

## 低溫處理及液體培養對水稻花藥癒傷 組織形成之效果<sup>1</sup>

蔡新聲      陳良築<sup>2</sup>

**摘要：**水稻花藥培養前，將附有劍葉之稻穗經 10 °C，7 天之低溫處理，可提高花藥 callus 形成率一倍，花藥接種於培養基後再行低溫處理則無效。低溫處理花藥所得 callus，分化之綠苗，有較多單倍體而較少雙倍體的趨勢。

液體培養不但無益於花藥 callus 之誘導，且形成之 callus 分化力極差，故不適宜水稻花藥培養。

1968年 Niizeki and Oono 首先利用水稻花藥培養誘得單倍植物體，唯因誘導花藥產生 callus 的頻率太低，限制了花藥培養技術被實際應用於育種工作上<sup>(14,17)</sup>。十幾年來，經由許多研究人員不斷努力的結果，已使水稻花藥培養的育種效率提高許多，如 Chen 發現單核期的水稻花藥進行培養可得最高的 callus 形成率<sup>(2)</sup>，Genovesi 等報導水稻花藥培養前行低溫處理，可使 callus 之誘導率提高四倍之多<sup>(10)</sup>，Chu 等所發表的 N<sub>6</sub> 培養基則比其他培養基（如 MS, Miller 等）更適合誘導水稻花藥產生 callus<sup>(7,12,13)</sup> 而 Chen 等所改良之 NK 培養基則又比 N<sub>6</sub> 更優良，不但提高水稻花藥 callus 之誘導率，而且使 callus 分化綠苗之機會大為增加<sup>(5)</sup>。凡此改進均已顯著提高了水稻花藥培養的育種效率，使利用水稻花藥培養技術從事育種工作趨於可能。

也有報告指出，利用液體培養技術，由於培養之花藥較易吸收養份，且可將花藥壁褐化時所產生之有毒物質洗去，所以效果較好<sup>(11,18,21)</sup>。本研究之目的在探討低溫處理及液體培養之效果，以供實際配合育種時之應用及參考。

### 材料與方法

#### 一、花藥的消毒及接種

花藥培養所用的材料為硬稻臺農67號品種。將劍葉葉耳距下位葉葉耳約 5 cm 之稻穗連同劍葉取下；低溫處理稻穗之方式係以濕潤之棉花包裹葉鞘基部，裝入塑膠袋中，置於恆溫 10°C 之冰箱中 7 天。預備採取花藥之材料，先以 70% 酒精擦拭葉鞘外表後，取出稻穗浸漬於 70% 酒精中 30 sec 再以 0.5% 次氯酸鈉消毒 3 min 後，以無菌水沖洗 3~4 次，將屬於單核期之花藥以 Chen 等<sup>(3)</sup> 所述之法，接種於培養基上。

#### 二、使用培養基之組成及種類

(一) 低溫處理試驗之培養基：以無機鹽減半 (Na-Fe-EDTA 除外) 之基本 MS (1962) 配方，配合 4 mg/l NAA, 2 mg/l Kinetin, 6% 蔗糖及 0.8% phytagar, 做為誘導水稻花藥 callus 形成之培養基。

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第1141號。本研究承國科會之補助 (NCS 72-0409-B055-01)，特此致謝。

2. 本所農藝系研究員及助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

(二) 液體培養試驗之培養基：含有 *Chu et al.*<sup>(7)</sup> 無機鹽類，MS 之有機物，配合 4 mg/l NAA, 2mg/l Kinetin 及 6% 蔗糖之改良式 NK 培養基<sup>(5)</sup> 為本試驗之基本培養基。固體培養基則以 0.8% phytagar 凝固之，並以 25×120 mm 之試管盛裝，每支試管含 10 ml 之培養基，液體培養基則以 10 ml 之量，裝於 125 ml 三角瓶中。液體培養初期四週為靜止培養，callus 開始形成後再行 60 rpm 之往復式震盪培養。

花藥培養於 26±1°C 恆溫、黑暗下，進行 callus 之誘導。誘導 callus 分化植物體之方式，則取10天日齡之 callus 培養於含有 1 mg/l NAA、4 mg/l Kinetin、170 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、40 mg/l adenine sulfate 及 3% 蔗糖之基本 MS 培養基上，在 26±1°C 恆溫、光照 1,500 lux 光期 16 小時的環境下培養。

## 結果與討論

### 一、低溫處理

表 1 顯示，附有劍葉之稻穗於 10°C 低溫下處理 7 天後之花藥，其 callus 形成率高達 41.9%，較不經低溫處理對照組 (CK-1) 之 21.2% 高出甚多，幾達一倍左右；而將花藥接種於培養基後再行低溫處理者，其 callus 誘導率為 26.4%，雖略高於未處理對照 (CK-2) 之 22.4%，但統計分析並無顯著差異。由此結果可知花藥接種前，將附有劍葉之稻穗以 10°C 低溫經 7 天之處理，對提高花藥 callus 之形成率非常有效。

表 1. 低溫處理水稻花藥對 callus 形成之效果  
Table 1. Effect of low temperature treatment on callus induction in rice anther culture (cv. Tainung 67).

| Material                  | Treatment       | No. of anthers cultured | No. of anthers forming callus | Percent of anthers forming callus |
|---------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Panicle with flag leaf    | 10°C for 1 week | 1,094                   | 452                           | 41.9 <sup>a</sup>                 |
|                           | CK-1            | 93                      | 202                           | 21.2 <sup>b</sup>                 |
| Anthers on culture medium | 10°C for 1 week | 667                     | 179                           | 26.4 <sup>b</sup>                 |
|                           | CK-2            | 700                     | 151                           | 22.4 <sup>b</sup>                 |

Basal medium: Murashige and Skoog (1962) organic salts,  $\frac{1}{2}$  strength of MS mineral salts (except Na-Fe-DETA), 6% sucrose, 4mg/l NAA and 2mg/l kinetin.

將低溫處理及未經低溫處理所誘得之 callus，分別繼代培養於分化培養基以誘導植物體形成，其形成植物之染色體倍數性如表 2 所示，經低溫處理所誘得之花粉來源植物體，單倍體佔 88%，雙倍體及多倍體僅各佔 7% 及 5%，而未經低溫處理者，雙倍體可達 38%，這種結果顯示低溫處理可使水稻花藥培養誘得 callus 形成之植物體趨向單倍體。

表 2. 低溫處理水稻花藥對 callus 分化所得植物染色體倍數的效果  
Table 2. Effect of cold shock on the chromosome distribution of anther-derived plants in rice anther culture (cv. Tainung 67).

| Treatment   | No. of anther-derived plants investigated | % of ploidy level |    |       |
|-------------|---|-------------------|----|-------|
|             |   | N                 | 2N | polyN |
| CK          | 48  | 58                | 38 | 4     |
| Cold shock* | 43  | 88                | 7  | 5     |

\*Unemerged panicles with flag leaf were kept under 10°C for 1 week before anther culture.

低溫處理花葯可促進單倍胚狀體形成的效果，早於 1973 年 Nitsch and Norreel 就在曼陀蘿的花葯培養中發現，氏等認為低溫處理，使花粉第一次有絲分裂產生大小相等的兩個細胞核，只有這種花粉將來才能形成胚狀體<sup>(15)</sup>。Vasil 解釋為低溫可引起花葯內代謝活性的減低，而使大量花粉粒停留於轉換成 sporophytic 發育所需之時期<sup>(19)</sup>。Duncan and Heberle 則認為低溫延遲了花粉粒劣變的過程，使較多花粉粒開始新的細胞分裂，而導致胚狀體形成<sup>(9)</sup>。

低溫處理水稻花葯的效果，許多學者均曾報導，其效果依處理溫度之高低及時間長短而有顯著之不同，一般介於 6—13 °C 之低溫處理均可提高 callus 誘導率<sup>(1,10,20)</sup>。太低的溫度如 3—4 °C 以下，處理時間極不易控制<sup>(8)</sup>。Genovesi and Magill 認為較溫和之低溫如 10—13 °C 處理 10—14 天效果最好，可增加 callus 的誘導率 4 倍之多<sup>(10)</sup>；超過 15 天的處理會造成誘得之 callus 較難分化，且形成較多的白苗<sup>(6,10,22)</sup>。本研究發現將附有劍葉，穗基包以濕潤棉花，置於塑膠袋內再經 8—10 °C 之低溫處理，可增加 callus 之誘導率一倍；將花葯切取後放置培養基上再行低溫處理之效果則不顯著，和前人之結果十分相似。Chen 等<sup>(5)</sup> 檢討培養基的效果發現，改良 NK 培養基亦可使水稻花葯 callus 之誘導率提高一倍，是否改良 NK 培養基及低溫處理花葯二者配合使用，對 callus 之誘導具有累加效果，頗值研究。在植物體誘導方面，低溫處理似乎增加了單倍體形成的比例，這種使自然倍加二倍體植物形成機會減少的情形，十分不利於實際育種，所以尋找一種可增加 callus 誘導率，而又不曾減少自然倍加二倍體形成之花葯低溫處理方式，頗值進一步探討。

## 二、液體培養

利用改良後之固體或液體 NK 培養基，及將植物荷爾蒙或蔗糖用量減半之液體培養基，測定其對水稻花葯 callus 誘導之效果，結果如表 3 顯示，含有相同植物荷爾蒙及蔗糖用量之固體與液體培養基，對 callus 之誘導有極大差異；液體培養者可見之 callus 數目為 56.9%，而固體培養者則僅 39.1%，這種結果從數字上看好像液體培養之效果優於固體培養，其實固體培養時，一個花葯可長出數個 callus，不同花粉來源之 callus 在短時間內即因生長混合而無法分辨，故極難以 callus 為單位計算。統計上若改以 callus 形成之數目計算，則固體培養的實際效果將超出液體培養甚多。至於同為液體培養，將荷爾蒙 NAA 及 Kinetin 或蔗糖濃度減半，對 callus 形成之影響可由表 3 得知，蔗糖濃度減半者其 callus 形成率為 53.3% 與不減半者之 56.9% 幾無差異，而 NAA 及 Kinetin 減半者，其 callus 形成率 43.1% 則較不減半者更低，這種結果說明在液體培養之環境下，植物荷爾蒙 NAA 4 mg/l 與 Kinetin 2 mg/l 仍較適合，蔗糖則影響不大。

表 3. 固體或液體培養基對水稻花葯 callus 形成之效果  
Table 3. The effects of liquid and solid media on callus induction in rice anther culture (cv. Tainung 67)

| Treatment* | No. of anthers cultured (A) | No. of visible callus produced (B) | (B)/(A) —%— |
|------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------|
| Solid-NK1  | 1,571                       | 684**                              | 39.1        |
| Liquid-NK1 | 1,200                       | 683                                | 56.9        |
| Liquid-NK2 | 840                         | 362                                | 43.1        |
| Liquid-NK3 | 960                         | 512                                | 53.3        |

\*Media components : NK1 : Chu *et al.* (1975) inorganic salts, MS organic compound, 6% sucrose, 4 mg/l NAA and 2mg/l kinetin.

NK2 : Same as NK1 except concentrations of NAA and kinetin were reduced to 2mg/l and 1mg/l, respectively.

NK3 : Same as NK1 except sucrose concentration was reduced to 3%.

\*\*No. of anthers producing callus.

在不同培養基成份下誘得之 callus，分別移至分化培養基上誘導植物體形成，結果如表 4 顯示，各種液體培養基所產生 callus 分化綠苗之能力幾近於零。大部分 callus 都在移至分化培養基後二、三週內死亡，少部分 callus 分化為不正常芽及根。而由固體培養基所形成之 callus 則有 25% 分化為綠苗，5% 分化為白苗，25% 分化為不正常芽及根。綜合表 3、4 之結果可知液體培養水稻花藥，不適用於以產生綠苗為主要目標的育種工作，除非有抑制 callus 褐化及促進分化綠苗的技術突破，否則仍以固體培養為佳。

表4. 水稻花藥 callus 之誘導培養基對 callus 分化能力之影響

Table 4. Influence of different callus-induction media on the differentiation ability of callus in rice anther culture (cv. Tainung 67).

| Callus induction media* | No. of callus cultured | No. of callus turning brown | No. of callus producing |               |                         |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
|                         |                        |                             | Green plants            | Albino plants | Abnormal shoot and root |
| Solid-NK1               | 80                     | 36(45)**                    | 20(25)                  | 4(5)          | 20(25)                  |
| Liquid-NK1              | 80                     | 64(80)                      | 0                       | 0             | 16(20)                  |
| Liquid-NK2              | 80                     | 62(77)                      | 2(3)                    | 2(3)          | 14(17)                  |
| Liquid-NK3              | 80                     | 50(63)                      | 0                       | 0             | 30(37)                  |

\*Media components: same as Table 1.

\*\* ( ) = percent

雜種水稻花藥培養產生 callus 時，每個花藥能自不同的小孢子分裂產生多個 callus，這些不同小孢子來源的 callus，含有不同的基因型，若能將此等不同基因型之 callus 均予以誘導分化成植物體，則少量的花藥培養即可產生各種不同基因型之後代，然因固體培養花藥佔的空間有限，而使 callus 形成後擠在一起，造成競爭而失去許多優良基因型，液體培養可克服上述缺點，Vasil<sup>(19)</sup> 認為固體培養易受老化花藥壁釋出的抑制物所影響，因此建議培養基中添加活性碳或利用液體培養可得較好的結果，Nitsch<sup>(16)</sup> 也建議液體培養有利於胚之發育。但本研究顯示水稻花藥行液體培養，不但對 callus 的誘導沒有幫助，且使誘得之 callus 分化綠苗之機會大為降低，因此水稻花藥似不宜利用液體培養，此結論與前人之研究結果極不一致，可能為作物不同或受其它因素之影響，有待進一步探討。

### 引用文獻

1. Chaleff, R. S. and A. Stolarz. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiol. Plant.* 51: 201-206.
2. Chen, C. C. 1977. In vitro development of plants for microspores of rice. *In Vitro* 13 (8): 484-489.
3. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1979. A. method for anther culture of rice. *TCA Manual* 5(2): 1051-1053.
4. Chen, C. C. 1982. Toward utilization of anther culture in rice breeding. In: *Proceeding of a Symposium on Plant Breeding* (Ed. by S. C. Hsieh & D. J. Liu) pp. 81-87. Agri. Assoc. of China. Taiwan, ROC.
5. Chen, L. J., P. C. Lai, C. H. Liao and H. S. Tsay. 1982. Medium evaluation for rice anther culture. In: *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.* (Ed. by A. Fujiwara) pp. 551-552. The Jap. Association for Plant Tissue Culture. Tokyo.
6. Chen, Y., Q. X. Zuo, H. Y. Li and R. D. Qu. 1982. Plant regeneration from isolated rice pollen

- culture and some factors affecting induction frequency. In: Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. (Ed. by A. Fujiwara) pp. 559-560. The Jap. Association for Plant, Tissue Culture. Tokyo.
7. Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 17 : 657-668.
  8. Cornejo-Martin, M. J. and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 30 : 541-546.
  9. Duncan, E. J. and E. Heberle. 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tobacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90 : 173-177.
  10. 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.
  11. Heberle, E. and J. Reinert. 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tobacum* : Dependence upon pollen development. *Protoplasma* 99 : 237-245.
  12. Miller, C. O. 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. *Modern Meth. Plant Anal.* 6 : 194-202.
  13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
  14. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 44 : 554-557.
  15. Nitsch, C. and B. Norreel. 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. *C. R. Acad. Cci. D.* 276 : 303-306.
  16. Nitsch, C. 1981. Production of isogenic lines : Basic technical aspects of androgenesis. In: *Plant tissue culture, methods and application in agriculture.* (Ed. by T. A. Thorpe) pp. 241-252. Academic Press.
  17. Oono, K. 1981. In vitro methods applied to rice. In: *Plant tissue culture, methods and application in agriculture.* (Ed. by T. A. Thorpe) pp. 273-289. Academic Press.
  18. Sunderland, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: *Proc. Symp. Plant Tissue Culture.* pp. 65-86. Peking. Science Press.
  19. Vasil, I. K. 1980. Androgenetic haploid. In: *Perspectives in plant cell and tissue culture.* (Ed. by G. H. Bourne and J. F. Danielli ) pp. 195-223. Academic Press.
  20. Wang, C. C., C. S. Sun and Z. C. Chu. 1974. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. *Acto Bot. Sinica* 16 : 43-53.
  21. Wernicke, W. and H. W. Kohlenbach. 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79 : 189-198.
  22. Zapata, F. J., L. B. Torrizo, R. O. Ramero and M. S. Alejar. 1982. Androgenesis in *Oryza sativa*. In: *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.* (Ed. by A. Fujiwara) pp. 531-532. The Jap. Association for Plant Tissue Culture. Tokyo.

## The Effects of Cold Shock and Liquid Medium on Callus Formation in Rice Anther Culture<sup>1</sup>

H. S. Tsay and L. J. Chen<sup>2</sup>

### Summary

Rice culm with flag leaf was pretreated by low temperature at 10°C for 7 days. Anthers taken from these pretreated flowers were cultured on solid medium. It was found that cold-shocked anthers produced more callus (2-fold) than those without pretreatment. The effect was not significant when pretreatment was done after anthers have been cultured on medium. Callus initiated from cold-shocked anthers produced more haploid plants and less diploid plants than the callus initiated from anthers without pretreatment.

Due to the low differentiation ability of callus initiated from anthers cultured in the liquid medium, it is considered that liquid suspension culture is not suitable for rice anther culture.

- 
1. Contribution No. 1141 from Taiwan Agricultural Research Institute. This study was supported by a grant (NSC72-0409-BO55-01) from National Science Council, Republic of China.
  2. Senior Agronomist and Research Assistant, respectively, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.