，於早期以株大小來判斷其倍數性的正確性很低 (未發表)，不具實用價值。本試驗乃觀察比較由試管移出 7—10 天小株之氣孔保衛細胞之長度，與其成株性狀對照，期以建立早期判定小株倍數性的簡易技術，以供 AC_1S_0 雙倍體小株比例未提高之前，為倍

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1258 號。

2. 本所農藝系助理研究員、助理及研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

加單倍體之用。

材料與方法

本試驗材料系本所農藝系稻作研究室之雜交育種材料，即兩個雜交組合之 AC_1S_0 小株。雜交組合之一為臺農糯育 2 號//臺農 67 號//臺農 8933 號//嘉農 252 號//臺農 8023 號//臺農 67 號⁵/Tetep 之複交，代號 3211；另一為臺農 667 號//臺農 69 號之單交，代號 5144。由組織培養室培養 F_1 花藥至形成綠苗 (AC_1S_0) 健化後，由稻作研究室移植至田間或溫室栽培管理。此兩組之 AC_1S_0 小株由試管移至培養土，在生長箱內健化後（移出 10 天後），轉移至溫室生長，並隨即以丙醯氰 (Cyanoacrylate, 日本 Alpha Techno 出品之 Alteco-Ace, Type EE) 塗於供試材料之葉中部之下表面，待 5—10 秒丙醯氰硬化後，以透明膠片將此聚合硬化之丙醯氰薄膜黏起，貼至載玻片上，完成取樣工作。樣品以 900 倍 (15×60) 顯微鏡觀察，以微量尺 (Micrometer) 測量印模 (impression) 上氣孔保衛細胞最大縱徑之長度 (μm 為單位)，為氣孔大小之觀測值。每一小株由不同的 3 片葉子各取一個樣本，每樣本逢機觀察度量 10 個氣孔保衛細胞印模之長度。每小株定位編號，於溫室生長二至三週後，移植至田間生長。至抽穗後觀察植株穗及穎花之大小及結實與否來判定其倍數性。植株矮小、葉細短、穗小直立、穎花小巧、不結實者，判定為單倍體。植株較大，穗及穎花與正常相似，有結實者判定為雙倍體。由此判定之倍數性再與氣孔保衛細胞長度一一對照歸類成單倍體及雙倍體之氣孔大小，再比較其差異顯著性。由 3211 組合計取 45 株，135 個樣本；5144 組合計取 50 株，150 個樣本。兩組合中無法判定倍數性的植株共約有 4%，其資料不包括於上述取樣中。

結 果

供試兩組合之 AC_1S_0 小株於早期觀察測量氣孔 (保衛細胞) 長度，結果如表 1。表中 (Total) 行為全部植株未分類之前的合計。3211 組合之氣孔長度分布於 16.86 至 31.31 μm 之間，平均為 22.57 μm ，變異係數為 31.30%；以小株的平均值為單位所做的頻度分佈如圖 1 所示，有兩個較明顯之尖峰，一在 17.5 至 20.5 μm 之間，另一在 25.5 至 28.5 μm 之間。以葉片平均為單位的頻度分佈，變

表 1. 花藥培養 AC_1S_0 小株及判別不同倍數體後之氣孔大小之變域、平均和變異係數。

Table 1. Range, mean and c. v. of stomatal size of the AC_1S_0 plantlets and after the identification of ploidy.

Cross combination	Ploidy	Obs. no.	Range ²⁾ (μm)	Mean (μm)	C. V. (%)
3211	Total ¹⁾	45	16.86—31.31	22.57	31.30
	n	28	16.86—28.44	20.07	21.43
	2n	17	20.86—31.31	26.68	16.54
5144	Total	50	17.25—31.36	22.73	28.52
	n	28	17.25—27.44	20.40	21.81
	2n	22	17.67—31.36	25.70	18.79

1) Before the identification of ploidy.

2) As an average of 30 stomata in 3 leaves per plantlet.

域較大，而於17至 $21\mu\text{m}$ 之間有顯著尖峰分布（圖1）。5144 組合之小株氣孔長度分布於17.25至 $31.36\mu\text{m}$ 之間，平均為 $22.73\mu\text{m}$ ，變異係數為28.52%。以小株平均為單位的頻度分布如圖2所示

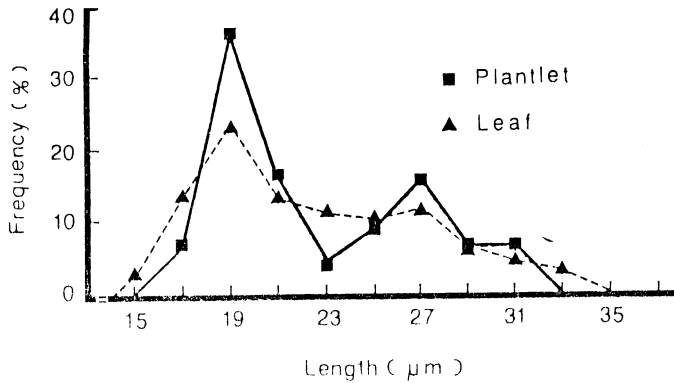


Fig. 1. Distribution of mean stomatal size per plantlet and of those per leaf (broken line) in the AC_1S_0 of anther cultured multi-cross 3211 hybrid.

圖1.複交組合3211之花藥培養 AC_1S_0 小株，分別以小株為單位和葉片（點線）為單位之氣孔大小之分布。

，亦有兩個較明顯之尖峰，一在 17.5 至 $20.5\mu\text{m}$ 之間，另一在 24.5 至 $27.5\mu\text{m}$ 之間，與3211組合之分布相當類似。但以葉片平均為單位的頻度分布則無顯著之尖峰分布（圖2）。

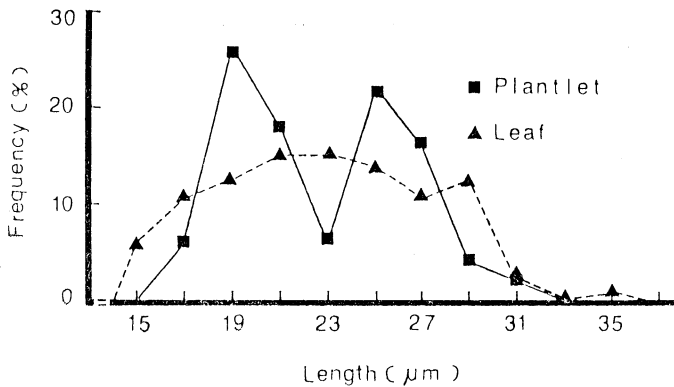


Fig. 2. Distribution of mean stomatal size per plantlet and of those per leaf (broken line) in the AC_1S_0 of anther cultured single-cross 5144 hybrid.

圖2.單交組合5144之花藥培養 AC_1S_0 小株，分別以小株為單位和葉片（點線）為單位之氣孔大小之分布。

AC_1S_0 植株依照外表形狀之特徵，歸類於單倍體及雙倍體二羣。各組合單倍體及雙倍體之氣孔長度之變域、平均值及變異係數如表1。3211組合裏，單倍體計有28株，其氣孔保衛細胞長度變域為 $16.86\mu\text{m}$ 至 $28.44\mu\text{m}$ ，平均為 $20.07\mu\text{m}$ 、變異係數為21.43%；雙倍體計有17株，其氣孔保衛細胞長度變域為 $20.86\mu\text{m}$ 至 $31.31\mu\text{m}$ ，平均為 $26.86\mu\text{m}$ 、變異係數為16.54%，其頻度分布如圖3所示。其中單倍體的氣孔保衛細胞長度在 $18\mu\text{m}$ 至 $22\mu\text{m}$ 所佔的比例最高，為60.71%。雙倍體者在 $24\mu\text{m}$ 至 $28\mu\text{m}$ 所佔的比例最高，為41.17%，其次為 $30\mu\text{m}$ 至 $32\mu\text{m}$ 者，為29.41%，分布較趨常態（圖3）。與未分類前之頻度分布（圖1）比較，單倍體之主峰與雙倍之主峰正與圖1之

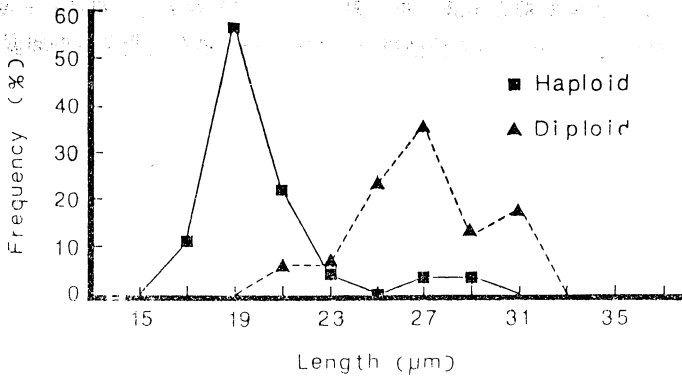


Fig. 3. Distribution of mean stomatal size per plantlet in haploid and diploid from anther culture of the multi-cross 3211 hybrid.

圖3. 複交組合3211之花藥培養之單倍體及二倍體小株之氣孔大小之分布。

兩個尖峰相符。5144組合裏單倍體計有28株，其氣孔保衛細胞長度變域為 $17.25\mu\text{m}$ 至 $27.44\mu\text{m}$ ，平均為 $20.40\mu\text{m}$ 、變異係數為21.8%；雙倍體計有22株，其氣孔保衛細胞長度變域為 $17.67\mu\text{m}$ 至 $31.36\mu\text{m}$ ，平均為 $25.70\mu\text{m}$ ，變異係數為18.79%，其頻度分布如圖4所示。其中單倍體氣孔保衛細胞長度在 $18\mu\text{m}$ 至 $22\mu\text{m}$ 所佔的比例最高，為53.57%，分布亦如3211者呈左傾；雙倍體者在 $24\mu\text{m}$ 至 $28\mu\text{m}$ 頻度集中，所佔比例為40.9%，分布亦較單倍體者趨於常態。與未分類前之頻度分布（圖2）比較，單倍體之主峰與雙倍體之主峯亦與圖2兩個尖峰相符。

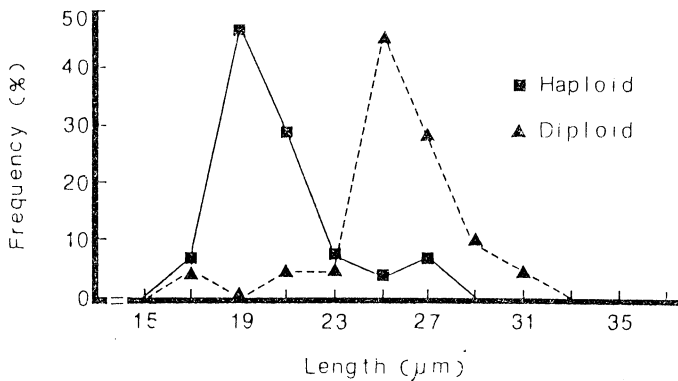


Fig. 4. Distribution of mean stomatal size per plantlet in haploid and diploid from anther culture of the single-cross 5144 hybrid.

圖4. 單交組合5144之花藥培養之單倍體及二倍體幼株之氣孔大小之分布。

花藥培養小株氣孔長度之變方分析結果如表2及表3。由F測驗得知，供試之兩組合，無論是單倍體之間、雙倍體之間或單倍體與雙倍體之間，皆有極顯著的差異。又二組合都有同樣之趨勢，即單倍體之間及雙倍體之間的均方皆較小而接近，且單倍體及雙倍體之間的均方則遠大於上二者。同時兩組各相對均方值亦接近。

表2. 複交組合3211花藥培養 AC₁S₀ 小株之氣孔大小之變方分析。Table 2. Variance analysis of stomatal size of the AC₁S₀ plantlets from the multi-cross 3211 hybrid.

S. V.	D. F.	S. S.	M. S.	F value
Among plantlets	(44)	2196.259	49.914	8.815**
Among haploid (n)	27	499.690	18.507	3.268**
Among diploid (2n)	16	311.638	19.477	3.440**
Between n & 2n	1	1384.930	1384.930	244.599**
Error	90	509.583	5.662	
Total	134	2705.842		

**p=1%.

表3. 單交組合5144花藥培養 AC₁S₀ 幼株之氣孔大小之變方分析。Table 3. Variance analysis of stomatal size of the AC₁S₀ plantlets from the single-cross 5144 hybrid.

S. V.	D. F.	S. S.	M. S.	F value
Among plantlets	(49)	2057.801	41.995	5.207**
Among haploid (n)	27	536.673	19.876	2.464**
Among diploid (2n)	21	481.840	22.944	2.845**
Between n & 2n	1	1039.287	1039.287	128.865**
Error	100	806.490	8.064	
Total	149	2864.292		

**p=1%.

討論與結論

水稻接近抽穗期前，似可由株高、葉長、葉寬，抽穗後可由穗及穎花大小結實率辨出單倍體或雙倍體等倍數性。早期觀察細胞的大小或可辨出單倍體小株。植物葉片上的氣孔可用矽橡膠 (Silicon rubber)⁽¹⁹⁾ 或類似物質之丙醯氰以印模方式取得可觀察的模型，而對植株不構成傷害。取樣相當便捷而可在低倍顯微鏡下迅速完成觀察。本試驗採用此法觀察由試管移出健化中之小植株氣孔保衛細胞之長度。雙倍體者的平均為 26.17 μm ，與 Majima 觀察水稻品種「旭」的 27.4897 μm ⁽⁹⁾ 相當接近，但 Oka 觀察53個水稻品種，測定氣孔的大小平均為 20.57 μm ⁽¹¹⁾，Tsunoda 引用 Terao 和 Yamashita 的測定值是 19.1—20.4 μm 之間⁽¹⁷⁾，與本試驗的觀察值差異甚大，可能是量度的範圍不同所致。本試驗所度量的長度是保衛細胞的外圍最大縱徑。至於單倍體方面，尚未有資料可供比較，本試驗測得單倍體氣孔之平均長度為 20.2 μm 。經統計分析結果證實兩個組合裏，單倍體與雙倍體小株的氣孔保衛細胞長度都有極顯著的差異。

單倍體間、雙倍體間的差異亦極顯著(表 2、3)且以葉片測定值為單位的頻度分布,不易明確顯示倍數性的關係(圖 1、2)。此可能是環境及葉片發育過程中的差異,形成株內不同葉片的差異較大,而造成此結果。禾草類植物葉片保衛細胞的母細胞分裂成保衛細胞,其長度在整個過程中可說是一直在增加^(12,18)。高粱不同葉位的氣孔密度有顯著的差異,而氣孔密度與氣孔大小呈反比,且葉上表面的氣孔較下表面的氣孔長⁽⁷⁾。黑小麥的氣孔頻度和大小不僅在種間有差異,同品種內葉片間及同葉之不同部位也都有顯著的差異⁽¹³⁾。水稻葉之上表面氣孔密度(357至543/mm²)亦較下表面者(445至721/mm²)為低^(17,21)。亦即上表面氣孔可能較下表面者為大。本試驗取樣時為小植株正在發育當中,可取樣之葉片相當有限,各小株遺傳性狀之表現尚未穩定,來自環境的、發育上的、部位上的,及遺傳上的變異均可能存在,也由於有這種可觀的變異存在,單一葉片取樣所得之資料將不易明確顯示倍數性的差異,所以同一小株上不同葉片的重覆取樣並以一株的平均值為標準似較妥當。

由圖 3 及圖 4 之頻度分布圖可看出,單倍體與雙倍體之分布有少部分的重疊。若以 21.9 μ m 為分界點,則兩組合誤辨小株倍數性的比例皆可減到最低之程度。在 3211 組合,以氣孔長度辨別,45 小株中有 26 株(57.78%)為單倍體,19 株(42.22%)為雙倍體。實際上,單倍體有 28 株(62.22%)雙倍體有 17 株(37.78%)。單倍體誤辨為雙倍體者為 3 株(6.67%),雙倍體誤辨為單倍體者有 1 株(2.22%),總誤辨率為 8.89%。在 5144 組合,以氣孔長度辨別,50 小株中有 24 株(48%)為單倍體,26 株(52%)為雙倍體。實際上,單倍體有 28 株(56%),雙倍體有 22 株(44%),單倍體誤辨為雙倍體者有 5 株(10%),雙倍體誤辨為單倍體有 1 株(2%),總誤辨率為 12%。據此,以氣孔保衛細胞長度於早期就 AC₁S₀ 個體予以選別,將氣孔保衛細胞較長之小株移植至田間繁殖,當可減少單倍體在田間所佔的空間而減少管理上的浪費,且提高田間雙倍體比例,例如 3211 組合應該有 84.21%;5144 組合有 80.76%,較全數移植本田之 37.78%及 44.00%高出約一倍。另一方面,早期選別出來的單倍體小株可立即於實驗室內進行倍加處理,如此在控制較佳的環境裏,可望獲得較佳的處理效果,而可於最短期間內繁殖所須的種子量,以供系統繁殖及各種檢定之用。

本試驗兩個組合間各類觀察數據相當接近(表 1)。如 3211 組合之單倍體,其氣孔保衛細胞長度為 16.86 至 28.44 μ m,平均為 20.07 μ m,變異係數為 21.48%;與 5144 組合之單倍體氣孔保衛細胞長度為 17.25 至 27.44 μ m,平均 20 μ m,變異係數 21.81%相當接近。此種結果可能與供試兩個組合之遺傳背景比較接近有關。若以不同遺傳背景的材料來觀察,則氣孔的長度將可能有所差異,當然辨認單、雙倍體的標準(如本試驗推定之 21.9 μ m)亦將有所不同;因此在應用上,不同組合的 AC₁S₀ 小株應依各組合之頻度分布來加以劃分,較為妥當。

本試驗採用的印模材料乃內醃氧,使用前為液狀,接觸物體及空氣後,以物體或空氣中的水分為催化劑,於短時間內凝固成為硬膜。故與葉表面密切接觸,無變形之慮,且可保存較長時間。因其瞬間強力接著之特性,使用時應注意勿讓其接觸皮膚或黏及他物。近年來有氣孔觀察專用之顯微鏡於田間直接觀察並拍照,此顯微鏡已有 40 \times 10 之倍率,唯易受蒸散水份沾矇⁽²⁰⁾,但仍不失為相當有潛力的辦法。

以上印模法應用於觀察水稻花藥培養 AC₁S₀ 之氣孔保衛細胞長度,而以同株不同葉取樣之氣孔長度平均值來辨別小株是否單倍體或雙倍體,有相當高的信賴度,使用 21.9 μ m 為分界點可獲得最低誤辨率(低於 10%)。在水稻花藥培養 AC₁S₀ 雙倍體株比例尚無法提高或試管內辨別倍數性之技術未發展成功之前,欲早期辨認水稻花藥培養小植株的倍數性,篩選單倍體以儘早進行倍加處理及提高移植本田之 AC₁S₀ 雙倍體之比例,以提高水稻花藥培養在育種上的利用效率,本方法似具有相當的實用價值。

引用文獻

1. 省農林廳・1982・水稻品種改良長程計畫研討會紀錄。省農林廳71近產字第06790號函。
2. 省農業試驗所・1983・稈稻抗病抗蟲育種。省農業試驗所七十二年年報，pp. 3-11。
3. 黃真生、蔡新聲、陳治官、卜瑞雄、陳正昌、曾東海、鄭清煥、林永佶和吳淋芬・1983・花藥培養於水稻育種之應用。中華農業研究 34 : 391—401。
4. 蔡新聲・1980・花藥培養單倍體植物之形成及應用。科學農業 28 : 379—396。
5. Gates, R. R. and K. M. Goodwin. 1930. A new haploid *Oenothera*, with some considerations on haploid in plants and animals. *Jour. Genet.* 23 : 123-156.
6. Kostoff, D. 1938. Studies on polyploid plants. XXI. Cytogenetic behaviour of the allopolyploid hybrids *Nicotiana glauca* Grah. X *N. langsdorffii* Weinam, and their evolutionary significance. *Jour. Genet.* 37 : 129-209.
7. Liang, G. H., A. D. Dayton, C. C. Chu and A. J. Casady. 1975. Heritability of stomatal density and distribution on leaves of grain sorghum. *Crop Sci.* 15 : 567-570.
8. Lindstrom, E. W. and L. M. Humphrey. 1933. Comparative cytogenetic studies of tetraploid tomatoes from different origins. *Genetics* 18 : 193-209.
9. Majima, I. 1940. Observation on some characters of tetraploid rice plant. *Jap. Jour. Genet.* 16 : 190-191 (in Japanese).
10. Nordenskiöld, H. 1939. Studies of a haploid rye plant. *Hereditas* 25 : 204-201.
11. Oka, H. I. 1954. Studies on tetraploid rice. III. Variation of various characters among tetraploid rice varieties. *Jap. Jour. Genet.* 29 : 53-67 (in Japanese).
12. Palevitz, B. A. 1981. The structure and development of stomatal cell. *In Stomatal physiology.* (Ed. by P. G. Jarvis and T. A. Mansfield). Cambridge University Press.
13. Sapra, V. T., J. L. Hughes and G. C. Sharma. 1975. Frequency, size and distribution of stomata in *Triticale* leaves. *Crop Sci.* 15 : 356-358.
14. Takenaka, Y. 1943. On relationship between polyploid and size of the organs, especially of the stomata. *Jap. Jour. Genet.* 19 : 21-45 (in Japanese).
15. Tan, G. Y. and G. M. Dunn. 1973. Relationship of stomatal length and frequency and pollen-grain diameter to ploid level in *Bromus inermis* Leyss. *Crop Sci.* 13 : 332-334.
16. Tometorp, G. 1939. Cytological studies on haploid *Hordeum distichum*. *Hereditas* 25 : 241-254.
17. Tsunoda, S. 1984. Adjustment of photosynthetic structures in three steps of rice evolution. *In Biology of rice.* (Ed. by S. Tsunoda and N. Takahashi). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 89-115.
18. Willmer, C. M. 1983. Development and differentiation of stomata. *In Stomata.* (Ed. by C. M. Willmer). Longman Inc., New York. pp. 18-32.
19. Willmer, C. M. 1983. Measurement of stomatal apertures. *In Stomata.* (Ed. by C. M. Willmer). Longman Inc., New York. pp. 144-150.
20. Woolley, J. T. 1983. Direct microscopic observation of stomata in the field—quick and easy. *Crop Sci.* 23 : 589-590.
21. Yoshida, T. and T. Ono. 1978. Environmental differences in leaf stomatal frequency of rice. *Jap. Jour. Crop Sci.* 47 : 506-514.

Ploidy Identification of Rice Plantlets Derived from Anther Culture by Stomatal Size¹

C. G. Chern, J. J. Chen and C. S. Huang²

Summary

Stomatal size or guard cell length of the lower leaf surface of young rice plantlets derived from anther culture was investigated by the cyanoacrylate impression method. Plantlets from two japonica rice hybrids that received anther culture were used. The guard cell length of their AC₁S₀ plantlets as a whole ranged from 16.86 μ m to 31.36 μ m with a mean of 22.64 μ m before the identification of ploidy. Highly significant difference in stomatal size was detected between haploid and diploid plantlets classified according to the morphological characteristics of adult plants in the paddy field. Stomatal size of young haploid plantlets varied from 16.86 μ m to 28.44 μ m with a mean of 20.18 μ m and those of diploids from 17.67 μ m to 31.36 μ m with a mean of 26.17 μ m. The results support the possibility of identifying the haploid plantlets from anther culture by this method and of doubling their chromosome number to obtain dihaploid for advancing rapidly the breeding cycle.

1. Contribution No. 1258 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Assistant agronomist, research assistant and senior agronomist, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, ROC.