中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 29(2) : 137～146 (1980)

水稻培養花葯褐變與癒傷組織形成之關係[1]

賴本智　蔡新聲　紀迺淳[2]

摘要：臺農 67 號水稻花葯以六種不同消毒方法處理後培養，結果發現消毒液濃度愈高，消毒時間愈長，會促使花葯愈早褐變，因而造成癒傷組織形成能力的降低；秈粳稻雜交 F_1 之花藥，培養後褐變的早晚，各雜交組合間亦呈褐變早者癒傷組織形成能力低，褐變晚者癒傷組織形成能力高的趨勢。培養花葯在第 4～6 週褐變者癒傷組織形成率最高。培養花葯癒傷組織的產生，約在培養後第 21 至 72 天之間，早於 21 天或晚於 72 天，形成癒傷組織機會極少，絕大多數癒傷組織在培養後 36～51 天間形成。花葯早期褐變所導致癒傷組織形成能力之低下。可能係酚類物質氧化所生之 quinone 產生毒害，不利於小胞子發育形成癒傷組織所致。

利用水稻花葯培養獲得的單元體進行染色體數的倍加，可得完全同質的純二元體 [7,14,20]，這種方式的水稻育種不但能縮短育種時間，且能提高選拔效果，實在是育種工作人員早已嚮往的育種新方法。目前一般作物誘導花葯產生癒傷組織的頻率仍太低 [3,4,20]。因此限制了花葯培養被廣泛的應用於實際的育種工作上。

許多報告指出，花葯褐變之速率與植物體形成之間有明顯的負相關。蔡和林等氏發現水稻花葯接種後，若在 2 週內褐變者癒傷組織就難以形成 [14]。Mii 氏研究菸草花葯的培養，發現花葯培養二週內褐變者，其植物體形成率較低，而且雙核期之花葯比單核期到有絲分裂期者更易褐變 [10]。蔡（未發表）發現培養菸草之花葯愈早褐變者，形成植物體百分率愈低，遲至第 4 週才褐變的花葯，其單元體形成率可高達 94.5%。Anagnostakis 氏及 Bajaj 氏等也發現菸草花葯培養時，若能抑制花葯之褐變，則可增加雄性起源（Androgenesis）植物體之形成 [5,6]。

蔡和林等氏發現水稻花葯癒傷組織的形成比率與品種（品系）的特性，期作之時間，及培養基組成份等有顯著的關係 [14]。又許和陳等氏也發現不同雜交組合之花葯產生癒傷組織能力不等，頻度介於 17.8% 至 40.0% 之間，其中以臺南 5 號 ×H-124 雜交 F_1 花葯培養所得 40.0% 之癒傷組織形成百分率最高 [2]。雖然水稻之花葯癒傷組織形成百分率經多年來許多學者的努力已大有進步 [1,2,4]，唯比起其他作物如煙草 [17]，曼陀蘿 [13] 等仍嫌太低；爲配合育種使花葯培養達到實用化的階段，提高花葯癒傷組織形成的能力是我們應努力的目標。本研究之目的在探求花葯因培養前的消毒而導致花葯對癒傷組織形成的影響。

材料與方法

花葯培養所用的材料爲臺農 67 號，F_1-3 (TCS 3/TNG 67//IR30)、F_1-4 (BG 35-2/PI 162319 // Milyang 23), F_1-11 (KSY 104/TNG 67)、F_1-14 (M 9/IR 30)、F_1-15 (M 9/嘉農育 247) 及 F_1-21 (M 9//Tan 1/Ta-Poo-Cho-Z) 等雜交組合之花葯。

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 923 號
2. 本所農藝系技佐、技正及研究助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

雜交 F_1 及臺農 67 號品種之稻穗係採自本所農藝系稻作研究室種植於臺中縣霧峰鄉試驗農場的植株，將劍葉葉耳距下位葉葉耳約 5 cm 時之稻穗連同劍葉摘下，臺農 67 號稻穗以下述六種方法消毒：

T_0：以 70% 的酒精擦拭葉鞘外部後，將幼穗取出。

T_1：將 T_0 方法消毒後之幼穗浸漬於 70% 酒精中消毒 10 秒。

T_2：將 T_0 方法消毒後之幼穗，浸漬於 70% 酒精中 30 秒。

T_3：將 T_2 方法消毒後之幼穗，以 0.5% 的次氯酸鈉消毒 3 分鐘。

T_4：以 1 %次氯酸鈉取代 T_3 之 0.5% 次氯酸鈉。

T_5：以 2 %次氯酸鈉取代 T_3 之 0.5% 次氯酸鈉。

雜交 F_1 之稻穗以 T_3 法消毒。經消毒後之稻穗以無菌水冲洗 3～4 次，移至含 5 ml 改良液體 MS (Murashige & Skoog) 培養基 (1962) 之 9cm 培養皿上，以鑷子挑取單核期之花葯[7]，接種於含有 10ml 之改良 MS 固體培養基上，培養基之無機鹽類，除 Na-Fe-EDTA 外均以原配方減半，蔗糖濃度爲 6 %，並加添 α-Naphthalene acetic acid (NAA) 4 mg/l 及 6-Furfurylaminopurine (Kinetin) 2mg/l[2]，培養環境爲光照 16 小時，光强 1000 lux，溫度 27±1°C 以誘導癒傷組織之形成。接種後每隔三天或七天調查花葯褐變及癒傷組織形成情形，花葯呈咖啡色或黑色者均視爲褐變，接種後 90 天停止調查，以二項分佈求出信賴介值，做爲不同處理或不同雜交組合間之比較。

結　　果

花葯培養三天後即開始褐變（圖 1），其褐變百分比六種不同消毒處理間呈現與消毒濃度及時間有正的關係，即消毒濃度越高消毒時間愈長，則褐變愈快，從培養開始至培養一個月左右，都依這種情形褐變，培養一個月後之花葯褐變，六處理間相差漸近約在 75～89% 間，培養二個月後，每處理均有 90% 以上的花葯褐變，超過二個月仍未褐變之花葯，部份仍呈白色，繼續觀察顯示，這種白色花葯不具誘導形成癒傷組織的能力，大概是接種初期即已死亡之故。

消毒較輕之處理如 T_0、T_1、T_2 之花葯，經培養 12～30 天褐變之花葯佔極大比例分別由 12、18、22%，褐變到 76、88、80%，平均約 60% 左右的花葯在此時期褐變，而 T_3、T_4、T_5 同時期所褐變之花葯分別由 38、48、46% 增至 88、87、90%，平均約有 45% 的花葯在此時期褐變，顯示濃度高之消毒方法所培養的花葯較早褐變，而消毒較輕的花葯，培養後之褐變大部份在第 3～4 週左右。

各種消毒方法間花葯癒傷組織形成的百分比如圖 2 所示；隨著消毒濃度之提高，消毒時間加長，癒傷組織形成率顯著下降，六處理中的 T_1 癒傷組織形成率最高，達 18%，隨消毒液濃度提高，漸次下降，至 T_5 癒傷組織形成百分比，降至最低，約 3 %而已。T_0 處理癒傷組織形成百分率雖低於 T_1 者，但以二項分佈的信賴介值比較之後並無顯著差異。圖 1、2 顯示由於消毒的强弱所造成花葯的褐變與癒傷組織形成百分率間有極大的關係。

六種雜交組合 F_1 的花葯培養，圖 3 顯示花葯褐變之速率亦因不同之雜交組合而異，F_1-4 褐變速率最快，其它五種雜交組合之花葯褐變速率相差不大。再由圖 4 得知 F_1-4 之雜交組合癒傷組織形成率僅 1 %而已。而其他五種組合則都在 24～43% 之間，由圖 3、4 可明顯看出，花葯褐變之速率與癒傷組織形成百分比間有極明顯的關係存在，即褐變速率愈快的花葯其癒傷組織形成也愈差。

圖 5 顯示臺農 67 號水稻花葯培養，以週爲單位調查花葯褐變的情形及癒傷組織形成能力間之關係，發現花葯褐變的早晚確與癒傷組織之形成率間有負相關關係。圖 5 顯示培養第 1 週即已褐變的花葯，癒傷組織形成率只有約 4 %，隨著褐變的延緩，癒傷組織形成率提高，第 4 週才褐變的花葯癒傷組織形成率可高達 29%，超過第 5 週仍未褐變之花葯其癒傷組織形成率則又降至 20% 左右，此乃

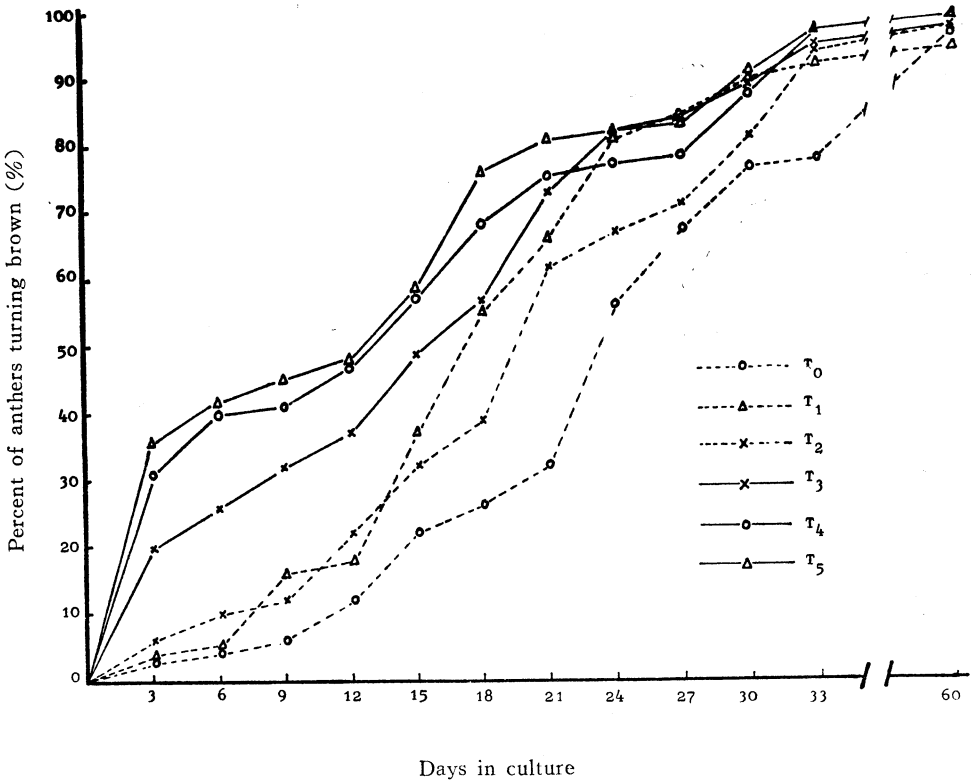


圖1. 臺農 67 號水稻花葯經 6 種不同消毒方法處理，培養後花葯褐變之頻度。T_0：以 70% 的酒精擦拭葉鞘外部後，將幼穗取出。T_1：將 T_0 方法消毒後之幼穗浸漬於 70% 酒精中 10 秒。T_2：將 T_0 方法消毒後之幼穗浸漬於 70% 酒精中 30 秒，T_3：將 T_2 方法消毒後之幼穗，以 0.5% 的次氯酸鈉消毒 3 分鐘。T_4 以 1 %次氯酸鈉取代 T_3 處理之 0.5% 次氯酸鈉，T_5：以 2% 次氯酸鈉取代 T_3 處理之 0.5% 次氯酸鈉。

Fig. 1. Frequencies of anthers turning brown from different sterilization method of rice anthers culture. T_0 : flag leaves were surface-sterilized by 70% ethanol. T_1 : inflorescences were sterilized in 70% ethanol for 10 seconds after T_0 treatment. T_2 : inflorescences were sterilized in 70% ethanol for 30 seconds after T_0 treatment. T_3 : inflorescences were sterilized in 0.5% NaClO for 3 minutes after T_2 treatment. T_4 : same as T_3 except 1% NaClO was used. T_5 : same as T_3 except 2% NaClO was used.

因超過第 5 週仍未褐變之花葯含有少許白色的死亡花葯，因而降低其癒傷組織形成率。

圖六顯示臺農 67 號花葯經培養後不同時間褐變之花葯與癒傷組織形成率間之關係。由圖六可明顯看出，經 90 天培養之花葯，每週褐變花葯數佔總培養花葯數之百分比，由第 1 週至第 9 週分別爲 6.42、32.85、30.0、21.19、2.14、1.66、1.42、0.71 及 3.57%，而每週內形成癒傷組織之花葯佔總培養花葯之百分比，由第 1 週至第 9 週，則分別爲 0.23、1.90、1.66、8.57、0.95、0.95、0.47、0.23 及 0.23%，由以上二項資料可得每週內形成癒傷組織之花葯佔該週褐變花葯數之百分比，由第 1 週至第 9 週分別爲 3.7、5.8、5.6、40.4、44.4、57.1、33.3 、33.3，及 15.2%。即大部份形

成癒傷組織之花葯都在第 4、5、6 週間褐變，如第 4 週褐變之花葯有 40.4% 可形成癒傷組織，第 5 週褐變者有 44.4%，而第 6 週褐變者更高達 57.1%，若能使培養之花葯遲至培養後第 4～6 週才褐變，則可大大提高癒傷組織之形成力，培養後第三週以前褐變之花葯，形成癒傷組織機會極少，分別爲 3.7、5.8 及 5.6%，晚於第 7 週才褐變之花葯，形成癒傷組織之能力亦降低，培養第 9 週後仍未褐變者，因含有培養初期即已死亡之花葯，故癒傷組織形成率急速降低。

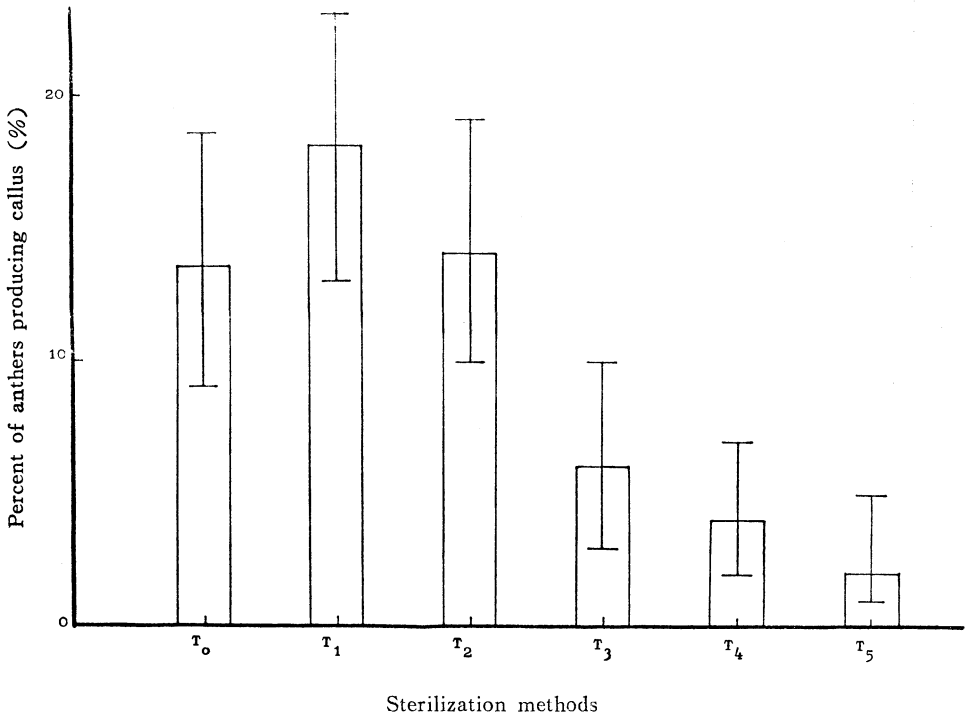


圖2. 臺農 67 號水稻花葯經 6 種不同消毒方法處理，培養後 Callus 形成之頻度。T_0、T_1、T_2、T_3、T_4、T_5 等六種消毒方法同圖 1 所示。

Fig. 2. Frequencies of callus formation from different sterilization methods of rice anthers culture. T_0 : flag leaves were surface-sterilized by 70% enthanol. T_1 : inflorescences were sterilized in 70% ethanol for 10 seconds after T_0 treatment. T_2 : inflorescences were sterilized in 70% ethanol for 30 seconds after T_0 treatment. T_3 : inflorescences were sterilized in 0.5% NaClO for 3 minutes after T_2 treatment. T_4 : same as T_3 except 1% NaClO was used. T_5 : same as T_3 except 2% NaClO was used.

花葯培養日數與癒傷組織形成的關係，由圖 7 顯示水稻花葯培養約 18 天後才開始形成癒傷組織到 36～51 天時形成癒傷組織頻度最高，以後隨著培養日數之增加而漸減，培養 72 天後則完全停止，消毒液濃度提高似乎可延緩癒傷組織形成之時間，及縮短形成癒傷組織的期限。唯此項結果似乎不大顯著，有更進一步研究之必要。

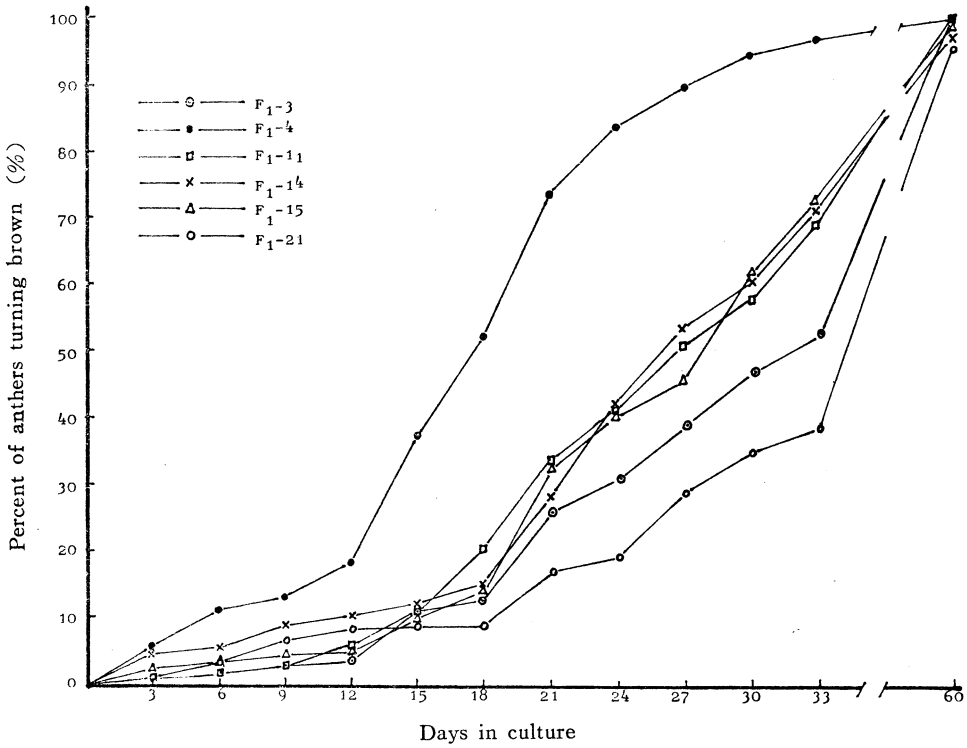


圖 3. 不同雜交組合 F_1 之水稻花葯經 T_3 之消毒方法處理，培養後花葯褐變之頻度。

Fig. 3. Frequencies of anthers turning brown from different F_1 hybrid anthers culture of rice.

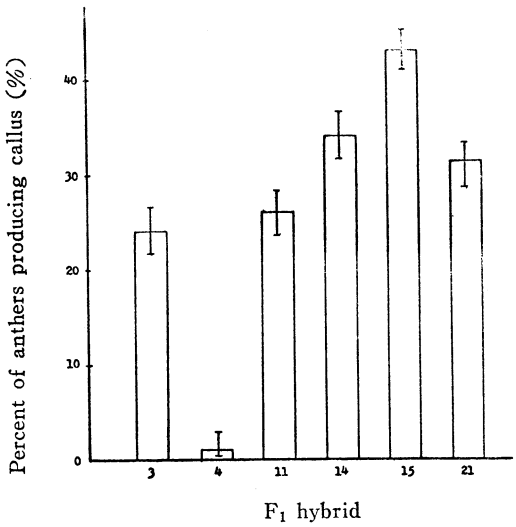


圖 4. 不同雜交組合 F_1 之水稻花葯，培養後 Callus 形成之百分率。

Fig. 4. Varietal difference in the formation of callus of F_1 hybrid anthers culture of rice.

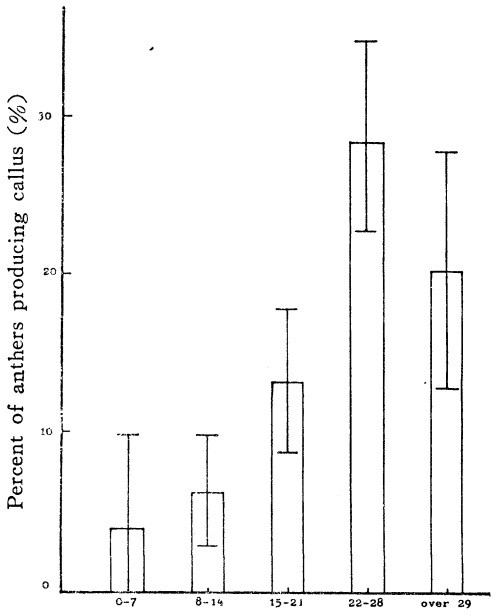


圖 5. 臺農 67 號水稻花葯，培養後花葯褐變與 Callus 形成百分率之關係。

Fig. 5. Relationship of percentage of anthers forming callus and anthers turning brown in rice anthers cultured.

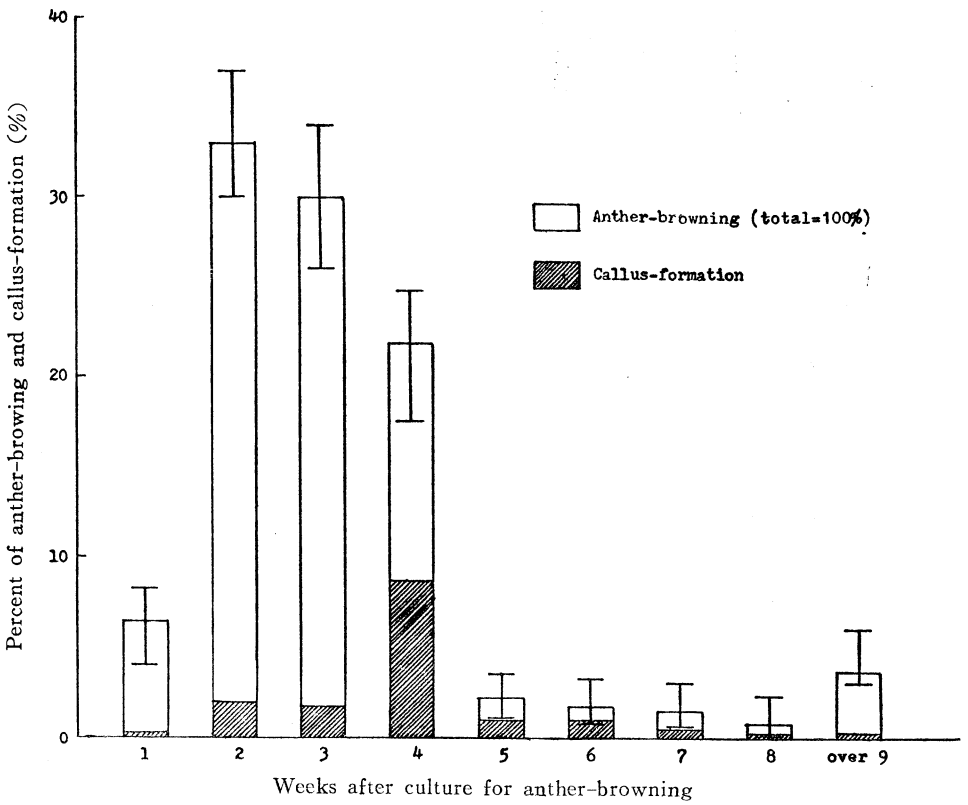


圖 6. 臺農 67 號水稻花葯培養後，不同時間褐變之花葯與 Callus 形成百分率之關係。

Fig. 6. Relation between anther-browning and callus formation of Tainung No. 67 anthers at intervals of culture period.

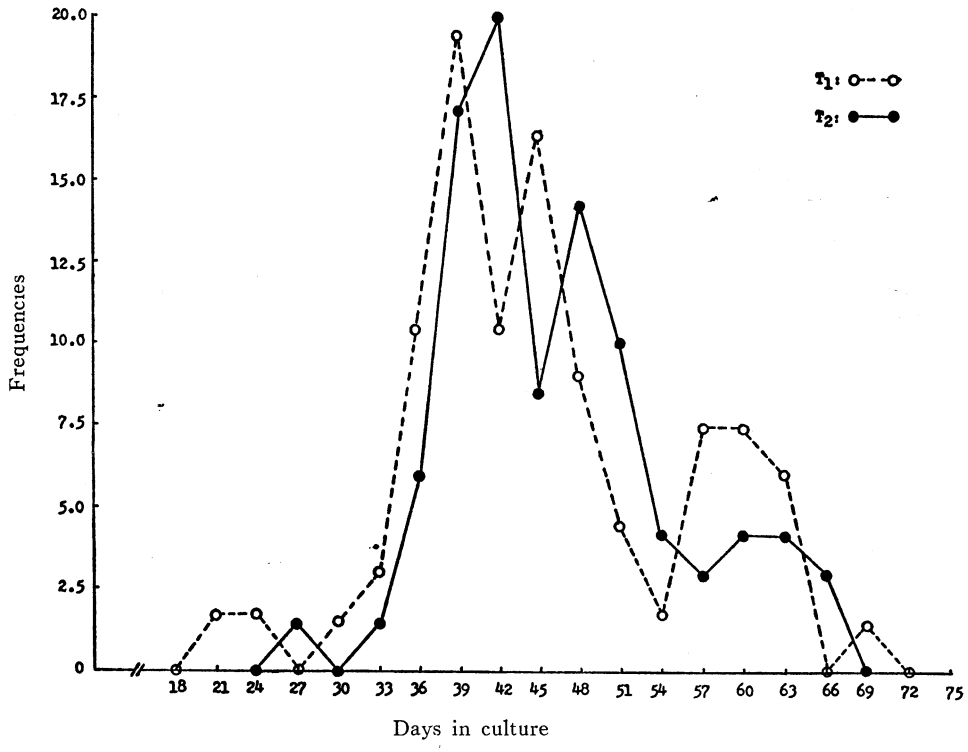


圖 7. 臺農 67 號水稻花葯經 T_1 及 T_2 兩種消毒方法處理，培養後花葯形成 Callus 之頻度，T_1 及 T_2 消毒方法同圖 1 所示。

Fig. 7. Frequencies of anthers producing callus within 75-day culture as affected by different were sterilization methods of Tainung No. 67 rice. Total of 900 samples were observed. T_1 : Flag leaves surface-sterilized by 70% enthanol and inflorescences were sterilized in 70% enthanol for 10 seconds. T_2 : Same as T_1 except 70% enthanol for 30 seconds.

討　　論

花葯壁在花葯培養中所扮演的角色，及因花葯褐變早晚所造成植物體之形成與否，許多文獻均曾提及[19]，Pelletier 和 Ilami 兩氏[17] 發現於草花葯培養超過 25 天才褐變之花葯，產生植物體的能力比早期即已褐變之花葯要好，並且提出花葯褐變現象分爲：（1）急速式褐變。（2）漸近式褐變二型。急速式褐變可能是培養時，從母體植物上切離時受到傷害或生理性的改變所致。而漸近式的褐變，可認爲是花葯本身自然老化的過程；Mii 氏[10] 報導於草花葯培養在最初 2 星期即已褐變之花葯，其植物體形成百分比極低，能維持較長時間才褐變之花葯，形成植物體之能力較高，雙核期之花葯比單核期或有絲分裂期更易褐變，他解釋爲雙核期之花葯，因對切離之方式，消毒方法及培養基組成份極爲敏感所致，所以他認爲花葯壁的組織對花粉粒之分裂，可能扮演著一種保護作用。Dunwell 氏[9] 發表於草母株於 8 小時短日强光，20°C 下所產生之花葯，因花葯壁中之荷爾蒙正處於誘導花葯形成胚狀體之最佳平衡狀態，故培養後具有較高之植物體形成率。蔡氏（未發表）從事於草花葯培養，發現第 1 週即已褐變之花葯，不具有形成植物體之能力，第 2 週褐變之花葯有 39% 可形成植物體，第 3 週褐變者則增至 64%，第 4 週以後才褐變之花葯，植物體形成率可高達 94%，本試驗所獲得水稻花葯由於消毒液之强弱及消毒時間之長短所造成花葯褐變之快慢，因而影響到 Callus 形成率的結果與上述諸學者所發表的結果極爲一致。

許多報告均曾强調花葯在花葯培養癒傷組織的形成過程中，扮演者傳送某種未知物質的角色，例如 Sharp, Paskin 及 Sommer 等氏[18] 利用培養於培養基上花葯的表面，隔以一層濾紙的保護培養法 (nurse culture) 培養蕃茄的小胞子獲得成功。利用相同的方法，Pelletier 氏[16] 以 *Petunia hybrida* 之花瓣癒傷組織做於草小胞子的保護培養獲得成功。Nitsch 氏[12] 報導培養基中加入曼陀蘿經培養一週後之花葯抽出液，可成功的獲得曼陀蘿小胞子培養的植物體。

爲何花葯褐變過早會影響到癒傷組織形成能力？Loomis 及 Battailer 兩氏[11] 認爲切離組織所含之酚類物質會馬上氧化，使苯環上之氫氧基，被氧化形成 quinone 之有毒物質，造成組織之褐變及傷害，因而抑制了癒傷組織形成。Pelletier 及 Ilammi (1972) 曾提及於草花葯培養時維持培養花葯保持原狀，以使花葯內發育中之胚狀體達到能自行從培養基中吸取養分爲止的一段時間，對單倍體的形成非常重要，Mii 認爲若培養的花葯過早褐變，則褐變所生之有毒物質，將嚴重的影響到胚狀體的發育，而且小胞子也將喪失由花葯壁所供給有利於胚形成或發育之未知物質，因而降低了單倍體植物形成的能力。本研究得知過早褐變之花葯，花粉粒將無法獲得來自花葯壁促進生長分裂之未知物質，因而使癒傷組織或植物體形成率降低，而遲至第 4 週以後才褐變之花葯，却又顯示褐變之物質對癒傷組織形成能力影響較小，其原因可能爲水稻花葯癒傷組織的產生，約在培養 21 天左右開始，陳氏[7] 發現培養 20 天之花葯，其花葯壁內花粉粒之發育，已發現分裂爲含有 100 個細胞左右之多細胞現象[7]，這種癒傷組織前身之多細胞體已可利用培養基之養分，不必再依賴細胞壁傳送養分，是故培養第 4 週以後花葯之褐變對發育中的多細胞作用較小。

上述結果顯示水稻花葯壁組織可能在花葯培養過程中提供著保護小胞子的角色，也可能扮演傳送某種與癒傷組織形成有關的重要未知物質，故欲提高水稻花葯癒傷組織形成的能力，首要之務乃如何防止培養花葯早期的褐變，可行的方法如花葯初期的液體振盪培養，活性碳及抗氧化劑 (Antioxidant) 等之利用，或將有益於花葯癒傷組織形成率提高。

引 用 文 獻

1. 林正義、曾美倉、蔡新聲・1974・影響水稻花葯起源 Callus 形成諸因子之研究。國立臺灣大學農學院研究報告 15(2)：1-16。
2. 許淑卿、陳其昌・1977・水稻花葯培養之研究：二元體花葯植株的來源。科學發展月刊 5 (10)：834-839。
3. 陳其昌・1976・水稻花葯培養之研究：花粉時期與低溫處理。科學發展月刊 4 (2)：2187-2190。
4. 蔡秀錦、林明華・1977・水稻花葯培養以育成植株之研究。中華農業研究 26(2)：100-112。
5. Anagnostakis, S. L. 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. Planta 115 : 281-283.
6. Bajaj, Y. P. S. and P. Nitsch, 1975. In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). J. Exp. Botany 26 : 883-890.
7. Chen, C. C. 1977. In vitro development of plants from microspores of rice. In Vitro 13 (8) : 484-489.
8. Chen, C. C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. Crop Science 18 : 905-906.
9. Dunwell, J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in culture anthers of *Nicotiana tabacum* Environ. Exp. Bot. 16 : 109-119.
10. Mii, M. 1976. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 80. S. 206-214.
11. Loomis, W. D., and J. Battaile. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry 5 : 423-438.
12. Nitsch, J. P. 1972. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzenzüchtg 67 : 3-18.

13. Nitsch, C. and B. Norreel. 1973. Effet dun choc thermique sur le pocevoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans lanthere ou isole de lanthere. C. R. Acad. Sc. Paris 276 : 303-306.
14. Niizeki, H. and K. Oono. 1971. Rice plants obtained by anther culture. In : Les cultures de plantes. Collogues Internationaux du C. N. R. S. No. 193. Paris : 251-257.
15. Nishi, T. and S. Mitsuoka. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. Jap. J. Genet. 44 : 341-346.
16. Pelletier, G. 1973. Les conditions et les premiers stades de lândrogenése in vitro chez *Nicotiana tabacum*. Soc. Bot. Fr., Memoires : 261-268.
17. Pelletier, G. and M. Ilami. 1972. Les facteurs de landrogenese in vitro chez *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 68. S. 97-114.
18. Sharp, W. R., R. S. Raskin and H. E. Sommer. 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Planta 104 : 357-361.
19. Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In : Haploids in Higher Plants : Advances and Potential. Kasha, K. J. (Ed.) : 91-122. Univ. Guelph, Guelph.
20. Woo, S. C. and I. J. Tung. 1972. Induction of rice plants from hybrid anthers of Indica and Japonica cross. Bot. Bull. Academia Sinica 13 : 67-69.

The relationship between anther browning and callus formation in rice anther culture

Pen-Chih Lai, Hsin-Sheng Tsay and Nai-Chwen Chi

Summary

Anthers of *Oryza sativa* cv. Tainung No. 67 containing microspores at uninucleate stage were sterilized with six different methods and were cultured at 27°C for 90 days to investigate the relationship between the formation of callus and browning of anthers. It was found that anther browning caused by sterilization reagents severely affected the ability of callus formation. In general, higher concentration or longer duration of sterilization accelerated the browning of cultured anthers and reduced the ability of callus induction.

The culture of F_1 hybrid anthers from six cross combinations of japonica x indica rices also showed the association between earlier anther browning and lower callus formation ability. The anthers turned brown in the later period, e. g., four to six weeks after culture, were shown to possess a greater potential for callus formation than those browned earlier.

1. Contribution No. 923 from the Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Research Assistant, Senior Agronomist and Research Assistant, respectively of the Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.

The callus formation started at 21 days and ended at 72 days after culture. the highest pecentage of callus induction from anthers was observed from 36 to 51 days after culture. The low callus formation ability caused by anther browning at early stage was probably due to the production of quinones which are toxic to the microspores.