

不同形式及濃度鐵源對水稻花藥培養之影響¹

陳駿季 許家言 蔡新聲²

摘要：將水稻花藥培養於含不同形式及濃度鐵源的培養基，探討對水稻花藥癒合組織形成及分化能力的影響，及瞭解葉綠素含量與鐵源濃度及移植成活率的關係。試驗結果顯示添加 0.1mM 之 Na_2FeEDTA (二價鐵) 或 NaFeEDTA (三價鐵) 於誘導癒合組織的培養基，有助於花藥癒合組織的形成，但提高濃度至 0.2mM，反而產生毒害。

癒合組織於含 0.05mM Na_2FeEDTA 或 0.1mM NaFeEDTA 或 0.05mM Na_2FeEDTA 混合 0.05mM NaFeEDTA 之培養基形成後，移至含相同鐵源之分化培養基，能分化較多的綠株；提高 Na_2FeEDTA 的濃度至 0.1mM 或 0.2mM 時，綠株分化率顯著降低。 NaFeEDTA 在受測的三種濃度中，對綠株分化影響不大。在本試驗受測的濃度與形式範圍內，白苗的分化，不受鐵源影響。

分化綠株葉片之葉綠素含量與培養基內鐵源的形式及濃度有很大的關係，此種關係受到植株根系大小影響。約有 85% 之分化綠株，移植前具有發育中等之根系，其植株葉綠素含量與培養基內鐵源濃度呈正相關，同時葉綠素含量高的植株，具有較高的移植成活率。

利用組織培養誘導植物體形成的過程中，經常可以發現一些喪失葉綠素合成機能的白苗個體^(6,26,27)，這種白苗個體產生的頻度，與不同品種及培養方式有很大的關係^(7,1)。一般經由癒合組織所分化的植株較易形成白苗，而經由生長點或胚狀體所產生的植株，形成白苗的機會很少。以水稻而言，經由花藥培養所分化的植株中，白苗所占的比例相當大，一般品種介於 10~20% 之間，雜交種後代則更高，其程度依品種不同而異，同時改變培養環境亦能使白苗的比例改變^(6,7,27)。

除了白苗的產生之外，水稻花藥培養所分化的綠株中，常可見到一些黃綠色的植株，這些植株雖可合成葉綠素，但其能力顯然不足，往往是造成移植初期即死亡的原因之一。因此如何減少白苗的產生及提高綠苗葉綠素合成的能力，是目前從事花藥培養急欲解決的問題。

鐵在組織培養誘導植物體形成的過程中扮演著極重要的角色，同時也是合成葉綠素過程中不可缺少的主要微量元素之一^(13,20,25)。許多報告已指出鐵源的形式與濃度對植株葉綠素含量影響很大^(9,13)，但這方面之研究大部分在 *in vivo* 狀況下進行，*in vitro* 的狀況進行研究的報告相當少，更缺乏有關水稻的資料。本試驗目的乃探討不同形式及濃度的鐵源對水稻花藥培養癒合組織及綠苗形成能力的影響，同時瞭解鐵源濃度對綠株之葉綠素含量及移植成活率的影響，希望藉此提高花藥培養之育種效率。

材料及方法

試驗用之水稻品種為硬稻臺農 67 號，花藥的選取、消毒及接種皆按本研究室以往所行的方法^(1,2)。

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1284 號。本研究承行政院農業委員會經費補助 (75 農建一 2.2 糧一 129)，文承成功大學生物系黃定鼎副教授斧正，特此申謝。

2. 本所農藝系助理、助理及研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

誘導癒合組織的培養基，除鐵源外，其餘成份依據陳等⁽²⁾所使用的配方；而誘導植株分化的培養基，除鐵源外，其餘成份則依據 Chen⁽⁷⁾所使用的配方。七種不同濃度或形式的鐵源分別為 $\text{Na}_2\text{-FeEDTA}$ (0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM), Na_2FeEDTA 0.05 mM+ NaFeEDTA 0.05 mM及 NaFeEDTA (0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM)，其中 Na_2FeEDTA 乃根據 Dalton 等⁽⁹⁾所述之方法由相同濃度之 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 及 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 混合而成，是屬二價鐵之錯化合物，而 NaFeEDTA 屬三價鐵之錯化合物。

含單核期之水稻花藥接種於癒合組織誘導培養基，當癒合組織形成後再分別移至含相同成分鐵源的分化培養基，以避免不同鐵源之相互影響。

植株自分化培養基形成後，調查所分化之綠苗及白苗，綠苗並移至相同成分之 MS 培養基，置於 2,000 lux 光照下二星期，移植前根據根系大小、重量，將分化株分為三羣，依 Arnon⁽⁴⁾所述之方法測定植株之葉綠素含量，而後將根系中等之綠株（約占總分化株之85%）移植於戶外，二星期後調查其移植成活率。

結 果

不同形式及不同濃度之鐵源對水稻花藥形成癒合組織能力的影響列於表 1。結果顯示，不論培養基內所添加鐵源為二價鐵或三價鐵，均以 0.1mM 濃度對癒合組織誘導的效果最好，鐵源濃度提高一

表 1. 鐵源對水稻花藥培養癒合組織形成之影響

Table 1. The effect of iron on callus formation in rice anther culture.

source of iron ¹	Conc. -mM-	No. of anthers cultured	% of anthers forming callus ²
Fe (II)	0.05	171	39.18 ^{ab}
Fe (II)	0.10	211	43.13 ^a
Fe (II)	0.20	208	34.13 ^b
{ Fe (II) Fe (III)	0.05 0.05	201	37.81 ^b
Fe (III)	0.05	219	39.73 ^{ab}
Fe (III)	0.10	170	48.82 ^a
Fe (III)	0.20	203	33.99 ^b

1. Fe(II): Na_2FeEDTA , Fe(III): NaFeEDTA

2. Means in each vertical column followed by the same letter are not significantly different at 5% level using Duncan's Multiple Range Test.

倍至 0.2 mM時，對癒合組織的誘導則有抑制的情形，顯示提高鐵源濃度對花藥已產生毒害作用。在相同鐵源濃度下，三價鐵源對癒合組織之誘導效果比二價鐵源好，但差異均未達顯著水準。就本試驗所用的鐵源形式及濃度中，以培養基內添加 0.1 mM Na_2FeEDTA 或 0.1 mM NaFeEDTA ，較有利於花藥形成癒合組織。

表 2 為不同形式及濃度之鐵源對癒合組織分化成綠苗及白苗的影響。二價鐵源與三價鐵源表現不盡相同，當分化培養基含二價鐵時，0.1mM濃度的鐵源組合之分化綠苗百分率為20.33%，濃度降至 0.05mM時，對綠苗分化有明顯促進效果，可達33.20%，而提高濃度至 0.2mM時，雖略能提高綠苗

照⁽⁸⁷⁾的影響，但往往適合綠化的條件都不適合分化。由本試驗得知，鐵源無法抑制白苗的產生，却能影響綠苗分化率及綠株之葉綠素含量，在各培養階段，適當的改變鐵源形式及濃度，以提高癒合組織形成能力及綠苗／白苗之比值，同時提高葉片中葉綠素含量以提高移植存活率，未嘗不是一種提高花藥培養育種效率的新手段。

引用文獻

1. 陳駿季、陳良築、蔡新聲。1984。水稻花藥癒傷組織形成，移植與分化之關係。中華農學會報新 126：1—9
2. 陳良築、賴本智、廖千賀、蔡新聲。1982。水稻花藥癒傷組織形成培養基的檢討。中華農業研究 31（4）：283—290
3. 蔡新聲、鄧耀宗、賴本智、紀迺淳。1981。秈硬稻雜種的花藥培養。中華農業研究 30（2）：133—139
4. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24：1-15.
5. Axelos, M. and C. Peaud-Lenoel. 1980. The apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b complex of tobacco cell as molecular marker of cytokinin activity. Plant Sci. Lett. 19：33-41.
6. Bandiera, M. and G. Morpurgo. 1970. Kinetin/auxin ratio and development of chloroplasts in tissue culture of *Daucus carota*. Experientia 26：558-559.
7. Chen, C. C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Sci. 18：905-906.
8. Dalton, C. C. and H. E. Street. 1976. The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension culture of spinach (*Spinacia oleracea*). In Vitro 12：485-494.
9. Dalton, C. C., K. Iqbal and D. A. Turner. 1983. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. Physiol. Plant. 57：472-476.
10. Donnelly, D. J., W. E. Vidaver and K. Colbow. 1984. Fixation of ¹⁴CO₂ in tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tissue Organ Culture 3：313-317.
11. Donnelly D. J. and W. E. Vidaver. 1984b. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109：177-181.
12. Edward, G. E., S. C. Huber, S. B. Ku, C. K. Rathnam, M. Gutierrez and B. C. Mayne. 1976. Variation in photochemical activities of C₄ plants in relation to CO₂ fixation. In CO₂ metabolism and plant productivity. (R. H. Burris and C. C. Black ed.) pp. 83-112. university Park press, Baltimore.
13. George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Tissue culture medium. In Plant propagation by tissue culture. (E. F. George and P. D. Sherrington ed.) pp. 184-244. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants, England.
14. Genovesi, A. D. and C. W. Magill. 1979. Improvement rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Sci. 19：662-664.
15. Herman, E. B. 19984. New method for increased vitality of anther culture. Agricell Report 2(6)：42.
16. Herman, E. B. 1985. Acclimatizing tissue cultured plants without shading. Agricell report 4(2)：11.
17. Horn, M. E. and J. M. Widholm. 1984. Aspects of photosynthetic plant tissue cultures. In Applications of genetic engineering to crop improvement. (G. B. Collins and J. G. Petolino ed.) pp. 113-161. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, Dordrecht, The Netherlands.

18. Johnston, M., C. P. L. Grof and P. F. Brownell. 1984. Effect of sodium nutrition on chlorophyll a/b ratios in C₄ plant. *Aust. J. Plant Physiol.* 11 : 325-332.
19. Kaul, K. and P. S. Sabharwal. 1971. Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 47 : 691-695.
20. Mengel, K. and E. A. Kirkby. 1982. Iron. *In Principles of plant nutrition.* (K. Mengel and E. A. Kirkby ed.) pp. 473-489. International Potash Institute, Worblaufen-Bern/Switzerland.
21. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
22. Nable, R. O. and P. F. Brownell. 1984. Effect of sodium nutrition and light upon the concentrations of alanine in leaves of C₄ plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 11 : 319-324.
23. Neumann, K. H. and A. Paafat. 1973. Further studies on the photosynthesis of carrot tissue cultures. *Plant Physiol.* 51 : 685-690.
24. Pamplin, E. J. and J. M. Chapman. 1975. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in tissue culture: change in the activity of enzymes of the chlorophyll biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 26 : 212-220.
25. Price, C. A. 1968. Iron compound and plant nutrition. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19 : 239-248.
26. Reddy, V. S., S. Leelavathi and S. K. Sen. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anther culture of *Oryza sativa*. *Physiol. Plant.* 63 : 309-314.
27. Rush, M. C. and Q. Q. Shao. Rice improvement through cell and tissue culture. *In Rice research strategies for the further.* (M. C. Rush and Q. Q. Shao ed.) PP. 1-46. International Rice Research Institute. Los Banos, Phillipines.
28. Singh, M. and A. D. Krikorian. 1980. Chelated iron in culture medium. *Ann. Bot.* 46 : 807-809.
29. Stoltze, L. P. 1979. Iron nutrition of cattleya orchid grown in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104 (3) : 308-310.
30. Steiner, A. A. and H. Van Winden. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46 : 862-863.

Effect of Iron on Rice Anther Culture¹

Junne-Jih Chen, Jia-Yan Hsu and Hsin-Sheng Tsay²

Summary

Experiments were conducted to identify iron requirement in rice anther culture for callus induction, plant regeneration, chlorophyll content of anther-derived green plants and its survival ability. It was found that rice anther cultured on a callus-inducing medium containing 0.1mM Na₂FeEDTA or 0.1mM NaFeEDTA gave better result for callus formation. Increasing the iron concentration to 0.2mM showed toxicity.

Transferring pollen-derived callus on a regeneration medium containing 0.05mM Na₂FeEDTA or 0.1mM NaFeEDTA or 0.05mM Na₂FeEDTA plus 0.05 mM NaFeEDTA showed better green plant production. Less green plant production was observed when Na₂FeEDTA concentration was increased to either 0.1mM or 0.2mM. Whereas, there was no difference on green plant production among 3 levels of NaFeEDTA tested. Regeneration ability of albino plants was not influenced by different sources or concentrations of iron tested in this study.

A close relationship between chlorophyll content of green plants and iron concentrations in rooting medium was observed. This phenomenon was related to root mass of green plants. About 85% of regenerated green plants had medium root weight (20-30 mg/plant). Their chlorophyll contents correlated positively with iron concentrations in rooting medium. Higher iron concentrations in the rooting medium also enhanced the survival rate of green plants upon transplanting.

-
1. Contribution No. 1284 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant from Council of Agriculture, Executive Yuan.
 2. Respectively, research assistant, research assistant and senior agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, ROC.