

イネ薬培養の効率化

荒木誠士・田中正美・小代寛正

I 緒言

平成元年の農研センター開設と同時に、熊本ブランド米を目指してイネの育種が開始された。育種手法として、従来の交配育種法に加えて、薬培養法が育種年限の短縮のため新たに導入された。

イネの薬培養法は、Niizeki, H and Oono⁶⁾によって初めて成功した培養法であり、開花前の一定のステージの花粉を持つ薬を無菌的に培養し、半数性である花粉由来のカルスを経由して植物体を獲得する手法である。

薬培養法により得られた植物体は薬中の花粉由来であるため、形質がすでに固定されており、育種年限の短縮が期待される⁷⁾。しかし、花粉からカルス形成を経ての再分化率が1%前後であり、品種間差が存在し^{8) 9)}、重要な育種目標である良食味を念頭に置いたとき、コシヒカリ及びコシヒカリを親に持つヒノヒカリ等の系統では特に再分化が問題になっている。また、葉緑体を欠しアルビノ個体が高頻度に出現する。さらに、再分化した緑色個体にも種子を結実しない半数体が多く発生する。そのため、実際に利用できる2倍体の割合が低いなど改善点が多い。

そこで、再分化率と培養作業の向上のため、培養素材や培養法及びその培地組成等について、平成元年から平成7年にかけて試験し、一定の成果が得られたので報告する。

なお、本研究は、イネ薬培養の世界的権威である新関宏夫博士を当農業研究センターの特別研究員として、平成元年から平成4年に招聘し開始した。この間、博士には多くの示唆と適切なご指導を頂いたことに、深く感謝の意を表す。また、本報告書をまとめるに当たり、御助言とご校閲を頂いた当農業研究センター農産園芸研究所の特別研究員朝日幸光、栢村鶴雄の両氏に感謝する。

II 材料及び方法

1 培養前条件の検討

1) 交配組み合わせによる再分化率の系統間差

コシヒカリ、旭1号等8品種を正逆交配し、培養に

供試した。

- (1) 供試品種：あきたこまち、旭1号、あそみのり、アリアケ、コシヒカリ、初星、はなの舞、ユメヒカリ
- (2) 培養法：2段階培養法
- (3) 培地：第1表参照
- (4) 穂の低温処理：10℃、10~14日間
- (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

第1表 培地組成-1

培地種類	基本培地	ホルモン濃度 (mg/l)				糖類 3糖 (g/l)	支持体 グルタミン酸 寒天 (%)	
		IAA	NAA	kinetin	ABA		グルタミン酸	寒天
脱分化	N ₆ -Y ₁	-	2	0.2	4	50	-	0.8
再分化	N ₆ -Y ₁	0.2	-	1	-	30	0.4	-
苗化	N ₆ -Y ₁	-	-	-	-	30	0.3	-

基本培地組成は第21表に示す(以下同じ)。

2) 栽培環境の影響

昼温及び夜温の制御が可能である生理生態温室でコシヒカリ他4品種栽培し、栽培温度によってカルス形成率、再分化率に影響があるかどうかを検討した。

- (1) 供試品種：コシヒカリ、旭1号、山田錦、ヒノヒカリ、あきたこまち
- (2) 栽培温度：第2表参照
- (3) 培養法：2段階培養法
- (4) 培地：第1表参照

第2表 栽培時の設定温度

区分	前 期		後 期	
	昼	夜	昼	夜
1	30℃	20℃	30℃	20℃
2	30	20	30	25
3	25	15	30	20
4	25	15	30	25

前期…播種から47日目まで

- (5) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
 (6) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件
- 3) 穂の採取適期の検討
 イネ品種と葉耳間長について、葉耳間長別に葍培養を行い、カルス形成率について検討した。
- (1) 供試品種：コシヒカリ、旭1号、山田錦、ヒノヒカリ、あきたこまち
 (2) 培養法：2段階培養法
 (3) 培地：第1表参照
 (4) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
 (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

- 4) 葍培養における低温処理期間の検討
 供試系統の長期間の低温貯蔵が可能かどうかについて次の方法で検討した。
- (1) 供試品種：F₁系統3品種
 (2) 培養法：2段階培養法
 (3) 培地：第3表参照
 (4) 穂の低温処理：10℃、10～28日間
 (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

第3表 培地組成-2

培地種類	基本培地	ホルモン濃度 (mg/l)				糖類 (g/l)		支持体 ゲルライト (%)
		IAA	NAA	kinetin	ABA	CH	Sor ショ糖	
脱分化	N ₆ -Y ₁	-	2	0.2	4	-	50	0.2
再分化	N ₆ -Y ₁	0.2	-	1	-	2.0	35	0.4
苗化	N ₆ -Y ₁	-	-	-	-	-	30	0.3

CH：カゼイン加水分解物、Sor：ソルビトール

2 2段階培養法の検討

1) 脱分化培地の検討

イネの葍培養に効果があると報告されたカゼイン加水分解物 (CH)¹⁾、プロリン、ヘチマ水¹¹⁾等の添加物、ABA等のホルモン組成、培地支持体の種類などの効果について以下の方法で検討した。

- (1) 供試品種：コシヒカリ
 (2) 培養法：2段階培養法
 (3) 培地：
 ア) 脱分化培地：第4表参照
 イ) 再分化培地：N₆-Y₁培地、kinetin 1 mg/l、IAA 0.2 mg/l、CH 2 g/l、ショ糖30 g/l、ソルビトール35 g/l、ゲルライト0.4%

ウ) 苗化培地：N₆-Y₁、ショ糖30 g/l、ゲルライト0.3%

- (4) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
 (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

第4表 脱分化培地の組成

培地記号	ホルモン (mg/l)				添加物 (g/l)			支持体 (%)	
	2,4-D	NAA	ABA	kinetin	CH	Pro	HE	ゲルライト	寒天
CP	2	-	-	-	0.3	1	-	0.2	-
CPA	2	-	2	-	0.3	1	-	0.2	-
CH	2	-	-	-	2	-	-	0.2	-
CHA	2	-	2	-	2	-	-	0.2	-
CA	-	2	4	0.2	-	-	-	-	0.8
HE	-	2	4	0.2	-	-	15	-	0.8

基本培地：N₆-Y₁、ショ糖50 g/l、CH：カゼイン加水分解物、Pro：プロリン、HE：ヘチマ水

2) 再分化培地の検討

イネの種子カルスからの再分化に効果が見られた⁵⁾カゼイン加水分解物及びソルビトールの添加効果について検討した。

- (1) 供試品種：F₁ 11系統
 (2) 培養法：2段階培養法
 (3) 培地：

ア) 脱分化培地：N₆-Y₁培地、kinetin 0.2 mg/l、ABA 4 mg/l、CH 2 g/l、ショ糖50 g/l、寒天0.8%

イ) 再分化培地：第5表参照

- (4) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
 (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

第5表 再分化培地の組成

培地番号	基本培地	ホルモン (mg/l)		添加物 (g/l)	糖類 (g/l)		支持体 (%)
		kinetin	IAA		CH	ショ糖	
NY	N ₆ -Y ₁	1.0	0.2	-	30	-	0.2
CHS	N ₆	1.0	0.2	2	30	35	0.4

CH：カゼイン加水分解物、Sor：ソルビトール

3) 再分化培地の支持体の影響

再分化培地の支持体としてのゲルライト濃度について検討した。

- (1) 供試品種：コシヒカリ他F₁系統5品種
 (2) 培養法：2段階培養法
 (3) 培地：

ア) 脱分化培地: $N_6 - Y_1$ 培地、 $2i$ 、 $4-D$ $2mg/l$ 、
 CH $2g/l$ 、 $シヨ糖$ $50g/l$ 、
 $ゲルライト$ 0.2%

第6表 再分化培地の組成

培地 番号	基本 培地	ホルモン濃度		添加物 CH (g/l)	糖類		支持体 ゲルライト (%)
		kinetin (mg/l)	IAA (mg/l)		シヨ糖 (g/l)	Sor (g/l)	
1	$N_6 - Y_1$	1	0.2	-	30	30	0.6
2	$N_6 - Y_1$	1	0.2	2	30	30	0.2
3	$N_6 - Y_1$	1	0.2	2	30	30	0.4
4	$N_6 - Y_1$	1	0.2	2	30	30	0.6
5	$N_6 - Y_1$	1	0.2	2	30	30	0.8

CH: カゼイン加水分解物、Sor: ソルビトール

イ) 再分化培地: 第6表参照

- (4) 穂の低温処理: $10^{\circ}C$ 、 $10\sim 14$ 日間
(5) 培養条件: $26^{\circ}C$ 、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

3 1段階培養法における培地の検討

1) 基本培地及び添加物の検討

基本培地及び添加物の効果は次の方法で検討した。

- (1) 供試品種: ヒノヒカリ及びF₁系統
(2) 培養法: 1段階培養法
(3) 培地: 第7表参照

基本培地 $N_6 - Y_1$ 、 R_2B_5 、 $1/4R_2B_5$ 、
 $1/3N_6$

ホルモン ABA $2mg/l$ 、カイネチン $5mg/l$

添加物 カゼイン加水分解物 $2g/l$ 、

アラニン $1g/l$ + アスパラギン
 $1g/l$

- (4) 穂の低温処理: $10^{\circ}C$ 、 $10\sim 14$ 日間

- (5) 培養条件: $26^{\circ}C$ 、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

2) 培地の窒素形態と濃度

培地の窒素形態と濃度の最適な条件を求めるため、
 R_2B_5 培地のアンモニア態窒素及び硝酸態窒素の濃度

第7表 1段階培養法の培地組成-1

培地 記号	基本 培地	窒素成分				マロ成分 (窒素以外) 希釈 倍	ホルモン濃度				培地添加物			糖類		支持体	
		$(NH_4)_2SO_4$ 濃度 (mg/l)	希釈 倍	KNO_3 濃度 (mg/l)	希釈 倍		2,4-D	NAA	ABA	kinetin	CH	Asp	Gln	シヨ糖	Sor	Ag	Gr
a	N_6	463	1/1	2830	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	YE+Gly+Trp*1	70	-	0.8	-		
b	$N_6 - Y_1$	232	1/2	2830	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	0.8	-
c	$N_6 - Y_1$	232	1/2	2830	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
d	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	-	2	-	-	70	-	-	0.6
e	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	0.5	-	2	-	-	70	-	-	0.6
f	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
L	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	-	2	1	1	30	30	-	0.6
M	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	5.0	2	-	-	30	30	-	0.6
L+M	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	5.0	2	1	1	30	30	-	0.6
N6/3	N_6	154	1/3	943	1/3	1/3	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6

*1: 酵母エキス $1g/l$ + グリシン $20mg/l$ + トリプロファン $20mg/l$

CH: カゼイン加水分解物、YE: 酵母エキス、Sor: ソルビトール Ag: 寒天、Gr: ゲルライト

第8表 1段階培養法の培地組成-2

培地 記号	基本 培地	窒素成分				マロ成分 (窒素以外) 希釈 倍	ホルモン濃度				培地添加物			糖類		支持体	
		$(NH_4)_2SO_4$ 濃度 (mg/l)	希釈 倍	KNO_3 濃度 (mg/l)	希釈 倍		2,4-D	NAA	ABA	kinetin	CH	Asp	Gln	シヨ糖	Sor	Ag	Gr
ア	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/4	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
イ	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
ウ	R_2B_5	84	1/4	2020	1/2	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
エ	R_2B_5	84	1/4	4040	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
オ	R_2B_5	168	1/2	1010	1/4	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
カ	R_2B_5	168	1/2	2020	1/2	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
キ	R_2B_5	168	1/2	4040	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
ク	R_2B_5	336	1/1	1010	1/4	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
ケ	R_2B_5	336	1/1	2020	1/2	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
コ	R_2B_5	336	1/1	4040	1/1	1/1	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6
サ	R_2B_5	84	1/4	1010	1/4	1/2	0.02	1.0	-	-	2	-	-	30	30	-	0.6

CH: カゼイン加水分解物、YE: 酵母エキス、Sor: ソルビトール Ag: 寒天、Gr: ゲルライト

をそれぞれ1/1、1/2、1/4に希釈し組合せた培地、さらにマクロ成分全体を1/2、1/4に減らすなど、変更の効果について検討した。

- (1) 供試品種：ヒノヒカリ
- (2) 培養法：1段階培養法
- (3) 培地：第8表参照
硝酸態窒素希釈率 1/1、1/2、1/4
アンモニア態窒素希釈率 1/1、1/2、1/4
マクロ成分希釈率 1/1、1/2、1/4
- (4) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
- (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

3) 培地支持体の濃度

1段階培養法において培地支持体であるゲルライト濃度の検討を行った。

- (1) 供試品種：4系統のF₁
- (2) 培養法：1段階培養法
- (3) 培地：R₂B₅培地 ((NH₄)₂SO₄ 84mg/l、KNO₃ 1010mg/l、2,4-D 0.02mg/l、NAA 1mg/l、酵母エキス 2g/l、ショ糖 30g/l、ソルビトール 30g/l)
- (4) ゲルライト濃度：0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%の5段階
- (5) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
- (6) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

4 薬培養の省力化の検討

450mlのマヨネーズ瓶を用い、上層に1段階培養法の培地10ml、下層に苗化培地50mlを重ねた培地を作成し、

第9表 2層培養法の培地組成

培地番号	基本培地	ホルモン Kinetin	支持体ゲルライト (%)
1	上層	1/4NR ₂ B ₅	—
	下層	N ₆ -Y ₁	—
2	上層	1/4NR ₂ B ₅	5.0
	下層	N ₆ -Y ₁	—
3	上層	1/4NR ₂ B ₅	5.0
	下層	N ₆ -Y ₁	—

上層培地組成：1/4NR₂B₅、2,4-D 0.02mg/l、NAA 1.0mg/l、CH 2g/l、ソルビトール 30g/l、ショ糖 30g/l

下層培地組成：N₆-Y₁、ショ糖 30g/l

2層培地による無移植培養法について検討した。また、ゲルライト濃度とカイネチン添加の効果を検討した。

- (1) 供試品種：F₁系統14品種
- (2) 培養法：2層培養法
- (3) 培地：第9表参照
- (4) 穂の低温処理：10℃、10～14日間
- (5) 培養条件：26℃、脱分化時は暗条件、再分化時は明条件

5 半数体の倍加

半数体固体を有効利用するためコルヒチン処理による倍加効果について検討した。

- (1) 供試材料：薬培養で得られた品種及びF₁系統、半数体から発生した、発根した側芽 (展開葉2.5～6枚)
- (2) コルヒチン濃度：500ppm
- (3) 処理方法：株もとの24時間浸漬
- (4) 栽培条件：洗浄後に水田圃場に定植

III 結果及び考察

1 培養前条件の検討

植物体の一部の組織や器官を植物本体から切り離し、人為的な環境で培養する場合、培養条件は最も重要である。しかし、同じように培養しても成否に差が生じることがある。このようなとき、培養に供した材料に問題があることが考えられる。ここでは、培養に供する材料がカルス形成や再分化に与える影響について次の4項目を検討した。

1) 交配組み合わせによる再分化率の系統間差

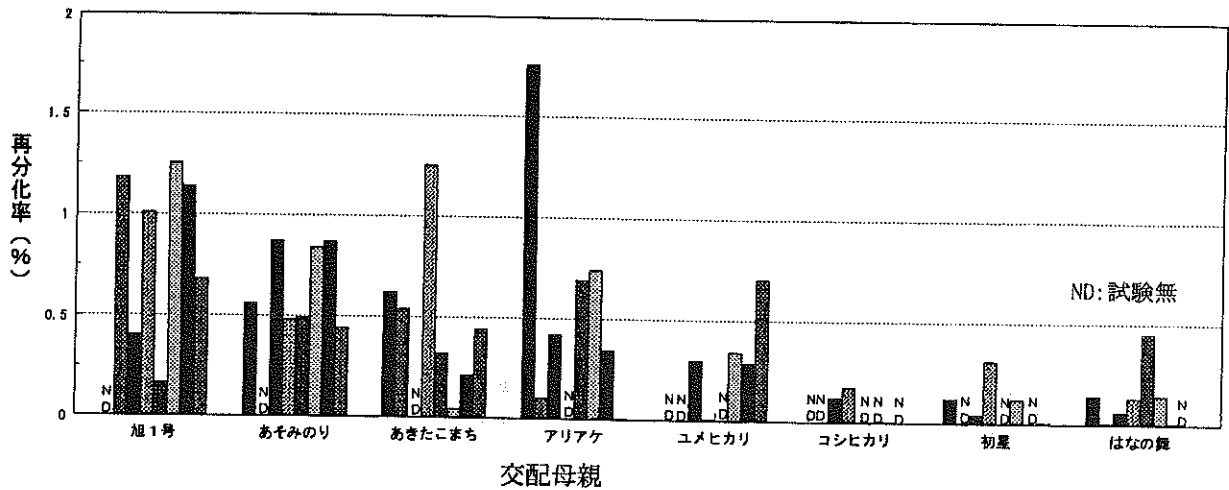
薬培養を実施する場合、品種間で再分化率に差があり、F₁を材料に利用するには、組合せ親によって再分化に差があるかどうかを確認する必要があった。

実験の結果、交雑で種子が得られないなど、供試できない組み合わせもあったが、正逆交雑で再分化率は異なった。概して、交配母本の影響が大きく、旭1号やあそみのり等の成育旺盛な品種を母本とした時に再分化はよくなる傾向が認められた。一方、コシヒカリや初星は父本として花粉親にした時に再分化率が高くなる傾向にあった(第1図)。

このことから、育種目標の形質が核または細胞質のいずれに存在するかによって、交配の方向を考慮する必要が示唆された。

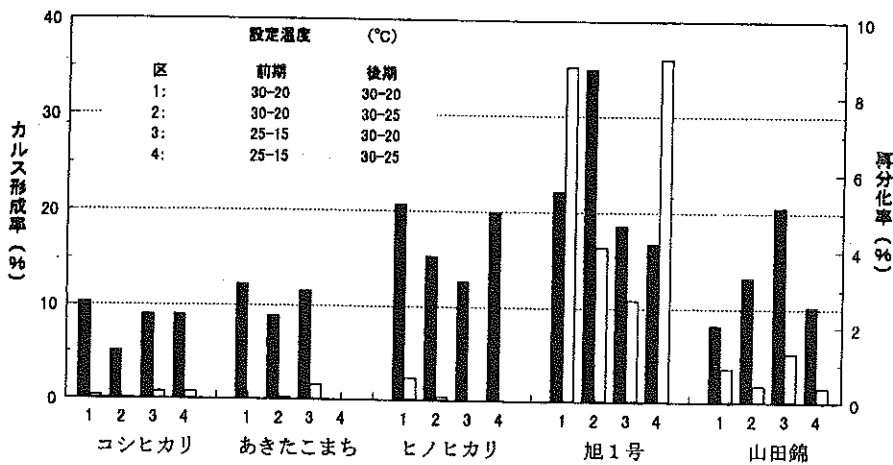
2) 栽培環境の影響

当初、薬培養の材料は、矢部試験地、高原、天草の



第1図 交配親の再分化率への影響

交配父親 ■ 旭1号 ■ あそみのり ■ あきたこまち ■ アリアケ ■ ユメヒカリ ■ コシヒカリ ■ 初星 ■ はなの舞



第2図 栽培温度の培養に対する影響

■ カルス形成率 □ 再分化率

地域研究所と農産園芸研究所の各圃場で栽培され、葉耳間長が9~10cmの穂を採取し、生物資源部に持ち込んで供試していた。しかし、同じ品種でも栽培地によってカルス形成率及び再分化率に差が生じていた。その要因の一つに栽培環境の違い、特に幼穂形成期以降の温度条件が考えられた。

実験の結果、栽培環境の違いにより、また、品種によってカルス形成率及び再分化率は著しく異なった。温度に対する反応は品種間差が認められたが、概して、後期の夜温を低温で管理した場合に、再分化率は向上する傾向がみられた(第2図)。

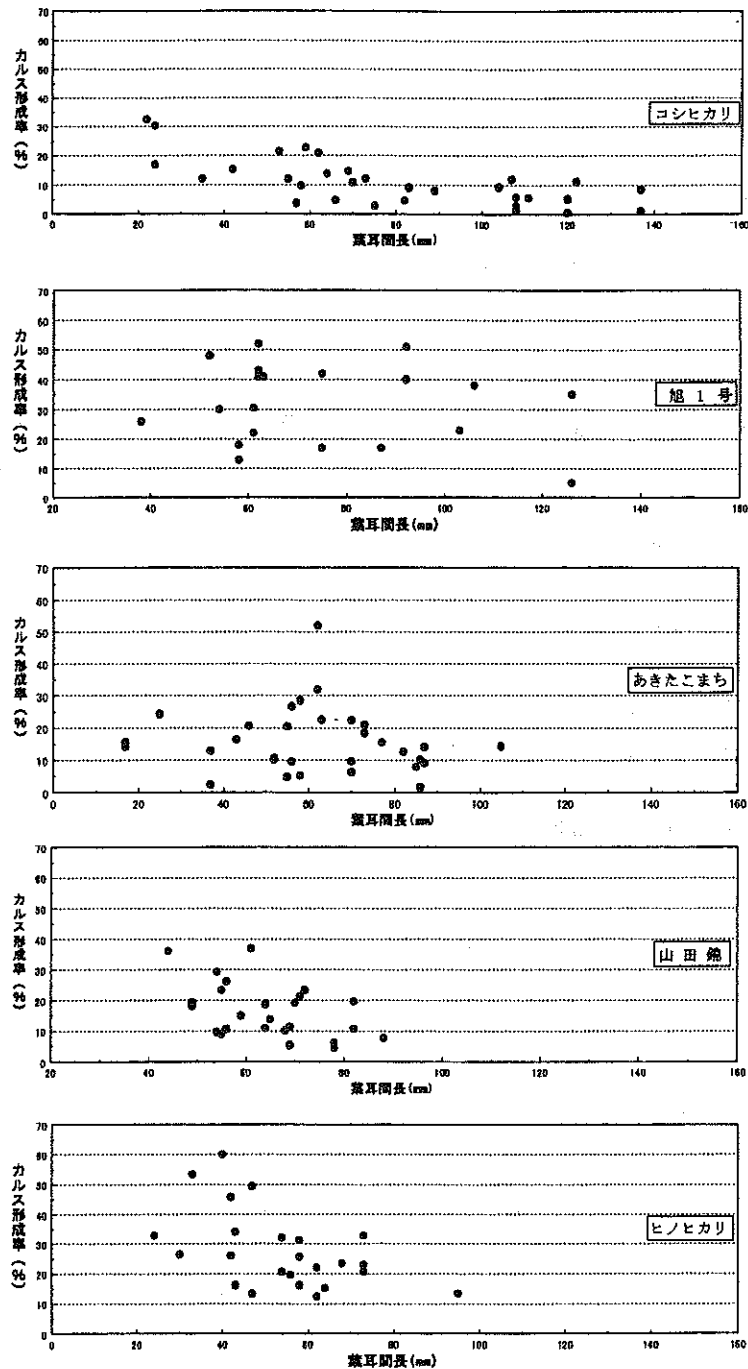
このことから、薬培養の母材栽培は、幼穂形成期以降の温度環境を考慮する必要があるものと考えられる。

3) 穂の採取時期の検討

イネの薬培養に適した花粉のステージは、1核期後期とされている。この適期の小孢子を含む薬を確認するには、顕微鏡下で観察する方法が最も確実である。しかし、育種を念頭に多数の系統を扱い、培養作業を迅速に進めるには、止葉と第1葉の間の葉耳間長を目安にして、便宜的に適期の穂を採取する方法⁹⁾が行われている。

イネの薬培養に供試する穂の葉耳間長は、通常10cm程度がよいとされていた。しかし、本実験によるカルス形成率は品種間で異なり、旭1号は5~10cm、他の品種は4~8cmで高い傾向がみられた(第3図)。

このことから、葉耳間長を目安として穂を採取する



第3図 品種別の葉耳間長とカルス形成率

場合、従来の10cmに達するより短い5~8cmの長さ、特にヒノヒカリ等の短穂系統では5~6cmで採取する方が最適と考えられるに至った。

4) 薬培養における低温処理期間の検討

薬からのカルス形成に影響を与える穂の低温処理は、通常10~14日であるが、F₁系統を材料とする場合、採取時期が不確定であり、時として大量の穂を貯蔵することになる。このような場合、長期間の貯蔵ができ

れば、薬の置床作業が無理なく効率的にできることが考えられる。

本実験では、24~28日間の長期低温処理を検討したが、通常の14日間低温処理との比較では、カルス形成率及び再分化率の低下は認められなかった(第10表)。

このことから、通常の2倍に当たる28日程度の長期間の低温保存が可能と考えられた。

以上の実験結果から、薬培養に用いる母材も、より効果的な条件を配慮する必要があるがうかがえた。

第10表 薬培養における長期間低温処理の影響

交配 番号	低温 処理 期間	薬数	カルス 形成率 (%)	再分化 個体数	再分化 率 (%)
H4004		A	B/A	C	C/A
	14	8,801	7.2	33	0.4
	17	10,437	15.1	18	0.2
	24	2,452	11.1	19	0.8
H4056	13	6,752	3.9	17	0.3
	14	12,579	10.8	51	0.4
	28	3,386	19.4	81	2.4
H4056	14	18,320	17.8	368	2.0
	28	2,328	18.1	91	3.9

すなわち、F₁を利用する場合は、目的に合わせて交雑方向を考える。

薬培養の実用場面では、気象条件、特に風雨を回避する目的で薬培養の母材栽培をハウス等の施設で行う場合が多く、幼穂形成期以降の温度環境を考慮すると、4月上旬までに播種することが有効と考えられた。

利用する穂の葉耳間長は5~6cmのものを採取し、10℃の低温処理は10~30日間の保存期間で培養に供試でき、培養作業がより計画的に実施できるようになった。

なお、長期保存の場合、期間中に2回ほど挿水を交換することが望ましかった。

2 2段階培養法の培地の検討

2段階培養法は、イネの薬培養では一般的な方法である。この方法は、カルス形成、カルスからの再分化、組織の形態と目的ごとに組成の異なる培地に移植する培養法であり、そのステージに最適な条件を創り出す必要がある。また、そのことで植物体の獲得が可能になる。

1) 脱分化培地の検討

イネの薬培養にはN₀培地(培地組成については、第21表に示す。)が広く使用されているが、効率よくカルス化するために、種々の添加物やホルモン等の使用が検討されている。

本実験では、植物体再生が劣るとされるコシヒカリの再分化率を向上させるため、脱分化培地への添加物の効果について検討した。

カゼイン加水分解物の2g/1添加はカルス形成率及び再分化率を向上させた。しかし、ABAの2mg/1添加はカルス形成率と再分化率を低下させた。また、プロリンやヘチマ水添加の効果は認められなかった(第11表)。

このことから、再分化率に低いコシヒカリに対しては脱分化培地への2、4-D 2mg/1に加えて、カゼイン加水分解物2g/1の添加が有効と考えられた。

2) 再分化培地の検討

カルスからの再分化にも種々の添加物の使用が試みられている。

本実験では、2種類の培地を検討した結果、カゼイン加水分解物2g/1とソルビトール35g/1を添加し、ゲルライトを0.4%に上げた培地で再分化率が著しく高くなり、カゼイン加水分解物とソルビトールの同時添加が有効と考えられた(第12表)。

第12表 再分化培地による再分化率の違い

培地 記号	カルス数	グリーンスポット 形成率(%)	再分化 個体数	再分化 率(%)
NY	689	39	2	0.3
CHS	689	61	82	12

第11表 薬培養における脱分化培地添加物の効果

培地 番号	ホルモン濃度				添加物			支持体		置床 薬数 A	カルス形成			再分化固体数		再分化 率(%) C/A
	2,4-D (mg/l)	NAA	ABA	kinetin	CH	Pro	HE	珪灰 (%)	寒天 (%)		数	率(%)	B	B/A	C	
CP	2	-	-	-	0.3	1	-	0.2	-	1405	241	17	1	0	0.1	
CPA	2	-	2	-	0.3	1	-	0.2	-	1106	135	12	0	0	0	
CH	2	-	-	-	2	-	-	0.2	-	1554	326	21	30	48	1.9	
CHA	2	-	2	-	2	-	-	0.2	-	1064	173	16	2	0	0.2	
CA	-	2	4	0.2	-	-	-	-	0.8	1555	220	14	1	0	0.1	
HE	-	2	4	0.2	-	-	15	-	0.8	1732	244	14	0	0	0	

CH: カゼイン加水分解物 *2 HE: ヘチマ水

3) 再分化培地の支持体の検討

いくつかの実験から、再分化培地の支持体、特にゲルライト濃度がカルスからの再分化に影響することが示唆された。

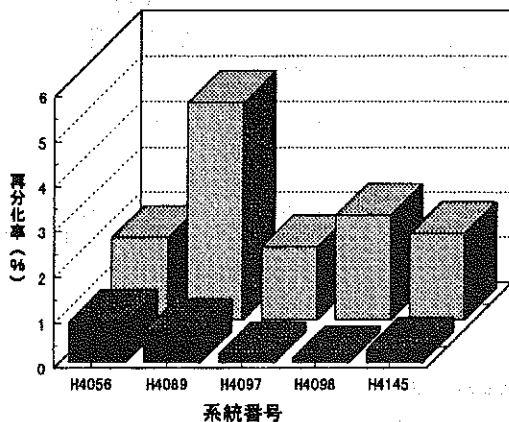
本実験の結果から、再分化培地のゲルライト濃度の影響は大きく、ヒノヒカリでは0.6%、0.8%の濃度で再分化体が得られ、0.8%の濃度でより再分化率は高くなった(第13表)。

第13表 再分化培地添加物及び支持体の効果

培地 番号	添加 物	支持体 加付 濃度	薬数	カルス 形成率 (%)	再分個体数		再分 化率 (%)
					緑色	7μE/	
1	—	0.6	524	19.9	4	0	0.8
2	CH2	0.2	496	15.9	0	0	0.0
3	CH2	0.4	438	16.4	0	2	0.0
4	CH2	0.6	450	11.8	3	35	0.7
5	CH2	0.8	381	14.7	6	44	1.6

品種：ヒノヒカリ

また、供試した全てのF₁系統でも0.4%より0.6%の濃度で再分化率が良かった(第4図)。



第4図 再分化培地のゲルライト濃度の影響

■ゲルライト 0.4% □ゲルライト0.6%

このことから、2段階培養法の再分化培地の支持体濃度は、従来の0.2%より高い0.6%の濃度が有効と考えられた。

以上3項目の実験結果から、イネの薬培養における2段階培養法では、コシヒカリやヒノヒカリ等の薬培養が困難とされる品種においても、脱分化培地及び再分化培地にカゼイン加水分解物とソルビトールを添加し、再分化培地のゲルライト濃度を0.6%程度まで高濃度にするすることで、再分化させることが可能であり、他のF₁系統や品種でも従来よりも効率よく再分化さ

せることが可能になった。

このような培地の改良により2段階培養の置床薬当たりの再分化率は当初の1%以下から、平均で6%まで向上させることができた。

3 1段階培養法の培地の検討

1段階培養法は、2段階培養法とは異なり、カルス形成から再分化までを1つの培地で行う方法である。そのため、この1段階培養法は、カルスを再分化培地へ移植する作業が省略できる。多くの系統を扱う実用場面では労力軽減効果が著しく、コスト低下につながる有効な技術である。この場合、同一培地上でカルス化と再分化という異なる目的を達成する必要がある。しかし、最終的には再分化個体の獲得が目標であり、カルス化より再分化の向上を目標に検討した。

1) 基本培地及び培地添加物の検討

1段階培養法の再分化率を向上させ、培養の効率化を図るために、基本培地の濃度を希釈する¹⁾、ホルモン組成ではカイネチン5mg/lを添加する⁴⁾、添加物ではアラニン1g/l+アスパラギン1g/l等アミノ酸を添加^{10) 12)}することが、有効であるとの報告がある。

本実験の結果、N₆培地からアンモニア態窒素や硝酸態窒素、またはその両方を減じた全ての改変培地で、再分化率が高まった(第14、15表、第5、6図)。特に、マクロ成分まで減じたN₆/3培地が最もよかった(第15表、第6図)。

カイネチン5mg/lの添加は再分化率の向上に効果がみられ(第15表、第6図)、ABA添加は、ヒノヒカリにおいて多少再分化率が向上した(第14表)。カゼイン加水分解物2g/lやソルビトール30g/lの添加は再分化率の向上に効果があった(第14表、第5図)。また、アスパラギン1g/lとグルタミン1g/lの添加も再分化率をわずかに向上させた(第15表、第6図)。

マクロ成分を減じた、N₆/3および1/4R₂B₅培地では、培地中のMg等の2価のイオン濃度が低く、支持体のゲルライトゲルの強度が弱くなった。また、1/4R₂B₅培地では、再分化植物体の生育が養分不足のため不良になる傾向にあった。

2) 培地の窒素形態と濃度

植物の組織培養では、しばしば窒素形態と濃度が問題となる。イネの薬培養でも、培養が困難な品種及び系統ではアンモニア態窒素及び硝酸態窒素の濃度の影

響が考えられる。

本実験によると、再分化率が全体に低く、窒素の形態と濃度の影響は論じられないが、マクロ成分全体を1/2や1/4にした培地の再分化率が高かった（第16表、第7図）。

3) 培地支持体濃度の検討

2段階培養法では、支持体のゲルライト濃度が再分化率に大きな効果があった。

本実験によると、カルス形成率及び再分化率は、支持体濃度と系統間で差がみられるが、植物体の再分化を考えると1段階培養法における培地のゲルライト濃

第14表 1段階培養法における培地改変の効果-1

培地記号	基本培地	窒素希釈			マクロ成分希釈	添加物等			ヒノヒカリ				系統H5110				
		7N/2	硝酸態	1/1		支持体	糖類	置床薬数	カルス形成率(%)	再分化緑色個体数	再分化率(%)	置床薬数	カルス形成率(%)	再分化緑色個体数	再分化率(%)		
a	N ₀	1/1	1/1	1/1		Ag	2,286	25	7	12	0.3	13,687	14	27	9	0.2	
b	N ₀ Y ₁	1/2	1/1	1/1		So	Ag	1,762	9	4	4	0.2	1,629	31	46	52	2.8
c	N ₀ Y ₁	1/2	1/1	1/1		So	Gr	2,507	15	8	1	0.3	943	29	51	102	5.4
d	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4			Gr	2,435	29	35	45	1.4	1,395	38	49	38	3.5
e	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4	ABA		Gr	2,238	36	46	16	2.1	1,207	45	46	53	3.8
f	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4		So	Gr	2,427	35	99	40	4.1	1,714	36	97	65	5.7

平成5年度培養 So:ソルビトール Ag:寒天 Gr:ゲルライト

第15表 1段階培養法における培地改変の効果-2

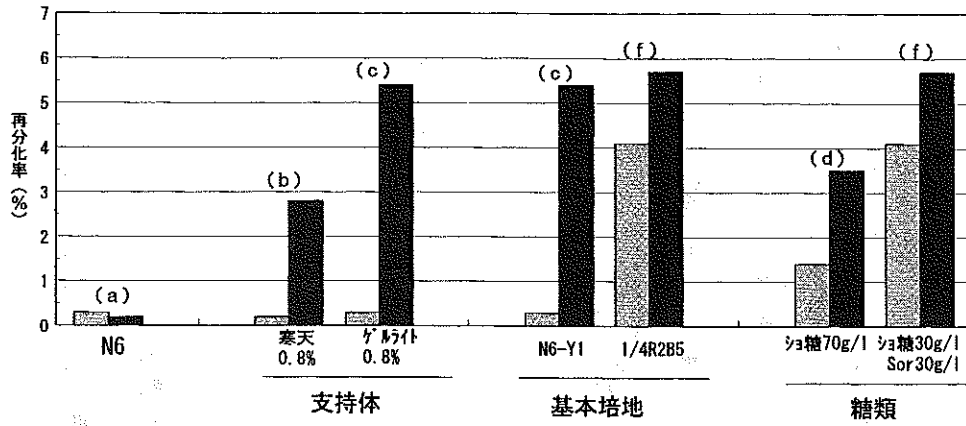
培地記号	基本培地	窒素希釈			マクロ成分希釈	添加物等			ヒノヒカリ				系統H7017				
		7N/2	硝酸態	1/1		支持体	糖類	置床薬数	カルス形成率(%)	再分化緑色個体数	再分化率(%)	置床薬数	カルス形成率(%)	再分化緑色個体数	再分化率(%)		
f	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4		So	Gr	3,562	29	41	13	1.2	6,498	18	189	120	2.9
L	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4	A, G	So	Gr	1,747	18	50	26	2.9	1,102	16	42	39	3.8
M	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4	k	So	Gr	1,665	4	52	4	4.4	1,225	3	82	30	6.7
L+M	R ₂ B ₅	1/4	1/4	1/4		So	Gr	1,508	4	74	15	5.7	3,363	3	203	181	6.0
N6/3	N ₀	1/3	1/3	1/3	k A, G	So	Gr	1,937	19	150	54	7.7	2,490	29	206	139	8.3

平成7年度培養 k:カイネチン A:アスパラギン G:グルタミン So:ソルビトール Gr:ゲルライト

第16表 1段階培養法における硝酸態窒素及びアンモニア態窒素濃度の影響

培地記号	基本培地	窒素成分				マクロ成分(窒素以外)		カルス形成率(%)	再分化緑色個体数		再分化率(%)
		(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(mg/l)	希釈倍	KNO ₃ 濃度(mg/l)	希釈倍	希釈倍	薬数		緑色個体数	7N/2	
ア	R ₂ B ₅	84	1/4	1,010	1/4	1/4	815	22.6	14	11	1.7
イ	R ₂ B ₅	84	1/4	1,010	1/4	1/1	2,126	7.0	2	4	0.1
ウ	R ₂ B ₅	84	1/4	2,020	1/2	1/1	786	2.9	1	0	0.1
エ	R ₂ B ₅	84	1/4	4,040	1/1	1/1	1,066	11.6	3	6	0.3
オ	R ₂ B ₅	168	1/2	1,010	1/4	1/1	971	12.6	1	3	0.1
カ	R ₂ B ₅	168	1/2	2,020	1/2	1/1	1,074	7.2	1	5	0.1
キ	R ₂ B ₅	168	1/2	4,040	1/1	1/1	808	7.3	0	0	0.0
ク	R ₂ B ₅	336	1/1	1,010	1/4	1/1	814	9.5	1	0	0.1
ケ	R ₂ B ₅	336	1/1	2,020	1/2	1/1	814	7.5	6	9	0.7
コ	R ₂ B ₅	336	1/1	4,040	1/1	1/1	797	10.0	4	9	0.5
サ	R ₂ B ₅	84	1/4	1,010	1/4	1/2	929	8.3	12	10	1.3

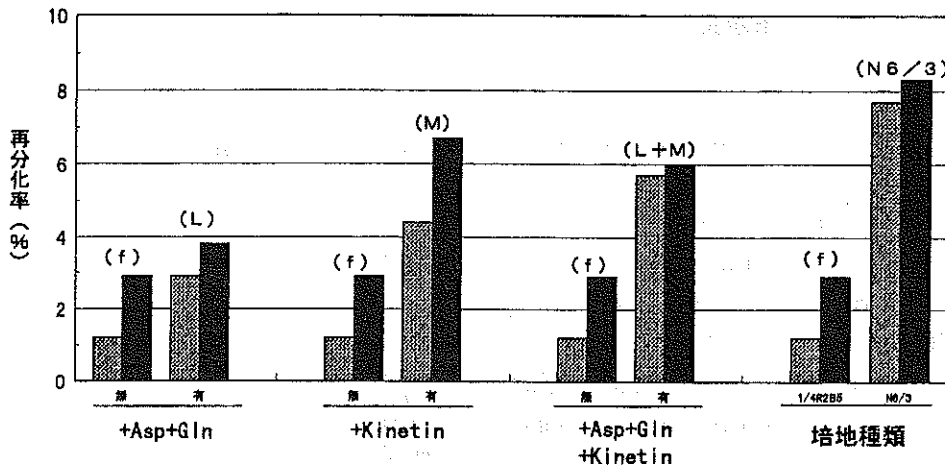
品種:ヒノヒカリ



第5図 1段階法における支持体等の効果

(a), (b), (c), (d), (f) : 培地記号

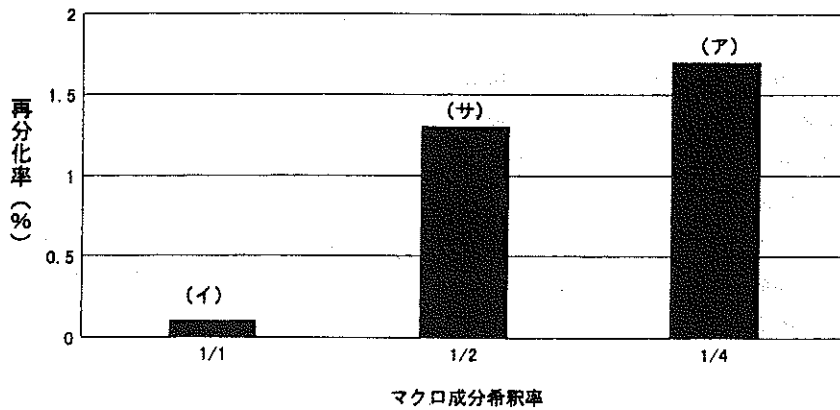
▨ ヒノヒカリ ■ 交配H5110



第6図 1段階法における添加物の効果

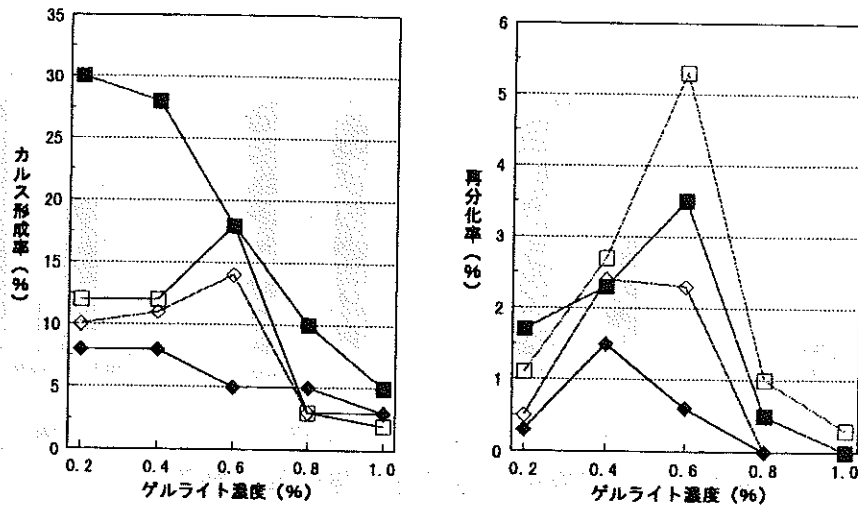
(f), (L), (M), (L+M), (N6/3) : 培地記号

▨ ヒノヒカリ ■ 系統H7017



第7図 マクロ成分の希釈率の影響

基本培地は、R2B5を用い、窒素成分は、1/4に希釈した
(イ), (サ), (ア) : 培地記号



第8図 1段階法におけるゲルライト濃度の影響

系統番号 ■ H6070 ◆ H6071 □ H6077 ◇ H6082

度は0.4~0.6%が適していると思われる(第8図)。

以上3項目の実験結果から、イネの薬培養における1段階培養法では、薬培養が困難とされるヒノヒカリにおいても、N₂培地のマクロ成分を1/3に減じ、カゼイン加水分解物とソルビトール、さらに、カイネチンを添加し、ゲルライト濃度を0.4~0.6%程度まで高濃度にする事で、再分化率を確保することが可能になった。

このような培地の改良により1段階培養の置床薬当たりの再分化率は当初の1%以下から、平均で3%強まで向上させることができた。

4 薬培養の省力化の検討

1段階培養法を用いた場合でも、再分化個体を苗化培地に移植する作業が必要である。そこで、さらに培養作業の省力化を図るため、同一培地上でカルス形成から苗化までを培養する無移植培養法について検討した。

その結果、培養開始から40日間程度の初期のカルス形成率は、1段階培養法と比較してわずかに低かった。しかし、明条件に移す培養後半の再分化期においてカルスの増殖が目立った。

再分化率は1段階培養法より低く、1/4以下であった(第17表)。

上層培地へのカイネチン添加は、再分化率の向上に効果があった(第18表)。しかし、上層培地のゲルライト濃度の変更では効果がなかった(第19表)。その結果、再分化率は1段階培養法には及ばなかった。

第17表 無移植培養法におけるカルス形成及び再分化

交配番号	無移植培養				1段階培養	
	カルス形成率(%)	再分化個体数 緑色体	7/1EJ	再分化率(%)	カルス形成率(%)	再分化率(%)
H6001	9	7	1	0.9	15	4.6
H6004	15	9	5	0.8	19	5.1
H6006	11	10	0	1.3	18	3.6
H6016	17	7	2	1.1	16	8.4
H6029	25	6	7	0.7	20	4.3
H6032	3	13	0	1.5	22	4.2
H6034	11	4	4	0.5	17	2.5
H6045	9	1	1	0.3	15	4.2
H6051	9	7	7	0.4	11	2.8
H6054	13	1	1	0.1	11	1.9
H6070	21	24	9	2.1	18	3.5
H6071	16	2	0	0.4	5	0.6
H6077	17	9	14	0.9	14	2.3
H6082	7	6	1	0.3	18	5.3
計	13	106	52	0.8	16	3.9

第18表 無移植培養法における上層培地へのカイネチン添加の効果

系統番号	カイネチン無添加		カイネチン添加	
	カルス形成率(%)	再分化率(%)	カルス形成率(%)	再分化率(%)
H7009	29	0.3	15	1.1
H7014	22	0.1	5	0.6
H7067	21	0.1	18	0.6
H7073	40	0.1	16	1.9
計	28	0.1	13	1.0

第19表 上層培地のゲルライト濃度の影響

系統 番号	ゲルライト0.6%		ゲルライト0.2%	
	カルス 形成率(%)	再分化 率(%)	カルス 形成率(%)	再分化 率(%)
H7009	16	2.6	15	1.1
H7014	3	0.0	5	0.6
H7067	20	0.8	18	0.6
H7073	7	0.5	16	1.9
計	11	0.9	13	1.0

Kinetin 5.0mg/l 添加条件

5 半数体の倍加

薬培養では、再分化した緑色個体の約半数は半数体であり、種子が採取できない。そこで、コルヒチン処理したところ、植え付けた株の48%が生育した。倍加の形態は、株全体が倍加するものから、一穂の内の数個が稔実するものまで様々であったが、倍加率は45%であった。また、籾だけが倍加したり、玄米部だけが倍加するものなどもみられ、3倍体等の高次倍体とみられる個体は1%程度発生した(第20表)。

第20表 コルヒチン処理による倍加の効果

系統 品種	植付け 株数	生育 株数	稔実 株数	倍加		高次倍加	
				株率%	株数	株率%	株数
F 1	367	1,591	657	292	44	13	2
品種	539	2,530	1,337	603	45	12	0.9
合計	909	4,121	1,994	895	45	25	1

IV 摘要

1) 培養前条件

交配組み合わせで再分化に差が生じるため、F₁を利用する場合は、目的に合わせて交雑方向を考慮する。

薬培養の母材栽培をハウス等の施設で行う場合、幼穂形成期以降の温度環境を考え、4月上旬までには播種し、ハウスの温度管理に注意する。

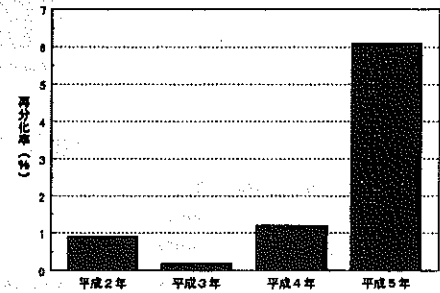
利用する穂の葉耳間長は5~6cmのものを採取し、10℃で低温処理し、10~30日の間に使用する。特に、長期保存する場合は、期間中に2回ほど挿水を交換することが望ましい。

2) 2段階培養法

脱分化培地及び再分化培地にカゼイン加水分解物とソルビトールを添加し、再分化培地のゲルライト濃度を0.6%程度まで高濃度にするこ

とされるコシヒカリやヒノヒカリ等の品種においても再分化させることができ、他のF₁系統や品種でも従来よりも効率よく再分化させることが可能となった。

このような培地の改良により2段階培養の置床薬当たりの再分化率は当初の1%以下から、平均で6%まで向上させることができた(第9図)。



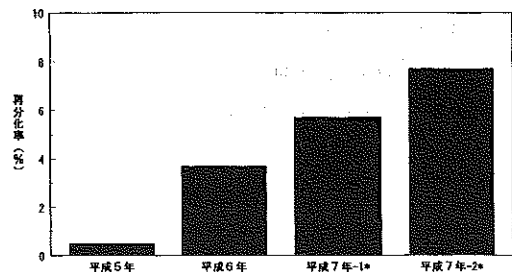
	平成2年	平成3年	平成4年	平成5年
脱分化培地	添加物 -	-	-	CH 2g/l
再分化培地	添加物 -	-	CH 2g/l ソルビトール30g/l	CH 2g/l ソルビトール30g/l
支持体	ゲルライト 0.2%	ゲルライト 0.2%	ゲルライト 0.4%	ゲルライト 0.6%

第9図 2段階法における培地修正の効果

3) 1段階培養法

N₆培地のマクロ成分を1/3に減じ、カゼイン加水分解物とソルビトール、さらに、カイネチンを添加し、ゲルライト濃度を0.4~0.6%程度まで高濃度にするこ

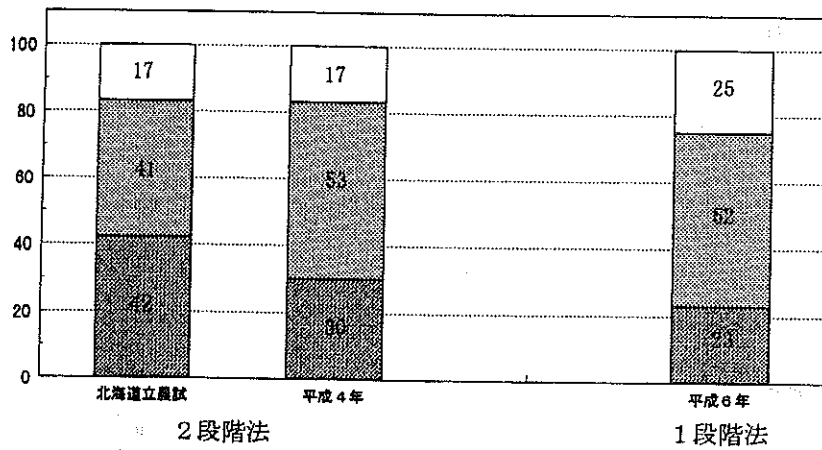
とされるヒノヒカリにおいても、再分化率を確保することが可能になった。このような培地の改良により1段階培養の置床薬当たりの再分化率は当初の1%以下から、平均で3%強まで向上させることができた(第10図)。



	平成5年	平成6年	平成7年-1*	平成7年-2*
基本培地	N6	1/4R2	1/4R2	N6/3
添加物	酵母2x1g/l	CH 2g/l ソルビトール 30g/l	Asn1g/l+81n1g/l Kinetin0.5g/l	CH 2g/l ソルビトール 30g/l
支持体	寒天 0.2%	ゲルライト 0.6%	ゲルライト 0.6%	ゲルライト 0.6%

*: 供試品種ヒノヒカリ 他はその年度の系統の総計

第10図 1段階法における培地修正の効果



		北海道立農試 昭和61年	平成4年
脱分化培地	基本培地	N6	N6-Y1
	添加物	-	-
再分化培地	添加物	-	CH 2g/l ソルビトール 30g/l
	支持体	寒天0.8%	ゲルライト0.4%

		平成6年
基本培地		1/4 R2
添加物		CH 2g/l ソルビトール 30g/l
支持体		ゲルライト 0.6%

第11図 再分化植物体の形態

■ アルビノ □ 半数体 □ 2倍体

4) 無移植培養法

2層培養は、カイネチン添加で再分化率が向上するが、さらに、添加物等の検討の必要がある。

5) 倍加処理

倍加処理は、展開葉2~3枚の苗をコルヒチン濃度500ppm液に24時間浸漬処理することで可能であり、処理株の半数程度が倍加する。

6) 半数体及びアルビノの抑制

半数体及びアルビノの抑制は重要な課題であったが、本県で薬培養を開始した頃に目標とした北海道農試での発生割合²⁾と比較し、2段階培養法では大差なく、改善の効果はみられていない。しかし、1段階培養法では2倍体の発生割合が多く、半数体やアルビノは抑制される傾向がみられる(第11図)。

V イネの薬培養マニュアル

現在、最も安定したイネ薬培養法のマニュアルは次の通りである。

- 1) 材料は4月上旬までに播種し、ハウス内で栽培する。
- 2) 穂の採取適期：葉耳間長が4~6cmのときのとき採取する。F₁の場合、顕微鏡で一度確認する。
- 3) 穂の低温処理：10℃で10~14日処理を行う。しかし、約1月程度の長期保存も可能である。
- 4) 培地：1段階培養法の培地は、N₆培地のマクロ

成分を1/3に減じ、ホルモン材は2,4-D 0.02mg/l、NAA 1mg/l、カイネチン5mg/lとする。添加物としてカゼイン加水分解物2g/l、アスパラギン1g/l、グルタミン1g/lを加える。糖類はショ糖30g/l、ソルビトール30g/lとし、支持体はゲルライト濃度を0.6%で使用し、9cmのシャーレに20mlずつ分注して使用する。

- 5) 薬の置床：穂を取り出し、70%アルコールで30秒間殺菌する。穂から穎を中の薬を傷つけないように切り落とす。内穎、外穎をピンセットで左右に引っ張って開き、薬を培地上に振り落として置床する。1シャーレ当たり80~100薬を置床する。
- 6) 培養条件：培養は、26℃で行う。脱分化時は暗条件で約1ヶ月培養し、明条件に移す。明条件に移動後1~2ヶ月にかけて再分化する。
- 7) 苗化：草丈が3cm以上に伸びた個体から苗化培地に移植する。このとき、コンタミに注意する。ピンセットが汚染されていると、コンタミが蔓延する。苗化培地は、基本培地N₆-Y₁、ショ糖30g/l、ゲルライト0.4%を使用する。
- 8) 順化：苗化培地で1ヶ月程度生育させ、発根が進んだら温室で順化育成する。

VI 引用文献

- 1) 平林泰平・三十尾修司・上島脩史・澤野稔(1992)：イネ薬培養における培地へのアミノ酸及び

第21表 基本培地の組成

成分	基本培地名							
	N ₀	N ₀ -Y ₁	1/3N ₀	R ₂	R ₂ B ₅	1/4R ₂ B ₅	B ₅	
マク ロ 成 分	KNO ₃	2830	2830	943	4040	4040	1010	2500
	(NH ₄) ₂ SO ₄	463	281.5	154	330	330	82.5	134
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	166	55.3	110	110	36.7	150
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	185	61.7	245	245	81.7	250
	KH ₂ PO ₄	400	400	133.3	-	-	-	120
	NaH ₂ PO ₄	-	-	-	312	312	104	-
鉄 分	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.8
	Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
ミ ク ロ 成 分	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	4.4	4.4	1.6	1.6	1.6	10
	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	1.5	1.5	1.5	2.2	2.2	2.2	2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	-	0.2	0.2	0.2	0.025
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	-	-	-	0.12	0.12	0.12	0.25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0.025
	KI	0.8	0.8	0.8	-	-	-	0.75
	H ₃ BO ₃	1.6	1.6	1.6	2.8	2.8	2.8	3
	KCl	-	-	-	-	-	-	-
ビ タ ミ ン	Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	-	1	1	1
	Thiamine-HCl	1.0	1.0	1.0	1.0	10	10	10
	Prydoxine-HCl	0.5	0.5	0.5	-	1	1	1
	m-inositol	-	-	-	-	100	100	100
	Glysin	2	2	2	-	-	-	-
	Glutamine	-	265	-	-	-	-	-

カゼイン加水分解物の添加効果 神大農研報20 23~29

- 2) 北海道立中央農業試験場 (1988) : 北海道立農業試験場資料 第19号 20~28
- 3) 岩井正志・吉田晋弥・渡辺和彦 (1991) : 水稻薬培養の再分化培地における高アンモニア体窒素濃度障害の遺伝 育雑41 (別冊1) : 40~41
- 4) 亀島雅史・中村幸生・溝淵正晃・宇賀博之 (1994) : 水稻新品種育成における薬培養 (一段階法) の育種への利用 高知農技セ研報3号17~22
- 5) 熊本県農業研究センター・農産園芸研究所 (1990) : 完熟種子からのカルス形成及び再分化 生物資源部成績書29~33
- 6) Niizeki, H. and Oono, K (1968) : Induction of haploid rice plant from anther culture, Proc. Japan Acad. 44 554~557
- 7) 大源正明・阿部聖一 (1993) : コシヒカリの種子カルス形成・懸濁培養と植物体再生 植物組織培養10 (2), 176~179
- 8) 大野清春 (1975) : イネ薬培養による半数体の作出とその育種的利用 農技研報 D26 139~222
- 9) 佐々木武彦 (1986) : イネ薬カルスから高い再分化能力を持つ品種とその系譜 育雑36 (別冊1) : 64~

65

- 10) 滋賀県農業試験場 (1990) : 水稻薬培養における一段階培養法試験 1) アミノ酸等の添加が分化に及ぼす影響 生物工学試験成績概要書 : 35
- 11) 張 承妹・章 振华 (1991) : ヘチマ水傷流液の薬培養効果向上への応用、作物学報17(5)352~361
- 12) 津川秀仁 (1992) : イネ薬培養における3段階法 農業技術47(7)

Summary

The improvement of technique for anther culture of rice

Seisi ARAKI Masami TANAKA and TGomomasa SHODAI

Anther culture of rice began in 1988. At the beginning of anther culture, the frequency of plant regeneration was less than 1% and it was different in varieties.

In this paper, improvement of anther culture of rice was studied during seven years from 1989 to 1995. The result was as follows.

1. The frequency of plant regeneration increased by improvement of culture condition.
2. In the two step method, it was effective containing 1g/l casein hydrolysate(CH) and 0.6% gelrite in the frequency of plant regeneration increased.
3. In the one step method, it was effective containing 1g/l asparagin, 1g/l glutamine and 5mg/l inetin. One step method was more efficient than two step method.
4. Improvement of culture condition and method made possible to write a Manual of Anther culture of rice in Kumamoto Prefectural Agriculture Research Center.