

水稻薬培養における培養前の穂の低温処理が再分化, アルビノ発生に及ぼす影響

土 屋 隆 生

キーワード：水稻，薬培養，低温処理，再分化，アルビノ

薬培養を利用した半数体育種法による水稻品種育成は供試品種によっては培養カルスからの再分化率が低く、さらに、アルビノ個体の出現率が高い手法上の欠点を有しているため、その効果を十分に発揮していない。加えて、今日に到るも、あらゆる品種・系統に有効な再分化率向上法やアルビノ個体発生抑制のための確実な手法は開発されていない。

筆者は1983年以降、この手法による水稻品種育成に取り組んできた。その育成は夏期に交配した F_1 を同年冬期温室内で栽培して薬培養に供試し、さらに F_2 を翌年夏期に圃場で栽培して薬培養に供する年間スケジュールで推進している。それぞれの薬培養における観察では、いずれも培養シーズンの後半になるほど、再分化率が低くなり、アルビノ個体の出現率が高くなる傾向が認められている。

大野⁵⁾やFUKUI¹⁾は種子由来カルスからはアルビノ等の突然変異個体が多発するが、その原因はカルス世代の遺伝子の状態が不安定であるためと推測した。筆者は、薬培養においてもカルスの過程を経過するためにアルビノ個体が出現し易いと考え、その観点から抑制法を検討してきた。しかし、それらの原因追求のなかで、予測外の培養前に穂を低温条件に保つ前処理期間の長短が、カルス化の段階を経過していないにもかかわらず、再分化率やアルビノ個体出現率にまで大きく関与していることを明らかにしたので、ここに報告する。

材料及び方法

薬培養法

各試験に共通する薬培養手法は以下のとおりである。すなわち、カルス誘導培地に所定のステージの薬を置床してカルスを誘導し、次いでカルスを再分化培地に移植して再分化させる二段階法によった。カルス誘導には N_6 を基本培地とし、これにFe-EDTA40mg/ℓ、蔗糖50g/ℓ、

寒天9g/ℓ、生長調整物質として2,4-D2mg/ℓを加えた培地を供試した。誘導したカルスは2,4-DをIAA 0.2mg/ℓとKinetin1mg/ℓに替えた培地に移植して再分化させた。

試験1. 低温処理期間による緑色個体の再分化率とアルビノ個体出現率

供試品種として、広島県の主要栽培品種で品種育成にも多く用いられる中生新千本と再分化能が高いコガネマサリを供試した。試験に先だって、これらの品種は1989年の夏期に当圃場に1本植えし、基肥0.3kg/a、追肥0.2kg/aを施用して栽培した。

低温処理はそれぞれの品種ともに花粉のステージが1核期から2核期の初期と推測される穂孕み期、すなわち葉耳間長5～10cmの穂を採取し、直ちに10℃に設定した恒温器内で開始した。処理期間は10日間、20日間、30日間、40日間及び50日間の5処理を設定した。所定の処理期間を終了した穂は、直ちに薬の抽出を行い1処理当たり試験管50本のカルス誘導培地に置床し、カルスの誘導を行った。いずれの処理期間のものも薬置床後約20日以降カルスが誘導されたので、それぞれ25日目、30日目、35日目及び40日目に試験管50本ずつの再分化培地に反復して移植して再分化させ、低温処理期間の推移による再分化率とアルビノ個体出現率の変化を調査した。

試験2. 低温処理期間の長短が育成中の F_2 における緑色個体の再分化率とアルビノ個体出現率に及ぼす影響

試験1で得られた結果が普遍性のあるものか否かを知らるために、より多くの組合せの F_2 を用いて追試験を行った。供試材料は1989年に高冷地研究部で栽培中の次の6組合せの F_2 ：88-1：越南140号/広系8号，88-6：〈中部47号/ふ系138号〉 F_2A_3 /庄内32号，88-9：ふ系130号/

越南140号, 88-16: 越南147号/ふ系130号, 88-17: コシヒカリ/奥羽318号, 88-18: コシヒカリ/北陸135号を用いた。これらのF₂は1本植えし, 高冷地研究部の慣行法の基肥 0.3 kg/a, 中間追肥 0.2kg/a, 穂肥 I 0.2kg/a及び穂肥 II 0.2kg/aを施用して栽培した。

それぞれのF₂は穂孕み期に葉耳間長5~10cmの穂を採取し, 直ちに10°Cに設定した恒温器内で低温処理を開始した。処理は試験1.の結果から10日間処理の短期処理区と20日間以上処理の長期処理区に絞った。実際には短期処理区は8~9日間処理, 長期処理区は23~36日間処理した穂を供試した。

カルスは各F₂当り100本のカルス誘導培地に置床して誘導し, 誘導したカルスが直径1~2mmに肥大した時点で,

順次再分化培地の入った試験管に1カルスずつ移植して再分化させ, 再分化率とアルビノ個体の出現率を調べた。供試できたカルスは各F₂当り短期処理は280~350個, 長期処理は140~330個であった。

結 果

1. 低温処理期間の推移による緑色個体の再分化率とアルビノ個体出現率の変化(試験1)

低温処理期間の推移による緑色個体の再分化率の変化を第1表に示した。

これによるとコガネマサリ, 中生新千本とも処理期間10日では, 葯置床後25日目でも直径1mm以上に肥大した

第1表 培養前の穂の低温処理が緑色個体再分化に及ぼす影響

低温 処理 日数 (日)	コガネマサリ					中生新千本				
	カルスの齢(葯置床後日数)					カルスの齢(葯置床後日数)				
	25	30	35	40	平均	25	30	35	40	平均
10	- ²⁾	48.0	74.0	58.0	60.0	- ²⁾	0.0	4.0	4.0	2.7
20	50.0	32.0	32.0	14.0	32.0	4.0	0.0	2.0	0.0	1.5
30	30.0	32.0	14.0	10.0	21.5	2.0	0.0	0.0	0.0	0.5
40	6.0	20.0	16.0	10.0	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50	12.0	16.0	18.0	10.0	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注1) 表中の数字は(再分化した緑色個体数/移植カルス)×100で算出した緑色個体再分化率(%)である。

2) 低温期間が10日の処理区の葯からはカルスの分化がやや遅く, 葯置床後25日目ではカルスが分化していなかった。

再分化培地に移植できるカルスは誘導できず, 移植可能なカルスが誘導できるのに葯置床後30日以上が必要であった。これに対して, 処理期間が20日以上処理区では葯置床後25日目でも移植できるカルスが誘導され, 低温処理期間が長いとカルス化が早まった。

コガネマサリにおいては, 再生植物中の緑色個体は, 葯置床後早期に誘導されたカルス, 遅い時期に誘導されたカルスともに, 低温期間の短い処理区のもので再分化率が高いという共通点が見出された。

一方, 中生新千本では全般に緑色個体の再分化率が極めて低かった。しかも, 低温処理期間が30日以下の処理によって誘導されたカルスのみで緑色個体が認められたにすぎない。

アルビノ個体の出現率を第2表に示した。

コガネマサリでは葯置床後30日までの早い時期に誘導されたカルスでは, 低温期間が10日の短い処理区のものアルビノ個体の出現率が低く, 20日目以上の処理期間の長い処理区のはアルビノ個体出現率が高まる傾向が認められた。

中生新千本は緑色個体の再分化は低かったにもかかわらず, アルビノ個体の出現率が高かった。この傾向はコガネマサリと類似していた。すなわち, 葯置床後比較的早い時期に誘導されたカルスでは, 低温期間が10日の短い処理区のはアルビノ個体の出現率が低く, 20日目以上の処理期間の長い処理区のはアルビノ個体の出現率が高かった。

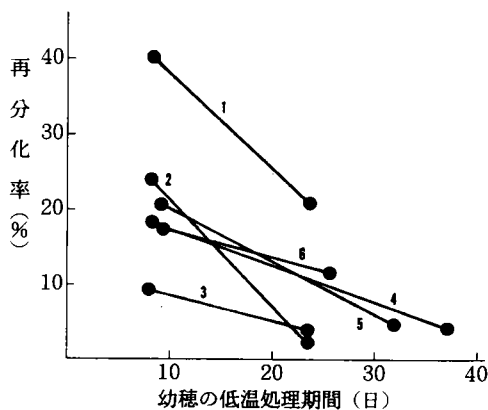
第2表 培養前の穂の低温処理がアルビノ個体出現に及ぼす影響

低温 処理 日数 (日)	コガネマサリ					中生新千本				
	カルスの齡 (葯置床後日数)					カルスの齡 (葯置床後日数)				
	25	30	35	40	平均	25	30	35	40	平均
10	— ²⁾	6.0	12.0	12.0	10.0	— ²⁾	0.0	20.0	8.0	9.3
20	30.0	32.0	16.0	4.0	20.5	18.0	38.0	4.0	2.0	15.5
30	50.0	26.0	14.0	20.0	27.5	34.0	20.0	10.0	4.0	17.0
40	26.0	28.0	12.0	6.0	18.0	10.0	24.0	10.0	0.0	11.0
50	44.0	28.0	30.0	20.0	30.5	6.0	0.0	14.0	0.0	5.0

注1) 表中の数字は (再分化したアルビノ個体数/移植カルス) × 100 で算出したアルビノ個体再分化率 (%) である。

2) 第1表参照。

なお、コガネマサリ、中生新千本とも、葯置床後30日以前の早い時期に誘導されたカルスにおいてアルビノ個体の出現率が高かった。

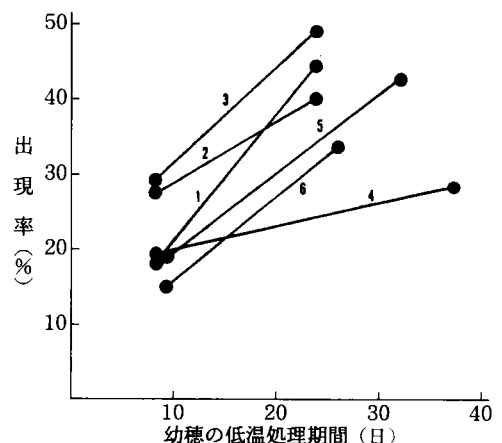


第1図 培養前の穂の低温処理期間の長さがF₂集団からの緑色個体再分化に及ぼす影響

- 注) 1: 88-1: 越南140号/広系8号
 2: 88-6: <中部47号/ふ系138号> F₂A₃
 /庄内32号
 3: 88-9: ふ系130号/越南140号
 4: 88-16: 越南147号/ふ系130号
 5: 88-17: コシヒカリ/奥羽318号
 6: 88-18: コシヒカリ/北陸135号

2. 低温処理期間の長短が育成中のF₂における緑色個体再分化とアルビノ個体出現に及ぼす影響(試験2)

培養前の低温処理の緑色個体再分化とアルビノ個体出現に及ぼす影響が中生新千本とコガネマサリ以外のF₂系統にも認められる現象であることを検討した結果をそれぞれ第1図と第2図に示した。



第2図 培養前の穂の低温処理期間の長さがF₂集団からのアルビノ個体出現率に及ぼす影響

注) 1~6は第2図参照

いずれのF₂もカルス誘導は順調で、葯置床後30～35日の間に再分化培地に移植できた。

いずれのF₂も低温処理期間が8～9日の短期処理区で緑色個体の再分化率が高かった。しかも、処理期間が長くなると緑色個体の再分化率が低下した。それに対してアルビノ個体は短期処理区において出現率が低く、処理期間が長期化すると出現率が著しく増加した。

考 察

現在、水稻の葯培養を利用した半数体育種においてはGENOVESI, et al.²⁾の、10°C前後の低温を7日間以上処理する培養前処理がカルス誘導を促進するとする報告に基づき、培養前に低温処理を加えて効率化が図られている。しかし、この低温処理の再分化への影響については厳密に検討された報告は見当たらない。

結果の項で既に述べたように、この培養前の低温処理は処理期間が長くなるとカルス誘導ばかりでなく、緑色個体の再分化やアルビノ個体出現に大きく関与するという新しい知見が得られた。

山田ら⁹⁾はカルス誘導培地に置床し、9°Cの低温に8日間処理した葯を顕微鏡観察したところ、低温処理期間中に膜や細胞質が変化し、細胞分裂も開始していたことを報告している。この変化は、低温処理が組織の分化に強く影響していることを示すだけでなく、処理期間中に組織的にカルス化がスタートしていることも推測させる。上記山田ら⁹⁾の試験では葯置床直後に低温処理を加えているが、本研究では葯置床前に低温処理をした。しかし、予備実験的に葯置床直後に低温処理した場合でもカルスは同様に誘導されることを認めている。このことは、培養前処理の穂の中の花粉も、処理中に同様の変化をしていると推測される。若狭⁹⁾は直径約2mmの若いカルスが約4mmの古いカルスより再分化率が高く、再分化にはカルス形成開始後4～8日(葯置床後30日前後と推測される)に誘導されたカルスを供試すべきであると報告している。本研究で低温処理期間が長い処理区の緑色個体再分化率が低くなったのは、処理期間中にカルス化が既に始まっており、処理期間が長引くと結果的にカルスの齢が進んでしまったことによると推測される。この結果から、緑色個体の再分化促進には低温処理期間10日程度の葯を主体にしてカルス誘導培地でカルスを誘導し、誘導時期の早いカルスを直ちに再分化培地に移植することが好結果を得る上で重要な条件と考えられる。

イネにおけるアルビノ個体発生は①albino, virescent, xantha等の突然変異⁹⁾によるもの他②培養細胞の生理

的な異常によるものと推測される。今回の試験2の長期間低温処理区ではアルビノ個体が緑色個体を含めた全再分化個体1,336個体中の64.4%を占める高率で出現していた。大野⁹⁾や新橋ら⁷⁾も、葯培養の研究や葯培養を利用した水稻品種育成の過程で、多くのアルビノ個体が出現した結果を報告しており、水稻は葯培養するとアルビノ個体が出現する頻度が高い作物と推測される。しかも、丸田ら⁹⁾は、アルビノ個体においては不要な遺伝子のイントロンを切り除き葉緑体に関与する遺伝子をつなぐ、いわゆるスプライシングがある段階で停滞していることをうかがわせる結果を得ている。したがって、水稻の葯培養でのアルビノ個体の発生の多くは、DNAレベルでの異常など突然変異に起因している可能性が大きいことを示唆している。しかし、短期処理区においてアルビノ個体の出現率が低く、処理期間が長引くと高くなった原因については、今回は解明できなかった。

培養条件面からアルビノ個体出現を抑制する方法については、若狭⁹⁾の培養中の温度を30°Cから25°Cに下げると多少減少させることができたとする報告がある程度である。

既述のように、試験1では低温期間10日処理区が中生新千本とコガネマサリのいずれも緑色個体の再分化率が高く、アルビノ個体の出現率が低かった。しかも、処理期間が20日以上になると緑色個体の再分化率は低下し、アルビノ個体の出現率は高まった。試験2でもいずれのF₂も20日以上長期処理区と比較して8～9日の短期間処理区は試験1と同様に緑色個体の再分化率が高く、アルビノ個体の出現率が低かった。なお、供試したF₂は遺伝的にかなり分離をしており、各F₂間の出穂特性も1週間以上の差があった。このように遺伝的な差異のあるF₂であるにもかかわらず同様な傾向が認められた結果から低温処理の効果は特定な遺伝的背景を有するものにだけ特異的に認められる現象ではなく、水稻各品種・系統に広く共通して生ずる現象であるものと判断される。

なお、試験1.では葯置床後30日以内の早期に誘導されたカルスにおいてはこれらの傾向が認められたが、35日以上経過して誘導されたカルスにおいては、アルビノ個体の出現率が低下し、低温処理の影響は認められなかった。この原因としては、緑色個体の再分化率も低下していることから推察して、カルスが過熟化による、いわゆる全能性の低下によって低温処理の効果が不明確になったものと考えられる。

培養前の低温処理はGENOVESI, et al.²⁾の結果によれば7日以上必要である。筆者はこの手法を利用した半数体育種法推進の際、葯置床作業やカルス移植作業における労力が集中するため、労力分散のために、長い場合は

30日程度低温処理したものまで供試していた。本研究の結果から、アルビノ個体出現抑制に有効な手法が未開発の現時点では、低温処理期間を10日前後として、誘導されたカルスを再分化培地に移植して緑色個体再分化の促進を図ることが最も有効と考えられ、今後はこの点を留意して育成を推進する方針である。

中生新千本や試験2において供試した88-9は緑色個体の再分化率が低いにもかかわらず、アルビノ個体の出現率が極めて高かった。このようにアルビノ個体の出現傾向には系統間に差異があり、前述の遺伝子以外の遺伝子の関与の可能性も考えられ、今後この点についての研究も促進して根本的解決を図る計画である。

摘 要

水稻の薬培養における培養前の低温処理がカルス誘導の後の緑色個体再分化とアルビノ個体発生に及ぼす影響を調査し、以下の結果を得た。

1. コガネマサリと中生新千本は低温期間が10日の短い処理区のもの緑色個体再分化率が高く、20日以上になると低下した。アルビノ個体の出現率は両品種とも低温期間が10日の短い処理区のもの低く、20日以上に長くなると高くなった。
2. 供試した6組合せのF₂はいずれも低温期間8～9日の短期間処理区で緑色個体の再分化率が高く、アルビノ個体出現率が低く、23～36日の長期処理区で緑色個体の再分化率が低下し、アルビノ個体出現率が高くなった。
3. したがって、緑色個体再分化促進もアルビノ個体出現抑制にも、培養前の低温処理は10日程度にして薬置床し、さらに、早期に誘導されたカルスをスムーズに移植して再分化させる方法が当面の有効な手法と言える。

謝 辞

本研究試験2の実施に当たっては、当センター高冷地研究部の前田博文研究部長及び伊藤夫仁主任研究員から供試材料提供等のご協力をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) FUKUI, K.: 1983, Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus, Theor. Appl. Genet. 65: 225-230
- 2) GENOVESI, A. D. and S. W. MAGILL: 1979, Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock, Crop Sci. 19: 662-664
- 3) 丸田一成・土屋隆生・菊池尚志・大野清春: 1992, イネ薬培養アルビノ個体の葉緑体遺伝子発現におけるスプライシング効果, 育種 36別1: 238-239.
- 4) 大野清春: 1975, イネの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.
- 5) ———: 1984, 組織培養による遺伝変異の拡大, 育種学最近の進歩 25: 46-52.
- 6) 佐藤 光: 1982, 葉緑体突然変異およびネクロシス突然変異の遺伝子分析, イネ遺伝子分析の現状(九州大学農学部育種学教室 イネ遺伝子研究班発行): 76-84.
- 7) 新橋 登・相川宗蔵: 1986, 水稻育種における薬培養法の利用, 育種学最近の進歩 27: 13-18.
- 8) 山田栄成・日向康吉: 1986, イネ薬培養における低温処理についての光顕・電顕的観察, 育種: 36別1: 70-71.
- 9) 若狭 暁: 1982, 植物組織培養の育種への利用——培養法の改良と変異体作出——農技研報 D33: 121-200.

Effects of Low Temperature Treatment to the Pre-culture Panicles on
Regeneration of Green-plants and Albino-plants from Anther Culture
Calli of Rice

Takao TSUCHIYA

Summary

The present paper describes the results of two experiments carried out to elucidate the influence and effective length of low temperature treatment to pre-culture panicles on regeneration of green-plants and albino-plants from rice calli induced by anther culture, and those results are summarized as follows.

First, pollen calli were initiated from Nakateshinsenbon and Koganemasari rice (*Oryza sativa* L. Subsp. *Japonica*). The panicles containing pollen at the stages between first contraction and binucleate of pollen were subjected to 10°C for different periods : That is 10, 20, 30 and 40 days respectively before placing the anthers on callus inducing N₆ medium containing 2mg/l of 2,4-D. Among those different treatment periods the 10 days treatment gave much higher frequency of green-plant regeneration and lower frequency of albino-plant. On the contrary, 20, 30 and 40 days treatments, frequency of green-plant regeneration decreased, while frequency of albino-plant increased.

Secondly, 6 F₂ populations that were crossed in Hiroshima Agri. Exp. Sta. in 1989 were provided as materials for anther culture. The panicles of these populations were subjected to low temperature (10°C) for 8-9 days and 23-36 days. The 8-9 days treatments of all F₂ populations gave higher frequency of green-plant regeneration while lower frequency of albino-plant, compared with the 23-36 days treatments.

Considering from these results, most effective length of low temperature treatment to obtain higher percentage of green-plant regeneration and to inhibit albino-plant regeneration is concluded to be 10 days.

Key word : paddy rice(*Oryza sativa* L. Subsp. *Japonica*), anther culture, low temperature treatment, regeneration, albino.