

イネ薬培養におけるカルス誘導培地と再分化培地の検討

島田多喜子*・大谷基泰・生田陽子

(石川県農業短期大学)

要旨: イネ育種に薬培養技術を効率的に用いるための薬培養培地を決定した。カルス誘導培地には、N 6 基本培地 (N 6 無機塩, glycine 2.0 mg L^{-1} , thiamine HCl 1.0 mg L^{-1} , pyridoxine HCl 0.5 mg L^{-1} , nicotinic acid 0.5 mg L^{-1}) に蔗糖 70000 mg L^{-1} および 2,4-D 4 mg L^{-1} を添加し、寒天 8000 mg L^{-1} で固形としたものが、供試したすべての品種で効果的であった。再分化培地は、LS 基本培地 (LS 無機塩, thiamine HCl 0.4 mg L^{-1} , inositol 100 mg L^{-1}) に蔗糖 30000 mg L^{-1} , ソルビトール 30000 mg L^{-1} , CH (casein hydrolysate) 2000 mg L^{-1} , kinetin 1.0 mg L^{-1} , NAA 2.0 mg L^{-1} , MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) 1000 mg L^{-1} を添加し、گرانガム 4000 mg L^{-1} で固形としたものが最も効率的に植物体を再生した。

キーワード: イネ薬培養, カルス形成培地, 再分化培地, 日本稲。

日本のイネ育種において薬培養技術はひろく用いられている。石川県においても 1984 年からイネ育種過程に薬培養をとりいれてきている (小牧・島田 1996)。効率よく倍加半数体を得るためには、薬培養培地が重要であることはいうまでもなく、多くの研究グループによって種々の培地が検討されてきている (Chen ら 1991)。我々は、イネ花粉からカルスを誘導し、カルスを再分化培地に移植して植物体を得るという二段階法を用いている。ここでは、石川県で育種素材としてよく利用される品種とそれらの F_1 を用いて、最も有効なカルス誘導培地と再分化培地を選択した。それらの培地を用いることによって、安定して倍加半数体を得ることができ、石川県におけるイネ育種に薬培養が定着している。

材料と方法

石川県農業短期大学の圃場で栽培されている日本稲の 4 品種 (コシヒカリ, 能登ひかり, 山田錦, 大正糯), F_1 -17 (初星/あきたこまち), および F_1 -50 (石川 14 号/東北 143 号) を用いた。葉耳間長 3~8 cm の穂を採取し, 8°C , 7 日間の低温処理を行った。1 核期中期から後期の小胞子を有すると考えられる薬を用い, 試験管 ($18 \times 100 \text{ mm}$) 当たり 18 薬をカルス誘導培地に置床し, 26°C , 暗黒条件下で培養した (小澤ら 1998)。

カルス誘導培地は, 4 種類 (C-1, 2, 3, 4) を試験した (第 1 表)。C-1 および C-2 は, N 6 基本培地 (Chu 1978) に 2, 4-D がそれぞれ 2 mg L^{-1} および 4 mg L^{-1} 加えられている。C-3 は, N 6 基本培地のビタミン類を変更し, Inositol (100 mg), LH (lactalbumin hydrolysate (500 mg L^{-1})) を添加し, 2, 4-D 2 mg L^{-1} 加えられたものである。C-4 は, 半量の N 6 培地の無機塩にジャガイモ抽出液を加え, 2, 4-D の濃度は 2 mg L^{-1} である。蔗糖の濃度は, C-1 および C-2 では 70 g L^{-1} であり, 他は 60 g L^{-1} である。ジャガイモ抽出液は, 培地 1000 mL につき 200 g のジャガイモの煮汁から調整した (島田・大谷 1988)。

再分化培地は, 4 種類 (R-1, 2, 3) を試験した (第 2 表)。R-1 と R-2 は, N 6 基本培地に kinetin 1 mg L^{-1} , NAA 0.5 mg L^{-1} , CH (casein hydrolysate) を 100 mg^{-1} 添加したもので, 固形剤としてそれぞれ寒天 8000 mg L^{-1} と gellan gum 2500 mg L^{-1} を加えた。R-3 では LS 培地 (Linsmaier and Skoog 1965) を基本培地とし, CH 2 g L^{-1} , kinetin 1 mg L^{-1} , NAA 2 mg L^{-1} , ソルビトール 30000 mg L^{-1} , MES (2-(N-monopholino) ethanesulfonic acid) 1000 mg L^{-1} を添加し, gellan gum 4000 mg L^{-1} で固形培地とした。カルス誘導培地とも, 1 N NaOH で pH 5.8 に調整した。各小胞子由来カルスを 1 本の試験管 ($18 \times 100 \text{ mm}$) 中の再分化培地に置床し, 26°C , 16 時間照明 ($38 \mu \text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 下で培養した。

カルス誘導培地に置床して 1 カ月目にカルスを形成した薬数を調査し, カルスを再分化培地に移植した。再分化培地上で 1 カ月培養後, 緑色植物体とアルビノ植物体の再生を調査し, カルス当たりの再分化率を求めた。

結 果

1. カルス誘導培地

各品種の薬各々 1300 以上を 4 種類のカルス誘導培地に置床し, カルスを形成した薬の割合をカルス形成率とした。結果を第 1 図に示す。カルス形成率は品種による違いがあり, 大正糯が最もカルス形成率が高く, 全ての培地で 20% 以上の薬でカルスを形成した。山田錦が最も低く, 5.6% から 12.8% の薬がカルスを形成した。4 種類の培地を比較すると, C-2 培地が最も効果的で, 全ての品種で最も高いカルス形成率を示した。2, 4-D の濃度が 4 mg L^{-1} と高いことが花粉からのカルス形成に効果的であることが明らかであった。山田錦以外の 5 品種では, C-3 培地は, C-1 よりカルス形成率が高く, ビタミン類とアミノ酸類の添加がカルス誘導に効果があることを示した。培地の無機塩の半量をポテトの抽出液に置き換えた C-4 培地は, 品種間差異があるが, 全体として C-1 培地と同程度のカルス誘

第1表 イネ花粉カルス誘導培地の組成 (mgL⁻¹).

	C-1	C-2	C-3	C-4
KNO ₃	2830	2830	2830	1415
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	463	463	231.5
KH ₂ PO ₄	400	400	400	200
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	166	166	166	83
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	185	185	185	92.5
Fe-EDTA	42.1	42.1	42.1	21
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	4.4	4.4	4.4	2.2
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1.5	1.5	1.5	0.8
H ₃ BO ₃	1.6	1.6	1.6	0.8
KI	0.8	0.8	0.8	0.4
Glycine	2.0	2.0	—	—
Thiamine · HCl	1.0	1.0	10.0	—
Pyridoxine · HCl	0.5	0.5	1.0	—
Nicotinic acid	0.5	0.5	—	—
Inositol	—	—	100	—
LH ¹⁾	—	—	500	—
CH ²⁾	—	—	200	—
2,4-D	2.0	4.0	2.0	2.0
Potato extract	—	—	—	20%
Sucrose	70000	70000	60000	60000
Agar	8000	8000	8000	8000

1) Lactalbumin hydrolysate.

2) Casein hydrolysate.

導率を示した。ポテト抽出液は、コムギ葯培養で効果的であったが（島田・大谷 1988）、イネ葯培養では顕著な効果は認められず、効果的ではなかった。

2. 再分化培地

4種のカルス誘導培地で形成されたカルスを再分化培地に移植後、1カ月目に緑色植物あるいはアルビノ植物を形成したカルスを調査した。カルス誘導培地の再分化率への影響は見られなかったため、まとめた結果を第3表に示す。緑色およびアルビノ植物の両方を再生したカルスもある。

第2表 再分化培地の組成 (mgL⁻¹).

	R-1	R-2	R-3
無機塩	N 6	N 6	LS
ビタミン類	N 6	N 6	LS
CH ¹⁾	1000	1000	2000
NAA	0.5	0.5	2.0
kinetin	1.0	1.0	1.0
MES ²⁾	—	—	1000
sucrose	50000	50000	30000
sorbitol	—	—	30000
Agar	8000	—	—
Gellan gum	—	4000	4000

1) casein hydrolysate

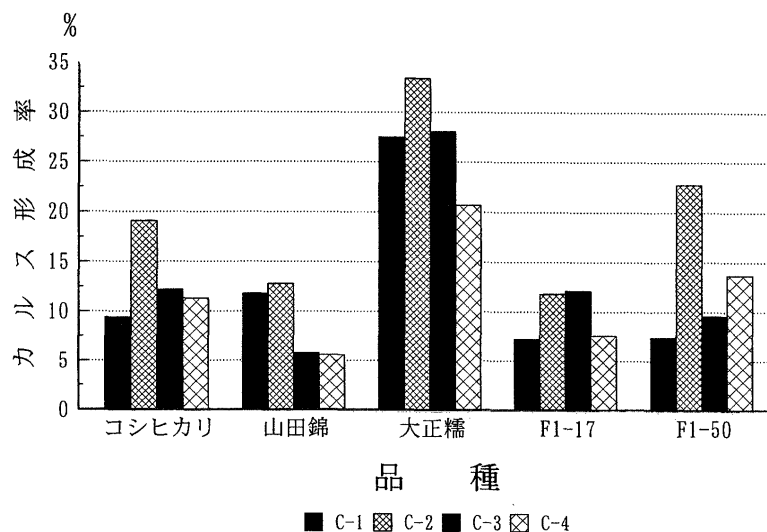
2) 2-(N-monopholino) ethanesulfonic acid

り、それは二重に測定された。

再分化率に関して顕著な品種間差異はなく、25%から84%のカルスが緑色植物を再生し、5%から53%のカルスがアルビノ植物を再生した。再分化培地による再生率には差異があった。R-1に比べてR-2の方が緑色植物再分化率が高く、培地の固形剤として寒天を用いるよりゲランガムを用いる方が再分化に効果的であることが示された。また、R-2とR-3を比較すると、概してR-3の方が緑色植物再分化率が高く、能登ひかりでは、R-3培地で84.6%のカルスが緑色植物を再生した。R-3培地は、アルビノ植物の再生率も高く、再分化に効果的であると考えられる。

考 察

イネ葯培養における花粉からのカルス誘導培地の基本培地としてN 6あるいはポテト抽出液を用いて、植物ホルモンとして2種類の濃度の2,4-Dの効果を試験した。その結果、N 6基本培地に2,4-Dが4 mg L⁻¹添加された培地がいずれの品種でも最もカルス形成率が高いことが明らかとなった。イネ花粉からのカルス形成率向上に対して



第1図 イネ5品種の4種のカルス誘導培地 (C-1, C-2, C-3, C-4) における花粉カルス形成率。

第3表 3種類の再分化培地におけるイネ花粉カルスからの再分化。

品種	再分化培地	移植カルス数	緑色植物再生 カルス数 (%)	アルビノ植物再生 カルス数 (%)
コシヒカリ	R-1	107	27 (25.2)	1 (0.9)
	R-2	599	153 (25.5)	30 (5.0)
	R-3	383	102 (26.6)	50 (13.1)
能登ひかり	R-2	50	29 (58.0)	21 (42.0)
	R-3	39	33 (84.6)	21 (53.8)
山田錦	R-2	90	23 (25.6)	16 (17.8)
	R-3	103	35 (34.0)	21 (20.4)
F ₁ -17	R-1	70	15 (21.4)	7 (10.0)
	R-2	202	65 (32.2)	11 (5.4)
	R-3	394	101 (25.6)	22 (5.6)
F ₁ -50	R-2	566	140 (24.7)	76 (13.4)
	R-3	421	227 (53.9)	145 (34.4)

種々の要素が考えられ、また、それぞれの品種に、それぞれ最適な培地があることも考えられるが、ここではC-2培地がいずれの品種でも最もカルス形成率が高いことが明らかとなった。従って、種々の品種を扱う育種の現場で種々の品種間のF₁の薬培養を行うにあたって、この培地が有効であると結論し、以後、F₁の薬培養にこの培地を用いている。イネ花粉からのカルス誘導には2 mg L⁻¹の2,4-Dが効果的とされている (Chenら 1991)。しかし、品種によって最適濃度が異なっている可能性があり、日本稲品種では、4 mg L⁻¹が効果的という結果になったと考えられる。一方、2,4-Dの濃度が高いことは、培養変異を誘発する可能性を高めると危惧される。新関ら (1989) は、2,4-Dが2 mg L⁻¹含まれた培地で培養して得られたコシヒカリ薬培養由来倍加半数体の約30%が何らかの変異をしていることを観察している。また、ここで選抜した薬培養培地 (2,4-D 4 mg L⁻¹) によって得られた倍加半数体の次代で、数%の分離が見られる (中村ら 1998)。しかし、これが、2,4-Dの濃度が原因であるかどうかは分からない。

ここで試験したR-3再分化培地は、イネ種子カルスからの再分化に最も効果的と報告されている培地を一部改変したものである (塚原・広澤 1990)。高濃度 (4 g L⁻¹) のゲランガムとソルビトールの添加がイネカルスからの再分化に効果的であるといわれているが (Tsukahara and Hirosawa 1992)、花粉由来カルスの再分化においても、その効果が高いと考えられる。カルスからの植物体再分化率が高くなり、アルビノ植物の再生も多くなるが、緑色植物再生も盛んであるため、以後、我々はこの再分化培地を用いている。

我々は、石川県農業総合研究センターと共同で、石川県のイネ育種事業に薬培養を用いており、毎年20以上のF₁の薬培養をここで決定された薬培養培地および再分化培地を用いて行っている。再分化した緑色植物のうち、約半数が自然倍加半数体である (小牧ら 1998)。両親の組合せに

より、また、年次により変動があるものの、これらの培地を用いることにより、かなり安定した量の倍加半数体を得られ、毎年各F₁につき100個体以上の倍加半数体を育成し、以後の選抜に供している。

謝辞: とりまとめにあたり、石川県農業総合研究センターの小牧正子博士から貴重なご意見を賜った。

引用文献

- Chen, C.C., H.S. Tsay and C.R. Huang 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In Y.P.S. Bajaj ed., Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 14 Rice. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 193—215.
- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Peking. 51—66.
- 小牧正子・島田多喜子 1996. イネ育種における薬培養. 農業と科学 9月号: 6—10.
- 小牧正子・島田多喜子・大谷基泰・小澤隆司・中村啓二・黒田晃・東真理子・吉秋斎・松本範裕 1998. 水稻育種におけるF₁薬培養の利用 過去8年間のとりまとめ. 石川県農業試験場報告 印刷中.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. *Physiol.Plant.* 18: 100—126.
- 中村啓二・小牧正子・黒田晃・大谷基泰・東真理子・島田多喜子 1998. イネ薬培養で得た倍加半数体 (A₂世代) の分離. 北陸作物学会報 34(別号): 36—37.
- 新関宏夫・島田多喜子・木庭卓人・大谷基泰 1989. 薬培養により得られたイネの突然変異体. 石川県農業短期大学農業資源研究所報告 1: 1—7.
- 小澤隆司・小牧正子・大谷基泰・島田多喜子 1998. イネの薬培養において培養期間の長短とカルスの大きさが植物体再分化に及ぼす影響. 北陸作物学会報 33: 13—16.
- 島田多喜子・大谷基泰 1998. 日本のコムギ品種の薬培養における胚状体形成へのポテト培地の有効性. 育種学雑誌 38: 212—222.
- 塚原正義・広澤孝保 1990. イネ培養細胞からの効率的植物再生. 育種学雑誌 40(別2): 54—55.

Tsukahara, M. and T. Hirosawa 1992. Characterization of factors affecting plantlet regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) callus. Bot.Mag. Tokyo 105 : 227—233.

Investigation of the Callus Induction Medium and the Regeneration Medium in Rice Anther Culture : Takiko SHIMADA*, Motoyasu OTANI and Yoko IKUTA (*Res. Inst. Agr. Resources, Ishikawa Agr. College, Nonoichi 921-8836, Japan*)

Abstract : We determined the callus induction medium and the regeneration medium to efficiently utilize the anther culture technique in rice breeding. The medium containing N6 basal medium supplemented with 4 mg L⁻¹ of 2,4-D effectively induced calli from microspores of some japonica varieties and two F₁ hybrids with japonica varieties. The regenerated plants containing green and/or albino shoots were produced efficiently from microspore-derived calli on the regeneration medium containing LS basal medium supplemented with sorbitol (30000 mg L⁻¹), CH (2000 mg L⁻¹), MES (1000 mg L⁻¹), NAA (2 mg L⁻¹), and kinetin (0.5 mg L⁻¹) solidified by gellan gum (4000 mg L⁻¹).

Key words : Callus induction medium, Japonica rice, Regeneration medium, Rice anther culture.
