

# 不同廠牌及種類之膠體化物質對水稻 花藥培養之影響<sup>1</sup>

高小玲<sup>2</sup> 葉常青<sup>2</sup> 許家言<sup>2</sup> 蔡新聲<sup>3</sup>

**摘要** 將水稻花藥培養於五種不同品牌之agar時，結果顯示以 Difco-Bacto agar (No. 01 40-01) 對水稻花藥癒合組織的形成及分化較優，而惠光出品之agar表現最差。

不同固體化介質以 agarose 最好，可以顯著提高水稻癒合組織形成率及綠苗分化率，其次為 starch, gelrite 雖可提高癒合組織形成率及綠苗分化率但與 agar 差異不大。增加 corn starch 濃度或以 rice starch 培養水稻花藥，均可提高癒合組織形成率及分化率。在 agar 的培養基內以不同比例之corn starch取代，隨著 corn starch 取代量的增加，癒合組織形成率及分化率均有漸增的趨勢。

利用花藥培養所獲得之單倍體植株，再經由染色體的倍加，能迅速獲得同質二倍體，如此可以縮短育種年限，並可提高選種效率，此乃目前許多先進國家採行的新興育種法。

1968年 Niizeki and Oono首先利用水稻花藥培養，成功的獲得單倍體植株後<sup>(19)</sup>，十幾年來，經許多學者不斷的努力研究，已顯著提高水稻花藥培養的效率<sup>(1,3,4,10,11,14)</sup>。

水稻花藥培養成功與否受許多因子所控制，接種前稻穗適當之低溫處理，有助於提高癒合組織形成率及分化率<sup>(1,4,5)</sup>；花藥以暗培養較照光有利<sup>(12)</sup>；花藥培養初期，以 35°C之高溫處理 1—2 天，再移至 25°C恆溫下培養，則可提高癒合組織形成率，且不影響分化能力<sup>(3)</sup>。此外，培養基之成分在花藥培養上也佔了舉足輕重之地位<sup>(7,8,10,17,26)</sup>，在癒合組織之誘導與植株分化上，均以NAA較2,4-D為優<sup>(9,10)</sup>，培養基中無機鹽類的氮源，以低濃度的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>與高濃度之 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>配合較有助於水稻花藥癒合組織的形成<sup>(10,11)</sup>；培養基中過高濃度的鐵源（大於0.2mM）會阻礙癒合組織之形成<sup>(2)</sup>。

植物組織培養上最常以agar（瓊脂）為固體化基質，然而不同品牌之 agar純度上有差異，低純度之 agar 可能含有某些未知物質而抑制胚狀體的形成<sup>(18)</sup>，近幾年來許多學者發現以 gellan gum（gelrite之商品名）代替 agar 為膠體化物質時，可以增加癒合組織的誘導能力及生長速率<sup>(16,23,27)</sup>，另有學者也發現以澱粉（starch）取代瓊脂，可以增加癒合組織的生長速率，提高分化能力及二次代謝物之產量<sup>(24,25)</sup>。本研究之目的乃探討不同品牌之 agar及不同種類的固體化物質對水稻花藥培養之影響。

## 材料與方法

- 1.臺灣省農業試驗所 研究報告第 1493 號。本研究承農委會補助經費，文稿承本系劉大江博士斧正，臺大食科所江文章教授及本所園藝系林瑞松博士提供討論資料，謹此申謝。
- 2.3.分別為本所農藝系助理及研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

本試驗所選用的材料為臺農67號硬稻品種，花藥的選取、消毒及接種皆按本研究室以往所行的方法<sup>(3)</sup>。

誘導花藥形成癒合組織之培養基為MS<sup>(19)</sup> 培養基之主要有機鹽類，及 N6<sup>(11)</sup> 培養基之無機鹽類加上4mg/l NAA、2mg/l kinetin、6% sucrose<sup>(3)</sup>，再配合以下各種不同之固體化物質。

- (一) 不同品牌之 agar 為固體化物質：Sigma agar、Difco-Bacto agar (No. 0140—01)、Difco-BiTek agar (No. 0138—01—4)、BBL agar及惠光agar，使用濃度均為0.8%。
- (二) 不同種類之固體化物質：0.8% Sigma agar、0.8% FMC agarose、0.25% gelrite、8% corn starch。
- (三) 不同濃度之corn starch為固體化介質：包括8%、10%及12%三種。
- (四) 不同種類之starch為固體化介質：包括corn starch、rice starch及wheat starch三種，使用濃度均為8%。
- (五) Corn starch與Sigma agar 不同比例混合以為固體化物質：0.8% agar、2% corn starch + 0.6% agar、4% corn starch + 0.4% agar、6% corn starch + 0.2% agar 及 8% corn starch。

誘導癒合組織分化的培養基為MS培養基加上2mg/l kinetin、0.5mg/l NAA、40mg/l adenine sulfate、3% sucrose及0.8% Sigma agar<sup>(3)</sup>。花藥培養於25±1°C恆溫黑暗下，以誘導癒合組織形成，再將約10日齡之花藥癒合組織移至分化培養基，於25±1°C恆溫，光照1,500 lux、光期16小時之環境下培養，經20天調查植株分化能力，包括綠苗、白苗、根及不定芽之比例。花藥癒合組織形成率，以每支試管為重複（每根試管接種約50個花藥），當變方分析中處理效應顯著時，以鄧肯氏多變域測驗法進行處理平均值間之差異顯著性測驗。

## 結 果

### 一、不同品牌之agar對水稻花藥培養之影響：

一般植物組織培養常使用0.7—0.9% Difco-Bacto agar做為固體化介質，Sigma agar 價格較Difco-Bacto agar便宜，品質尚可，因此在本研究室常用於大量繁殖，另外，同樣為Difco公司出品Difco-BiTek agar及BBL公司出品之agar均未被廣泛使用，惠光公司出品之 agar 價格最便宜，但也許由於純度稍差，一般試驗單位較少使用。

將以上幾種不同品牌之agar用於水稻花藥培養時，發現不同廠牌之agar 對於水稻花藥癒合組織之形成及綠苗分化率有差異（表1），以Sigma agar、Difco-Bacto agar、BBL agar做為固體化介質時，癒合組織的形成率均可達50%以上，綠苗比例亦超過30%，若同時考慮癒合組織誘導率及綠苗分化率，則以Difco-Bacto agar表現較佳。Difco-BiTek agar 及惠光 agar 則比以上各品牌之agar稍差，其中以惠光 agar對癒合組織之誘導及分化影響最大，但由於價格最便宜，故某些私人公司仍然採用為蘭花大量繁殖之介質。

### 二、不同固體化介質對水稻花藥培養之影響：

以表2之四種不同固體化介質培養水稻花藥，發現以 agarose對提高癒合組織誘導率及綠苗分化率效果最好，分別達67.5%及38.8%，其次為corn starch分別為57%及35.2%，而 gelrite 雖可稍提高癒合組織形成率及綠苗分化率，但與Sigma agar（對照）比較差異不大（表2）。

### 三、不同濃度之corn starch對水稻花藥培養之影響：

由表3可知，以8、10及12%三種濃度之corn starch做為固體化介質培養水稻花藥，癒合組織的形成率及綠苗分化率均隨 corn starch 濃度之增加而提高，而以12%之處理最佳，但高濃度之corn starch由於粘稠度太大，配置培養基時頗為困難，因此並不適於一般使用。

表 1. 不同品牌之 agar 對水稻花藥培養之影響

Table 1. Effects of agar brand on rice anther culture.

Agar brand	No. of anthers cultured	No. and % of anthers forming callus	No. of callus cultured	No. and % of callus forming plant		
				Green	Albino	Root and abnormal shoots
Sigma	250	130(52.0)b*	120	44(36.7)a	18(15.0)b	39(32.5)a
Difco-Bacto (No. 0140-01)	250	141(56.4)ab	125	48(38.4)a	14(11.2)b	35(28.0)b
Difco-BiTek (No. 0138-01-4)	250	114(45.6)c	100	29(29.0)b	19(19.0)b	28(28.0)b
BBL	250	148(59.2)a	130	41(31.5)ab	19(14.6)b	39(39.0)ab
Huey-Guang	250	104(41.6)c	96	19(19.8)c	28(29.2)a	33(34.4)a

\*Means with the same letter are not significantly different at 5% level by Duncan's multiple range test.

Numbers in parentheses are percentages relative to total number.

表 2. 不同膠體化介質對水稻花藥培養之影響

Table 2. Effects of different gelling agents on rice anther culture.

Gelling agent	No. of anthers cultured	No. and % of anthers forming callus	No. of callus cultured	No. and % of callus forming plant		
				Green	Albino	Root and abnormal shoots
Sigma agar (CK)	200	101(50.5)c*	90	27(30.0)b	13(14.4)a	28(31.1)b
Agarose	200	135(67.5)a	121	47(33.8)a	19(15.7)a	42(34.7)ab
Gelrite	200	108(54.0)bc	103	35(34.0)ab	15(14.6)a	40(38.8)a
Corn starch	200	114(57.0)b	108	38(35.2)a	11(10.2)b	29(26.9)c

\*Same as Table 1.

表 3. 不同濃度之玉米澱粉對水稻花藥培養之影響

Table 3. Effects of different corn starch concentrations on rice anther culture.

Corn starch concentration (%)	No. of anthers cultured	No. and % of anthers forming callus	No. of callus cultured	No. and % of callus forming plant		
				Green	Albino	Root and abnormal shoots
8	200	109(54.5)b*	100	36(36.0)b	12(12.0)b	24(24.0)b
10	200	118(59.0)b	113	45(39.8)b	21(18.5)a	34(30.1)a
12	200	127(63.5)a	121	63(52.1)a	23(19.0)a	24(19.8)c

\*Same as Table 1.

## 四、不同來源之 starch 對水稻花藥培養之影響：

以玉米、水稻及小麥三種來源之 starch 各 8 % 培養水稻花藥，結果發現水稻來源之 starch 可得較高之癒合組織形成率及綠苗分化率，稍優於玉米或小麥來源之 starch 但差異不顯著（表 4）。

表 4. 不同種類之澱粉對水稻花藥培養之影響

Table 4. Effects of different starches as gelling agent on rice anther culture.

Starch type	No. of anthers cultured	No. and % of anthers forming callus	No. of callus cultured	No. and % of callus forming plant		
				Green	Albino	Root and abnormal shoots
Corn starch	200	114(57.0)ab*	111	40(36.0)a	14(12.6)ab	37(33.3)a
Rice starch	200	120(60.6)a	107	41(38.3)a	9(8.4)b	29(27.1)ab
Wheat starch	200	108(54.0)b	95	30(31.6)a	15(15.8)a	21(22.1)b

\*Same as Table 1.

## 五、不同比例之 corn starch/agar 混合後對水稻花藥培養之影響：

如表 5 所示，以不同比例之 corn starch/agar 混合後培養水稻花藥，隨著 corn starch 比例之增加，癒合組織形成率及分化率均有遞增之趨勢，完全以 corn starch 取代 agar 時，可提高約 9 % 癒合組織形成率及約 7 % 綠苗分化率。

表 5. 不同玉米澱粉/瓊脂之比例對水稻花藥培養之影響

Table 5. Effects of corn starch/agar ratio on rice anther culture.

Concentration (%)		No. of anthers cultured	No. and % of anthers forming callus	No. of callus cultured	No. and % of callus forming plant		
Corn starch	Agar				Green	Albino	Root and abnormal shoots
0	0.8	200	96(48.0)b*	92	27(29.3)b	19(20.6)a	29(31.5)ab
2	0.6	200	101(50.5)b	98	29(29.6)b	18(18.4)ab	32(32.6)ab
4	0.4	200	110(55.0)a	103	34(33.0)ab	21(20.4)a	28(27.2)c
6	0.2	200	111(55.5)a	107	36(33.6)ab	25(23.4)a	31(29.0)bc
8	0.0	200	114(57.0)a	105	38(36.2)a	17(16.2)b	35(33.3)a

\*Same as Table 1.

## 討 論

Agar 是組織培養上不可或缺的固體化物質，品質優良的 agar 聚膠性強，穩定性高，在使用過程中不會被代謝分解而變質；而品質較差純度較低的 agar 因含有某些未知之抑制物質，而影響組織培養胚狀體的形成<sup>(18)</sup>，故於使用前應先加以純化。

不同廠家生產之 agar 純度上有差別，價格亦有差異。由本試驗之結果發現，一般使用的 Difco-Bacto agar 較 Sigma agar 適合水稻花藥培養，可以增加水稻花藥癒合組織形成率及綠苗分化率（表 1）。Debergh 亦發現不同品牌之 agar 會影響培養基內營養元素之化學及物理性質，進而影響菜

薊 (globe artichoke) 植株之分化<sup>(13)</sup>。惠光生產的 agar 純度較其它品牌為差，但價格最便宜，故以經濟利益的觀點衡量時，一些較粗放的大量繁殖試驗，或許可採用，但較為敏感之作物如禾本科作物之花藥培養，以採用較高純度之 agar 為佳。

近幾年來，許多學者嘗試使用其他固體化介質取代 agar，例如 agarose、gelrite、k-carrageenan、gellan gum、apple parenchyma、starch 等。Ichi *et al.* 發現以 gellan gum 取代 agar 可以增加菸草癒合組織的鮮重及生長速率<sup>(16)</sup>，Zimmerman and Robacker 亦報告以 gelrite 代替 Difco-Bacto agar 可以增加棉花癒合組織形成量及分化率<sup>(27)</sup>；Sorvari 以大麥 starch 取代 agar 培養大麥花藥，結果亦發現以 starch 為介質，可以顯著提高大麥花藥胚狀體的產生，植株分化率亦較對照高出 5 倍<sup>(24,25)</sup>。水稻花藥對不同介質的反應國內外均少有研究，因此本試驗以 Sigma agar、agarose、gelrite、corn starch 四種固體化介質，探討其對水稻花藥培養之影響，結果發現以 agarose 為固體化介質，可以顯著提高水稻花藥癒合組織形成率及分化率(表 2)，但由於價格過於昂貴(每 100 公克約 1 萬元)，因此用於大量繁殖並不符合經濟效益，若用於原生質體平碟培養則可考慮。本研究也發現以 corn starch 或 gelrite 為固體化介質，確實可增加水稻癒合組織形成率及綠苗分化率，若將 corn starch 濃度提高至 12% (表 3) 或以 rice starch 培養水稻花藥 (表 4)，可以明顯增加癒合組織形成率及綠苗分化率。許多學者也發現將 agar 或 gelrite 濃度提高可增加植株分化率且減少玻璃質化的現象<sup>(6,21,22)</sup>。Henderson and Kinnersley 發現以 corn starch 代替 agar 培養胡蘿蔔，可以增加癒合組織之乾重及胡蘿蔔素的累積量，此增加量與 starch 濃度成正比，若將 agar 培養基以不同比例之 starch 取代，胡蘿蔔癒合組織的乾重及胡蘿蔔素均隨 starch 取代量增加而遞增<sup>(15)</sup>；此結果與本試驗之結果非常相近；當水稻花藥培養之培養基以不同比例之 corn starch/agar 混合時，發現隨著 starch 比例增加，水稻癒合組織形成率及分化率均有遞增趨勢(表 5)，由此可知 starch 在培養基內扮演著重要的角色，它除了可以提供支持力量外，並可維持滲透壓。澱粉及蔗糖水解再經高溫高壓處理後，可以轉換分子結構進而改變滲透壓。不同種類之 starch 其顆粒大小不同，例如 corn starch 直徑約 10—60 $\mu$ ，wheat starch 約 20—30 $\mu$ ，rice starch 約 2—10 $\mu$ 。當高溫高壓處理後，由於吸水膨潤，晶體之複曲折性發生不同程度之改變，加上不同種類之 starch 其 amylose 及 amylopectin 解離程度不同，因此冷卻後，晶格的排列彼此間有差異，此可能影響培養基之滲透壓及花藥吸收養分之能力，而導致 starch 類別對水稻花藥培養有不同的影響。本研究發現在 8—12% corn starch 下，愈高濃度則癒合組織形成率及綠苗分化率愈佳，是否意味結合水與游離水比例與凝膠作用之交互作用影響「滲透壓」進而影響結果，則有待進一步之研究證實。

### 引用文獻

1. 林素蘭、蔡新聲。1984。低溫處理對水稻花藥癒傷組織形成效果之研究。中華農學會報 127: 8—17。
2. 陳駿季、許家言、蔡新聲。1986。不同形式及濃度鐵源對水稻花藥培養之影響。中華農業研究 35: 244—252。
3. 葉常青、蔡新聲。1988。高溫處理及培養基成份對水稻花藥培養之效果。中華農業研究 37: 250—256。
4. 蔡新聲、陳駿季、葉常青、許家言。1988。低溫處理對水稻花藥接種適期之影響。中華農業研究 37: 257—265。
5. 蔡新聲、許家言、葉常青。1988。低溫處理及植物生長調節劑對水稻花藥培養之影響。科學農業 6: 282—298。
6. Arnold, S. V. and T. Erikson. 1984. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3: 257—264.
7. Chaleff, R. L. and A. Stolarz. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiol. Plant.* 51: 201—206.
8. Chen, C. C. 1978. Effect of sucrose concentration of plant production in anther culture of rice. *Crop Sci.* 18: 905—906.
9. Chen, C. C. and M. H. Lin. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 17: 18—24.

10. Chen, L. J., P. C. Lai, C. H. Liao and H. S. Tsay. 1982. Medium evaluation for rice anther culture. *J. Agric. Res. China* 31 : 283-290.
11. Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, H. Chan, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen source. *Sci. Sinica* 18 : 659-668.
12. Cornejo-Martin, M. J. and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 30 : 541-546.
13. Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue medium. *Physiol. Plant.* 59 : 270-276.
14. Genovesi, A. D. and C. W. Magill. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci.* 19 : 662-664.
15. Henderson, W. E. and A. M. Kinnersley. 1988. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15 : 17-22.
16. Ichi, T., T. Koda, I. Asai, A. Hatanaka and J. Sekiya. 1986. Effects of gelling agents on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric. Biol. Chem.* 50 : 2397-2399.
17. 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.
18. Kohelenbach, H. and W. Wernicke. 1978. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 86 : 463-472.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
20. Niizeki, H. and K. Onon. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jap. Acad.* 44 : 554-557.
21. Pasqualetto, P. L., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of "Gala" apple *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111 : 976-986.
22. Pasqualetto, P. L., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14 : 31-40.
23. Singha, S. 1984. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of "Almey" crabapple and "Seckel" pear. *Hortscience* 19 : 227-228.
24. Sorvari, S. 1986. The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. *Ann. Agric. Fenn.* 25 : 127-133.
25. Sorvari, S. 1986. Comparison of anther cultures of barley cultivars in barley-starch and agar gelatinized media. *Ann. Agric. Fenn.* 25 : 249-254.
26. Tsai, S. C. and M. H. Lin. 1977. Production of rice plantlets by anther culture. *J. Agric. Res. China* 26 : 100-112.
27. Zimmerman, T. W. and C. D. Robacker. 1988. Media and gelling agent effect on cotton callus initiation from excised seed hypocotyls. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 15 : 269-274.

## Effects of Agar Brand and Gelling Agent on Rice Anther Culture<sup>1</sup>

S. L. Gau<sup>2</sup>, C. C. Yeh<sup>2</sup>, J. Y. Hsu<sup>2</sup> and H. S. Tsay<sup>3</sup>

### Summary

A series of experiments were taken to compare the effects of five agar brands (Sigma, Difco-Bacto No. 0140—01, Difco-Bitek No. 0138—01—4, BBL and Huey-Guang) and different gelling agents and concentrations on callus induction and plant regeneration in rice anther culture. In the comparison of the five agar brands, the best results on callus and plant differentiation was obtained with Difco-Bacto agars while the addition of Huey-Guang agar to the medium resulted in the lowest differentiation rate.

The use of gelling agents of either agarose or corn starch increased markedly the percentages of callus induction and green plant formation when compared with the check treatment of Sigma agar. Medium solidified with gelrite also showed a tendency of increasing differentiation rate. However, its effect was not significantly different from the other three treatments.

Increasing corn starch concentration or replacing agar by rice starch also showed positive effect on callus induction and green plant formation in rice anther culture. The effects of different concentration combinations of corn starch and agar in the medium in rice anther culture were also tested. The results indicated that higher concentrations of corn starch were beneficial to callus and green plant regeneration.

---

1. Contribution No. 1493 from Taiwan Agricultural Research Institute. This research was supported by a grant from Council of Agriculture, Executive Yuan, ROC.

2, 3. Research Assistants, and Senior Agronomist, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, ROC.