

血清反應測定稻麥類緣初步研究

繆 進 三 姚 潤 德

一、緒言：

關於禾本科植物，異屬種間類緣關係之血清學的研究，早於 1928 年，有加藤茂苞及其助手丸山吉雄之報告，(1) 其後繼起報告不多，或以此項方法，試驗技術上雖已逐步改善，而所得結果，尙未能盡滿人意，每有難解之處；初期所使用者，爲無處置免疫血清之輪環沉澱反應 (1) 後有 Weichardt 氏之試管內飽和沉澱法 (2) 及操氏之生體內飽和沉澱法，(3) 使檢查結果發生疑義時，可以順次應用其次之方法獲得結果。作者本試驗係以無處置免疫血清爲主，用家兔爲免疫動物，以其對於蛋白質特異性最爲敏感 (4) 試測粳型稻三種，籼型稻兩種，南洋稻兩種，(因有主張南洋稻另成一系統者) (5) 大小麥各一種之類緣視疎關係。試驗於卅七年十二月廿日開始，原擬于卅八年一月廿七日取血分離血清，即用爲測定材料，後因廿七日晨直接由心臟取血試驗結果，抵抗性血清內之沉降素，尙未達濃厚有效程度，乃再行注射蛋白質溶液 5c. c. 一針，更經一週，于二月一日由頸動脈放血，分離血清，用爲本試驗抵抗素材料。試驗進行時，承前任農藝系主任兼所長湯文通先生予以指示，及畜產系黃立群先生協助家兔生體處理手術，陳源泉先生協助實驗室內日常工作，作者等至表謝意。

二、前人研究方法介紹：

A. 加藤氏免疫血清製造法：(1)

先取成熟新鮮種子粉末，在石油醚中脫脂，乾燥後以一定重量 (1g) 之粉末，在乳鉢中與 0.85% 之生理食鹽水 (10c. c.) 充分研和，放置于室溫下 2 小時後，分離上部清液，更藉遠心器除去浮游物。而以此作爲免疫原液，逕直使用於生物體之注射，或將此澄清液與正常家兔血清 (1:1) 混合液，除去沉澱使用。前述種子浸出液，每隔三日，用 5c. c. 在家兔耳脈內注射七次後 5—6 日，試採其血檢查免疫價，如過低不堪使用時，更行二回注射，認爲免疫價充分後，於最後之注射日起，一週間全行採血，由所得血液分離血清，收藏于真空管，在 0°-2°C 之冰箱內貯存，免疫動物常爲體重 2kg 左右之家兔。

B. 加藤氏輪環沉澱反應法：(1)

先將含有蛋白質一定量之種子浸出液，逐次以算術級數稀釋之，如此所得之諸種濃度順次爲 $\frac{1}{2}$ ， $\frac{1}{3}$ ， $\frac{1}{4}$ ， $\frac{1}{5}$ ，…… $\frac{1}{12}$ (原浸出液爲 1) 試驗時先設各容免疫血清 0.1 c. c. 之細小試驗管數列，順次各加諸種濃度之稀釋原液 0.5 c. c. 於免疫血清上，此際注意兩者接觸面上所生輪環沉澱之強弱及速度，每隔 15. 30. 60. 120 分鐘分四次觀察反應，凡類緣愈近者，在同一時間，能在愈稀釋之溶液中，起沉澱反應。

C. Weichardt 氏試管內飽和沉澱法：(2)

爲進一步之測驗方法，當用無處理免疫血清進行試驗，識別困難時，可採用此項方法；例如過去日人試驗時，于湖南秈免疫血清與湖南秈浸出液及神力浸出液，分別混合檢查，不能發現後二者之差異，則可能由於副沉澱作用之蒙蔽，乃將湖南秈免疫血清中可能發生副作用之物質，儘量使其沉澱移去。即以小玻管 6 支，順次注入 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 c. c. 之神力種子浸出液，再各加 0.2 c. c. 之免疫血清，于 37°C 之溫度下，放置定溫器中 5 小時，時時振盪混和，更以遠心器約每分鐘 2500 次之速度，迴轉 40 分鐘，靜止後，讀其沉澱子量，當其極大沉澱量時，血清與種子浸出液之比，爲湖南秈免疫血清 1 對神力種子食鹽水浸出液 2 之比例。

附表

湖南紉免疫血清	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
神力浸出液	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
沉澱子量	1.0	3.0	4.5	4.0	3.5	3.0

其次供試血清依照 1 與 2 之比例，兩者混合放置于 37°C 定溫器中 3 小時後，用遠心器分離上部清液使用，如此已將副沉澱除外。

即由最大沉澱子生成時之比例，施飽和處理，以獲得免疫血清之“絕對特異性”。

D. 操氏生體內飽和免疫血清法：(3)

此法係將種子食鹽水浸出液處置之家兔，值其免疫價達到高漲之時期，預檢其血清免疫價及其特異性。次以蛋白質含量 0.03% 之飽和異種浸出液 40—50c. c. 由耳靜脈注射，注射後 3—4 小時採血，分離血清後，供試驗時，比無處置免疫血清，易見顯著之特異化。

三、本試驗進行經過：

試驗時期：37年12月20日—38年2月3日

試驗地點：臺灣省農業試驗所

試驗材料：免疫動物·家兔二隻 (A) 1.38kg (12月19日稱重)—1.73kg (1月31日稱重)

(B) 1.25kg (12月19日稱重)—1.61kg (1月31日稱重)

水稻品種：粳型：旭 (日本) 臺農38號 (臺灣蓬萊) 臺中65號 (臺灣蓬萊)

私型：烏梨 (福州) 霜降 (臺灣在來)

南洋：南ラガス (臺灣高山) 南佛印12號 (越南)

麥類品種：小麥：農林34號 (日本)

大麥：臺中在來種 (臺灣)

(A) 免疫血清製造經過：參照作者 32 年 9 月在福建進行之血清測定糯稻類緣方法，其經過日程及樣品分量多照已往情形。

(1) 每樣品去穎後，取其 30g 磨成粉末，在乳鉢中搗碎成細粉，浸入醚液，在脂肪抽出器中脫去脂肪。

(2) 取 5g “烏梨”及“旭”粉末溶解于 50 c. c. 之生理食鹽水中，充分攪拌，在室溫下經過二小時，完全沉澱，再藉遠心器除去浮游物，仍不甚清，再用濾紙濾過，得澄清之浸出液。

(3) 以浸出液每隔一週，分五次注射于 1.5 公斤左右之家兔耳靜脈中，逐次遞增其注射量。

12月20日起 0.5 c. c. → 1 c. c. → 1.5 c. c. → 2 c. c. → 2.5 c. c. → 5 c. c.

(最後一次注射係臨時增加者)

注射過程中，兩兔體溫，均無顯著上昇或下降之情形，但作者前在福建永安試驗時(6)依此種程序，在初二次注射後，兔體猶有病態；而此次實驗，家兔健康似未有影響，此與兔之體重及溶液之澄清度似有關係。本次實驗之兔體較大，而溶液曾經離心器及過濾兩項處理也。揆諸加藤氏標準，每次注射量 5 c. c. 三次完畢，即可試用，故以後實驗可選用較大之兔而增重其注射量。

厥後于一月廿七日，取心臟血液製血清檢驗，免疫體效應尚甚微弱，故再增其注射量，一次 5 c. c. 二月二日由頸動脈放血，一兔係割斷頸動脈後，將細玻璃管接上延引流出，而集于玻杯中者，約得 20 c. c.；其他一兔則任意割殺，而淋取血液者，所得較少。在定溫箱 (0°C) 中沉降兩晝夜，血清與沉澱分離，用吸管吸出血清，冷藏備用。

(B) 各試驗組合接觸面沉澱量之比較：血清冷藏後，次日用漏斗注入量管中，然後由量管中滴入預先準備之兩排小玻管中，前排滴入旭血清，後排烏梨血清，每管滴入 0.1 c. c. 然後再順次加入種子蛋白質浸出液于其上，浸出液分三種濃度，即全液， $\frac{1}{3}$ 液， $\frac{1}{9}$ 液。各組合反應如下列：

甲、第一次觀察 (二月三日二時廿分起觀察，三時〇五分完了。)

1. 旭血清對各種溶液

品種	溶液濃度	全液	$\frac{1}{3}$ 稀釋液	$\frac{1}{9}$ 稀釋液
	種			
水	旭	卅	+	-
	臺農 38	+	-	○
	臺中 65	+	+	○
	烏梨	+	+	○
	霜降	-	○	○
稻	南ラガス	+	+	-
	南佛印12	+	+	-
小麥	農林 34	痕跡	○	○
大麥	臺中在來	○	○	○

2. 烏梨血清對各種溶液

品種	溶液濃度	全液	$\frac{1}{3}$ 稀釋液	$\frac{1}{9}$ 稀釋液
	種			
水	旭	+	-	○
	臺農 38	-	痕跡	○
	臺中 65	+	-	○
	烏梨	+	+	-
	霜降	-	○	○
稻	南ラガス	卅	-	○
	南佛印12	+	-	○
小麥	農林 34	○	○	○
大麥	臺中在來	○	○	○

卅，卅，十，一順次表示沉澱之濃淡程度，○表示無沉澱。

上述兩種血清試管係配對聯列，觀察順序，自旭起迄臺中在來大麥爲止。

乙、第二次觀察（同日三時廿分再觀察，三時四十三分觀察完了。）

1. 旭血清對各種溶液

品種	溶液濃度	全液	$\frac{1}{3}$ 稀釋液	$\frac{1}{9}$ 稀釋液
	種			
水	旭	卅	卅	+
	臺農 38	卅	+	痕跡
	臺中 65	+	+	○
	烏梨	+	+	-
	霜降	-	○	○
稻	南ラガス	卅	+	-
	南佛印12	+	+	-
小麥	農林 34	痕跡	○	○
大麥	臺中在來	○	○	○

2. 烏梨血清對各種溶液

品種	溶液濃度	全液	$\frac{1}{3}$ 稀釋液	$\frac{1}{9}$ 稀釋液
	種			
水	旭	卅	+	-
	臺農 38	+	+	○
	臺中 65	+	+	痕跡
	烏梨	卅	+	-
	霜降	-	○	○
稻	南ラガス	卅	+	○
	南佛印12	+	-	痕跡
小麥	農林 34	○	○	○
大麥	臺中在來	○	○	○

由上列四表觀察，甲項 1 表內水稻欄表示旭血清與旭蛋白質全浸出液沉澱最多，而與霜降沉澱最少，其次臺農 38，臺中 65，烏梨，及兩種南洋稻沉澱情形略相若。與臺農 34 號小麥略有沉澱痕跡，與臺中在來大麥溶液相和，則絕不生沉澱。再由 $\frac{1}{9}$ 稀釋液觀察，南洋稻兩種，似與旭亦甚接近，此爲始料不及者。

由甲項 2 表觀察，在全液欄烏梨血清與南ラガス沉澱甚多，或由於副沉澱之混入，亦可能由于試驗誤差。在 $\frac{1}{3}$ 稀釋液欄，表示烏梨血清與烏梨本身溶液沉澱最深，其次爲旭，臺中 65 號，南ラガス，南佛印 12 號，臺農 38 號等。而霜降與烏梨之關係稍遠。由此可知旭與烏梨，在類緣測定上非絕對對立之品種。供試大小麥對烏梨血清均未生沉澱。此與旭血清混農林 34 號小麥溶液猶有沉澱痕跡者不同。由 $\frac{1}{9}$ 稀釋液觀察，僅有烏梨之溶液與其本身血清發生沉澱。南洋稻則未生沉澱，此與對旭血清之情況不同。

由乙項1表觀察，一部分組合之沉澱現象，由甲項1表加深，由全液瀾觀察，除旭本身血清與其溶液沉澱最深外，其次為臺農38號，南ラガス。再由 $\frac{1}{3}$ 稀釋液觀察，旭與霜降關係最遠，由 $\frac{1}{9}$ 稀釋液觀察，烏梨及南洋稻二品種均為旭之近緣者。此外臺農38號與旭亦略為接近，有沉澱之痕跡。小麥之沉澱痕跡則未有變化。

由乙項2表視察，大部組合為甲項2表之加深，烏梨血清與其本身溶液及旭，南ラガス(高山稻)之沉澱程度相若，與霜降之關係較疎，與大小麥則不起反應。由 $\frac{1}{9}$ 稀釋液觀察，亦表明旭與烏梨，並非絕對對立之品種。其關係反相當接近。又臺中65號及南佛印12號，僅有沉澱之痕跡。

丙、開始沉降時刻表

旭血清對各品種全液

品 種	時 間			
	3:44	4:45	5:5	6:48
水	旭	※		
	臺農38		※	
	臺中65		※	
	烏梨	※		
	霜降			※
稻	南ラガス		※	
	南佛印12		※	
小麥	農林34			
大麥	臺中在來			

烏梨血清對各品種全液

品 種	時 間			
	3:44	4:45	5:5	6:48
水	旭		△	
	臺農38			△
	臺中65			△
	烏梨		?	
	霜降			
稻	南ラガス			
	南佛印12			
小麥	農林34			
大麥	臺中在來			

由開始沉澱之時刻觀察，旭及烏梨兩品種類緣甚為接近，其次與二者接近者，為臺農38號，臺中65號，而與霜降關係最淺，與大小麥在上述時間內，尙未有沉澱情形。以上情形，與前此測定之沉澱量結果相一致。又根據沉降時刻，南洋稻兩種，與旭關係較為接近，而與烏梨關係稍遠。此與沉澱量測定之結果，頗相符合。

上述為開始沉降時刻，但其沉降穩定後最終之量，于一次觀察時，則不足為比較標準。作者于試驗開始後18小時觀察沉澱量一次，以若干組合方穩定未久，而若干組合已經開始破壞，甚難比較，惟有足述者，即旭血清對旭溶液，烏梨血清對烏梨溶液之組合，最為穩定耳。

四、結果及討論：

總觀全試驗之情形，雖大多數結果頗為一致，但仍有少數不整齊之記錄項目，此或由於試驗未具重複及副沉澱作用之影響。由上列結果，可歸納如下：

工作程序方面：

(1) 血清測定類緣，若單憑無處置免疫血清之輪環法，似猶有未足。必須進一步為試管內飽和沉澱法，及生體內飽和沉澱法，以便補助解釋疑義之項目。

(2) 作者先後兩次實驗，注射原液分量均嫌過少，以後可做加藤氏方法，增加分量至每次5c.c.，應用兔體須選較為碩大(2公斤以上)者，每3日注射一次，而加速工作之進行。

(3) 放血時以頸部開刀後找出頸動脈所在，直接割斷連接玻璃管上淋取為佳。所得血液量較多，而取血迅速清潔。

(4) 本試驗必須具有重複，而期比照，並得多量血清供試。又穀粉溶解，宜在室溫下舉行，血清取得後，宜在冷藏庫內保存。

試驗結果方面：

- (1) 福州晚稻“烏黎”與日本梗稻“旭”在類緣上並非絕對對立之品種，而反相當接近。
- (2) 臺灣在來晚稻“霜降”品種，與“烏黎”及“旭”均為較疎遠者。臺灣蓬萊稻兩品種：“臺中65號”及“臺農38號”，前者接近“烏黎”，後者接近“旭”。
- (3) 南洋系統稻兩種，由本次血清測定結果，對“旭”及“烏黎”之關係，均較“霜降”為近緣。且與“旭”更為接近。
- (4) 大小麥對“旭”及“烏黎”之關係，不及稻屬品種間關係之接近，甚為明顯，故血清測定法，用于同科異屬間之親疎判別，較諸品種間之判別，更易顯著。
- (5) 根據本試驗，小麥與水稻尚較近緣，大麥關係更遠。
- (6) 在籼梗稻性狀十分對立之個體，如早籼與晚梗，大糯與小糯之血清測定類緣，尚易覓出其顯著差異；(6)(7)而在比較折衷型之個體（如圓粒晚籼及一部分蓬萊稻等）以血清輪環反應測定，尚未能找出籼梗兩型斷然之界線。
- (7) 近年寺尾氏證明依籼梗稻名稱劃分，舉行廣泛之雜交，不能決定籼梗兩型稻之絕對差異。(8)但其所含化學成分，確各有一定界限，若干物理性狀，亦頗有差別。(9)然此僅為實用上及表型上之差別，其遺傳形質上是否有先天的差異，尚有待於細胞學上之研究，近年陸續發現稻屬染色體在分裂期中，有第二次集合情形。(10)將來就此研究籼梗稻之來源，能有所發現，亦未可知。但禾本科異屬間之類緣關係，則用血清測定，較易判別。

參 考 文 獻

1. 加藤茂苞、丸山吉雄：稻の異なる種類間に於ける類緣關係の血清學的研究 學藝 Vol. 3 No. 1 (1928)
2. Weichardt : Hygienische Rundschau Jg. 13. P. 756 (1903) 未讀原文
3. 操 坦 道：福岡醫科大學雜誌 18. P. 760 (1925) 未讀原文
4. 馬庭二郎：植物に於ける免疫抗體形成に關する研究 農及園 Vol. 3 No. 11 (1928)
5. 周 拾 祿：中國是稻原產地 中國稻作 Vol. 7 No. 5 P. 53—54 (1948)
6. 繆 進 三：血清測定永安兩型糯稻類緣初步報告 福建農業 Vol. 4 No. 4. 5. 6. (1944)
7. 湯 文 通：用血清判斷法檢定若干稻種親緣關係之初步研究 福建農業 Vol. 4 No. 4. 5. 6. (1944)
8. 顧 復：關於籼梗二型稻最近之研究 中農所農報 Vol. 8 No. 19—24 (1943)
9. 繆進三、姚潤德、蕭賢邦：蓬萊稻與早籼稻理化性之比較 臺農試所農報 Vol. 2 No. 5—6 (1948)
10. Ramiah, K. 等：A Tetraploid Plant in Wild Rice Proc. Ind. Acad. Sci. 1, P. 565—570

Résumé

A Primary Investigation on Serous Reaction for Testing the Affinities
between Different Varieties of Rice, Wheat & Barley

By T. S. Mou and Y. T. Yao

This investigation is the continuous work, which started the preparative experiment in Fukien Agricultural Experiment Station, by means of the nature of proteide, to find out the relationship between several cereal crops, on the foundation of serodiagnostic knowledge.

In order to carry on these experiments, we have used rabbits, as immune animals and "Ringprob" method for Precipitin reaction.

The following varieties of rice, wheat and barley have used as experimental materials:

- Rice { Japonica:
(1) Asahi (2) Tai-Nong No. 38 (3) Taichung No. 65
Idica:
(1) Woo-Li (2) Shuang-Chiang
Southern Islands Group:
(1) Ragarse (ラガース) (2) French Indo China No. 12
Wheat (1) Non-Ling No. 34
Barley (1) Taichung Native

The results of this investigation may be stated as follows :-

(1) Between the rice varieties, Woo-Li (2nd crop variety in Foochow) and Asahi (later variety in Japan but earlier variety in Taiwan), whichever immune-serum was employed, both appeared to be comparatively intimate one another.

(2) Shuang-Chiang, one of the Taiwan native variety during 2nd crop period, was differentiated from Woo-Li and Asahi, by the precipitin reaction.

(3) Two rice varieties of Southern Islands System, which used to be recognized the relation with Woo-Li and Asahi, appeared to be intimate with Asahi.

(4) Wheat and barley could be distinguished as the remote group from Woo-Li and Asahi, but the affinity of the wheat was nearer to the rice than the barley, based upon comparative study of the precipitate.

(5) Between the early rice varieties of Indica and the late of Japonica, or the two types (big and small grains) of glutinous, we have found the serodiagnostic difference. But some varieties appeared to be the middle type, for example, between Woo-Li (Indica) and Asahi (Japonica), there didnot seemd to be contrary pair.

(6) According to Shigemoto's report about serous reaction "though the varieties have not been distinguished one from another by Ringprob, they have been differentiated by Absattigungsverfahren" so as, we should take the reseach of Absattigungsverfahren, during precipitin reaction in the future investigation.