

イネの葯浮遊培養による高頻度の植物体復原

小林好次*・丸田一成・大野清春

農林水産省農業生物資源研究所

(〒305 つくば市観音台2-1-2)

*福島県立会津農林高等学校

(〒969-65 福島県河沼郡会津坂下町)

(1992年3月9日受付)

(1992年5月16日受理)

イネ葯培養を用いた植物体の作出効率を高めるため、葯浮遊培養について検討した。農林8号および日本晴の葯73,350個を2,4-D 10^{-5} Mを含む液体培地上で浮遊培養することで多数の花粉由来カルスを誘導できた。誘導カルスを植物体復原培地に移植し植物体を得た。植物体復原率は誘導初代カルスで10~14%、固体培地で一度継代したカルスで32~35%、液体培地で一度継代培養したカルスで16~35%であり、効率的に植物体を復原することができた。再分化個体のうち58~75%がアルビノであったが、浮遊培養と固体培養とで顕著な差はなかった。カルスの分化能選抜により植物体復原率は73~75%に高まり、1000個体以上の半数性植物体を獲得した。成熟した緑色再生個体のうち11~19%が半数体、75~78%が二倍体、他が異数体であった。これらの結果は、イネ葯培養として浮遊培養法を組み入れることにより効率が一層高まることを示している。

1. 緒言

近年、組織培養を利用した細胞工学的育種法の開発が精力的に進められている。その中の技術の一つとして半数体作出利用が進められている。

半数体植物はその染色体倍加により同型接合体が容易に得られるので、植物育種における純系化に要する年数を大幅に短縮できる。また、半数性細胞は突然変異が劣性であっても直ちに発現するので、突然変異体の作出・選抜に有利であるばかりでなく、組換えDNA技術を用いた異種遺伝子導入の宿主細胞として望ましい特性でもある。半数体を人為的に作出する技術として葯培養による半数体作出法によりすでに200種以上で半数性組織や半数体が得られている。また、葯培養による実用品種もイネ¹⁾、タバコ²⁾において育成されている。しかしながらイネにおいては、葯培養による半数体作出の効率向上がその技術的効率を大きく向上させることから、葯培養により半数性植物をより効率的に誘導する培養技術の開発が強く求められている。葯培養では、通常、寒天による固形培地に葯を置床することによって行なわれてき

た。これに対してタバコ³⁾、ナタネ⁴⁾、コムギ⁵⁾、サトウキビ⁶⁾およびポテト⁷⁾では葯を液体培地上で培養し、カルスないし胚様体の誘導頻度を向上させた。

イネでは、原田と大野⁸⁾が葯浮遊培養により高頻度の花粉起源カルスの誘導に成功している。しかし、TsayとChen⁹⁾、MercyとZapata¹⁰⁾は、液体培地では、寒天培地に比べ再分化能の低いカルスができやすいと報告したことから、現在、イネ葯培養はその全過程を固体培地を用いて行なわれている。

浮遊培養法は葯置床および継代操作を極めて容易にし大量の葯を培養できることから、進展した再分化技術と組み合わせれば、半数体作出の効率向上に大きく寄与すると考えられる。ここでは、葯浮遊培養法により、カルスを高頻度で誘導し、それらカルスよりの植物体復原について液体継代培養を含めて検討し、多数の成熟個体を得ることができた。また、ここで得られた効率的な植物体復原技術とあわせたイネ花粉起源植物体の効率的作出について報告する。

Table 1. Effect of basal media on callus formation

No.	Basal medium	Norin 8			Nipponbare		
		No. of cultured plates	No. of callus formed plates	B/A (%)	No. of cultured plates	No. of callus formed plates	B/A (%)
		(A)	(B)		(A)	(B)	
①	MS	217	27	12.4	629	98	15.6
②	N6-B5	169	23	13.6	366	92	25.1
③	1/8N6-B5	155	26	16.8	347	81	23.3
④	MS-C	81	15	18.5	177	22	12.4
⑤	N6-C	83	10	12.0	164	41	25.0
Total		705	101	14.3	1683	334	19.8

2. 材料および方法

イネの2品種(農林8号, 日本晴)を供試した。出穂2~3日前の穂ばらみ期の個体を刈り取り, 葉を除去後, 下端を水切りし, ポリ塩化ビニリデンフィルムで穂を覆い, 10°Cの暗黒低温室内に静置し, 5~40日間の低温前処理^{11,12)}を行なった。

薬培養の方法は, 大野¹³⁾に準じ, 葉鞘から穂を取り, 穎花の一部から薬を取り出し, 押し潰し法により顕微鏡下で一核期の花粉を含む穂を選別した。穂を70%エタノールで20秒間滅菌後, 穎花の先端より1/2~1/3を切除し, ピンセットで無菌的に薬をつまみ出し, Table 1. に示した液体培地(① MS, ② N6-B5, ③ 1/8N6-B5, およびイネカルスでコンディショニングした④ MS-Cと⑤ N6-C)に浮遊させた。径60mmの滅菌済プラスチックシャーレに培地を4mlずつ分注し, シャーレ当たり30個の薬を浮遊させた。培地の蒸発と汚染を防止するためにシャーレをパラフィルムで封印し, 25°C暗黒下¹⁴⁾で培養した。

薬カルス形成後, カルスの一部を同一組成の液体培地および継代用固形培地(MS+10⁻⁵M 2,4-D+0.2% カザミノ酸+3% ショ糖)に移植し, 継代・増殖した。

10~20mgほどに成長したカルスを再分化培地(MS+10⁻⁷M NAA+10⁻⁶M カイネチン+0.3% カザミノ酸+3.5% ソルビトール+2.0% ショ糖)に移植し, 40日後に植物体分化率およびアルビノの分化率について調査した。分化率の計算は鉢上げ可能な個体を分化したカルス数を再分化培地に置床したカルス数で除した。したがって, 一個のカルスから複数個体が分化した場合でも分化カルス数は1とした。薬浮遊培養で誘導カルスを継代せずに再分化培地に移植したカルスのうち, 緑色再分化しているカルスおよび緑色カルスを選抜し, 新鮮な再分化培地にカルスごと移植し, 緑色分化を促した。

復原植物体の地上部が10~15cm程度になり十分に発根後, 馴化・鉢上げし温室内で20cm程度に生育した後, 水田へ移植し育成した。出穂日・草丈・種子稔性および形態等を調査し, また, 個体の倍数性については成熟個体の形態および種子稔性から判別した。

3. 結果および考察

薬浮遊培養開始30日頃から134日までカルス形成が認められた。農林8号では27株47穂より705枚のシャーレに薬を置床し, 101シャーレ(14.3%)にカルス形成が観察された。日本晴では55株156穂より1683シャーレに置床し, 334シャーレ(19.8%)にカルス形成が認められた。カルスの誘導頻度は, 二品種合計で18.2%であった(Table 1.)。寒天培地を用いた方法で初期には大野¹³⁾の0~10%で, 最近ではHuang¹⁴⁾の21~31%という値が報告されている。液体浮遊培養でもほぼ同等の高い頻度のカルス誘導が観察された。液体培地における薬カルス誘導に対する種々培地の効果には差異が認められた。日本晴ではMS系で12.4~15.6%, N6系で23.3~25.1%の値を示し, N6系の方が効果的であった。一方, 農林8号では, 供試基本培地間で一定の傾向は得られなかった。低温処理期間とカルス誘導頻度との間には明らかな関係は見出せなかったが, 40日間の長期にわたる低温処理でも問題なく高い頻度でカルス誘導が見られた。このことは, 薬培養に使用できる穂を長期にわたって保存できることを示している。

液体培地上で誘導したカルスを引きつづき液体培地で継代増殖および再分化させることができれば, 固形培養に比べ培養操作を簡略化することが可能で, 薬培養の効率化に寄与すると考えられる。そこでまず, 初代液体培地上で比較的大型に成長したカルスを継代せず(培養経過I), 固形培地で継代(培養経過II), 液体培地で継代(培養経過III)の三つの異なる培養方法を経過させた後, 固形再分化培地における再分化能を調査し, 薬浮遊継代

Table 2. Effect of culture progress on plant regeneration

cultivar	culture progress	No. of tested calli	No. of regenerated calli	green plant regenerated calli	albino regenerated calli	B/A (%)	D/B (%)
		(A)	(B)	(C)	(D)		
Norin 8	I	1290	186	78	108	14.4	58.1
	II	151	49	12	37	32.5	75.5
	III	73	12	5	7	16.5	58.3
Nipponbare	I	4182	402	124	278	9.6	69.2
	II	1540	546	159	387	35.5	70.9
	III	185	65	19	46	35.1	70.8

culture progress I: (Float-Regeneration) II: (Float-Solid-Reg.) III: (Float-Liquid-Reg.)

Table 3. High frequent plant regeneration by retransplanting after the selection of differentiation potency

cultivar	No. of tested calli	No. of regenerated calli	green plant regenerated calli	albino regenerated calli	B/A (%)	D/B (%)
	(A)	(B)	(C)	(D)		
Norin 8	239	180	102	78	75.3	43.8
Nipponbare	596	437	313	124	73.3	28.4

Table 4. Polyploidy in regenerants derived from anther floating culture

cultivar	No. of tested calli	No. of matured plants	haploids (%)	diploids (%)	aneuploids (%)
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
Norin 8	57	344	64 (18.6)	258 (75.0)	22 (6.4)
Nipponbare	70	368	41 (11.1)	286 (77.7)	41 (11.1)

培養の可能性を検討した (Table 2). 培養経過 I における再分化率は農林 8 号で 14.4%, 日本晴で 9.6% であったが, 継代 (培養経過 II および III) により再分化率は上昇する傾向にあった. 固形継代 (同 II) と液体継代 (同 III) とを比べた場合, 農林 8 号では再分化率が液体継代の方がやや劣ったが, 日本晴では優劣は認められなかった. この結果は薬カサの浮遊継代培養が十分可能であることを示している. イネ薬培養では高頻度のアルビノ個体が再分化する. 上述の培養経過 I~III におけるアルビノ率は農林 8 号で 58~75%, 日本晴で 69~71% にのぼった.

次に, 薬浮遊培地から直接再分化培地に移植したカサ (Table 2, 培養経過 I) の中から現に緑色個体を分化しているカサおよび緑化カサを緑色再分化能を有するカサクローンとみなし選抜した. これらカサを選抜に用いた再分化培地から新鮮な再分化培地に移植し, 再分化を促した (Table 3). 選抜により農林 8 号で 75.3%, 日本晴で 73.3% という高い再分化率達成できた. また, アルビノ分化も当然軽減できたが, 根絶すること

はできなかった. これらの結果はデータは示さないが培養経過と II と III でも同様であった.

イネ科植物の薬・花粉培養による半数体育成において, 復原個体のアルビノが大きな障害となっている. これまでアルビノ発生頻度に, 花粉供与植物の生理状態¹⁵⁾・花粉発育段階¹⁶⁾・培養温度^{17,18)}・ショ糖温度¹⁹⁾などが影響すると報告されているが, 培養条件の改良によりアルビノを回避した例はない. 緑色分化能選抜後の花粉由来カサの再分化 (Table 3) を詳細に観察したところ, カサおよび再分化初期に組織が緑色を呈していても生育に伴い, 葉先からアルビノ化していく個体が数多く見られた. イネ²⁰⁾, コムギ²¹⁾, オオムギ²²⁾の薬培養由来アルビノ個体ではプラスチド DNA の欠失が報告されていることから, 花粉起源カサとその再分化個体とは葉緑体ゲノム構成に差異が生じているとも考えられる. しかし復原個体集団のなかでどのような機構でアルビノ個体が出現するかはなお明確とはいえず, 今後アルビノ発生機構解明が必要と思われる.

今回イネ薬浮遊培養により, 千個体以上の緑色分化個

Norin 8

Nipponbare

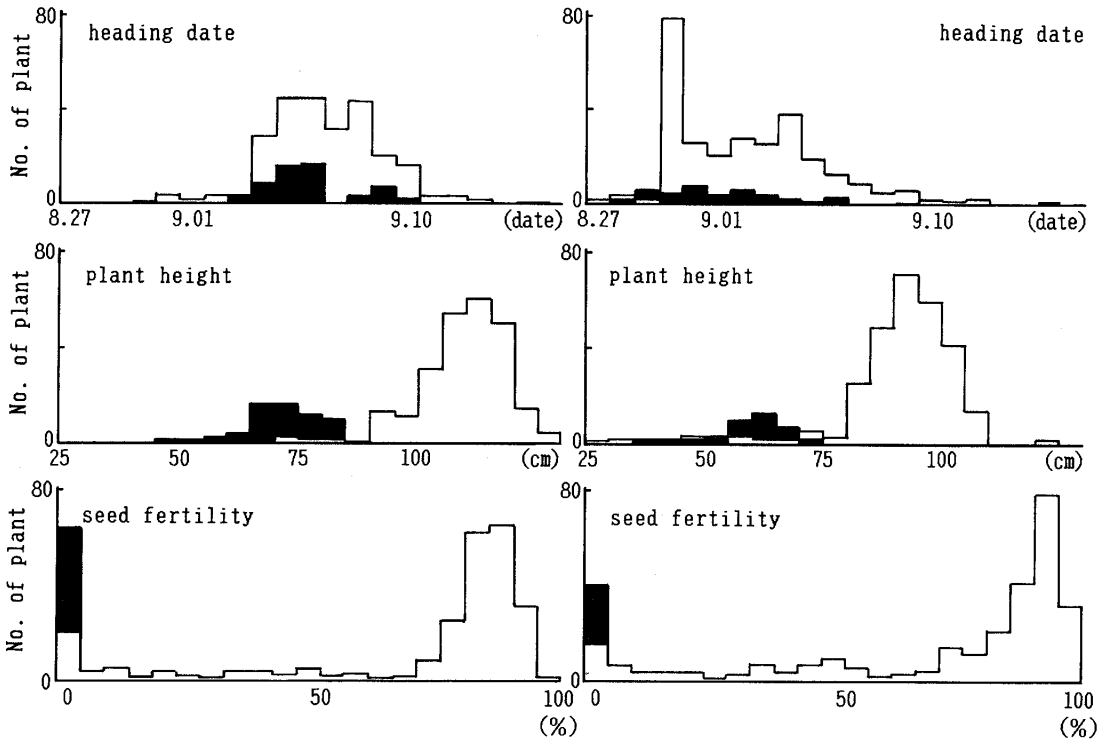


Fig. 1 Frequency distributions of heading date, plant height, and seed fertility. Closed area and opened area indicate the values of haploid and diploid plants, respectively. The total numbers of haploid and diploid regenerants are equal to the values described in **Table 4**.

体を得たが、その一部について倍数性を調査した (**Table 4**). 農林 8 号で 75.0%, 日本晴で 77.7% の個体が二倍体であった。コルヒチンを用いずに自然倍加のみで十分量の半数性植物体が確保できることが明らかとなった。Fig. 1 に半数体と二倍体の主な農業形質を示した。

以上より、イネ薬培養において、薬浮遊培養法とここに用いた植物体復原技術とにより、効率的な花粉起源植物体の復原が可能と言える。

文 献

- 1) 佐々木一男, 新橋 登, 佐々木多喜雄, 相川宗蔵, 柳川忠男, 沼尾吉則, 1988. 北海道立農試集報 58: 13-23.
- 2) Nakamura, A., T. Yamada, N. Kadotani, R. Itagaki, M. Oka, 1974. SABRAO J., 6: 107-131.
- 3) Sunderland, N., M. Roberts, 1977. Nature, 270: 236.
- 4) Lichter, R., 1981. Z. Pflanzenphysiologie, 103: 229-237.
- 5) Henry, Y., J. Buyser, 1981. Theor. Appl. Genet., 60: 77-79.
- 6) Fitch, M. M., P. H. Moore, 1984. J. Plant Physiology, 117: 169-178.
- 7) Uhrig, H., 1985. Theor. Appl. Genet., 71: 455-460.
- 8) 原田辰也, 大野清春, 1984. 育種学雑誌 34 卷別冊 1, 28-29.
- 9) Tsay, H. S., L. J. Chen, 1984. J. Agric. Reseach of China, 33: 24-29.
- 10) Mercy, S. T., F. J. Zapata, 1987. Plant Cell Reports, 6: 318-319.
- 11) Cornejo-Martin. M. J., E. Primo-Millo, 1981. Euphytica, 30: 541-546.
- 12) Qu, R. D., Y. Chen, 1983. Acta Phytophysiologia Sinica, 9: 375-381.
- 13) 大野清春, 1975. 農業技術研究所報告 D 第 26 号 139-222.
- 14) Huang, C. S., H. S. Tsay, C. G. Chern, C. C. Chen, C. C. Yeh, T. H. Tseng, 1988. J. Agric. Research of China, 37: 1-8.
- 15) Bullock, W. P., P. S. Baenziger, G. W. Schaeffer, P. J. Bottino, 1982. Theor. Appl. Genet. 62: 155-159.
- 16) Chen, C. C., M. H. Lin, 1976. Bot. Bull. Acad. Sin., 17: 18-24.
- 17) Huang, H., 1984. Z. Pflanzenzucht, 92: 22-29.
- 18) Genovesi, A. D., C. W. Magill, 1979. Crop Sci., 19: 662-664.
- 19) Clampham, D., 1973. Z. Pflanzenzucht, 69: 142-155.
- 20) Harada, T., T. Sato, D. Asaka, I. Matsukawa, 1991. Theor. Appl. Genet., 81: 157-161.
- 21) Day, A., T. H. N. Ellis, 1984. Cell, 39: 359-368.
- 22) Day, A., T. H. N. Ellis, 1985. Curr. Genet., 9: 671-678.

Summary

High Frequent Plant Regeneration *via* Anther Floating Culture in Rice (*Oryza sativa* L.)

Kouji KOBAYASHI*, Issey MARUTA and Kiyaharu OONO

National Institute of Agrobiological Resources

Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan

**Fukushima Prefectural Aizu Agriculture-Forestry High School*

Kawanuma, Fukushima, 969-65, Japan

To improve the system of rice anther culture, anther floating culture was performed using cultivar Norin 8 and Nipponbare. The rate of pollen callus formation on liquid medium was equal to that on solid medium. The efficiency of plant regeneration via solid and liquid subculture were 32-35% and 16-35%, respectively. The liquid subculture did not affect the albino percentage in pollen plants. Regeneration efficiency increased to 73-75% by the selection by green plant differentiation potency.

We were able to obtain more than a thousand pollen plants through the anther floating culture method. Three fourth of mature regenerants in field trials were doubled haploids without artificial diploidisation. These experimental results indicate possible application of the rice anther floating culture method in practical use.