

2012 年度
修士論文

イネ蒔培養効率におよぼすカルス誘導期の
培養環境の影響

21131009 九島 有梨華

指導教員 植物遺伝学 教授 我妻尚広

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

目 次

緒 言	1
材料および方法	
1. 効率的な材料の養成法および採取法	4
2. 蔕の二段階培養法	5
3. 実験Ⅰ カルス誘導期の培養温度の影響	6
4. 実験Ⅱ カルス誘導期の照明の有無の影響	7
結 果	
1. 実験Ⅰ カルス誘導期の培養温度の影響	8
2. 実験Ⅱ カルス誘導期の照明の有無の影響	9
考 察	10
要 約	14
謝 辞	15
引用文献	16
Summary	20
図 表	21

緒 言

Niizeki and Oono (1968) は世界で最初にイネの薬培養による半数体の作出に成功した。この成果は自殖性作物であるイネの育種年限を短縮する技術になりうるとして、中国の研究者が薬培養の基礎技術を確立させ、中国国内の実用品種を多数育成した（福井 1981, 島田 1991）。この頃、日本国内では系統育種法や集団育種法、さらに育種年限を短縮させるため集団育種法に世代促進法を組み合わせた方法が育種事業として展開され、新たに薬培養法による半数体育種法を導入する必要性が見出せなかった。しかし、1980 年に北海道の優良米早期開発試験で、薬培養法による半数体育種法が開始され、1987 年に北海道立上川農業試験場が国内初の薬培養品種「上育 394 号」を育成した（佐々木ら 1988）。その後、北海道の内外でも 25 を超す薬培養品種・系統が育成され（佐竹 1999）、日本国内にも育種事業への薬培養法の利用が定着した。

一方、イネの育種事業に取り組む研究機関では薬培養効率の低さに起因する労力の負担が問題となっている。国内では、イネの育種事業に対する薬培養法の利用がない時代に、大野（1975）は薬培養法の育種事業への導入に膨大な労力が必要となることを自身のデータに基づき示した。その後、国内において薬培養法がイネの育種事業に導入されると、1989 年および 1997 年に薬培養技術に関するア

ンケート調査が実施され、それぞれの実施時期で葯培養効率は葯あたり倍加半数体率が国内の平均値で 1.35% および 1.30%（交配 1 組合せにおける割合）と低く、育種に必要な倍加半数体数を確保するためには、葯の置床やカルスの移植など多大な労力をかけていることが明らかとなった（大槻ら 1989, 佐竹 1999）。大野（1975）をはじめ、大槻ら（1989）や佐竹（1999）は、葯培養効率の向上のための、技術改善研究の必要性をそれぞれ指摘している。特に、佐竹（1999）は現行法の培養効率に関与する諸要因の効果を再検討し、各要因の最適条件を組み合わせることによって培養効率の飛躍的向上を図ることの必要性を提言した。

イネ葯培養効率には花粉の発育時期、ドナー植物の遺伝子型や栽培条件、葯の前処理、培地組成、培養環境、アルビノの発生などが関与している（Chen 1986）。イネの葯培養法には一段階培養法（中村ら 1985）、二段階培養法（Niizeki and Oono 1986）、三段階培養法（津川 1992）、二層培養法（佐藤 1993）など、様々な培養法がある。佐竹（1999）の提言以降に実施された培養効率改善の研究は二段階培養法と三段階培養法で取り組まれ、二段階培養法では培養環境の照明（出原ら 2005）、培地組成の培地支持体（出原ら 2005, 吉田ら 2006）に関し、三段階培養法（浮遊葯培養法）では花粉発育時期（木下ら 2000）、培養環境の温度（岡本ら 2001）、培養環境の通気性（岡

本ら 2003), 培養環境の葯密度 (木下ら 2005) に関する要因の効果について検討された。

二段階培養法は国内の育種事業では 31 機関中 19 機関と多くが採用している方法である。したがって、二段階培養法において葯培養効率の改善研究に取り組むことが、国内の多くの育種機関に成果を還元することが可能である。また、イネの場合、葯 (小孢子) 由来のカルスを経由し、再分化植物体が得られる培養系である。葯培養効率の向上にはカルスの形成が必須であることから、カルス誘導期に対する処理の効果を検討することが重要である。さらに、育種事業に取り組む機関では基本培地や葯の低温前処理期間はほぼ共通の条件であったが、培養温度や照明の有無など機関ごとに異なる条件も見られた (佐竹 1999)。異なる培養条件は、培養効率に対して、普遍性が見られない要因ととらえられる一方、培養効率に対する影響が確定していない要因ともとらえることができる。

そこで、本研究では実験 I では、二段階培養法のイネ葯培養効率におよぼすカルス誘導期の培養温度の影響を、15℃から 30℃の範囲で調査し、培養に最適な温度を明らかにしようとした。次に実験 II では二段階培養法のイネ葯培養効率におよぼすカルス誘導期の照明の影響を、12 時間照明条件と 24 時間暗黒条件の比較により明らかにしようとした。

材料および方法

1. 効率的な材料の養成法および採取法

北海道の水稻品種「キタアケ」と「きらら 397」の 2 品種を供試した。2011 年 5 月 23 日と 7 月 30 日に酪農学園大学実験圃場のガラス温室で「キタアケ」を、同年 6 月 6 日と 7 月 13 日に「きらら 397」を、佐竹（1972, 1989）の方法を準用した円形 16 粒播きポット栽培法により播種した（図 1）。円形 16 粒播きポット栽培法は発育時期の揃った穂を効率的に得るための方法で、5 g の粒状複合肥料 BB474（N:0.7 g, P:0.85 g, K:0.7 g）をよく混合した 2 kg の乾土を、3.5L のプラスチックポットに詰め、同心円状に 16 粒の催芽種子を直播した。2 葉期に湛水し、発生する分けつを適宜切除して主稈のみを生育させた（図 2）。ポット内およびポット間の個体の生育を揃えるため、ガラス温室内の微気象の差を考慮し、ポットの位置を毎日変えた（図 3）。

生理的素質の均一な葯を供試するため、上位 3 枝梗の 1 次枝梗に着生した穎花のうち、それぞれの先端から 1, 3, 4, 5 番目の穎花（1 穂あたり 12 穎花）を特定穎花（図 4）とし、止葉葉数（播種月によって 9 葉または 10 葉）の同じ主稈穂の特定穎花から葯を採取した。穂ばらみ期に、葉耳間長別に主稈穂の特定穎花の葯の花粉発育ステージを検鏡して、1 核中期から後期の葯が多く得られる葉耳間長を、

3 cm の範囲で決定し、直ちにその範囲の葉耳間長を持つ茎を一斉に採取し、1 cm 刻みで分級した (図 5-A)。これらの茎を止葉前葉の節の直下で水切りし (図 5-B)、止葉の前葉を基部から数 cm 残して切除した (図 5-C)。これらの茎を水の入ったプラスチックポットに挿し、茎全体を黒色のポリエチレン袋で覆い光を遮断し (図 5-D)、暗黒下で 10℃ のインキュベータ内にて低温前処理をした (図 5-D)。

2. 葯の二段階培養法

低温前処理の後、葉鞘の中から穂を取り出し、70% エタノールに 1 分間浸漬し、滅菌水で 3 回洗浄した。洗浄後、穎花内葯群別培養法 (岡本・我妻 2006) により特定穎花内の葯を摘出し、二段階培養法で葯を培養した。二段階培養法ではカルス誘導と植物体再分化に対して、それぞれ組成の異なる固形培地を用い、カルス誘導期を 35 日、植物体再分化期を 60 日とした。

カルス誘導には N₆ 培地 (Chu 1978) を基本培地として用い、これに 2,4-D 2 mg/l, アスパラギン酸 1 g/l, グルタミン 1 g/l, ショ糖 50 g/l, ゲランガム 2 g/l を添加し、培地 pH を 5.5 に調整した。植物体再分化には、N₆ を基本培地とし、これに IAA 0.2 mg/l, BA 0.5 mg/l, カザミノ酸 2 g/l, ソルビトール 30 g/l, ショ糖 30 g/l, 寒天 10 g/l を添加し、培地 pH を 5.5 に調整した。培地の滅菌には、オートクレーブを用い、121℃・1.02 気圧で 15 分間の湿熱滅菌した。カルス誘

導培地は滅菌後に $\phi 90 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ のプラスチックシャーレ（岩城硝子株式会社 SH-20）に培地 20 ml を分注した．植物体再分化培地は $\phi 25 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 試験管に培地 15 ml を分注した後に滅菌した．

3. 実験 I カルス誘導期の培養温度の影響

「キタアケ」および「きらら 397」を用い、「キタアケ」では 7 月播種の材料で 2 回（葉耳間長 $\pm 0 \text{ cm}$ と葉耳間長 -1 cm ）,「きらら 397」では 6 月播種（葉耳間長 -3 cm ）と 7 月播種（葉耳間長 -4 cm ）の材料で 1 回ずつ実験し、それぞれ「キタアケ」I -①,「キタアケ」I -②,「きらら 397」I -①,「きらら 397」I -②とした．材料の低温前処理期間は「キタアケ」I -①で 19 日,「キタアケ」I -②で 10 日,「きらら 397」I -①で 20 日,「きらら 397」I -②で 19 日間とした．

実験には温度勾配可能なグロースチャンバー（株式会社日本医化器械製作所 TG-180CCFL-5LD）を用い、カルス誘導期の培養温度を 15°C , 20°C , 25°C , 30°C に設定した 4 試験区で実施した．主稈穂ごとに穎花内葯 4 群別培養法で特定穎花の 72 葯を 18 葯ずつに分け、4 試験区のカルス誘導培地（シャーレに培地 20 ml）に置床した．各実験とも 1 シャーレに 36 葯（2 穂）置床し、試験区あたり 15 シャーレで 540 葯を目標とし、暗黒条件で培養した．各区で得られたカルスを再分化培地（試験管に培地 15 ml）に全数移植を基本とし、1 試験管に 1 カルスずつ移植した．移植した後、 25°C で約 3,000 lx・

12 時間照明で培養した。

蒔置床後 35 日目に直径 0.5 mm 以上のカルスを形成した蒔数を調査し、置床した蒔数で除してカルス形成率 (C, %) を求めた。カルス移植後 60 日目に緑色植物を再分化したカルス数およびアルビノ植物を再分化したカルス数を調査した。それぞれ移植したカルス数で除して緑色植物再分化率 (G, %) およびアルビノ植物再分化率 (A, %) を求めた。ただし、1 個のカルスから複数個体を再分化した場合でも再分化したカルス数を 1 と数えた。1 個のカルスから緑色植物とアルビノ植物が混在して再分化した場合には緑色植物を再分化したカルス数とした。また、緑色植物再分化率とアルビノ植物再分化率を加えて全個体再分化率 (G+A, %) を、カルス形成率と緑色植物再分化率を乗じて蒔あたり緑色植物再分化率 ($C \times G$, %) を求めた。

4. 実験Ⅱ カルス誘導期の照明の有無の影響

「キタアケ」および「きらら 397」を用い、「キタアケ」では 5 月播種 (葉耳間長-1 cm) と 7 月播種 (葉耳間長±0 cm), 「きらら 397」では 6 月播種 (葉耳間長-1 cm) と 7 月播種 (葉耳間長-3 cm) の材料で 1 回ずつ実験し、それぞれ「キタアケ」Ⅱ-①, 「キタアケ」Ⅱ-②, 「きらら 397」Ⅱ-①, 「きらら 397」Ⅱ-②とした。材料の低温前処理期間は「キタアケ」Ⅱ-①で 26 日, 「キタアケ」Ⅱ-②で 15 日,

「きらら 397」Ⅱ-①で 15 日,「きらら 397」Ⅱ-②で 17 日間とした。

実験にはカルス誘導期に 3000 lx・12 時間照明下で培養する照明区と, 培養シャーレをアルミホイルで包み照明を遮断して培養する暗黒区の 2 試験区で実施した。主稈穂ごとに穎花内葯 2 群別培養法で特定穎花の 72 葯を 36 葯ずつに分け, 2 試験区のカルス誘導培地に置床した。各実験とも試験区あたり 540 葯・150 カルスを目標に培養した。カルスの培養温度と照明条件は 25℃で約 3,000 lx・12 時間照明であった。なお, カルス形成率やカルスからの植物体再分化に関して, 実験Ⅰの方法に従い調査した。

結 果

1. 実験Ⅰ カルス誘導期の培養温度の影響

水稻品種「キタアケ」および「きらら 397」の葯培養効率によろぼすカルス誘導期の培養温度の影響を表 1 に示す。カルスは「キタアケ」のⅠ-①とⅠ-②および「きらら 397」のⅠ-②では 25℃区と 30℃区でのみ形成された。カルス形成率は「キタアケ」では 25℃区に比べ 30℃区で有意に高くなったが, 「きらら 397」では 25℃区と 30℃区に有意な差が見られなかった。一方, 「きらら 397」のⅠ-①では新たに 20℃区でカルスの形成が見られた。20℃区のカルス形成率は 25℃区および 30℃区に比べて有意に低くなったが, 25℃区と 30℃区

との間には有意な差は見られず、25℃区と 30℃区でのカルス形成率では両品種間で温度に対する反応に差異が認められた。

緑色植物再分化率は両品種とも 2 回の実験では 25℃区が 30℃区に比べて高くなった。また、アルビノ植物再分化率では 25℃区と 30℃区と間に、品種間や実験の繰り返し間で一定の関係は見られなかった。葯当たり緑色植物再分化率は「キタアケ」のⅠ-①とⅠ-②の 2 回の実験で 25℃区に比べ 30℃区が高くなったが、「きらら 397」のⅠ-①とⅠ-②の 2 回の実験では両区にほとんど差がなかった。

2. 実験Ⅱ カルス誘導期の照明の有無の影響

水稻品種「キタアケ」および「きらら 397」の培養効率におよぼすカルス誘導期の照明の有無の影響を表 2 に示す。カルス形成率は「キタアケ」のⅡ-①と「きらら 397」のⅡ-①およびⅡ-②では照明区と暗黒区との間に有意な差は見られなかったが、「キタアケ」のⅡ-②では照明区よりも暗黒区が有意に高くなった。

緑色植物再分化率は「キタアケ」のⅡ-①では照明区より暗黒区が低く、Ⅱ-②では両区に差はなく、2 回の実験結果が一致しなかった。一方、「きらら 397」ではⅡ-①およびⅡ-②ともに、照明区より暗黒区が高くなった。アルビノ植物再分化率は「キタアケ」のⅡ-①では照明区に比べ暗黒区で著しく高くなったが、Ⅱ-②では両区に差はほとんどなく、アルビノ植物の発生割合はわずかであった。「きらら

397」のⅡ-①では照明区より暗黒区でアルビノ植物の発生は抑制されたが、Ⅱ-②では両区で差はなかった。葯当たり緑色植物再分化率は「キタアケ」のⅡ-②と「きらら 397」のⅡ-①およびⅡ-②で照明区に比べて暗黒区が高かったが、「キタアケ」のⅡ-①では両区に差は見られなかった。

考 察

イネ葯培養効率と培養温度に関する研究はすでにいくつか報告されている（亀島ら 1994，岡本ら 2001，若狭 1981）。二段階培養法での評価は若狭（1981）の報告のみで，その他の研究は一段階培養法（亀島ら 1994），三段階培養法（岡本ら 2001）であった。これらの既報はカルス誘導期の培養温度が 25℃前後～30℃前後と狭い範囲で行なわれ，二段階培養法で実施した若狭（1981）でも温度条件は 24℃，28℃，32℃と狭かった。若狭（1981）によれば，イネ葯培養効率は「農林 8 号」では 32℃で高く，「藤坂 5 号」では 28℃でやや高かったが，培養温度による顕著な差は見られなかったと述べており，この温度範囲では供試した 2 品種に対する最適温度はなかったと言える。しかし，本研究では若狭（1981）が供試した品種と異なるが，同様の温度区間で比較すると，「キタアケ」では 30℃区が 25℃区に比べて有意に高く，「キタアケ」のカルス形成には 30℃が

最適温度であることが明らかになった（表 1）。一方、「きらら 397」では 30℃ 区が 25℃ 区より高かったが、有意な差はなく、本研究で供試した 2 品種間ではカルス形成に対するカルス誘導期の培養温度の影響に差異が認められた。コムギ（前野ら 1988, Ouyang *et al.* 1983）やオレンジ（Hidaka 1984）では好適な培養温度が品種により異なることが報告されている。本研究では 2 品種であるものの、イネにおいても上記の作物での報告と同様に品種間差異が認められた。また、本研究では若狭（1981）が比較検討した温度範囲よりも低い温度条件（15℃ と 20℃）でも実験したが、「キタアケ」では 25℃ よりも低い温度、「きらら 397」では 20℃ よりも低い温度ではカルスが全く形成されず、カルス形成に対する閾値の存在と、品種によりその閾値温度が異なることが示唆された。

カルス誘導期の培養温度が高い条件で形成されたカルスは緑色植物再分化率が低くなり、アルビノ植物の再分化率が高くなることが報告されている（Song *et al.* 1978, 若狭 1982, Wang *et al.* 1978）。本研究では両品種とも緑色植物再分化率は 25℃ 区よりも 30℃ 区の方が低く（表 1）、温度が高いと緑色植物再分化率が低くなるという報告（文献）と一致した。しかし、アルビノ植物再分化率ではカルス誘導期の高温条件が必ずしもアルビノ植物の発生を促すとはいえなかった。

葯当り緑色植物再分化率は選抜対象となる倍加半数体の数を左右する重要な指標である。本研究におけるこの割合は「キタアケ」では 25℃ 区に比べ 30℃ 区が高くなったが、「きらら 397」では 25℃ 区と 30℃ 区にほとんど差はなかった。北海道の水稻 2 品種という限定された結果ではあるが、品種で最適な温度が異なった。イネの育種事業では多様な育種素材を扱うため、遺伝背景の異なる個々の材料に対して温度条件を変えることは現実的ではない。実際、育種事業に葯培養法を導入している機関では 25℃～30℃ の範囲でカルスを誘導している（佐竹 1999）。したがって、事業育種におけるカルス誘導期の培養温度は現状のままでよいと考えられる。

出原ら（2005）は本研究と同一の 2 品種を供試し、イネの二段階葯培養法におけるカルス誘導期の照明の有無の影響を検討し、カルス誘導期の暗黒培養の有効性を示した。すなわち、カルス誘導期を暗黒にすることでカルス形成率は向上し、カルスからの緑色植物再分化率も高くなることを「キタアケ」と「きらら 397」で示した。しかし、本研究の実験Ⅱではカルス誘導期の暗黒培養の有効性が示されたのは、カルス形成率では「キタアケ」Ⅱ-②の 1 回と、緑色植物再分化率では「きらら 397」Ⅱ-①とⅡ-②の 2 回で、品種間や実験の繰り返し間で結果が異なり、暗黒培養の効果を明確に示すことはできなかった（表 2）。この結果の原因は材料の低温前処理期間の違

いに起因すると考えられた．出原ら（2005）の実験では供試材料の
蒔の低温前処理期間は 12 日または 13 日で，品種間や実験の繰り返
し間での低温処理期間の差はわずか 1 日であった．これに対して，
本研究では低温前処理期間が 15 日，17 日，26 日と品種間や実験の
繰り返し間での差が大きかった．このことから，低温前処理期間が
カルス形成の照明の有無に対する交絡要因として働いたものと考え
られる．

以上の結果，カルス誘導期の培養温度は 25℃～30℃の範囲が適す
ることを示した．また，カルス誘導期の照明の有無は低温前処理期
間との関係を明らかにすることが今後の課題として残された．

要 約

本研究ではイネ薬培養効率を改善するため、水稻品種「キタアケ」と「きらら 397」を用い、二段階培養法で培養効率におよぼすカルス誘導期の培養環境（培養温度と照明）の影響を検討した。

培養温度の実験ではカルス形成率は「キタアケ」で 30℃区が 25℃区に比べて有意に高く、「キタアケ」のカルス形成には 30℃が最適温度であることが明らかになった。一方、「きらら 397」では 30℃区が 25℃区より高かったが、有意な差はなく、本研究で供試した 2 品種間ではカルス形成に対するカルス誘導期の培養温度の影響に差異が認められた。緑色植物再分化率では 2 品種とも 25℃区が高くなった。薬当たり緑色植物再分化率は「キタアケ」では 25℃区に比べ 30℃区が高くなったが、「きらら 397」ではほとんど差がなかった。

一方、照明の実験ではカルス形成率は「キタアケ」の 1 回の実験のみで照明区よりも暗黒区で有意に高くなった。しかし、残りの実験では照明の有無で差は見られなかった。また、緑色植物再分化率と薬当たり緑色植物再分化率では 2 品種とも照明区と暗黒区にほとんど差が見られなかった。

以上の結果から、カルス誘導期の培養温度は 25℃～30℃の範囲が適することが示唆された。また、照明の有無では明確な結論が得られなかった。

謝 辞

本論文の執筆にあたり，主査の資源植物学研究室の我妻尚広教授においては本論文の完成に至るまで，日々温かい御指導および御助言・御助力を賜りました．副査として本論文の審査をしてくださった，草地学研究室の小阪進一教授，園芸学研究室の森 志郎准教授におかれましても厚くお礼申し上げます．また，本研究の遂行および本論文の執筆にあたり，植物育種学研究室の岡本吉弘准教授におかれましては，終始懇切な御指導および御助言・御協力を賜りまして心より厚くお礼申し上げます．

北海道上川農業試験場の佐藤博一研究員にはイネの蒔培養効率の貴重な情報のご提供をいただきました．心よりお礼申し上げます．

さらには，本研究における「キタアケ」と「きらら 397」の蒔培養の材料育成と実験のために培地の作成に御尽力頂いた，植物育種学研究室の後輩の小林幹仙氏，中崎大希氏には多大な御協力をいただきました．幌加内町農業技術センターの皆様には，本論文の執筆中に温かく見守ってくださいました．

最後にここまで温かく見守ってくれていた家族に感謝致します．

引用文献

- Chen, Y. (1986) Anther and pollen culture of rice. *In* "Haploids of Higher Plants in Vitro." Hu, H. and H. Yang (eds.) China Academic Publishers, Beijing, 3-25.
- Chu, C. C. (1978) The N₆ medium and its application to anther culture of cereal crops. *In* "Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture." Science Press, Peking, China, 43-50.
- 福井希一（1981）中国における半数体育種の進展（3）—新品種の育成—．農業および園芸 56:10-14.
- Hidaka, T. (1984) Effects of sucrose concentration, pH of media, and culture temperature on anther culture of citrus. *Japan J. Breed.* 34:416-422.
- 出原 慧・森 宏一・我妻尚広・岡本吉弘（2005）イネの葯培養における照明条件およびゲランガム培地がカルス形成と植物体再分化に及ぼす影響．育種学研究 7（別 1・2）:205.
- 亀島雅史・中村幸生・溝渕正晃・宇賀博之（1994）水稻新品種育成における葯培養(一段階法)の育種への利用．高知県農業技術センター研究報告 3:17-22.
- 木下厚・岡本吉弘・石村櫻・佐竹徹夫（2000）イネの葯培養におけるカルス形成に最適の花粉発育時期の決定．育種学研究 2:73-79.

- 木下厚・岡本吉弘・石村櫻・佐竹徹夫（2005）イネの浮遊葯培養における葯密度の低下およびカルスに付着した液体培地除去による培養効率の向上．育種学研究 7:103-111.
- 前野真司・島田多喜子（1988）コムギ葯培養における低温処理および培養温度の影響．育種学雑誌 38:194-195.
- 中村幸生・広田年信・藤巻宏（1985）イネ葯培養における一次成苗法について．北陸作物学会報 20:1-4.
- Niizeki, H. and K. Oono (1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. Proceedings of the Japan Academy 44:554-557.
- 岡本吉弘・木下厚・石村櫻・佐竹徹夫（2003）イネの浮遊葯培養において培養容器の蓋をパラフィルムで封じないことによるカルス形成率および植物体再分化率の向上．育種学研究 5:37-44.
- 岡本吉弘・木下厚・佐竹徹夫（2001）イネ葯の昼夜変温培養によるカルス形成率および植物体再分化率の向上．育種学研究 3:87-94.
- 岡本吉弘・我妻尚広（2006）イネの葯培養実験においてカルス形成能のほぼ等しい二群に分けるための穎花内葯二群別培養法．育種・作物学会北海道談話会報 49:31-32.
- 大野清春（1975）イネの葯培養による半数体の作出とその育種的利用．農技研報 D 26:139-222.

大槻義昭・新関宏夫・丹野久・佐々木武彦・中村幸生（1989）座談

会「稲の薬培養」．農業技術 44:135-139, 177-182.

Ouyang, J. W., S. M. Zhou and S. E. Jia (1983) The response of anther

culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. Theor Apple

Genet 66:101-109.

佐々木一男・新橋登・佐々木多喜雄・相川宗嚴・柳川忠男・沼尾吉

則（1988）水稻新品種「上育 394 号」の育成について．北海道

立農試集報 58:13-23.

佐竹徹夫（1972）イネポット栽培の改良法—生育時期の揃った穂を

得るために—．日作紀 41:361-362.

佐竹徹夫（1989）登熟実験のための材料養成法，“植物化学調節実験

法”高橋信孝編，植物化学調節学会，東京．379-381.

佐竹徹夫（1999）イネ育種における薬培養の利用—道・県の育種担

当者に対するアンケート調査—．農業技術 54:259-265.

佐藤毅（1993）水稻の効率的薬培養技術の開発．平成 4 年度新しい

研究成果—北海道地域— :37-41.

島田多喜子（1991）中国におけるイネ・コムギ薬培養の現状．農業

および園芸 66:19-22.

Song, H. G., S. N. Li, G. R. Li, S. G. Yun and J. W. Li (1978) Studies of

increasing the induction rate of callus tissue and pollen plants from

anthers of *Oryza sativa* cultured *in vitro*. Proceedings of symposium on plant tissue culture. 97-106.

津川秀仁（1992）イネ葯培養における三段階培養法．農業技術 47:295-299.

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 D 33:121-200.

Wang, C. C., C. S. Sun, C. C. Chu and S. C. Wu (1978) Studies on the albino pollen plantlets of rice. Proceedings of symposium on plant tissue culture. 149-16.

吉田智美・岡本吉弘・我妻尚広（2006）イネの葯培養におけるゲランガム培地と寒天培地の組合せの影響．育種学研究 8（別2）:317.

Summary

Effects of culture environmental factors during callus induction on anther culturability in *japonica* rice

Yurika KUSHIMA

Haploid breeding through anther culture has been used for the improvement of *japonica* rice in Japan. Actually, commercial cultivars have been developed at domestic agricultural experiment stations. However, anther culturability of *japonica* rice is extremely low level.

In this study, the effects of culture temperature and light condition during callus induction were examined by using two step culture. Two *japonica* rice cultivars, 'kita-ake' and 'kirara 397' were used. Frequency of anthers producing microspore calli at 30 °C was significantly better compared at 25°C for 'kita-ake'. Contrarily, the one was not significantly for 'kirara 397'. Although the calli formed at 25°C showed high green-plant regenerability for both cultivars, the frequency of green-plant regeneration per anther was not increased. The effects of light conditions on callus induction and green-plant regeneration were not observed.



図1. 円形16粒播きポット栽培.

真ん中の3粒はその回りにある16粒の生育が不良だった
場合の移植用.



図2. 分げつを切り主稈穂だけを生育したイネの草姿.

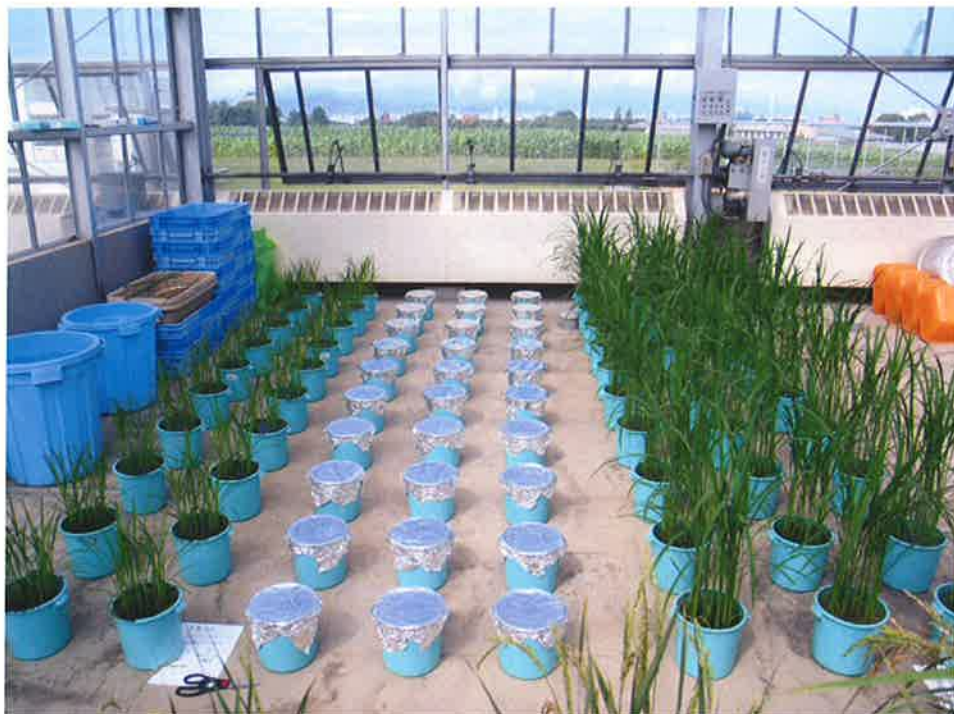


図3. 材料養成の様子.



図4. 葯培養で用いる上位3枝梗.

赤い矢印で示した上位3枝梗の先端から1, 3, 4および5番目の穎花（1穂あたり12穎花）を特定穎花とし，その穎花の葯を培養で供試した.

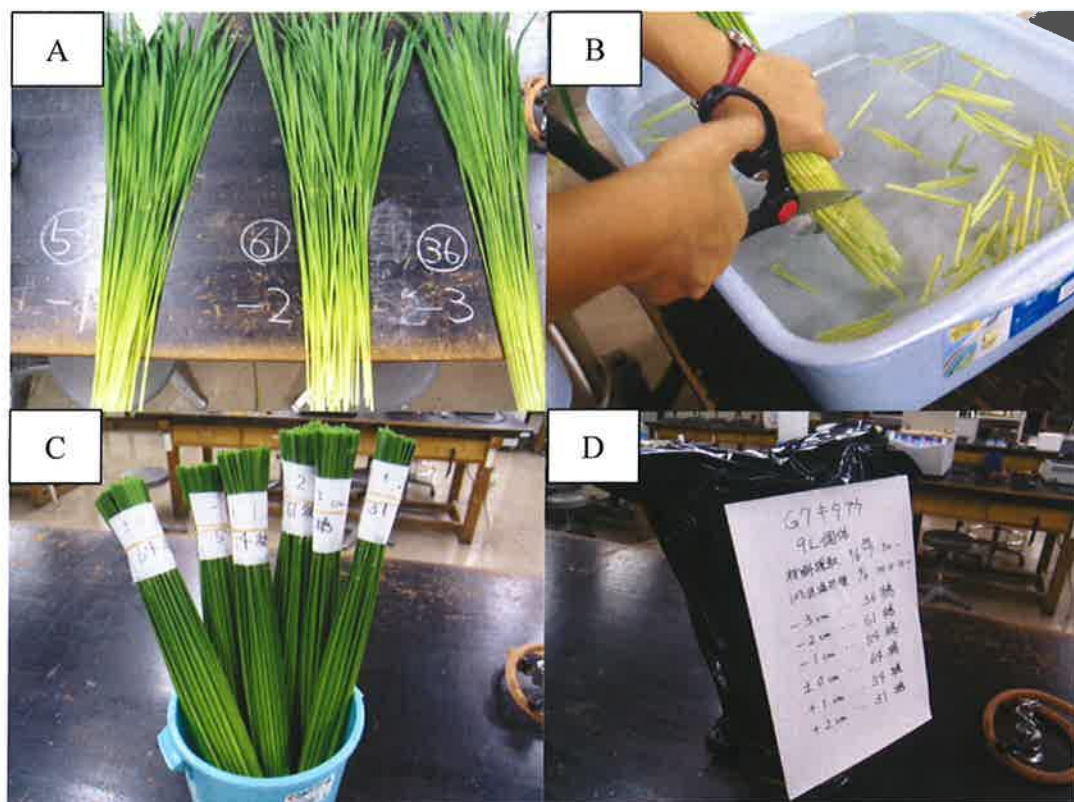


図5. 採取した材料の保存手順.

- A. 採取した材料を1 cmごとに分級する.
- B. 葉耳間長ごとに茎を止葉前葉の節の直下で水切りする.
- C. 止葉の前葉を基部から数cm残して切除し，葉耳間長ごとにまとめて水のいったポットに挿す.
- D. 茎全体を黒のポリエチレン袋で覆い，暗黒下で10℃で保存する.

表1. 水稻品種「キタアケ」および「きらら397」の薬培養効率率におよぼすカルス誘導期の培養温度の影響

品種 ¹⁾	播種月	葉耳間長	低温前 処理期間	試験区	置床薬数	カルス形成率 ²⁾ (%, C)	移植 カルス数	カルスからの植物体再分化率(%)			葯当たり緑色 植物再分化率 (%, C×G)
								緑色植物 (G)	アルビノ植物 (A)	全植物 (A+G)	
キタアケ I-①	7月	±0	19日間	15℃	394	0	0	-	-	-	-
				20℃	395	0	0	-	-	-	-
				25℃	392	24 ± 3.0	93	67	7	74	16
				30℃	395	35 ± 2.6	139	63	13	76	22
キタアケ I-②	7月	-1	10日間	15℃	432	0	0	-	-	-	-
				20℃	432	0	0	-	-	-	-
				25℃	432	49 ± 2.0	150	91	7	98	45
				30℃	432	66 ± 2.9	151	87	6	93	57
きらら397 I-①	6月	-3	20日間	15℃	465	0	0	-	-	-	-
				20℃	467	2 ± 0.9	7	29	71	100	1
				25℃	464	25 ± 4.2	122	70	21	91	18
				30℃	463	29 ± 4.5	132	58	30	88	17
きらら397 I-②	7月	-4	19日間	15℃	178	0	0	-	-	-	-
				20℃	177	0	0	-	-	-	-
				25℃	178	37 ± 8.6	67	36	37	73	13
				30℃	179	44 ± 11.0	77	25	31	56	11

1) 「キタアケ」 I-①および I-②は水稻品種「キタアケ」を葉耳間長±0 cmと-1 cmを32穂ずつ用いた。
「きらら397」 I-①および I-②は水稻品種「きらら397」を I-①では葉耳間長-3 cmを28穂、 I-②では葉耳間長-4 cmを30穂用いた。

2) 平均値±標準誤差で表し、異なる英小文字間には検定（「キタアケ」 I-①と I-②、「きらら397」 I-①と I-②）またはTukey-Kramer法（「きらら397」 I-①）により、5%水準で有意差があることを示す。

また、「キタアケ」 I-①ではn=12, I-②ではn=11, 「きらら397」 I-①ではn=13, I-②ではn=5であった。

表2. 水稻品種「キタアケ」および「きらら397」の薬培養効率におよぼすカルス誘導期の照明の有無の影響

品種 ¹⁾	播種月	葉耳間長	低温前 処理期間	試験区	置床薬数	カルス形成率 ²⁾ (%, C)	移植 カルス数	カルスからの植物体再分化率(%)			葯当たり緑色 植物再分化率 (%, C×G)
								緑色植物 (G)	アルビノ植物 (A)	全植物 (A+G)	
キタアケ II-①	5月	-1	26日間	照明区	430	38 ± 7.9	150	64	23	87	24
				暗黒区	431	41 ± 8.6	150	59	35	94	24
キタアケ II-②	7月	±0	15日間	照明区	576	74 ± 3.1	150	90	5	95	67
				暗黒区	576	81 ± 3.7 *	150	91	3	94	74
きらら397 II-①	6月	-1	15日間	照明区	501	53 ± 5.1	150	51	29	80	27
				暗黒区	502	53 ± 5.6	150	57	21	78	31
きらら397 II-②	7月	-3	17日間	照明区	714	65 ± 3.4	150	36	51	87	23
				暗黒区	710	67 ± 3.2	150	39	51	90	26

1) 「キタアケ」II-①およびII-②は水稻品種「キタアケ」をII-①では葉耳間長-1 cmを14穂、II-②では葉耳間長±0 cmを18穂用いた。
「きらら397」II-①およびII-②は水稻品種「きらら397」をII-①では葉耳間長-1 cmを14穂、II-②では葉耳間長-3 cmを20穂用いた。

2) 平均値±標準誤差で表し、*は検定により、5%水準で有意差があることを示す。

また、「キタアケ」II-①ではn=12, II-②ではn=16, 「きらら397」II-①ではn=14, II-②ではn=20であった。