

# 花藥培養引發之水稻遺傳變異<sup>1</sup>

黃真生 蔡新聲 陳治官<sup>2</sup>

**摘要：**水稻品種臺農67號由花藥培養產生的綠苗 ( $AC_1S_0$ ) 113株中，有54.0% 是四倍體及單倍體；有44.2% 是二倍體：包括38.9%的正常植株，3.5%稔性降低，1.8%有粒型、葉型及葉綠素之突變。另有1.8%未抽穗無法鑑定。 $AC_1S_0$  個體內也有低頻度的遺傳變異發生。52個  $AC_1S_1$  系統中有5.8%顯示低產，其餘均與原品種臺農67號產量相似。系統內個體的結實率分離及降低使穗重減輕，因而引起低產。 $AC_1S_1$  系統除了結實率有突變外，株高、粒型、芒也有突變發生。共有69.8%的  $AC_1S_1$  系統保持與原品種臺農67號同樣之性狀。

花藥培養是目前可用於作物品種改良之生物技術<sup>(12)</sup>。此技術不但有縮短育種年限之功效，也可用於節省育種圃的面積及室外勞力。然花藥培養是否使其後代產生變異或何種變異，程度如何，均需吾人預先明瞭。

水稻的標誌基因經花藥培養仍然以正常的遺傳法則遺傳<sup>(3)</sup>，且使用  $F_1$  花藥培養之後代做連鎖遺傳分析，結果與  $F_2$  所得者相互吻合<sup>(1,2)</sup>。此似表示水稻花藥培養後代有相當高的遺傳穩定性，以致有人推薦花藥培養為遺傳分析之新手段<sup>(1)</sup>。另一方面水稻經花藥培養後發現有矮性、不稔性等變異<sup>(6,8,9,10)</sup>，只有%的花藥二倍體是同型結合，其他%携有同型或異型結合的突變基因<sup>(8)</sup>。Calrose 76 經花藥培養後不但產生不稔性、大粒、矮性等突變體，也提高糙米的蛋白質含量，且有84%之系統與原品種有同樣的產量<sup>(9,10)</sup>。臺中65號花藥培養品系之產量與期作有顯著的交感效應<sup>(7)</sup>。

臺農67號為本省目前的主要水稻品種，大多數育種材料均以此品種為主要遺傳背景，於此品種所得的任何資料將有助於育種工作。筆者得到此品種的花藥培養綠色植物 113株，以此為材料研究水稻純系品種經花藥培養後可能產生的遺傳變異，所得結果將報告於下。

## 材料及方法

本所組織培養室使用改良式  $N_6$  培養基<sup>(4)</sup>，與稻作室合作進行應用花藥培養的水稻品種改良工作。為此育種計畫的對照，該室培養多數臺農67號之花粉植株，取其中 113株於一般水田栽種，即花藥培養第一代或  $AC_1S_0$  個體。在此世代仔細觀察每個體的形態特性，並依照外表特性分類為單倍體，二倍體及多倍體。當代收穫結種子個體53個，其餘不結實個體則予淘汰。收穫種子以系統繁殖下一代，即  $AC_1S_1$  共53系統，另以未經花藥培養的臺農67號系統15個為對照。每系統有45株，其中20株為混合收穫後估計稻穀產量之用，10株，為個體調查之用。調查項目除20株產量之外，有一株穗數、穗長、穗重、一穗粒數、千粒重、結實率、株高及其他可能之突變性狀。

花藥培養後各世代之代號尚無統一之命名制度，本試驗建議採用  $AC_1, AC_2, \dots$  代表花藥培養次數， $S_0, S_1, \dots$  代表培養後自交之次數。

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1227 號。本研究承行政院農業委員會的經費補助（計畫號碼74農建—4.1—產植—46）及林永信先生之協助，特此申謝。  
2. 臺灣省農業試驗所研究員、研究員及助理研究員。臺灣省 臺中縣 峰霧鄉。

## 結果及討論

### 花葯培養第一代個體之變異

臺農67號花葯培養  $AC_1S_0$  秧苗，因陸陸續續從試管移出，以致抽穗期極是不整齊。有的個體或一個癒傷組織長出之營養系，只有一穗已抽穗開花，而其他穗延後 2、3 星期才抽出。由試管先移出的秧苗常有較長之秧苗期，有的延遲一個月以上，故部分秧苗在苗床先行花芽分化，成為老秧而抽穗不整齊。此現象在  $AC_1S_0$  特別嚴重。有一個  $AC_1S_0$  個體下葉是縞葉，但上葉却正常；另有一株整株形態顯示標準的單倍體，但部分的穗却有半結實之現象。按正常單倍體不可能有如此之結實率。繁殖其種子，長出之後代却顯出標準的二倍體。故  $AC_1S_0$  個體在發育過程中，其少部分細胞的遺傳構造包括染色體之數目會隨生長而變化；以致下葉是縞葉上葉却是正常，或內外穎是單倍，但雌雄蕊却是二倍體。

總共113株綠苗中，有56株 (49.5%) 是單倍體，50株 (44.2%) 雙倍體，2株 (1.8%) 顯示四倍體之形態特徵，3株 (2.6%) 為單倍及雙倍的混倍體 (Mixoploid)，剩餘2株 (1.8%) 未抽穗 (表1)。50株雙倍體中有44株 (38.9%) 外型正常，3株半不稔，1株全不稔，1株小粒突變體，另一株是縞葉和窄葉的突變體 (表1)。

表1. 臺農67號花藥培養第一代 ( $AC_1S_0$ ) 個體之變異 (1984一期作)

Table 1. Variation of  $AC_1S_0$  plants of Tainung 67 from anther culture (1st crop, 1984).

2n				n	n+2n	4n	未抽穗 Unheaded	計 Total
正 Normal	半不稔 Semisterile	全不稔 Compl. sterile	突變體 Mutant					
44	3	1	2	56	3	2	2	113
38.9	2.6	0.9	1.8	49.5	2.7	1.8	1.8	100(%)

小粒或具有縞葉及窄葉。

Small grain or variegated and narrow-leafed.

水稻花葯培養已有許多國內外之報告<sup>(2,3,4,6,8,9,10)</sup>，均認為雙倍及四倍體是由花粉癒傷組織單倍體細胞加倍而來者。本試驗  $AC_1S_0$  個體中有約50%是單倍體，而約45%是雙倍體 (表1)。育種家的希望是雙倍體有更高的頻度，而單倍體則愈少愈好。因為單倍體不結實，無種子可收，必須加倍染色體成二倍體才有用途，而加倍染色體所花的時間必然會抵消掉花葯培養所節省的育種年限。故如何利用秋水仙精於試管內加倍染色體，以提高雙倍體秧苗的頻度，乃當前之急務。

以上花葯培養所產生的第一代  $AC_1S_0$  個體有如下之特性。(1) 個體間染色體數目有變化，尤其是各級倍數體之出現，(2) 個體間性狀可能有大幅的變異，即突變，(3)  $AC_1S_0$  個體內有遺傳變異，包括染色體數目及基因之變異以及生理作用不穩定或後生的遺傳變異 (Epigenetic change)。故於  $AC_1S_0$  不宜做選拔，只能做不良基因型之淘汰。

### 花葯培養對其後代系統產量之影響：

臺農67號  $AC_1S_1$  系統的產量與未經花葯培養的臺農67號系統比較有少部分的差異，即產量低的系統數目較多。例如 TNG 67  $AC_1S_1$  系統內，20株產量低於 300g 者有三系統，而 TNG 67 (CK) 內則全無 (表2)。因沒設重複，不能做確定的測驗。但最低產系統的產量只有臺農67號 CK 的一半，產量有如此大之差異是不可能不顯著的。 $AC_1S_1$  系統除了有5.8%的系統顯示低產之外，其餘系統之產量均與對照種臺農67號系統相似；產量變異之範圍也相同 (表2)。按前述少部分系統的產量降低是產量構成因素發生變化之關係。如後述花葯培養後代的結實率及穗重容易發生變化，以致產量降低。

表2. 臺農67號花藥培養第二代 (AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>) 系統稻穀產量之分布

Table 2. Distribution of grain yields of Tainung 67 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> lines from anther culture. (400g/20株=4,464kg/ha, 1984-II)

產量 (g/20pl.) Yield	150	200	250	300	350	400	450	500	計 (系統數) Total (line No.)
TNG 67 AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub>	1 (2)	1 (2)	1 (2)	10 (20)	15 (29)	14 (27)	8 (16)	2 (2)	52 (100%)
TNG 67 (CK)				3 (20)	5 (33)	2 (13)	3 (20)	2 (13)	15 (100%)

TNG=Tainung

花藥培養對其後代系統農藝性狀之影響

AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統 7 個農藝性狀的變量分析如表 3 所示。以系統內變量之平均為機差做 F 測驗，結果有不少性狀連臺農67號系統間的差異也顯著 (表 3)。此是否臺農67號系統間的確存有遺傳變異，或系統內土壤差異小，以致機差的估計過小，則不得而知。故特使用臺農67號系統間的變量為機差做 F 測驗，以便測出花藥培養所引起之遺傳變異，即：

$$\frac{\text{TNG67AC}_1\text{S}_1 \text{ 系統間變量}}{\text{TNG67 系統間變量}} = \frac{\sigma_e^2 + \sigma_{\text{TNG67}}^2 + \sigma_{\text{AC}}^2}{\sigma_e^2 + \sigma_{\text{TNG67}}^2} = F \text{ 值} \rightarrow \text{測驗 AC 之遺傳變量}$$

結果穗重，結實率及株高有極顯著的花藥培養遺傳變異，穗長及一穗粒數也呈顯著 (表 3)。

穗重與結實率是互相有連帶關係的，即結實率低，穗重亦低。故系統內有些個體的結實率降低，不但使穗重變量顯著增加，也使該系統的產量降低。臺農67號 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 有10個系統，其平均結實率比臺農67號 CK 任何系統低，而有 5 個系統其結實率變異係數比臺農67號高 (表 4)。例如 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6963 分離出結實與半結實個體各10株及33株，而20株產量只有 145g，幾乎為臺農67號 CK 的一半

表3. 臺農67號花藥培養第二代 (AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>) 系統各農藝性狀之變量分析表 (民國73年二期)

Table 3. Variance analysis for agronomic traits of Tainung 67 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> lines from anther culture (1984-II).

變因 Source of variation	自由度 Degree of freedom	均 方 Mean square						
		一株穗數 Panicle No./plant	穗長 Panicle length	穗重 Panicle wgt.	一穗粒數 Grain No./panicle	千粒重 1,000 grain wgt.	結實率 Seedset (%)	株高 Plant height
全系統間 Among all lines	66	16.568**	1.873**	0.561**	623.25**	7.530**	783.11**	129.02**
AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> 系統間 Among AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> lines	51	17.097**	1.630**	0.681**	634.89**	8.158**	852.52**	143.04**
TNG 67 系統間 Among TNG 67 lines	14	13.168**	0.728	0.161	292.62	5.552**	191.76**	29.71**
AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> 系統對 TNG 67系統 AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> vs. TNG 67	1	37.163**	30.284**	0.045	4,856.46**	3.187	5,563.18**	549.50**
機差 Error	603	5.395	0.601	0.104	184.14	1.047	61.62	11.75
變量 (AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> )/變量 (TNG 67) Variance (AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> )/Variance (TNG 67)		1.298n. s.	2.239*	4.230**	2.170*	1.469n. s.	4.446**	4.982**

TNG=Tainung

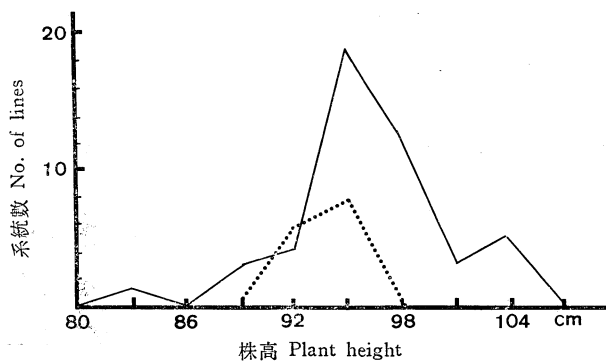
表4. 臺農67號花藥培養第二代 (AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub>) 系統平均結實率及變異系數之分佈 (民73年二期)Table 4. Average seedset percentage and its coefficient of variation of Tainung 67 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> lines from anther culture (1984, second crop).

總實率 (%) Seedset (%)	25	35	45	55	65	75	85	計 Total	結實率 C. V. (%) Seedset % C. V.		
									5	15	25
									TNG 67 AC <sub>1</sub> S <sub>1</sub>	1	
TNG 67 CK					4	10	1	15	12	3	

TNG=Tainung

或不到。AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6926 結實率平均只有49.4%又呈連續性變異，其產量只有 248g。其他結實率低而呈連續性或不連續性變異的系統有 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6927, 6955, 6965 及 6968。以上花藥培養引起後代結實率之降低，以致穗重、產量減少是勿庸置疑之結論。不稔性或半不稔性對育種有某程度的麻煩，但不致於構成障礙。因為不稔或半不稔個體必然會遭自然淘汰，也不難於人工選拔時給予淘汰。

另一個性狀在 TNG 67 AC<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 系統間變量與 TNG 67 CK 系統間變量有極顯著差異者是株高(表3)。株高的遺傳力與結實率同樣屬於較高的一類。TNG 67 CK 的系統平均株高最高是96.7 cm，最低 90.5cm。然而 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統最高者有 103.9cm (6924)，而最低的只有 83.8cm (6942)。兩者株高的分佈亦如圖1。很明顯的 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 的株高往高低兩方向增加及減少。數量性狀的突變往正負兩方向發生，在放射線誘變試驗已有不少的報告佐證。按水稻體細胞的組織培養會引起後代的基因突變已是確立的定論<sup>(5,11)</sup>。花藥培養也同樣引起相似之突變，也許兩者發自同樣的機制。

圖1. 臺農67號 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統平均株高之分佈 (臺農67號 CK 虛線, 民國73—II)。Fig. 1. Distribution of average plant heights of Tainung 67 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> lines and Tainung 67 CK (broken line) as the control (1984 second crop).

除上述性狀之外，粒型、芒也有花藥培養所引發之遺傳變異，雖然變量分析在千粒重未測得顯著的  $\sigma^2_{AC}$ 。為進一步明瞭  $\sigma^2_{AC}$  之存在，特選 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統內有遺傳變異或可能有遺傳變異的系統，每系統取具代表性者 2~3 株，於民國74年一期參加後裔檢驗，以便於 AC<sub>1</sub>S<sub>2</sub> 進一步觀察其遺傳變異。經過花藥培養而尚正常的臺農67號及臺農67號 CK 兩者為對照。

花藥培養引發之遺傳變異，常有多發性之現象。例如 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6942，其結實率平均有53.0%而成連續性變異；株高平均只有 83.8cm 相當整齊，比正常者矮約 10cm；同時小粒型及正常粒型成約 1比1之分離。AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6963 結實率低而有分離現象外，粒型變大，即千粒重有 25.1g。AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 6968

分離出有芒半不稔個體，同時粒型變大（千粒重 25.3g）。總共53個 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統中有16系統具有遺傳變異或可能具有遺傳變異，變異性狀包括稔性，株高、粒型、芒。剩餘37個 AC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> 系統即69.8% 顯示正常與原臺農67號相同。

#### 花藥培養引起之遺傳變異對育種之沖擊

以上試驗結果確認水稻花藥的體外培養使其後代個體或系統產生各種遺傳變異，包括染色體數目及基因的突變。這些變異與體細胞培養所引起之突變<sup>(5,11)</sup>，可能源於同一機制。植物有70%之重複DNA，基因不穩定<sup>(12)</sup>，易受環境因素之影響產生突變，這是動物所少有的<sup>(12)</sup>。誘變的因素包括自然或人工的放射線，引變化學藥品，培養液或培養基之營養條件等。植物無動物的機動遷移能力，遇到不良環境時無法以遷移來逃避，只好靠不穩定的基因組成來改變其本身的性狀，以便適應於環境<sup>(12)</sup>。

作物育種的第一步驟是增加遺傳變異，以便擴大選拔之基因型範圍。引種及雜交乃是常用的增加新基因型之手段。若花藥培養的對象是雜種，所產生的花粉後代除了原有的雜種遺傳變異之外也有花藥培養所引起之突變，增加選拔之基因型範圍，對育種而言並無不利之處。問題是基因的重組是否會受花藥培養擾亂。如前述，水稻標誌基因不受花藥培養之影響，仍然以正常的遺傳法則遺傳至花粉後代<sup>(3)</sup>。由花粉後代估計之重組價與傳統方法估計者互相吻合<sup>(1,2)</sup>。故到目前為止，尚未發現花藥培養對育種有不利之證據。

花藥培養的另一個值得重視的產物是同源四倍體。水稻四倍體的育種至今還在理論之階段，主要瓶頸是材料之來源。收集花藥培養引發的四倍體，累積四倍體之育種材料，將有助於開發水稻育種的新途徑。

前述花藥培養產生的後代，有54%是單倍體。按單倍體只有單量的基因，基因的表現單純，易由表現型來推斷基因型，便於性狀之測驗及篩選。但試管外單倍體的染色體加倍，需要多花時間，且成功率有限，以至花藥培養的優點之一即縮短育種年限，必然會受到折扣。故最好能發展一種技術，以便於癒傷組織做各種性狀例如抗病抗蟲之測驗及篩選，並於試管內加倍癒傷組織細胞或花粉植物的染色體，如此不但能保持縮短育種年限之優點，也有可能節省特性檢驗所需之勞力及時間。

#### 引用文獻

1. Chen, C. C. 1984. Utilization of microspore-derived plants for genetic analysis in rice. *Rice Genetics Newsletter* Vol. 1. pp. 137-138.
2. Chen, C. M., C. C. Chen and M. H. Lin. 1983. Genetic analysis of anther derived plants of rice. *J. Hered.* 73 : 49-52.
3. Chen, C. C., W. L. Chiu, L. J. Yu. S. S. Ren and W. J. Yu. 1983. Genetic analysis of anther-derived plants of rice: independent assortment of unlinked genes. *Can. J. Genet. Cytol.* 25 : 324-328.
4. Chen, L. J., P. C. Lai, C. H. Liao and H. S. Tsay. 1982. Medium evaluation for rice anther culture. *In plant Tissue Culture*, ed. by A. Fujiwara, pp. 551-552, 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, July 11-16, Tokyo, Japan.
5. Fukui, K. 1983. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *Theor. Appl. Genet.* 65 : 225-230.
6. Kucherenko, L. A. 1980. Tissue culture in rice improvement: Experiences in the USSR. *In Innovative Approaches to Rice Breeding*, IRRI, Philippines. pp. 93-102.
7. Kuo, Y. C., M. H. Lin and S. C. Hsieh. 1980. A preliminary observation on field performance of doubled haploid rice through anther culture. *Jour. Agric. Res. China* 29(2) : 131-136.
8. Oono, K. 1975. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. Series D. No. 26.* Tokyo, Japan. (in Japanese)

with English summary)

9. Schaeffer, G. W., F. T. Sharpe, Jr. and P. B. Cregan. 1984. Variation for improved protein and yield from rice anther culture. *Theor. Appl. Genet* 67 : 313-389.
10. Schaeffer, G. W. 1982. Recovery of heritable variability in anther derived double-haploid rice. *Crop. Sci.* 22 : 1160-1164.
11. Sun, Z. X., C. Z. Zhao, K. L. Zheng, Z. F. Qi and Y. P. Fu. 1983. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.* 67 : 67-73.
12. Marx, J. L. 1984. Instability in plants and the ghost of Lamark. *Sci.* 224 : 1415-1416.

## Genetic Changes of Rice Variety Induced by Anther Culture<sup>1</sup>

C. S. Huang, H. S. Tsay and C. G. Chern<sup>2</sup>

### Summary

Among 113 anther-derived green plants ( $AC_1S_0$ ) of rice variety Tainung 67, 54.0% were haploid, tetraploid and mixoploid; 44.2% were diploid, including 38.9% of the normal plants, 3.5% of low seedset plants and 1.8% of mutated types in the grain size, chlorophyll and leaf shape. The remaining 1.8% did not produce panicle at harvest. There was a low frequency of genetic change occurred within an individual  $AC_1S_0$  tiller. All  $AC_1S_1$  lines gave a yield similar to those of Tainung 67 lines, except 5.8% that yielded distinctly lower. The low yield of these lines was caused by the segregation and lowering of seedset percentage and the panicle weight. In addition to the seedset percentage, mutations in the plant height, grain size and awn also appeared in the  $AC_1S_1$  lines, of which 69.8% retained the characteristics of the original Tainung 67.

<sup>1</sup>Contribution No. 1227 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by the Council of Agriculture under the code number of 74 Nungchien-4.1-Tsangchi-46.

<sup>2</sup>Senior agronomists and assistant agronomist, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsieh, Taiwan 431, ROC.