水稻花藥培養以育成植株之研究[1]

蔡秀錦　林明華[2]

摘要　培養42種不同水稻品種、品系及雜交第一代之花藥於 MS、ML 和 MW 三種培養基上，可誘導癒合組織之形成，其發生頻率介於0～20.21%之間，因品種不同而不同。此等培養基均含有 5ppm NAA、2.5ppm Kinetin、15 %椰子汁及6 %蔗糖。日本型水稻適合於 MS 培養基；印度型水稻則適合於 ML 培養基。蔗糖濃度對癒合組織形成率之影響很大，多於或少於 6 %蔗糖的培養基均將降低癒合組織之形成率；甘露蜜醇（mannitol）雖有調節滲透壓的功效，然其效果則遠次於蔗糖。花藥事先經由低溫(5°、10° 及15°C）處理一日，與癒合組織的形成率之相關甚少。二期作花藥癒合組織之形成率遠低於一期作。

癒合組織移入含有 0.5ppm NAA、4ppm Kinetin、40ppm Adenine sulfate、15 %椰子汁及3 %蔗糖的 MS 培養基後二至四週，就有小植株的分化，其分化頻率由 30至80不等。再則分化率亦因癒合組織之齡期、品種和期作而有所差異。十日大（0.2至0.4公釐）的癒合組織再分化率最高，分化成綠苗之百分比亦大；太老或經由繼代培養之癒合組織之分化率降低，且形成白苗的百分比亦提高。椰子汁對再分化並不十分重要，反而有抑制現象。

緒　言

單元體育種早爲學人所重視，惟因自然變異率太低而難以應用。Guha and Maheshwari [2] 成功地培養蔓陀蘿花藥成爲單元性胚狀體和小植株以來已有十餘年，利用此法而育成之單元體植株已有六十餘種（或雜交品系），大部分是雙子葉植物，除於草、蔓陀蘿的單元體形成率較高，且廣泛地被應用於育種外，餘者因單元體形成率太低而幾乎無法利用。水稻自 Niizeki and Oono [12] 首次培養日本型水稻花藥成功以來，仍無多大進展。此乃誘導水稻花藥產生癒合組織的頻率太低 [6,18] 及癒合組織不易分化成單元體植株 [4,6] 之故。水稻是我們主要的糧食作物，爲配合二期稻之增產，新品種的育成最爲重要。如能利用花藥單元體之育種，不但能縮短育種時間，亦能提高選拔效果。在稻單元體實用化以前，必需先提高花藥癒合組織之形成率，同時需促進癒合組織再分化而成植株。本文即針對此等問題而加以探討。

材料與方法

試驗材料：栽培稻品種、品系及雜交第一子代花藥共42種。

培養基的配置：(A) 第一種培養基：這是誘導水稻花藥形成癒合組織的培養基，以 Miller [7]、Murashige & Skoog [8] 及 Modified White [5] 等培養基爲主，再加入15%椰子汁，5ppm NAA，2.5ppm Kinetin。分別配以蔗糖濃度（3.6.9%）。今以阿拉伯數字書於簡寫培養基的右下方以表示蔗糖的百分比濃度。例如：

ML_3：ML + 15%椰子汁 + 5ppm NAA + 2.5ppm Kinetin + 3%蔗糖。

MS_6：MS + 15%椰子汁 + 5ppm NAA + 2.5ppm Kinetin + 6%蔗糖　(B) 第二種培養基：這是癒合組織再分化成植株的培養基，以 Murashige & Skoog [8] 爲主，加入 4ppm Kinetin、40ppm Adenine sulfate、0.5ppm NAA 及 3 %蔗糖，繼而配以椰子汁、酵母抽出液及肌醇（Inositol）等。

本研究承臺灣農業研究中心補助，本文蒙謝主任順景校正，謹此一併致謝。

1.試驗報告農試字第七九四號　2.臺灣省農業試驗所技佐、技士。

試驗方法：

（A）水稻花藥癒合組織的誘導： 由田間取得上述品種之稻穗，先用醋酸洋紅塗片檢驗花粉之發育期正處於單核中期或晚期，此時的穗頂正伸到最後一葉（即劍葉下第一片葉子）。採下的幼穗用3～5%次氯酸鈉消毒5分鐘，再移入75%酒精5分鐘後，即經由無菌水洗滌數次。取出花藥分別植於第一種培養基，每一試管約移入40個花藥，培養在生長恆溫箱，光照度 1200 Lux，16小時，溫度爲 25±1°C，一週後隔日觀察，並記錄癒合組織長出的數目及日數。

溫度處理花藥的方法是將田間取得單核時期之稻穗，分別置於5,10及 15°C 恆溫箱，隔日分別取出，依上述方法再植於第一種培養基上。 （B）幼植株的誘導： 當花藥長到肉眼可見的癒合組織（約0.1公釐）後10、20、30日分別取出並植於第二種培養基，此時照度約 1800 Lux，16 小時，溫度30±1°C。每隔一日觀察並記錄癒合組織的分化能力、分化過程、形成白苗之可能率……等 。待植株長到10～15公分，即可移栽室外，此時需防植株過分蒸散所導致的枯萎。進而檢定根尖染色體數目。

試驗結果

一、癒合組織的誘導：

花藥接種後一至二週即轉變成褐色，四至七週即有淺黃色癒合組織從裂開之花藥壁釋放出來，如花藥轉成深褐色，癒合組織就難以形成，平均每一花藥可長出一至七個癒合組織，此時之癒合組織質鬆易脆，逐日增大，形成癒合組織頻率可因下述幾種因素而有所差異。

（A）品種間的差異： 癒合組織的形成率與品種（品系）相關甚切，此表示其受制於基因。一般而言，日本型水稻的形成率較高，最高達 20.21 %；印度型水稻的形成率很低，甚至有些品種根本無法形成癒合組織；雜交第一子代的花藥誘導癒合組織形成率適介於上兩者之間，有些超過親代的形成率。由表一可以清晰得知。

（B）期作間與品種上的差異：臺灣地區水稻培植每年有二期作。期作影響了花藥癒合組織形成率。一期作的癒合組織形成率遠高於二期作者，幾爲二期作的一至二十倍（圖一）。供試品種中相差最大的是臺中187，其一期作花藥癒合組織形成率幾爲二期作的二十倍；相差最少的是臺北309，其一期作之癒合組織形成率爲二期作的一倍多。

表一、水稻花藥癒合組織形成率與品種（品系）的關係

Table 1. Variation in callus formation in rice varieties and hybrids by anther culture.

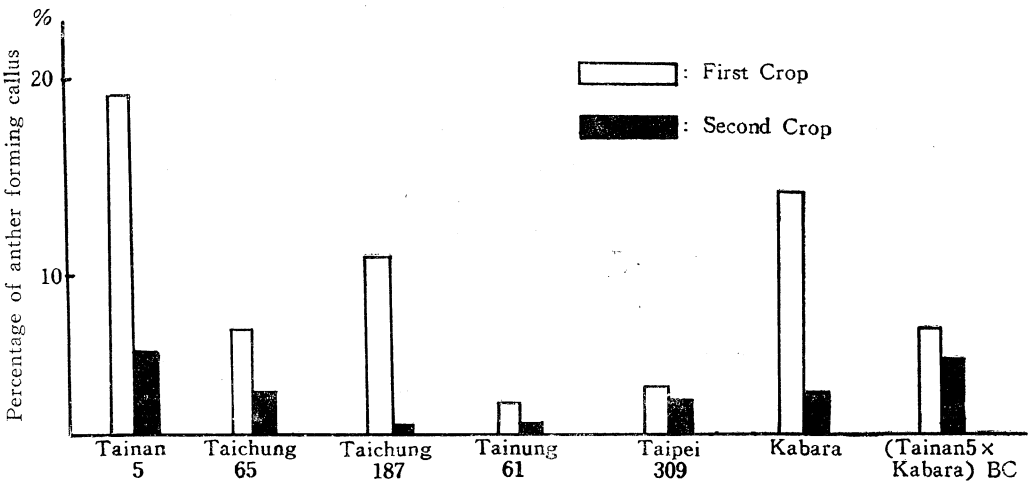
Varieties and hybrids	No. of incubated anthers	No. of anthers from which callus formed	Frequency %
H-124	183	37	20.21
Tainan 5	305	59	19.34
Taichung 187	141	14	9.92
Taichung 186	385	23	5.97
Taichung 65	253	15	5.92
Since Yauo	414	12	2.89
Tainan 6	647	18	2.78
Taipei 309	345	9	2.60

Tainung 61	315	5	1.58
O-loan-chu	285	3	1.05
Hsinchu 56	328	2	0.61
Kabara	310	42	13.54
Mudgo	270	18	6.66
Kaoshiung-sen Yu 54	481	4	0.83
Chianung-sen 8	394	3	0.76
Chianung 242	241	2	0.50
Pai-mi-fen	519	2	0.38
Chianung-sen 11	236	0	0
I-kung-pao	429	0	0
Ai-chueh-chien	424	0	0
Taichung Native I	324	0	0
F_1, IR-2×Tainung 61	247	52	21.05
F_1, IR-2×Kabara	653	83	12.71
F_1, IR-2×Tainan 5	609	45	7.39
F_1, IR-2×Mudgo	660	13	1.97
F_1, IR-2×Chianung-sen 11	528	6	1.14
F_1, IR-1×Tainan 5	252	28	11.11
F_1, Taichung Native 1×Kabara	613	27	4.40
F_1, Taichung Native 1×IR-2	628	9	1.43
F_1, Taichung Native 1×IR-1	706	5	0.71
F_1, Chianung-sen 8×Tainan 5	303	29	9.57
F_1, Chianung-sen 11×Tainan 5	617	36	5.83
F_1, Chianung-sen 11×Tainung 61	597	52	8.71
F_1, Chianung-sen 11×Kabara	718	36	5.01
(Tainan 5×Firooz) BC_3	391	58	14.83
(Tainan 5×Kabara) BC_3	416	24	5.76
(Tainung 61×Kabara) BC_3	357	19	5.32

Media: ML_6, MS_6 and MW_6 (Pooled Data)

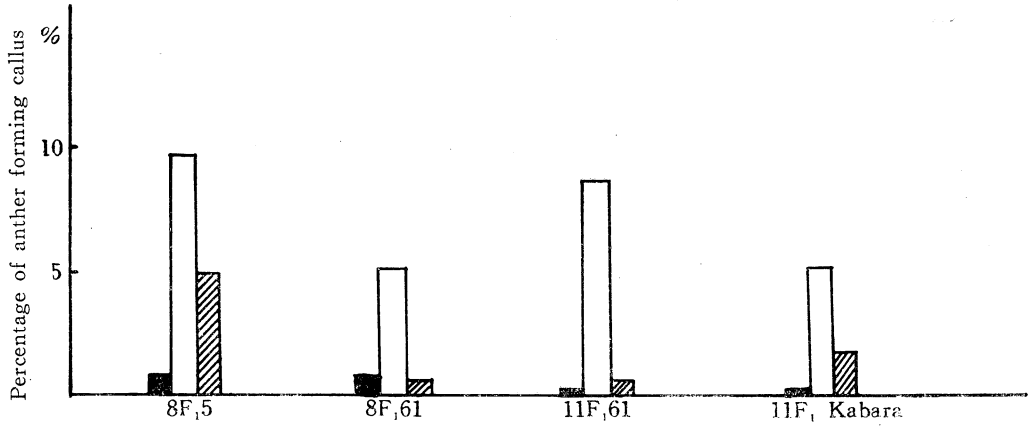
(C) 雜交品種第一子代之水稻花藥癒合組織形成率均高於親本（圖二），這種結果應用在雜交育種上非常有價值。

(D) 培養基的影響：培養基是離體花藥生長的溫床，其成分之不同、多寡與有無均影響花藥之生長與發育。其中「碳」源的多少爲影響滲透壓的主要因素。本實驗結果發現含6％蔗糖的培養基最適合花藥發育成癒合組織；含9％蔗糖者最差（表二）。甘露蜜醇（mannitol）雖可調節培養基之滲透壓，然在此實驗中並無法取代蔗糖，反而抑制花藥癒合組織的形成（表三）。



圖一、水稻花藥癒合組織形成率在期作上之差異

Fig. 1: A comparison of percentage of anther forming callus between first and second crop seasons.



圖二、水稻雜交第一子代花藥癒合組織形成率與親本之關係

Fig. 2: A comparison of frequency of anther forming callus between F_1 progeny and parental varieties (2nd crop, 1975).
8: Chianung-sen 8; 5: Tainan 5; 61: Tainung 61; 11: Chianung-sen 11

表二、蔗糖濃度對臺南5號、臺中65號的花藥癒合組織形成率之影響

Table 2: Effect of different sucrose concentrations on callus formation in rice anther culture. (1st crop, 1975)

Varieties	Tainan 5			Taichung 65		
Media	No. of incubated anthers	No. of anther forming callus	%	No. of incubated anthers	No. of anther forming callus	%
MW_5	328	28	8.53	133	5	3.75
$M S_3$	331	23	6.94	307	15	4.88
$M S_6$	305	59	19.34	253	15	5.92
$M S_9$	315	19	6.03	291	3	1.01

表三、醣濃度對水稻花藥癒合組織形成之影響

Table 3: Effect of different ratios of sucrose to mannitol on callus formation in rice anther culture. (1st crop, 1975)

Varieties Sucrose : Mannitol	Tainan 5 %*	Taichung 65 %
6% : 0	19.34	5.92
1% : 2.2%	0.26	20.9
0.5% : 2.4%	0.52	0
0.1% : 2.6%	0	0

Medium: MS_6

*: See table 4

印度型水稻的花藥癒合組織形成率很低，曾從事多方面的探討，諸如植物荷爾蒙（2,4—D、NAA、Kinetin）間的濃度，酵母抽出液及椰子汁有無，都沒有顯著的差異，尤其是 2,4—D 的存在與否，關係並不大。有些品種在缺 2,4—D 的培養基上之癒合組織形成率高於含有 2,4—D 者。由實驗得知，日本型稻適合於 MS_6 培養基；印度型稻則適合於 ML_6 ；雜交第一子代的花藥則依親本而有所區別（表四）。

表四、不同培養基對水稻花藥形成之影響

Table 4: Effect of different kinds of media on callus formation in rice anther culture. (1st and 2nd crops, 1975)

Varieties and hybrids	Frequency of callus formation in percent*		
	MW_6	ML_6	MS_6
Kabara	9.52	13.54	
Chianung-sen 8	0	0.28	
Mudgo	4.46	6.66	
Tainan 5	8.53		19.34
Taichung 65	3.75		5.92
F_1, IR-2×Tainung 61		15.17	21.05
F_1, IR-1×Tainan 5		8.25	11.11
F_1, Chianung-sen 8×Tainan 5		8.76	9.57

$$* \text{ Frequency} = \frac{\text{No. of anthers from which calluses are formed}}{\text{No. of incubated anthers}} \times 100$$

(E) 溫度處理：水稻稻穗先經由低溫（5、10 及 15°C）處理一日後，取出花藥加以培養，所誘導之癒合組織形成率甚低。第一期作水稻花藥經低溫處理後的形成頻率降低，愈低溫處理者，降低的頻率愈大；第二期作的癒合組織形成率亦因低溫處理而降低，然經 15°C 處理者則有促進的現象；二期作之 Kabara 經低溫處理，則癒合組織形成率增多（表五）。

表五、低溫處理花藥與花藥形成率之關係

Table 5: Effect of low-temperature on callus formation in rice anther culture.

Treatment	Frequency of callus formation in percent*				
	1st crop		2nd crop		Kabara
	Taichung 65	Tainan 5	Taichung 65	Tainan 5	
Control	3.75	8.53	2.26	4.46	2.23
5°C 24 hrs	2.72	2.54	1.89	1.59	4.32
10°C 24 hrs	2.06	2.72	1.64	5.49	4.69
15°C 24 hrs		4.08	2.35	5.66	8.39

* See table 4

（二）幼植株的誘導：

水稻花藥癒合組織移至分化培養基約一至二週後，開始綠化，並有芽的分化，繼而由芽基長出不定根以成小植株。一般而言，根的分化較芽的分化容易；先分化成根的癒合組織很難再有芽之分化，而先分化成芽者都能由芽基長出不定根。一塊癒合組織分化的芽數由一至十個不等，也有十幾支小植株者。一塊癒合組織可分化成綠苗、白苗或綠白苗同時存在的植株。水稻花藥癒合組織的再分化率約爲50%，其中分化成綠苗者約爲分化率的一半。分化率隨品種而有很大的差異。

（A）品種不同對再分化率的影響：品種（品系）不同影響再分化率甚大，分化率由30～80%不等，而綠苗率占3～55.44 %。日本型稻的綠苗率高於白苗率；印度型稻及雜交第一子代的花藥癒合組織分化成白苗的比例很高（表六）。白苗之成因爲何？目前尚不完全明顯，尚待日後進一步之探討。

表六、不同水稻品種之花藥癒合組織之再分化率

Table 6: Variation in frequency of normal green and albino plantlets developed from the callus of rice anther.

Varieties	No. of incubated callus	No. of callus forming plantlet	% callus forming plantlet	
			Normal	Albino
Mudgo	21	17	42.86	38.09
Taichung 65	92	68	55.44	18.48
Tainan 5	212	133	48.59	14.15
Taichung 187	11	6	36.37	18.18
Taichung 186	16	8	43.75	6.25
Kabara	76	25	3.95	28.95
(Tainung 61×Firooz) BC_2	13	8	7.69	53.84
(Tainan 5×Kabara) BC_2	22	12	22.73	31.82
(Tainan 5×Firooz) BC_3	51	24	17.65	29.41
(Tainung 61×Kabara) BC_3	26	12	7.69	38.46
F_1, Chianung-sen 11×Tainan 5	26	20	19.23	57.69

F_1, Chianung-sen 11×Kabara	26	12	3.85	42.31
F_1, Chianung-sen 11×Tainung 61	41	20	4.88	43.90
F_1, Chianung-sen 8×Tainan 5	44	19	9.09	34.09
F_1, IR-2×Kabara	57	26	12.28	33.33
F_1, IR-2×Tainan 5	29	19	17.24	48.28
F_1, IR-2×Tainung 61	89	50	6.74	47.19
F_1, IR-1×Tainan 5	56	26	14.29	32.14
F_1, Taichung Native 1×Kabara	23	9	8.70	30.43

(Pooled Data)

(B) 癒合組織年齡（Aging）不同與再分化的關係：癒合組織的年齡對再分化率有所影響。十日左右（肉眼可見之日起十天，其直徑約0.2～0.4公釐）之癒合組織分化成植株的百分比最高，且分化成綠苗數亦多；太老者或經由繼代培養者，其再化分之能力降低，且分化成白苗的比例亦增高（表七）。表七，臺中65號略有差異，可能由於樣本太少或觀察上之誤差。

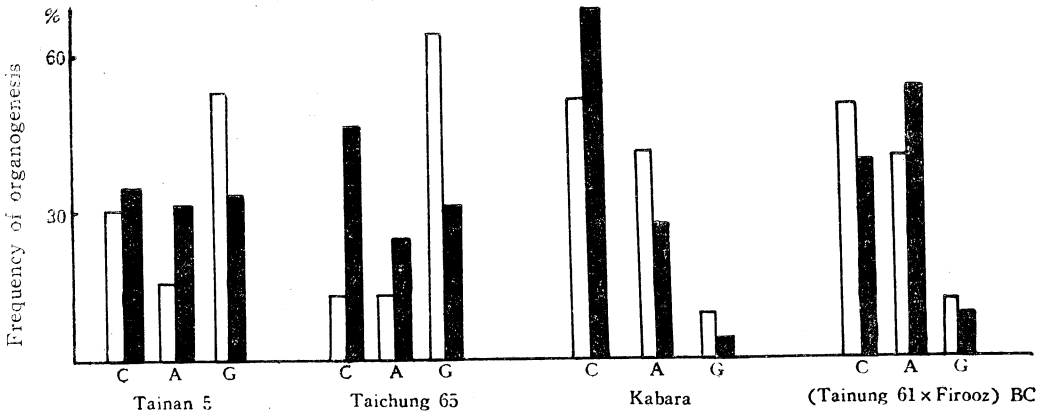
表七、癒合組織年齡不同與再分化率之關係

Table 7: Relationship between regenerative potential and callus age.

Varieties	Tainan 5			Taichung 65			Kabara			H-124		
Aging (day)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
No. of incubated callus	113	40	59	39	33	20	154	22	10	79	19	12
% callus forming normal plantlet	53.10	47.50	40.68	64.10	45.45	55.00	8.44	0	0	86.08	47.37	41.66
% callus forming albino plantlet	15.93	15.00	10.17	17.95	21.21	15.00	40.91	63.63	80.80	3.80	5.26	0

(C) 期作不同與分化的關係：癒合組織之再分化率亦因期作不同而有所差異。二期作之花藥癒合組織分化成綠苗的百分率較一期作低；未分化者或只分化根的百分率反較一期作高，可由圖三得知。

(D) 癒合組織形成率與再分化力的關係：花藥癒合組織形成率高者，其癒合組織之再分化能力降低，然而形成率低者之癒合組織之再分化力增大。如表八所示，不論是臺南5號或臺中65號，MS_6最適於癒合組織的形成，然此等癒合組織再分化成綠苗率却降低。



圖三、期作不同對癒合組織再分化率之影響

Fig. 3: A comparison of frequency of organogenesis from rice anther callus between first and second crops. ▭ : 1st crop; ▤ : 2nd crop

C: callus of death, undifferentiation and root-formation only

A: albino plantlet

G: green (normal) plantlet

$$\% = \frac{\text{No. of callus forming albino or green plantlet}}{\text{No. of incubated callus}} \times 100$$

表八、水稻花藥癒合組織形成率與再分化率之關係

Table 8: Relationship between the frequencies of callus formation and callus regeneration.

Item	Tainan 5		Taichung 65	
Callus-induced media	% Anther forming callus	% Callus forming normal plantlet	% Anther forming callus	% Callus forming normal plantlet
MW_6	8.53	50.00	3.75	33.33
MS_3	6.94	64.29	4.88	62.50
MS_6	19.34	34.37	5.92	20.00
MS_9	6.03	40.21	1.01	50.00

Callus-regenerated medium: MS+15% coconut milk

(E) 椰子汁對再分化的影響：椰子汁乃一種奇特之物質，在組織培養中佔重要地位，對再分化有促進作用。在本文中水稻花藥癒合組織再分化過程中，不含椰子汁的培養基反而有利於癒合組織的再分化，且分化成綠苗數亦有增加現象（表九），然有例外。

酵母抽出液（Yeast extract）、肌醇（Inositol）及硫酸腺嘌呤（Adenine sulfate）的含量、有無亦曾加以探討，然因樣本太少，無具體結果，惟部分顯示它們並無促進作用。

表九、椰子汁對癒合組織再分化率之影響

Table 9: Effect of coconut milk on callus regeneration in rice anther culture.

Varieties	Coconut milk	No. of incubated callus	% Callus forming plantlet	
			Normal plantlet	Albino plantlet
Tainan 5	+ CM	160	47.50	15.00
	− CM	20	60.00	10.00
Kabara	+ CM	41	0	39.02
	− CM	12	25.00	25.00
F_1, Chianung-sen 11× Tainung 61	+ CM	20	5.00	30.00
	− CM	21	4.76	57.14
F_1, IR-2×Kabara	+ CM	14	14.29	21.43
	− CM	39	10.26	38.46

-CM: Without coconut milk

（三）移栽室外的植株成活率可達80%以上，經由根尖檢查約有⅓植株爲單元體，⅓爲二元體，亦有三、四元體之存在。詳細資料仍在整理中，農藝性狀亦有初步成果，尙在整理。





圖四、水稻花藥之癒合組織

Fig. 4: Callus formation in the rice anther culture.

圖五、水稻花藥癒合組織再分化所成之植株（綠苗）

Fig. 5: Plantlet from callus organogenesis growth in the test tube.

討　　論

水稻花粉發育成單元體，須先逆分化成癒合組織，再由癒合組織再分化成小植株[13]，此與蔓陀蘿[2]、菸草[18]之花粉發育成植株之過程有所不同。最適合於花粉發育之時期是單核中期；而菸草是單核後期[18]；蔓陀蘿[3,4]需採取成熟的花粉才能發育成單元性胚狀體；番茄[1]之花粉則需處於Metaphase I，故培養花粉的最適時期常隨種類而異。

Auxin 對逆分化具有觸發作用，其中以 2,4—D 效果最佳，據多方面的報導均顯示 2,4—D 的重要性[19,25,27]。Oono (1975) 言水稻在 2,4—D、NAA、Kinetin 濃度均在 10^{-5}M 下，所誘導出的癒合組織形成頻率最高 (10.3%)；然在吾人實驗中，只需加以 5ppm NAA 及 2.5ppm Kinetin 所得之形成頻率高達20.2%，如改以 2,4—D 替代 NAA，所得的形成頻率反而降低，故水稻花藥癒合組織的誘導過程中，2,4—D 並非必需品。

癒合組織的形成頻率隨品種及雜交第一子代而有很大差異。Iyer[6] 培養15種印度型水稻，只有4種成功，且形成頻率是 5.51～2.94 %；Niizeki[12] 培養10種日本型稻亦誘導出6種，形成頻率是 2.94～0.46%；澳州 Myint和 de Fossard[10] 培養6種水稻，其頻率是0.21～2.20%；Oono[19] 從事培養基的改良，頻率最高可達13.5%；然在本報告中，從事四十餘種水稻品種、品系及雜交第一子代花藥培養，可誘出38種，其中日本型稻由0.50～20.21%；印度型稻由 0～13.54 %；雜交第一子代的花藥癒合組織形成頻率均較親本高（圖二）。由此水稻花藥培養以育成植株之技術極可應用於雜交育種上，不但可以縮短育種時間，尚可提高選拔效率。

Oono[19] 曾謂培養基之種類對癒合組織之形成無多大影響，然在本報告中，日本型稻在 MS 培養基培養最佳；印度型稻則適合於 ML；雜交第一子代的花藥視親本而加以選擇。蔗糖影響培養基的滲透壓，在癒合組織誘導過程中所需蔗糖濃度以 6 %最爲理想，3 %或 9 %之蔗糖均不利於花藥的培養，而 Oono[19] 則以含有 3 %蔗糖的培養基效果最好。甘露密醇（mannitol）雖有調節滲透壓的功效，然無法取代蔗糖。有機附加物對花粉癒合組織形成頻率的影響[14] 亦爲目前所注意，如椰子汁、酵母抽出液等，然在吾人實驗中無法證明它能促進癒合組織的形成。

蔓陀蘿、番茄及菸草經低溫處理後的花粉形成不定胚的頻率顯著增加，然亦有若干學者未能得到相同的結果。水稻花藥經由 5°、10°C 處理一日，均無法促進癒合組織的形成。15°C 處理一日者，似有促進的跡象，尤以二期作爲顯著，故推測二期稻如以 15～20°C 處理，則有可能促進癒合組織的形成，以補救二期水稻花藥癒合組織形成率的低微。

癒合組織年齡的大小與再分化率之關係密切[15]，如經由繼代培養或30日以上水稻花藥癒合組織的再分化率降低，且提高白苗形成的可能性，此與他種作物（甘蔗、馬鈴薯）的情形相似。

癒合組織再分化成植株的百分率由30～80%不等，然印度型及雜交第一子代的花藥癒合組織在分化過程中常有白苗之出現，幾占分化率的$\frac{2}{3}$，其原因甚多，推測是葉綠素形成過程中某一步驟受阻，基因或細胞質發生變異及外界光度不足等，今後將針對此等原因加以探討，以期水稻花藥單元體育種更能廣泛地有效地加以應用。

參 考 文 獻

1. Gresshoff, P., and C. H. Doy. 1972. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Planta 107 : 161—170.
2. Guha, S., and S. C. Maheshwari. 1964. In Vitro Production of Embryos from Anthers of Datura. Nature 204 : 489.
3. Guha, S., and S. C. Maheshwari. 1966. Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of Datura in Vitro. Nature 212 : 97—98.

4. Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic Differences in the Vitro Formation of Embryoids from Rice Pollen. J. Exp. Bot. 24 : 139—144.

5. Hildebrandt, A. C., and J. Riker, B. M. Duggar. 1964. The Influence of the Composition of the Medium on Growth in Vitro of Excised Tobacco and Sunflower Tissue Culture. Amer. J. Bot. 33 : 591—97.

6. Iyer, R. D., and S. K. Rainz. 1972. The Early Ontogeny of Embryoids and Callus from Pollen and Subsequent Organogenesis in Anther Cultures of *Datura metel* and Rice. Planta 104 : 146—56.

7. Miller, C. O. 1963. Kinetin and Kinetin-like Compounds. Morderne Methoden der Pflenzenanalyse, Berlin. Band 6 : 194—202.

8. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant 15 : 473—96.

9. Murashige, T., and R. Nakano. 1965. Morphogenetic Behavior of Tobacco Tissue Cultures and Implication of Plant Senescence. Amer. J. Bot. 52 : 819—27.

10. Myint, A., and de Fossard, R. A. 1974. International Symposium Haploid in Higher Plant Advances and Potential.

11. Nei, M. 1963. The Efficiency of Haploid Method of Plant Breeding. Heredity 18 : 95—100.

12. Niizeki, H., and K. Oono. 1968. Induction of Haploid Rice Plant from Anther Culture. Pro. Japan. Acad. 44 : 554—57.

13. Niizeki, H., and K. Oono. 1971. Rice Plants Obtained by Anther Culture. In: Les Culture de Plants. Collogues Internationaux du C. N. R. S. No. 193. Paris. pp. 251—257.

14. Niizeki, H., and W. F. Grant. 1971. Callus, Plantlet Formation, and Polyploidy from Cultured Anthers of Lotus and Micotiana. Can. J. Bot. 49 : 2041—51.

15. Nishi, T., Y. Yamada, and E. Takahashi. 1968. Organ Redifferentiation and Plant Restoration in Rice Callus. Nature 219 : 508—09.

16. Nishi, T., and S. Mitsuoka. 1969. Occurence of Various Ploidy Plants from Anther and Ovary Culture of Rice Plant. Japan. J. Genetics 44 : 341—46.

17. Nitsch, J. P. 1969. Experimental Androgenesis in Nicotiana. Phytomorphology 10 : 339—344.

18. Nitsch, J. P., and C. Nitsch. 1969. Haploid Plants from Pollen Grains. Science 163 : 85—87.

19. Oono, K. 1975. Production of Haploid Plants of Rice (*Oryza sativa*)by Anther Culture and Their Use for Breeding. 農業技術研究所報告 D,第26號 139—222.

20. Pelletier, G., and Y. Henry. 1974. Haploid Information Service No. 10. pp. 5—8.

21. Sunderland, N., and F. M. Wicks. 1969. Cultivation of Haploid Plants from Tobacco Pollen. Nature 224 : 1227—29.

22. Sunderland, N., and F. M. Wicks. 1971. Embryoid Formation in Pollen Grains of *Nicotiana tabacum*. J. Exp. Bot. 22 : 213—16.

23. Sunderland, N. 1973. Pollen and Anther Culture. In: Plant Tissue and Cell Culture. (H. E. Street, Ed.) pp. 205—39.

24. Tanaka, M., and K. Nakata. 1969. Tobacco Plants Obtained by Anther Culture and the Experiment to Get Diploid Seed from Haploids. Japan. J. Genetics 44 : 47—54.

25. Wang, P. J., and B. K. Chua. 1972. Induction of Callus from Stem Section of *Cryptomeria japonica*. Bot. Bull. Acad. Sinica 13 : 118—120.

26. Wernicke, W., and H. W. Kohlenback. 1974. Haploid Information Service. No. 10. pp. 13—16.

27. Winton, L. L. 1970. Shoot and Tree Production from Aspen Tissue Cultures. Amer. J. Bot. 57 : 904—909.

PRODUCTION OF RICE PLANTLETS BY ANTHER CULTURE

by

Shung-ching Tsai Ming-hwa Lin

Summary

Anthers of 42 varieties and F_1 hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) were culture on synthetic medium. Calluses were successfully induced from pollens and the number of anther which could produce calluses ranged from 0 to 20.21%. Callus-formation rates were different among varieties and hybrids in the order of *Japonica* varieties > F_1 Hybrid > *Indica* varieties. Basic media used for anther culture were developed by Miller (ML), Murashige and Skoog (MS) and modified White medium. These media contain 5ppm NAA, 2.5ppm Kinetin, 15% Coconut milk and 6% Sucrose. The MS medium was useful to *Japonica* varieties and ML medium was apt to *Indica* varieties. Concentration of sucrose was an important factor for callus induction. Sucrose concentrations higher or lower than 6% would decrease the induction frequency. It is impossible to substitute mannitol for sucrose. Anther treated with low temperatures can not produced calluses with higher frequencies, except Kabara. The callus-formation rate of the 2nd crop of rice was far lower than that of lst crop.

After the calluses were transferred to MS medium containing 0.5ppm NAA, 4 ppm Kinetin, 40ppm Adenine sulfate, 15% Coconut milk and 3% Sucrose, plantlets regenerated in 2-4 weeks. The range of regenerative rates was from 30 to 80%. Potentially of regeneration of plantlets from pollen calluses was found to be related with callus age, varieties and rice crop season. The 10-day-old calluses were most optimal, older or younger calluses would decrease the regenerative frequency and produce more albino plantlets. The coconut milk was not essencial for plantlet regeneration.