

## 低溫處理對水稻花藥接種適期之影響<sup>1</sup>

蔡新聲 陳駿季 葉常青 許家言<sup>2</sup>

**摘要：**水稻稻穗經不同時間之低溫 (10°C) 處理後，選取含四分子期至晚單核期小孢子之花藥進行培養，探討低溫處理對花藥接種適期之影響。結果發現，各時期小孢子對低溫處理的反應差異極大。經七天之低溫處理，以中單核期小孢子之花藥最易形成癒合組織，且其誘導率較經低溫處理一天者提高一倍左右。低溫處理14天，可提高晚單核期小孢子之花藥形成癒合組織之能力，但對中單核期之花藥癒合組織誘導率則無提高之效果，過長之低溫處理 (超過21天) 反會抑制癒合組織之產生。

七天之低溫處理，會導致由四分子期小孢子之花藥所誘導的癒合組織喪失分化能力，短期 (1—7天) 之低溫處理，由中、晚單核期小孢子之花藥所形成的癒合組織，分化率有提高之現象，但較容易分化成白苗。超過14天之低溫處理，綠苗分化能力則顯著降低。

就育種效率而言，低溫處理七天以內，接種中單核期小孢子之花藥可得較高之育種效率；低溫處理14天則以接種晚單核期小孢子之花藥為佳，但其所分化綠株多為單倍體。超過21天之低溫處理，任何時期小孢子之花藥育種效率皆低於3%，而不適合進行培養。本試驗同時以二種貯存方式進行低溫處理，結果顯示，定期更換包裹於葉鞘基部之衛生紙，有助於花藥在長期低溫處理下維持較佳的活力。

水稻花藥培養技術被應用於實際育種工作上已多年，目前農試所每期作可獲得上萬株以上花粉來源之綠苗，對提高水稻選拔效率及精簡人力裨益極大。唯水稻種植為配合期作，在無法分期播種的情形下，各植株抽穗、開花期只相差約一星期左右，如欲取得足夠的花藥進行培養，須在植株抽穗前將適期的材料預先取回貯存。而貯存的溫度可直接影響花藥培養的成效<sup>(1,11,18)</sup>。本研究室以往的報告指出，水稻在進行花藥培養前，將連同劍葉之稻穗，經 10°C 的低溫處理七天，對花藥癒合組織形成有促進的效果<sup>(28,29)</sup>。在大量培養的過程中，接種所花的時間相當長，換言之，有些材料往往須貯存二至三星期。因此較長期的低溫處理是否對花藥培養有不利的影響，是應先評估的問題之一。又花藥內小孢子的時期，對花藥培養具有關鍵性之影響<sup>(3,5,14)</sup>。Chen (1977) 曾報導培養中單核期小孢子的花藥最易形成癒合組織，同時也可形成較多的綠苗<sup>(3)</sup>。此種現象是否會因稻穗之低溫處理而有所變化？亦是目前急需了解的問題。本研究之目的乃在較長時期的低溫貯存下，建立稻穗最適當的貯存方式，並確立在低溫處理後，花藥最適當的培養時期。

### 材料與方法

本試驗所選用的材料為臺農67號硬稻品種。將適期之稻穗 (劍葉葉耳距下位葉葉耳3—5公分) 連同劍葉及第二葉自基部取下，以濕潤之衛生紙包裹葉鞘基部，裝入塑膠袋中，置於 10±1°C 之恆溫箱。處理方式分二種：第一種方式在稻穗進行低溫處理後至取出花藥接種前，不更換衛生紙；第二種

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1416 號。本研究承農委會補助特此申謝。

2. 本所農藝系研究員、前助理、助理及助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

方法將包裹於葉鞘基部之衛生紙，每隔七天定期更換並保持濕潤。

上述二種貯存方式之稻穗，自低溫處理後每隔一星期自恆溫箱取出並接種，至第四星期為止。取出之稻穗按本研究室所建立之方法，選擇適當的材料<sup>(9,10,11)</sup>，經消毒後，將四分子期至晚單核期小孢子的花藥，分別接種於誘導癒合組織形成的培養基<sup>(28,29)</sup>。小孢子發育時期係以 Giemsa 染色後在顯微鏡下鑑定。當癒合組織形成後10—20天移至分化培養基誘導其分化<sup>(11)</sup>，並調查植株之分化情形。成活之綠株移至田間種植，抽穗後調查植株的倍數性。

## 結 果

表 1 之結果顯示，以低溫處理後中單核期小孢子之花藥進行培養，除處理七天的花藥能有效提高花藥癒合組織形成能力外，隨低溫處理時間的延長，花藥逐漸喪失形成癒合組織的能力；而第二種貯存方式似乎稍可減緩此一下降趨勢，此種結果顯示在長期低溫處理下，定期的更換包裹於稻稈葉鞘基部的衛生紙，有助於維持花藥的活力。

**Table 1.** Influence of various durations of cold shock on callus formation ability of rice anther culture\*

Method of cold shock**	% of callus induced from anther with various duration of cold shock (days)				
	1	7	14	21	28
I	21.24	39.14	17.62	16.00	8.95
II	19.86	38.24	22.15	23.36	16.20

\* 300 anthers at uninucleate stage were cultured in each treatment.

\*\* I: Tissue paper was not changed during the whole period of cold shock treatment.

II: Tissue paper wrapped in panicle base was changed every 7 days during the period of cold shock treatment.

稻穗以第二種方式貯存，經不同時間的低溫處理後，各時期小孢子之花藥形成癒合組織的能力，各有不同(表 2)。低溫處理七天，中單核期小孢子之花藥，最易形成癒合組織，晚單核期小孢子之花藥次之；四分子期小孢子之花藥癒合組織形成率低於 5%。隨低溫處理時間的延長，最易形成癒合組織的小孢子時期，由中單核期漸趨向於晚單核期。含晚單核期小孢子之花藥癒合組織形成率由低溫處理七天之 13.04%，提高至 21 天之 72.9%；而中單核期小孢子之花藥癒合組織形成由 40.66% 降至 23.65%。經低溫處理 28 天後，各時期小孢子形成癒合組織能力均普遍下降，晚單核期之小孢子雖有 40.69% 的癒合組織形成率，但仍比 21 天低溫處理之 72.90% 低很多，此結果顯示，就癒合組織形成能力而言，低溫處理的時間不宜超過 21 天。

表 3 及表 4 顯示不同時期小孢子，經低溫處理後所誘導之癒合組織，分化能力差異極大。經七天之低溫處理，四分子期小孢子之花藥所誘導的癒合組織已喪失分化植株能力；中單核期及晚單核期小孢子之花藥所誘導的癒合組織，分化綠苗能力隨花藥低溫前處理的長短，而有相同的趨勢(表 3)。經七天低溫處理的花藥，癒合組織分化綠苗的能力最高，超過七天的低溫處理，分化綠苗能力顯著下降(表 3)，然分化白苗的比例則反而相對提高(表 4)。表 3 及表 4 中，由於早單核期小孢子經低溫處理 14 天及 28 天所誘導之癒合組織數目太少，所以分化綠、白苗之比例並不代表任何意義，綜合表 3、4 之結果可知，花藥在培養前經過適當的低溫處理，對日後癒合組織的分化有促進之效果，但低溫處理過長則分化成白苗的比例比綠苗高，特別在低溫處理三週以後，情形更為明顯。

**Table 2.** Influence of cold shock treatment and microspore developmental stage on callus formation ability of rice anther culture\*

Duration of cold shock (days)	% of callus induced from anther with different microspore developmental stage**			
	TT	EU	MU	LU
1	4.78	7.99	23.57	24.83
7	1.16	7.15	40.06	13.04
14	5.64	0.86	20.31	57.52
21	0.59	10.84	23.65	72.90
28	0.00	0.58	14.16	40.69

\* 300 anthers were cultured in each treatment.

\*\* Development stage of microspores: TT-tetrads, EU-early uninucleate, MU-mid-uninucleate, and LU-late uninucleate.

**Table 3.** Influence of cold shock treatment and microspore developmental stage on green plant formation of rice anther culture

Duration of cold shock (days)	% of green plant produced from callus derived from anther with different developmental stage*			
	TT	EU	MU	LU
1	16.67	8.33	12.22	30.00
7	0.00	23.74	30.77	33.33
14	0.00	33.33**	12.50	12.94
21	0.00	15.00	5.85	2.13
28	0.00	50.00**	18.37	6.03

\* Same as Table 2.

\*\* Not representative data due to small sample size.

**Table 4.** Influence of cold shock treatment and microspore developmental stage on albino plant formation of rice anther culture

Duration of cold shock (days)	% of albino plant produced from callus derived from anther with different developmental stage*			
	TT	EU	MU	LU
1	33.33	8.33	12.22	30.00
7	0.00	26.62	27.88	29.63
14	0.00	66.66	47.66	37.17
21	0.00	36.67	56.73	41.34
28	0.00	0.00	44.90	39.36

\* Same as Table 2.

就育種效率（癒合組織形成率×綠苗分化率）而言，低溫處理七天，以中單核期小孢子之花藥，有較高之育種效率，達 12.33 % (表 5)，但經低溫處理14天以後，育種效率則以晚單核期小孢子的花藥最高，達7.44%。低溫處理超過三星期，則因癒合組織形成率大幅降低，或因分化成綠苗的能力不佳，花藥培養之育種效率皆小於 3 %。

**Table 5.** Influence of cold shock treatment and microspore developmental stage on breeding efficiency of rice anther culture\*

Duration of cold shock (days)	Breeding efficiency of anther with different developmental stage**			
	TT	EU	MU	LU
1	0.80	0.67	2.88	7.45
7	0.00	1.70	12.33	4.35
14	0.00	0.29	2.54	7.44
21	0.00	1.63	1.38	1.55
28	0.00	0.29	2.60	2.45

\* Breeding efficiency = % of callus induction X % of green plant production  
= Number of green plants produced from one hundred cultured anthers

\*\* Same as Table 2.

表 6 顯示中單核期及晚單核期小孢子之花藥所分化的植株，其染色體倍數性可因低溫處理時間的長短而異。中單核期小孢子之花藥，經七天低溫處理後所分化的植株，單倍體約佔67%，二倍體佔29%，其餘為多倍體；低溫處理14天後，單倍體增多至73%，二倍體則減少為20%。含晚單核期小孢子之花藥，所分化綠苗的倍數性亦有相同的趨勢。大體言之，單倍體的比例隨低溫處理時間的延長而增多，二倍體則減少。就育種效率最高的低溫處理時間而言，中單核期小孢子，在低溫處理七天有將近29%的分化綠株為二倍體，晚單核期小孢子在低溫處理14天約有14%的綠株為二倍體。

**Table 6.** Distribution of ploidy level of anther-derived green plant from rice anther with microspore at mid-uninucleate and late-uninucleate stages subjected to various cold shock treatment

Duration of cold shock (days)	% of ploidy level of anther-derived green plant induced from anther with microspore at					
	mid-uninucleate stage			late-uninucleate stage		
	N	2N	poly N	N	2N	poly N
1	62.50	31.25	6.25	57.69	26.92	15.39
7	66.67	28.57	4.76	75.00	12.50	12.50
14	73.33	20.00	6.67	79.36	14.29	6.35
21	60.00	20.00	20.00	70.00	10.00	20.00
28	75.00	12.50	12.50	93.33	6.67	0.00

## 討 論

利用花藥培養誘導癒合組織或胚狀體形成，小孢子所需之發育時期可因不同作物或品種而異<sup>(4,7,13)</sup>。水稻及大部分禾本科作物皆以中單核期小孢子的花藥最易形成<sup>(3,26)</sup>。本試驗在花藥培養前，稻穗先行七天之低溫處理，仍以含中單核期小孢子之花藥最易形成癒合組織，且其形成率比經低溫處理一天者高出一倍左右。然經低溫處理14天後，適當的培養時期由中單核期轉移至晚單核期（表2）。花藥培養前利用低溫進行花藥預措處理，以提高癒合組織的形成能力，在許多作物已被廣泛應用<sup>(11,18,19)</sup>，然適當的溫度及處理時間因作物種類而異<sup>(16,28)</sup>。

水稻花藥經6°—13°C之低溫處理，均可提高癒合組織之誘導率<sup>(1,2,18,32)</sup>，過低的溫度如3°—4°C，則處理時間的長短較不易控制。Genovesi and Magill 認為較溫和之低溫如10°—13°C處理10—14天效果最好，癒合組織誘導率約可提高4倍<sup>(18)</sup>，然而過長的處理時間，例如超過15天，則使癒合組織難於分化，且形成眾多白苗<sup>(12,18,34)</sup>。Hu *et al.* 報導將水稻花藥培養於液體N<sub>2</sub>培養基，經8°C低溫處理4天後再接種於30°C之高溫，可使癒合組織增加一倍<sup>(22)</sup>。Tsay and Chen 發現，連同劍葉將穗基包以濕潤棉花，置於塑膠袋內經8—10°C之低溫處理一星期，可增加癒合組織誘導率一倍，而將花藥切取後放置培養基上再行低溫處理之效果較不顯著<sup>(28)</sup>，若和改良培養基配合使用，則具累加之效果<sup>(23)</sup>；這些結果使我們相信水稻小孢子由配子體轉變為孢子體發育，並不需特別的養分，可能只要某種特殊之物理化學處理即可達成。低溫可提高花藥培養單倍體形成的效果，原因至今未明。Dollmantel and Reinert 指出花藥小孢子內荷爾蒙間的平衡決定癒合組織或胚狀體誘導之難易。而低溫處理所引起的效應，可能與改變小孢子分裂特性而有利於癒合組織的形成<sup>(15)</sup>，或改變小孢子荷爾蒙的平衡，特別是減少ABA的含量而促使胚狀體的產生有關<sup>(16)</sup>。Nitsch及Nitsch and Norrel 認為低溫可使花粉第一次有絲分裂之紡錘絲方向改變，因而形成兩個大小相同之核，這種過程可使小孢子易於分裂形成胚狀體或癒合組織<sup>(24,25)</sup>；Vasil and Nitsch 解釋為低溫可引起花藥內代謝活性的減低，而使大量小孢子停留於轉變為孢子體的過程<sup>(30)</sup>。對於菸草及曼陀羅，Duncan and Heberle 及 Sunderland 認為低溫延遲了花粉劣變及退化的過程，使較多花粉具有分裂能力，導致胚狀體之形成<sup>(16,27)</sup>。Wenzel *et al.* 認為裸麥花藥於第一次花粉有絲分裂前的低溫處理，阻止了澱粉粒合成，這種情形促使幼齡而未空泡化的小孢子發育至有絲分裂期，而產生許多正處於發育及培養適期的小孢子<sup>(33)</sup>；Chen *et al.* 則以為低溫可停止基因的作用，或有抑制類似酵素等基因產物之功能，這些產物與配子體的發育有關<sup>(8)</sup>。低溫對有絲分裂及減數分裂的影響早為世人所知，但其生化效應需更詳細的研究，方足以解開低溫有益於花藥培養單倍體產生之謎。

低溫處理在水稻已被證實確有提高花藥癒合組織形成能力的效果，但就本試驗進行長時間的低溫處理發現，各時期小孢子對低溫處理的反應頗不一致（表2），中單核期小孢子，在低溫處理超過14天後，就失去提高癒合組織形成能力的效果，而較長時間的低溫處理（21天），反可使含晚單核期小孢子有較高的誘導率。此結果顯示，花藥培養前長時間的低溫處理，可使小孢子最適培養期由中單核期轉移至晚單核期。提高培養基蔗糖濃度亦可使水稻花藥最適培養期由中單核期轉變為早單核期<sup>(4)</sup>，但由於低溫處理的時間很少有超過20天以上的相關報告，因此本試驗所發現的這種差異性，尚無法由其他報告加以引證比較。

以花藥培養進行實際育種工作，其前題為必需獲得足夠的綠株。綠株產生的多寡決定於癒合組織形成率及綠株之分化率。本試驗結果發現長期之低溫處理，雖能藉著培養不同小孢子時期的花藥來提高或維持其癒合組織形成能力，但不論小孢子時期為何，其分化綠苗之能力均大幅下降（表3），且分化植株中，白苗佔大部分（表4）。Genovesi and Magill 亦指出過長的低溫處理，會導致癒合組織難以分化，且形成較多之白苗<sup>(18)</sup>。禾本科作物之花藥培養，產生白苗的情形十分普遍<sup>(29)</sup>；雖有許多學者致力於白苗形成機制的探討，提出許多假說，但目前仍無一有效方法可控制。就本試驗之

育種效率而言，最佳的處理組合為經七天低溫處理之中單核期花藥（表 5）。經七天低溫處理的晚單核期小孢子，綠株分化率雖為經十四天低溫處理的 2.6 倍，但因其癒合組織形成能力只為十四天低溫處理的 0.23 倍，因此相乘之育種效率仍以十四天低溫處理較佳。

許多作物花藥培養形成的綠株常產生染色體倍數性的變異<sup>(17,27)</sup>。核融合，核內有絲分裂及核內複製均為可能的原因<sup>(21,31)</sup>，這種變異受到許多因子的影響，例如早期形成或年輕的癒合組織所誘得之植株，單倍體佔大部分，隨著癒合組織形成時間的延後及老化，則二倍體及多倍體顯著增加<sup>(6,10)</sup>。Engvild *et al.* 亦曾指出曼陀蘿花藥小孢子時期與其所誘導植株之倍數性有顯著的相關，培養小孢子發育早期的花藥，產生之胚狀體大多數為單倍體，隨著小孢子時期的延後，到雙核期則以二倍體及多倍體居多<sup>(17)</sup>。表 6 之結果亦可發現中、晚單核期小孢子所分化的綠株倍數性受低溫的影響很大，短時間低溫處理（七天以內）自然倍加之二倍體比例約佔 30%，經長期低溫處理後分化綠株單倍體佔大部分，此結果與 Tsay and Chen 報導低溫處理可使水稻花藥來源植株產生較多比例單倍體之結果極為相似<sup>(28)</sup>。由於多倍體植株在長時期低溫處理後亦有增多的趨勢，顯示二倍體的減少及單倍體的增多，並非意味著各種倍加機制受到低溫前處理之抑制，造成這種現象的原因，有待進一步研究。

由本試驗證據顯示，短期之低溫處理（七天以內），不但不會影響小孢子之接種適期，而且能有效提高育種效率，而過長之低溫處理則會導致育種效率降低。在無法避免較長時間的低溫保存（21 天以內）情形下，接種晚單核期小孢子之花藥，可以減緩育種效率的降低，而超過 21 天以上之低溫處理則應盡量避免。另一方面因經 14 天低溫處理，晚單核期小孢子所分化之綠株多為單倍體，為能有效利用這些材料以進行育種，發展高效率之染色體人工倍加技術實刻不容緩。

### 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. Chaleff, R. S. and A. Stolarz. 1982. The development of anther culture as a system for in vitro mutant selection. *In Rice Tissue Culture Planning Conference.* pp. 63-74. Intl. Rice Res. Inst. Los Banos, Laguna, Philippines.
3. Chen, C. C. 1977. In vitro development of plants from microspore of rice. *In Vitro* 13(8):484-489.
4. Chen, C. C. 1978. Effect of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Sci.* 18 : 905-906.
5. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1979. A method for anther culture of rice. *TCA Manual* 5(2) : 1051-1053.
6. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1980. Change in chromosome number in microspore callus of rice during successive subculture. *Can. J. Genet. Cytol.* 22 : 607-614.
7. Chen, C. C. 1982. Toward utilization of anther culture in rice breeding. *In Proceeding of a symposium on plant breeding.* (Hsieh, S. C. and Liu, D. J. eds.) pp. 81-87. Agri. Assoc. of China. Taiwan, ROC.
8. Chen, C. M., C. C. Chen and M. H. Lin. 1982. Genetic analysis of anther derived plants of rice. *J. Hered.* 73 : 49-52.
9. Chen, J. J. and H. S. Tsay. 1984. The callus forming ability of rice anther originated from tillers of different order and from spikelets of different position and branches on the panicles. *J. Agric. Res. China.* 34(4) : 354-362.
10. Chen, J. J., L. J. Chen and H. S. Tsay. 1984. Relationship between the time of callus initiation, callus age and the ability of organ regeneration from rice anther culture. *J. Agric. Assoc. China.* 126 : 2-9.
11. 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. (Fujiwara, A. ed.) pp. 551-552. The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo.*
12. 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 (Fujiwara, A. ed.) pp. 559-560. The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo.*
  13. Clapham, D. 1971. In vitro development of callus from the pollen of *Loium* and *Hordeum*. *Z. Pflanzenzucht.* 65 : 285-292.
  14. Cornejo-Martin, M. J. and E. Primo-Millo. 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 30 : 541-546.
  15. Dollmantel, C. and J. Reinert. 1980. Auxin level, antiauxin and androgenic plantlet formation in isolated pollen culture of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 103 : 155-162.
  16. Duncan, E. J. and E. Heberle. 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspore of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90 : 173-177.
  17. Engvild, K. C., I. Linde-Laurden and A. Lundquist. 1972. Anther culture of *Datura innoxia*: flower bud stage and embryoid level ploidy. *Hereditas* 7 : 331-332.
  18. 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 : 237-245.
  19. Genovesi, A. D. and G. B. Collins. 1982. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22 : 1137-1144.
  20. Heberle, E. and J. Reinert. 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: Dependence upon pollen development. *Protoplasma* 99 : 237-245.
  21. Hsu, S. C. and C. C. Chen. 1977. Studies on the anther culture of rice origin of the anther-derived diploid plant. *Natl. Sci. Council. Mon.* 5 : 839-843.
  22. Hu, C., S. C. Huang, C. P. Ho, H. C. Liang, C. C. Chuang and L. P. Peng. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. *In Proc. Symp. Plant Tissue Culture.* pp. 87-95. Peking Science Press.
  23. Lin, S. L. and H. S. Tsay. 1984. Effect of cold treatment on rice anther culture. *J. Agric. Assoc. China* 127 : 8-17.
  24. Nitsch, C. 1974. Pollen culture—a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. *In Haploids in Higher Plants—Advances and Potential.* (Kasha, K. ed.) pp. 123-135. Guelph Univ. Guelph. Canada.
  25. Nitsch, C. and B. Norrel. 1973. Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* culture dans l'anthere ou isole de l'anthere. *C. R. Acad. Sci. D.* 276 : 303-306.
  26. Oono, K. 1981. In vitro methods applied to rice. *In Plant tissue culture method, and application in agriculture.* (Thorpe, T. A. ed.) pp. 273-289. Academic Press.
  27. Sunderland, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. *In Proc. Symp. Plant Tissue Culture.* pp. 65-86. Peking. Science press.
  28. Tsay, H. S. and L. J. Chen 1984. The effect of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. *J. Agri. Res. China* 33(1) : 24-29.
  29. Tsay, H. S. 1986. Improvement of cereal crops through anther culture. *J. Agri. Assoc. China* 134 : 1-23.
  30. Vasil, I. K. and C. Nitsch. 1975. Experimental production of pollen haploids and their uses. *Z.*

- Pflanzenphysiol. Bd. S. 76 : 191-212.
31. Wilson, H. M., G. Mix and B. Foroughi-wehr. 1978. Early microspore division and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anther of *Hordeum Vulgare* L. J. Exp. Bot. 29 : 227-238.
  32. 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. ACTA Bot. Sinica 16 : 43-53.
  33. Wenzel, G., F. Hoffmen and E. Thomas. 1976. Heterozygous microspore-derived plants in rye. Theor. Appl. Genet. 48 : 205-208.
  34. 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. (Fujiwara, A. ed.) pp. 531-532. The Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo.

# Influence of Cold Shock Treatment and Microspore Developmental Stage on Rice Anther Culture<sup>1</sup>

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

## Summary

The base of rice panicles with microspores at different developmental stages were wrapped with moist tissue paper and kept at 10°C for various durations to test the effect of cold shock on callus formation, organ regeneration and chromosome distribution among regenerated plantlets in rice anther culture. Experimental results indicated that culture efficiency of anther increased significantly from cold shock pretreatment. For treatment over two weeks, anther activity could be maintained longer when the moist tissue paper was changed periodically.

Callus formation ability increased one-fold for anthers with microspore at mid-uninucleate stage receiving cold shock for 7 days. However, best result was obtained from anthers with microspore at late-uninucleate stage pretreated by cold shock for 14 days. Nevertheless, callus formation ability reduced for anthers pretreated by cold shock longer than 21 days, regardless of the developmental stage of microspores.

Anthers receiving 7 days cold shock rendered callus which originated from microspores at tetrads stage lost their regeneration ability. A stimulate effect on organ differentiation was observed for callus induced from late-uninucleate microspores in spite of the increase in percentage of albino plants. Production of green plants decreased significantly when cold shock pretreatment was longer than 14 days.

Culturing anthers with mid-uninucleate microspore in combination with cold shock pretreatment for 7 days resulted in the highest breeding efficiency. Breeding efficiency could be maintained from the anther with microspores at late-uninucleate stage treated by cold shock for 14 days. Over 21 days of cold shock treatment caused anthers no longer suitable for culturing as breeding efficiency decreased to below 3%.

---

1. Contribution No. 1416 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Senior Agronomist, former Assistant and Assistants of Agronomy Department, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan 41301, ROC.