

イネの浮遊葯培養における培養効率の改善に関する研究

岡 本 吉 弘

Study on the floating anther culture of rice to improve the culture efficiency

Yoshihiro OKAMOTO

酪農学園大学紀要 別 刷 第 29 卷 第 2 号

Reprinted from

”Journal of Rakuno Gakuen University” Vol.29, No.2 (2005)

イネの浮遊葯培養における培養効率の改善に関する研究

岡 本 吉 弘

Study on the floating anther culture of rice to improve the culture efficiency

Yoshihiro OKAMOTO
(October 2004)

目 次

第1章 緒 論

- 第1節 イネにおける葯培養の研究史
- 第2節 日本のイネ育種における葯培養利用の現状
- 第3節 イネの浮遊葯培養の特徴と本研究の目的

第2章 材料の養成と葯の培養法

- 第1節 材料の栽培と葯の採取
- 第2節 標準葯培養法
- 第3節 培養効率の表示法

第3章 葯培養に最適な花粉の発育時期

- 第1節 培養に最適な花粉の発育時期の決定
- 第2節 育種現場で利用できる培養適期の葯の採取法

第4章 培養法の改善によるカルス形成率および植物体再分化率の向上

- 第1節 昼夜変温培養による培養効率の向上
- 第2節 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
- 第3節 葯密度の低下によるカルス形成率の向上
- 第4節 カルスに付着した液体培地除去による植物体再分化率の向上

第5章 浮遊葯培養における花粉起源カルスと分割起源カルスの増殖の実態

第6章 総合考察

- 第1節 培養効率の向上
- 第2節 育種技術としての葯培養の今後の研究課題

摘 要

謝 辞

引用文献

Summary

第1章 緒 論

第1節 イネにおける葯培養の研究史

Guha and Maheshwari は 1964 年に *Datura innoxia* の葯を培養して胚様体 (embryoid) を誘導することに初めて成功した。続いて彼らは 1966 年にその胚様体が花粉に由来すること, 1967 年にはそれから発育した植物体が半数体であることを報告した。この報告を契機にして葯培養の研究が盛んに行われるようになり, 今日までに多くの植物種で花粉起源の半数体植物が作出されてきた。Reed (2000) によれば, 葯培養により半数体が作出されたのは 170 以上の種におよんでいる。

イネで葯培養による半数体を最初に作出したのは Niizeki and Oono (1968) である。Niizeki and Oono (1971) は, 半数体の自然倍加もしくはコルヒチン処理により倍加した 2 倍体植物の 20 系統が遺伝的に純粋であることを報告した。これらの報告は葯培養が育種期間を短縮する技術になり得るとして, 国内外のイネ研究者から注目された。大野 (1975) は葯培養法を詳細に研究して葯培養の育種の利用に道を拓いたが, 当時の技術水準はなお低く, 葯培養を育種の実用技術とするためには当時のカルス形成率 2.1% を 8% に, カルスからの植物体再分化率 10% を 50% に向上させることが必要であると論述した。その後, 培養効率に関与する要因の研究が進み, Chen (1986a) はその要因として花粉の発育ステージ, ドナー植物の遺伝子型・栽培条件, 葯の前処理, 培地の組成, 培養環境, アルビノ発生などをあげている。この中でアルビノ発生を除いた要因に関しては一定の研究成果が得られ, それらの成果について新関 (1990) が詳細に紹介している。

培養効率を向上させる研究の進展とともに、新たな培養方法や葯置床の省力技術が開発された。イネの葯培養法では、カルス誘導培地と植物体再分化培地の2種類を用い、培養操作を2回行う二段階培養法が一般的である。中村ら(1985)はカルス誘導から植物体再分化までを一種類の培地で行い、培養操作が1回のみ的一段階培養法を開発した。津川(1992)は液体培地でカルスを誘導すると固形培地(寒天)に比べてカルスが多数できる利点を活かし、カルス誘導(液体)——カルス増殖(寒天)——植物体再分化(寒天)の3種類の培地を用いる三段階培養法を開発した。三段階培養法は二段階培養法より移植に伴う培養操作が1回多いものの、多数のカルスが形成され、移植回数の多い欠点を補った。佐藤ら(1993)は三段階培養法の高い効率を維持しながら、培養操作を1回減らした二層培養法、すなわち固形のカルス増殖培地に液体のカルス誘導培地を重層した方法を開発した。

事業育種での葯置床作業を軽減させる省力技術として、Toriyama and Hinata(1985)は穎花から葯を摘出しないで穎花のついた穂をそのまま液体培地で振盪培養し、穎花の中でカルスを誘導することに成功した。坂ら(1995)は、篩と受け皿を組み合わせ、その中に上下を切除した穎花とスターラー・バーを入れ、それを滅菌水の入ったビーカーの中に沈めた。スターラー・バーの回転により、穎花から葯が離れ、葯が水面に浮かび、これをガラス棒ですくいとり、液体培地に置床することで省力化を実現した。

最近の葯培養研究では、培養により得られる品種・系統に関する研究と培養効率の遺伝解析研究が主である。大里ら(1999)はF₁葯培養により育成した系統と交雑育種法の集団育種法による育成系統の農業形質を比較し、葯培養法で育成した系統は集団育種法に比べ、収量が低く、穂長が短い傾向にあったが、出穂期、稈長、千粒重、食味は両育種法で差はなかったことを報告した。葯培養によって再分化した当代個体(A₁個体)は遺伝的に純系で固定しているはずであるが、A₂世代の穂系統内における形質の分離がChen(1986b)、新関ら(1989)、中村ら(1999)、星ら(2000)、小牧ら(2001)によって報告された。新関ら(1989)はA₂世代で確認した穂系統内分離には、カルス増殖中に起こる突然変異で説明できる場合(A₁個体のすべての穂が同じ変異を示す場合、A₁個体の穂別に変異する場合)と変異発生のメカニズムの説明がつかない場合(1穂内の突然変異の型が異なる場合)とがあるとし、培養変異以外の原因を示唆した。小牧ら(2001)は培養変異以外

の原因がA₁株養成中の他花受粉によるものかどうかを調査したが、明確な結論は得られなかった。星ら(2000)は分離の原因が体細胞(葯壁や花糸)からの再分化によるか否かを検証するため、F₁葯培養によって再分化した倍加半数体97株についてRFLPマーカーで分析した。その結果、体細胞由来の倍加半数体は認められなかった。これらの報告から、今のところ培養変異以外で生じる穂系統内分離の原因は明らかにされていない。その一方で、Sugimoto *et al.*(1999)は葯培養過程で生じる変異が、突然変異育種法として有用であることを実証した。

葯培養効率についてのダイアレル分析により、Miah *et al.*(1985)と藺牟田ら(1991)はカルス形成率、Sugimoto *et al.*(2000)は植物体再分化率が核に支配されている遺伝形質であることを実証した。しかし、関連している遺伝子数や染色体上の位置は明らかでない。山岸(1997)はRFLPマーカーを用い、カルス形成率と緑色植物再分化率を支配する染色体領域の一部を明らかにした。

第2節 日本のイネ育種における葯培養利用の現状

佐竹(1999)は北海道と各県の農業試験場50ヶ所と民間農業研究所10ヶ所に対し、イネ葯培養に関するアンケート調査を実施し、45機関から回答を得た(回収率75%)。その調査結果によれば、イネの葯培養を実施したことのある機関は33、そのうちの25機関が現在も培養を継続している。現在までに葯培養により育成された品種・系統は25を超え、この成果は葯培養技術が国内のイネ育種の実用技術の一つとして定着していることを示している。しかし、葯培養効率すなわち葯当たり稔実植物再分化率(カルス形成率×緑色植物再分化率×染色体の自然倍加率)が低いために育種に必要な再分化植物体数を得るためには相当の規模で培養しなければならない。現在、交雑1組み合わせ当たりの葯培養の規模は調査機関の平均で置床葯数10,738、移植カルス数2,594、再分化稔実植物体数148で、10年前に大槻ら(1989)が調査したときの規模に比べ、それぞれ2.6、1.6、3.3倍に増加し、葯培養育種への労力負担の大きさが伺える。そしてこのことが現在葯培養を実施している25機関のうち5機関は培養規模の縮小を、残りの機関は現状の規模で継続を考えているというアンケートの結果に反映していた。

葯培養育種での労力負担を軽減するには、培養効率を向上させればよいが、現在の培養効率すなわち

薬当たり稔実植物再分化率は1.3%で、この値は10年前の水準と同じであった(佐竹 1999)。佐竹がアンケート調査の依頼先に送った「イネ薬培養アンケート調査結果(最終まとめ)、1998年11月15日」によれば、現場のブリーダーの一部(13%)は、現行の技術水準はかなり限界に近いと考え、これ以上研究を重ねても培養効率の向上は望めないとしている。これに対し、残りの大半のブリーダー(87%)は稔実植物再分化率(緑色植物再分化率×染色体の自然倍加率)の向上、半数体の減少、薬培養の作業性の向上や培養操作の省力化、アルビノの抑制などを可能にする培養技術の改善・開発を望んでいる。現在の培養効率が10年前と変わらないという佐竹(1999)の分析結果は、技術水準が限界に近いという一部のブリーダーの考えを支持しているようにみえる。しかし、イネの薬培養の論文・講演要旨数が1990年以降急激に減少したという事実(岡本ら 2000)からみて、過去10年間の薬培養効率の停滞は、培養技術の限界というよりも技術改善のための研究が衰退したためと考えられる。

育種現場から求められている高い効率の薬培養法を確立するためには培養効率に関与する要因をさらに解析して技術の向上を図らなければならない。

第3節 イネの浮遊薬培養の特徴と本研究の目的

イネの薬培養は通常、薬を寒天などのゲル化剤によって固化した培地に置床するが、浮遊薬培養は薬を液体培地に置床する方法である。浮遊薬培養は通常の寒天培養に比べて、多数のカルスを誘導できることと置床作業が容易であることが優れている。しかし、浮遊薬培養のカルスは寒天培養のそれに比べて、再分化能が低いことが欠点である(Tian and Chen 1983)。

培養効率に影響する要因として、花粉の発育ステージ、ドナー植物の遺伝子型・栽培条件、薬の前処理、培地の組成、培養環境、アルビノ発生などがあげられる(Chen 1986a)。これらの要因に関していくつかの研究(Niizeki and Oono 1971, 大野 1975, Sunderland and Roberts 1977, Genovesi and Magill 1979, 若狭 1982)は行われているが、個々の要因の影響とその仕組み、および個別要因の最適条件についてはなお不明の点が多い。著者はこれら要因の効果を再検討し、培養効率の高い培養法を確立しようと考えた。

本研究ではカルス形成率が高い浮遊薬培養の特性を活かした培養法の改善を目指し、以下の項目について研究を行った。

第3章第1節では、浮遊薬培養に最適の花粉発育ステージを明らかにしようとした。この結果に基づき、第2節では花粉の発育ステージを顕微鏡で確認することなく、穎花長とそれに占める雄ずい長の割合との関係から培養適期の薬を採取する方法を検討した。第4章では、津川(1992)の三段階培養法に準じた浮遊薬培養法の改善によるカルス形成率と植物体再分化率の向上を明らかにしようとした。このため、第1節で昼夜変温の条件で培養すること、第2節では培養容器の蓋をパラフィルムで封じないで容器の通気性を向上させること、第3節では液体培地当たりの置床薬数を5種類の薬密度で培養すること、第4節では液体培地で誘導したカルスを寒天培地に移植する直前にカルスに付着した液体培地を濾紙で除去することの4つの改善点について調べた。第5章では、浮遊薬培養におけるカルスの発生と増加の実態を明らかにしようとした。

第2章 材料の養成と薬の培養法

第1節 材料の栽培と薬の採取

薬培養効率の高い北海道の水稲品種「キタアケ」と、培養効率の低い「きらら397」、「ゆきひかり」および「彩」を供試した。

発育時期の揃った穂を効率的に得るため、佐竹(1972, 1989)の方法を準用した円形16粒播きポット栽培法で材料を養成した。すなわち、2 kgの乾土と5 gの化成肥料BB 474(N:0.7 g, P:0.85 g, K:0.7 g)とをよく混合して3.5 Lのプラスチックポットに充填し、16粒の催芽種子を円形に直播してガラス室で栽培した。4月～8月に毎月1回播種した。ポット内およびポット間の個体の生育を統一にするため播種や灌水を丁寧に行うとともに、ガラス室内の場所による微気象の差を消去するため毎日ポットの位置を変えた。2葉期に湛水し、分けつは出現後ただちに切除して主稈だけを生育させた。

生理的素質が均一な薬を供試するため、一穂の上位3枝梗のそれぞれの先端から1, 3, 4および5番目の穎花(1穂当たり12穎花)を特定穎花とし、止葉葉数の同じ主稈穂の特定穎花だけから薬を採取した。穂ばらみ期に、葉耳間長別に特定穎花の薬の花粉発育ステージを検鏡して、1核中期～後期の薬が多く得られる葉耳間長の範囲3 cm(生育程度が斉一な材料では2 cmまたは1 cmの範囲)を決定した。直ちにその範囲の葉耳間長をもつ茎を一斉に採取し、これらの茎を止葉前葉の節の直下で水切りし、止葉の葉身を基部から数 cm 残して切除した。これらの茎を水の入ったビーカーに挿し、茎全体をポリ

エチレン袋で覆い暗黒下で10℃の低温処理を10～15日間行った。その後、葉鞘の中から穂を取り出し、特定穎花以外の穎花を全て切除し、特定穎花だけを残した。このように調整した穂を70%エタノールに1分間浸漬し、滅菌水で3回洗浄した後、葯を置床した。

第2節 標準葯培養法

1) 浮遊葯培養法（三段階培養法）

葯の培養は津川（1992）の方法に準じて、カルスの誘導（35日間）——カルスの増殖（7日間）——植物体再分化（60日間）の三段階培養で行った。三段階のそれぞれにおける培地は津川と同じものを用いた。

(1) カルス誘導（液体培地）

φ 90 mm×20 mm のプラスチックシャーレ（岩城硝子株式会社）に20 mlの液体培地を入れ、この中に1穂の12特定穎花から採取した72葯を入れて、穂別に1シャーレずつ35日間培養した。基本培地としてN₆培地（Chu 1978）を用い、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を添加した。なお、pHはすべての培地（カルス誘導・増殖、再分化）とも5.5に調整した。

(2) カルス増殖（寒天培地）

φ 90 mm×20 mm のプラスチックシャーレに寒天培地 20 ml を入れ、この上に任意に選んだカルスを16個移植して7日間培養した。培地はN₆を基本培地とし、これに2,4-D 0.4 mg/l, カイネチン 0.1 mg/l, アブジシン酸 0.5 mg/l, アスパラギン酸 1 g/l, グルタミン 1 g/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を添加した。

(3) 植物体再分化（寒天培地）

φ 25 mm×100 mm の試験管に寒天培地 15 ml を入れ、この上にカルス1個を移植し60日間培養した。培地はN₆を基本培地とし、これにインドール酢酸 0.2 mg/l, ベンジルアデニン 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を添加した。試験管の蓋としてφ 25 mm用のポリプロピレン製の植物用試験管キャップ（松本医科器機株式会社）を用いた。

カルス誘導から植物体再分化までの培養全期間において、培地の乾燥と培養組織へのコンタミネーションを防ぐために培養容器の蓋をパラフィルムで封じた。培養温度と光の条件は、培養全期間を通じて25℃、昼白色蛍光灯で約3000 lx・12時間照明とした。湿度は制御しなかった。

葯置床より35日後にカルス形成の調査を、再分化

培地にカルスを移植した60日後に植物体を再分化したカルスの調査を行った。

葯の採取と置床あるいはカルスの移植を複数の実験者が行った場合は、各個人ごとに置床したシャーレあるいは試験管をすべての区に均等に分けて、特定の個人が置床したシャーレあるいは試験管が特定の試験区に偏らないように留意した。

2) 寒天培養法（二段階培養法）

一部の実験では寒天培地によるカルス誘導（35日間）——植物体再分化（60日間）の二段階培養を行った。カルス誘導培地は三段階培養の液体培地に寒天 10 g/lを添加したものを用い、植物体再分化培地には三段階培養と同一のものを用いた。その他の培養条件は三段階培養と同一にした。

第3節 培養効率の表示法

1) カルス形成率

液体培地を用いた実験では、置床35日後に肉眼で確認できる大きさのカルスを数え、形成されたカルス数を置床した葯数で割った値をカルス形成率(%)とした。寒天培地を用いた実験では、置床35日後において肉眼でカルス形成の認められた葯数を置床した葯数で割った値をカルス形成率(%)とした。

2) 植物体再分化率

植物体再分化培地に移植60日後に、緑色植物とアルビノ植物に再分化したカルス数をそれぞれ調査した。緑色植物を再分化したカルス数の移植カルス数に対する割合を求め、これを緑色植物再分化率(%)とした。また、緑色植物再分化率にアルビノ植物を再分化したカルス数の移植カルス数に対する割合を加え、これを植物体再分化率(%)とした。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カルス数は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は、そのカルスを緑色植物再分化カルスに分類した。

第3章以降で特に断りがない限り、材料の栽培と葯の採取、葯の培養、培養効率の表示は上述の方法に従った。これと異なる方法を用いた場合は該当する箇所でも個別に説明を加えた。

第3章 葯培養に最適な花粉の発育時期

第1節 培養に最適な花粉の発育時期の決定

適期の葯を用いることは培養の最初のステップとして重要である。イネでは1核期の花粉を含む葯が培養適期とされているが、1核期の中のどの時期が最適であるかについては必ずしも明らかでない。

本節では花粉発育ステージによる培養効率の差を

明確にするため、カルス形成率の高い液体培養を用い、ステージごとに十分量の薬を置床することによって、薬培養の最適時期を明らかにする。

材料および方法

実験Ⅰ 葉耳間長別の薬培養

1995年に「キタアケ」を6月に播種し、8月に薬を置床した。1996年には「きらら397」を7月に播種、9月に薬を置床した。

標準栽培法に従い、1～2日ごとに数回播種して発育時期が段階的に異なる材料を養成し、穂ばらみ期に止葉と止葉前葉の葉耳間長が $-4\text{ cm} \sim +6\text{ cm}$ の範囲にある茎を一斉に採取した。採取した茎を $10^{\circ}\text{C} \cdot 10$ 日間の低温・暗黒処理した後、1995年は葉耳間長2 cmごとの刻み、1996年は1 cmごとの刻みで材料を分け、特定穎花から薬を摘出した。摘出した薬を液体培地に置床し、葉耳間長ごとにカルス形成率を比べた。

この実験では直径0.5 mm以上のカルス数の置床薬数に対する比率をカルス形成率(%)とした。

1区当たり置床した薬数は「キタアケ」で462～767薬、「きらら397」で700～1012薬であった。

実験Ⅱ 花粉の発育ステージ別の薬培養

1997年に「キタアケ」と「きらら397」を5月に播種し、7月に薬を置床した。

標準栽培法に従い材料を養成し、採取した穂を $10^{\circ}\text{C} \cdot 14$ 日間の低温・暗黒処理した後、特定穎花から薬を摘出した。1穎花6薬の中から、任意に選んだ1薬を検鏡して花粉の発育ステージを判定し、残りの5薬を置床した。Fig. 1に4分子から分離した小孢子が成熟花粉に至るまでの発育過程を顕微鏡写真で示した。Satake (1974)の区分を準用して花粉の発育ステージを1核期の前期 (Fig. 1のAとB)、中期 (同CとD)、後期 (同E)、2核期の前期 (同F)、後期 (同G) および成熟花粉 (同H) の6つに区分した。

この区分により穎花ごとにステージを確定し、同一ステージの穎花から1シャーレ当たり60薬を液体培地に置床し、カルス形成率を比較した。実験Ⅰの場合と同じく直径0.5 mm以上のカルス数を調査してカルス形成率を算出した。各ステージで500薬以上置床することを目標にしたが、材料の関係で早いステージと遅いステージではこの目標数の薬を採取できなかった。とくに1核前期の置床薬数は「キタアケ」で0、「きらら397」で99にとどまった。さらに各ステージで得られたカルスを増殖および再分化させ、植物体再分化率を調査した。

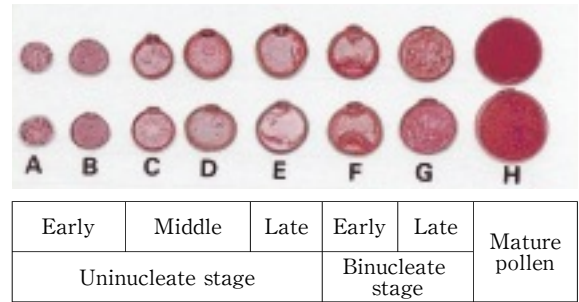


Fig. 1. Pollen developmental stages in rice. Pollen grains were observed after staining smeared anthers with acetocarmine. A Japonica rice cultivar, Kita-ake was used.

A: Each tetrad is released and becomes an individual microspore. B: Thin exine and germ pores become perceptible. C: Exines and germ pores are prominent. D: Small vacuoles disperse widely. Cytoplasm appears thin in comparison with C. The nucleus is located in the center of the pollen. E: One large vacuole occupied almost the entire cell. The location of the nuclei changes to the peripheral position; from near germ pores to the other side of germ pores. F: Mitotic division occurs forming two nuclei. Starch begins to fill the other side of germ pores. G: Starch fills in the whole cell and the nuclei can not to be seen. H: The pollen filled with starch. Division of sperm nuclei occurs and results in mature pollen with three nuclei.

花粉の発育ステージごとに再分化した緑色植物体の自然倍加率を調査するため、順化した苗を1998年春に試験田へ移植し、同年秋に稔実調査した。株内の穂が稔実している植物体を自然倍加した2倍体と判定した。なお、同一株内に半数体と2倍体が混在している場合は2倍体に分類した。

1区当たり薬数は「キタアケ」が222～746薬、「きらら397」が99～888薬、1区当たりカルス数は「キタアケ」が7～200、「きらら397」が63～200、1区当たり定植個体数は「キタアケ」が5～61、「きらら397」が1～22であった。

結 果

実験Ⅰ 葉耳間長別の薬培養

Fig. 2に葉耳間長別に採取した薬のカルス形成率を示した。葉耳間長が -4 cm から $+6\text{ cm}$ までのすべての区でカルスが形成された。カルス形成率は、葉耳間長により「キタアケ」では11～205%、「きらら397」では43～304%の間で変動し、「キタアケ」では葉耳間長0 cm、「きらら397」では葉耳間長

+1 cm にピークをもつ鋭い単頂曲線で示された。カルス形成率は、両品種ともピークの葉耳間長からわずか 1~2 cm 離れただけでも著しく低下した。

実験 2 花粉の発育ステージ別の葯培養

1 核前期から成熟花粉までを 6 区分したすべてのステージでカルスの形成が認められた (Table 1)。カルス形成率は、花粉の発育ステージにより「キタアケ」では 5~261%、「きらら 397」では 8~415%の

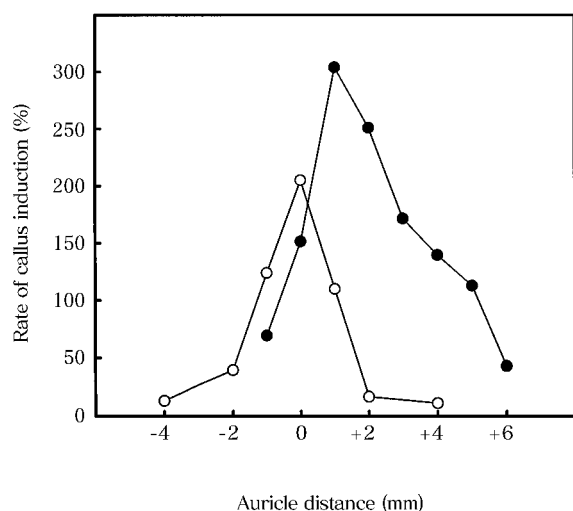


Fig. 2. Relationship between auricle distance and the rate of callus induction (percentage of the number of calli to that of anthers). Japonica rice cultivars, Kita-ake (○, open circle) and kirara 397 (●, closed circle) were used in 1995 and 1996, respectively. Time of seeding and anther inoculation were June and Aug., respectively, in 1995, and July and Sept., respectively, in 1996.

間で変動した。カルス形成率が最も高かったのは両品種とも 1 核中期であり、それに次いで高かったのは 1 核後期である。1 核後期のカルス形成率は 1 核中期の形成率を 100 とすると、「キタアケ」で 62, 「きらら 397」で 79 であった。1 核前期, 2 核期および成熟花粉のカルス形成は, 1 核中期と後期に比べて著しく低かった。「きらら 397」のカルス形成率はどのステージでも「キタアケ」を上回った。

Table 2 に発育時期の異なる花粉から誘導されたカルスの植物体再分化率を示した。供試カルス数の少ない区の間データは変動が大きいため、193~200 カルスを供試した 1 核中期, 1 核後期および 2 核前期の 3 つのステージ間で植物体再分化率を比較する。植物体再分化率 (Table 2 の A+B) は, 「キタアケ」では 1 核中期および後期が 2 核前期よりやや低く, 「きらら 397」では 1 核中期が 1 核後期および 2 核前期よりやや高かった。緑色植物再分化率 (同 A) は両品種とも 1 核中期が他の 2 つのステージよりも高かった。アルビノ植物再分化率 (同 B) は, 「キタアケ」では 1 核中期が他の 2 つのステージよりやや低く, 「きらら 397」では 3 ステージ間でほとんど差はなかった。植物体再分化率, 緑色植物再分化率およびアルビノ植物再分化率における 3 ステージ間の差は両品種とも 12% 以内で, この差が有意であるかどうかは明らかでない。これに対して, 3 ステージの間におけるカルス形成率の最大値と最小値の差は, 「キタアケ」で 184%, 「きらら 397」で 250% であった (Table 1)。これらの数値が示すように, カルス形成率に対するステージの影響は植物体再分化率に対するステージの影響に比べて著しく大きい。この結果, 葯当たり緑色植物再分化率 (カルス形成率×緑

Table 1. Rates of callus induction and green plant regeneration from anthers at different pollen developmental stages.

Pollen stage	No. of anthers inoculated	Rate of callus ⁴⁾ induction	Rate of green- ⁵⁾ plant regeneration	No. of anthers inoculated	Rate of callus ⁴⁾ induction	Rate of green- ⁵⁾ plant regeneration
		(%)	per anther (%)		(%)	per anther (%)
Kita-ake				Kirara 397		
Early-uninucleate (A, B) ¹⁾	— ²⁾	—	—	99	8 (2) ³⁾	2
Mid-uninucleate (C, D)	746	261 (100) ³⁾	110	565	415 (100)	79
Late-uninucleate (E)	580	161 (62)	53	888	329 (79)	30
Early-binucleate (F)	330	77 (30)	28	470	165 (40)	15
Late-binucleate (G)	222	5 (2)	0	156	72 (17)	2
Mature pollen (H)	277	5 (2)	2	112	27 (7)	1

Note: 1) Alphabet in parentheses represents pollen developmental stage shown in Fig. 1.

2) Anthers at early-uninucleate stage could not be collected.

3) Numbers in parentheses show the ratio to the mid-uninucleate stage as 100.

4) Rate = total number of calli induced/number of anthers inoculated.

5) Product of the rate of callus induction (Table 1) and that of green-plant regeneration from calli (Table 2).

Time of seeding and anther inoculation were May and July, respectively, in 1997.

色植物再分化率によって求めた計算値, Table 1)は、カルス形成率に強く影響され、両品種とも1核中期に最大値を示し、ステージの進行にともなって低下した。再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (Table 2 の $A/(A+B)$) は、両品種とも1核中期が1核後期および2核前期に比べてやや高かったが、3ステージ間の差は「キタアケ」で10~13%、「きらら397」で14%で、この差の有意性は明らかでない。

一方、両品種間には、植物体再分化率 (同 $A+B$)、緑色植物再分化率 (同 A) および再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (同 $A/(A+B)$) に明瞭な差が認められ、いずれも「キタアケ」が「きらら397」を上回った。また、葯当たり緑色植物再分化率 (Table 1) も「キタアケ」が「きらら397」を上回った。

Table 3 に再分化した緑色植物体の中に占める染色体自然倍加植物体の割合を示した。両品種とも自然倍加植物体率を考察するのに十分な個体数とはい

えないが、この中ではある程度まとまった個体数 (56~61 個体) が供試された「キタアケ」の1核中期、1核後期および2核前期の3つのステージ間で自然倍加植物体率を比較した。この3区の自然倍加植物体率は32~38%で、ステージ間に明らかな差は認められなかった。

考 察

Niizeki and Oono (1971) はイネの花粉の発育ステージを胞原細胞、花粉母細胞~4分子、花粉1核期、花粉2核期~成熟花粉の4期に区分して葯を培養し、花粉1核期の葯だけがカルスを形成したと報告した。その後の研究 (Wang *et al.* 1974, Genovesi and Magill 1979, Nakano and Maeda 1989) で、2核期の葯でもカルスの誘導が報告され、さらに本実験では従来の研究 (Niizeki and Oono 1971, Wang *et al.* 1974) でカルスを誘導できなかった成熟花粉からも低頻度ながらカルスが誘導された

Table 2. Rate of plant regeneration from the calli derived from anthers at different pollen developmental stages.

Pollen stage	No. of calli inoculated	Rate of plant regenera- tion from calli (%)			Green plants/All plants (%)	No. of calli inoculated	Rate of plant regenera- tion from calli (%)			Green plants/All plants (%)
		Green plants (A)	Albino plants (B)	All plants (A + B)			Green plants (A)	Albino plants (B)	All plants (A + B)	
Kita-ake						Kirara 397				
Early-uninucleate (A, B) ¹⁾	— ²⁾	—	—	—	—	116	21	43	64	33
Mid-uninucleate (C, D)	200	42	33	75	56	200	19	38	57	33
Late-uninucleate (E)	200	33	43	76	43	200	9	39	48	19
Early-binucleate (F)	193	37	45	81	46	200	9	38	47	19
Late-binucleate (G)	7	0	86	86	0	112	3	19	21	14
Mature pollen (H)	14	43	50	93	46	63	2	11	13	15

Note: 1) Alphabet in parentheses represents pollen developmental stage shown in Fig. 1.

2) Anthers at early-uninucleate stage could not be collected.

Time of seeding and anther inoculation of two Japonica rice cultivar were May and July, respectively, in 1997.

Table 3. Rate of spontaneous doubling plants regenerated from the calli derived from anthers at different pollen developmental stages.

Pollen stage	No. of plants transplanted	Rate of spontaneous doubling plants regenerated (%)	No. of plants transplanted	Rate of spontaneous doubling plants regenerated (%)
	Kita-ake		Kirara 397	
Early-uninucleate (A, B) ¹⁾	— ²⁾	—	19	26
Mid-uninucleate (C, D)	56	34	22	36
Late-uninucleate (E)	61	38	10	50
Early-binucleate (F)	56	32	16	38
Late-binucleate (G)	—	—	3	33
Mature pollen (H)	5	0	1	0

Note: 1) Alphabet in parentheses represents pollen developmental stage shown in Fig. 1.

2) Anthers at early-uninucleate stage could not be collected.

Time of transplanting was spring, 1998.

(Table 1)。この成熟花粉からのカルス誘導は、従来の寒天培地に替えて、それよりもカルス形成の容易な液体培地を用いたことによると考えられる。培養効率と花粉の発育ステージとの関係を論じた上記の諸研究を通して、1核期が薬培養の適期であることは一致している。しかし、1核期の中のどのステージが最適であるかに関しては一致した見解が得られていない。例えば、薬培養の最適ステージを Wang *et al.* (1974) は1核後期とした（ただし1核期の中を前期と後期に区分）のに対し、Chen (1977) は1核中期とし、Nakano and Maeda (1989) は1核中期から1核後期への移行期と報告している。1核期の中を2期に分けるか3期に分けるか、それを花粉のどのような特徴で分けるかは研究者により区分の仕方や区分の基準が異なるので、中期とか後期とかいってもそこに含まれる実際のステージは必ずしも同じでない。このようなステージの区分と基準の違いも、結果が一致しない一因になっていると思われる。したがって薬培養の最適ステージを確定するためには、ステージの区分を明確にして実験することが肝要である。著者は Fig. 1 の顕微鏡写真を手元において検鏡し、ステージの区分を正確に行った。また花粉の発育ステージによる培養効率の差を明確に検出するため、寒天培地に比べてカルス形成率の高い液体培地を用いて実験した。

Fig. 2 において、カルス形成率のピークはわずか1~2 cm の葉耳間長の差によって著しく減少した。この時期の葉耳間長は1日に2~3 cm 変化するので、Fig. 2 の結果は、カルス形成に最適な花粉の発育ステージは短時間のうちに経過する限定されたステージであることを示唆している。したがって薬培養に最適な花粉の発育ステージを確定するには、1核期の中を可能な限り細分して実験するのが望ましい。このような観点から、Fig. 1 の顕微鏡写真に基づいて1核期を前期、中期、後期に3区分して薬を培養し、カルス形成率が最も高くなるのが1核中期であることを明らかにした (Table 1)。薬培養の最適期が1核中期であることは Chen (1977) の報告と一致するが、1核中期の基準が Chen と著者との間で異なっている。Chen は液胞の発達によって核が小胞子の一方の端 (one end) に位置する時期を1核中期と述べているが、これは著者の1核後期 (Fig. 1 の E) に相当し、著者の1核中期は大きな液胞が形成される前で核が細胞の中央に位置する時期 (Fig. 1 の C と D) である。また Chen は考察の中で供試薬数が45~267 薬と少ないので、得られた結果は確定的でないと言及している。著者は花粉の発育ステージに

よるカルス形成率の差をより明確に検出するために、カルス形成の容易な液体培地を用い、さらに1核中期と後期に500以上という十分な数の薬を培養することによって、2品種におけるカルス形成率の最も高い時期が1核中期であることを確定した。この実験で1核前期のカルス形成率は1核中期に比べて著しく低かったが、イネでは4分子期の薬からカルスが誘導されたことはない (Chen 1977, Nizeki and Oono 1968, Wang *et al.* 1974)、4分子期直後の1核前期のカルス形成率が1核中期に比べて著しく低いのは妥当な結果と考えられる。「キタアケ」では1核前期の材料が得られなかったため、1核前期のカルス形成率が1核中期のそれに比べて著しく低いかどうかを確認できなかった。しかし、1核中期以降のステージにおいて「キタアケ」と「きらら397」のカルス形成率が並行的に変動していること、および前述したように4分子期直後の時期のカルス形成率が低いことは容易に推測されることから、「キタアケ」においても「きらら397」と同じく、1核前期のカルス形成率は1核中期に比べて低いと考えられる。

培養開始時の花粉の発育ステージが植物体再分化率や再分化した植物の自然倍加率にまで影響するかどうかに関しては、数値の差が小さい上に供試材料数も少なく、明確な結論を得られなかった。しかし、カルス形成率が花粉ステージに影響される程度は、植物体再分化率がステージに影響される程度に比べて著しく大きく、その結果、薬当たり緑色植物再分化率は1核中期が最も高く、その程度は次に値の高い1核後期に比べて「キタアケ」で2.1倍、「きらら397」で2.6倍であった。

以上の結果より、カルス形成率や薬当たり緑色植物再分化率を最も高くする適期は1核中期であると結論された。今後、育種現場ではできる限り「1核中期」の薬を用いて培養効率を高めるのがよいと考える。ステージの範囲をもう少し広げて材料の採取効率を高めたいときは、1核中期に次いで反応のよい1核後期も含めて、1核中期および後期の薬を用いるとよい。また、ステージによるカルス形成率の差はかなり大きいので、培養条件の効果を解析するような実験では同じステージの薬を用いて実験精度の向上を計ることが必要である。本研究で用いた、ポット当たり円形16粒播き栽培で主稈穂の特定穎花だけから薬を採取する方法は、実験材料の花粉の発育ステージを含む生理的素質を揃えるための一つのよい方法である。

Table 1 および Table 2 における培養効率を品種

間で比較すると、「キタアケ」は「きらら 397」に比べてカルス形成率は低いが緑色植物再分化率は高く、これらの総合結果として葯当たり緑色植物再分化率が高い、ということができる。「キタアケ」の葯培養特性をこのような表現で一般化できるかどうかは、さらに事例を集めて検討しなければ分らないが、葯培養効率の品種特性を評価するには、葯からのカルス形成、カルスからの緑色植物再分化、再分化植物の染色体自然倍加、のそれぞれの段階における品種の特性を評価することが必要である。

第2節 育種現場で利用できる培養適期の葯の採取法

第3章第1節において、培養に最適の花粉発育ステージが1核中期であることを実証した。また、材料採取効率を考慮し、育種現場での培養適期の葯は1核中期～後期であることを報告した。実験や育種に供する葯の花粉発育ステージを正確に知るには、葯を直接検鏡しなければならず、これは非常に手間のかかる作業である。Satake and Hayase (1970) はイネの穎花長あるいは葯長によって花粉発育ステージを推定できることを報告した。大野 (1983) および許 (1988) は雄ずい長の穎花長に対する比が $1/2 \sim 1/3$ の範囲を指標にして培養適期の葯 (大野は1核期、許は1核後期を適期とした) を採取できると報告したが、その根拠となるデータは一切記していない。

本節では穎花長 (内穎基部から芒を除く外穎先端までの長さ) と雄ずい長 (花糸の基部から葯先端までの長さ) を測定し、これらの値と花粉発育ス

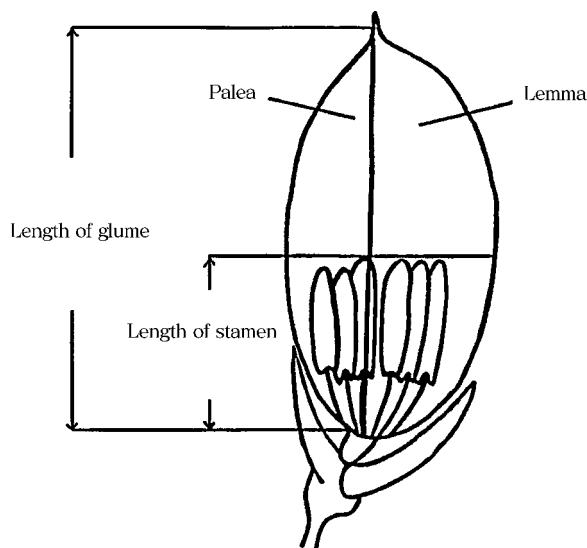


Fig. 3. Length of glume and stamen.

ジとの関係から1核中期～後期の葯を採取するための方法を検討する。

材料および方法

第3章第1節の実験1で養成した「きらら 397」を供試した。

穂ばらみ期に止葉と止葉前葉との葉耳間長が $-5 \text{ cm} \sim +8 \text{ cm}$ の範囲にある茎を一斉に採取した。これらを水の入ったビーカーに挿し、全体をポリエチレン袋で覆って $10^\circ\text{C} \cdot 10$ 日間の低温・暗黒処理した。低温・暗黒処理後、葉耳間長1 cm ごとく刻みで材料を分け、穂をむき出して70%エタノールで固定した。後日、固定した穂の特定穎花の穎花長および雄ずい長 (Fig. 3) を測定した後、穎花から葯を摘出し、Fig. 1の区分に従い花粉の発育ステージを判定した。この方法で各葉耳間長ごとに3～5穂、全部で55穂から採取した586穎花を調査した。

結 果

Fig. 4に、花粉の発育ステージ別の穎花長、雄ずい長およびそれらの比率 (雄ずい長/穎花長) を示した。その結果、穎花長は花粉ステージA～D間でステージの進行に伴い伸長したが、ステージEで全長に達し、ステージE～H間では穎花長の差がなかった。

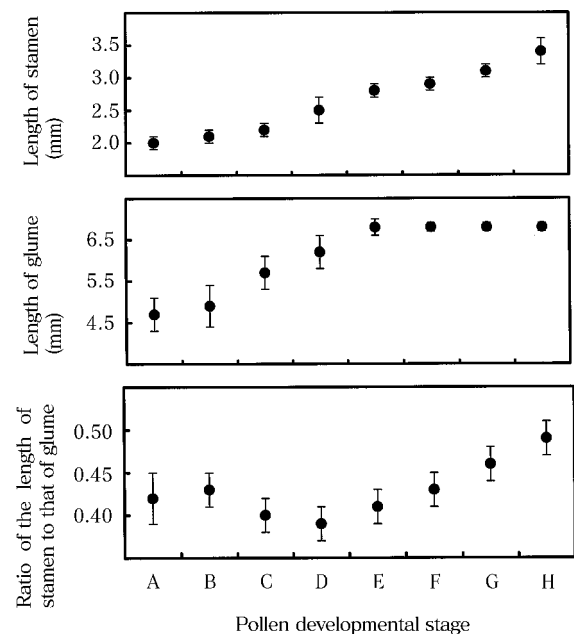


Fig. 4. Length of stamen, that of glume and the ratio of the length of stamen to that of glume at each pollen developmental stage. A Japonica rice cultivar, Kirara 397 was used. Vertical bars indicate \pm S.D. Horizontal axis shows pollen developmental stages in Fig. 1.

雄ずい長はステージ A～H までステージの進行に伴い伸長した。雄ずい長/穎花長の比率は、ステージ A～D 間ではステージの進行に伴い漸減し、ステージ D～H 間ではステージの進行に伴い増加した。これらの値が花粉の発育ステージの進行とともに一定の増減傾向を示す範囲では、どの値もステージを推定する指標になり得る。しかし、これらの値はステージと連続的に変化しており、あるステージの平均値±標準偏差の範囲がその前後のステージの範囲と重なっているため、特定のステージを正確に判別する指標にはならなかった。

第 3 章第 1 節で、カルス形成に最適の花粉ステージは 1 核中期（ステージ C・D）であることを明らかにしたが、実際の育種の場面では、1 核中期の葯だけでは 1 穂から採取できる葯数が少ないので、1 核中期～後期の葯を適期の葯として培養するのが現実的である。そこで培養適期の葯、すなわちステージ C・D・E を採取する指標値を以下の基準により決定し、Fig. 4 で調査した 586 穎花をその基準にしたがって選抜したときの確率を試算した。

指標値の基準の決定方法について、穎花長を例にして説明する。穎花長ごとにステージの出現数をまとめてみると、穎花長は 3.7～4.7 mm の間ではステージ A・B のみであるが、4.8～5.7 mm の間では A・B と C・D が混在して現れた。4.8～5.2 mm の間では A・B の数が C・D の数より多いが、5.3 mm 以上では A・B の数に比べて C・D の数が多くなった。この C・D が A・B よりも多くなり始める 5.3 mm を培養適期の葯を選ぶ穎花長の下限とした。同じ考えで穎花長が 6.6 mm では C～E の数が F～H の数より多いが、6.7 mm 以上ではその関係が逆転して F～H の数が C～E の数よりも多くなり、6.6 mm を培養適期の葯を選ぶ穎花長の上限とし

た。以上の考え方により、C・D・E の葯を採取するための穎花長の範囲を 5.3～6.6 mm とした。同じ考え方により、雄ずい長の範囲を 2.2～2.8 mm、雄ずい長/穎花長の比率を 0.42 以下とした。その他に、穎花長 5.3 mm 以上、穎花長 5.3 mm 以上で雄ずい長/穎花長の比率 0.42 以下を指標に加えた。

調査総数 586 穎花の花粉発育ステージを検鏡した結果、235 穎花が培養適期（C、D および E のステージ）と認められた。そこで 586 穎花から上記 5 つの指標値によって穎花を選抜した場合に、選抜された穎花の中に含まれる培養適期の穎花数の割合（Table 4 の A）、およびその培養適期穎花数の培養適期総穎花数（235）に対する割合（同 B）を求めて、各指標値による選抜効率を比べた。その結果、雄ずい長（Table 4 の III）と、穎花長および雄ずい長/穎花長の比率を組み合わせた場合（Table 4 の V）の 2 つの選抜指標において Table 4 の A・B とともに高い割合を示し、81～88% の確率で適期の葯を含む穎花を選抜できることがわかった。

考 察

Sopory and Maheshwari (1976) は *Datura innoxia* の葯長から花粉の発育ステージを推定できることを報告した。培養適期の花粉ステージを推定する形態指標として、タバコでは花冠長（Sunderland and Roberts 1977）、ナタネでは花弁長/葯長の比（Chuong *et al.* 1988）、ハクサイでは花蕾の幅、および花弁長/葯長の比（Sato *et al.* 2002）が利用されている。イネでは雄ずい長の穎花長に対する比が 1/2～1/3 の範囲の穎花（大野 1983、許 1988、新関 1990）または約 40% の穎花（三十尾 1995）が培養適期の葯を含む穎花であると報告されている。しかし、いずれの報告も根拠となるデータは一切記されてお

Table 4. Efficiency of the selection the spikelets suitable for anther culture by several indexes.

Indexes			Efficiency of selection of suitable spikelets ¹⁾			
			A ²⁾	%	B ³⁾	%
I	Glume length	5.3mm～6.6mm	134/161	83	134/235	57
II	Glume length	≥5.3mm	226/499	45	226/235	96
III	Length of stamen ⁴⁾	2.2mm～2.8mm	191/219	87	191/235	81
IV	Ratio of the length of stamen to that of the glume	≤0.42	205/268	76	205/235	87
V	Combinations of the index II and IV		202/230	88	202/235	86

Note: 1) Spikelets with anthers at the pollen stage of C, D and E, which are suitable for anther culture.

2) Number of suitable spikelet included in the spikelets selected by each index/Total number of spikelet selected by index.

3) Number of suitable spikelet included in the spikelets selected by each index/Total number of suitable spikelets for anther culture.

4) Length from the tip of anther to the base of palea.

らず、培養適期の薬を選抜する確率は不明である。

Table 4 より雄ずい長あるいは穎花長と雄ずい長/穎花長の比を組み合わせることで、花粉ステージ C・D・E（1 核中期～後期）の薬を含む穎花をそれぞれ 81～87%、86～88% の高い確率で選抜できることを実証した。この二つの指標のうち、適期の範囲（2.2～2.8 mm）がわずかに 0.6 mm しかない雄ずい長は肉眼による判別が困難で育種現場では利用し難い。他方、穎花長 5.3 mm 以上で雄ずい長/穎花長の比が 0.42 以下という指標は肉眼による判別が容易で育種現場に適している。

許（1988）は薬培養適期の薬を選別する指標として、雄ずい長の穎花長に対する比が 1/2～1/3 の範囲の穎花であることに加え、穎花の色が淡緑色で大きさは最終長に近く、穎が硬すぎもせず軟らかすぎもしない性状であることをあげている。三十尾（1995）は黄白色で穎がまだ柔らかく、雄蕊の全長が穎花長の約 40% のものを選ぶことを報告している。したがって、育種現場では上記の指標に穎花の色や柔らかさなどを加味して総合的に培養適期の薬を選別することが重要である。

イネの穎花長を花粉ステージの判別の指標として用いる場合、品種間差があることが報告されている（Satake and Hayase 1970）。本研究は、北海道の水稲品種「きらら 397」についての結果であるので、これ以外の品種の指標を得るための研究が今後必要である。

第 4 章 培養法の改善によるカルス形成率および植物体再分化率の向上

第 1 節 昼夜変温培養による培養効率の向上

夜温が昼温より低い昼夜変温が昼夜恒温より植物の生育を良好にすることが知られている（Went 1944, 松島・角田 1957, 柴田ら 1970）。イネの薬培養では 25～28℃ の恒温器の中で培養するのが常法とされ、昼夜変温条件下で培養した研究報告はない。本節では昼夜恒温下と昼夜変温下で薬培養を行い、培養効率におよぼす変温の効果を明らかにする。

材料および方法

1) カルス形成に対する昼夜変温の効果

実験 1 液体培地での実験

1994～1997 年の 4 年にわたり「キタアケ」（1994 年は 8 月播種・9 月薬置床、1995 年は 4 月播種・7 月薬置床、1996 年および 1997 年は 6 月播種・8 月薬置床）を、1997 年には「きらら 397」、「ゆきひかり」および「彩」の 3 品種（3 品種ともに 6 月播種・8

月薬置床）を加えた計 4 品種を供試した。

標準薬培養法に従い、20 ml の液体培地を入れた ϕ 90 mm×20 mm のプラスチックシャーレ（1994 年のみ 100 ml 三角フラスコ）に、60 薬を入れて 35 日間（ただし 1994 年は 30 日間、1995 年は 31 日間）培養した。人工気象器の中にシャーレを入れて培養し、カルス誘導期間の温度を恒温区（昼/夜=12 hr/12 hr=25℃/25℃、平均温度 25℃）と変温区（昼/夜=12 hr/12 hr=30℃/20℃、平均温度 25℃）の 2 区設け、カルス形成率を比較した。昼温と夜温の切り替え時には、毎時 10℃ の速度で変温させた。10℃・8～10 日間の低温・暗黒処理を行ったこと、および直径 0.5 mm 以上のカルスを数えてカルス形成率を算出したこと以外は第 2 章の材料養成法と薬培養法に従った。

1 区当たり薬数は「キタアケ」で 826～1880 薬、「きらら 397」で 945～1031 薬、「ゆきひかり」で 1575～1603 薬、「彩」で 1030～1274 薬であった。

実験 2 寒天培地での実験

1999 年に「キタアケ」と「きらら 397」の 2 品種（両品種とも 7 月播種・9 月薬置床）を供試した。

寒天培地（寒天 10 g/l 添加）で薬を 35 日間培養し、実験 1 と同じ培養温度条件で恒温区と変温区の 2 区を設け、カルス形成率を比較した。また、参考区として液体培地による恒温区と変温区の 2 区も設けた。

1 区当たり薬数は「キタアケ」で 1181～1342 薬、「きらら 397」で 1270～1337 薬であった。

実験 3 5 種類の昼夜変温培養の比較

1998 年と 1999 年に「キタアケ」と「きらら 397」を供試した。

この実験では 5 種類の昼夜変温条件を設けて、液体培地に薬を置床し、カルス形成率を比較した。人工気象器の数の制限により昼 30℃/夜 20℃を対照区にして 3 回に分けて実験した。1998 年の 1 回目の実験（両品種とも 5 月播種・7 月薬置床）では日平均温度を 25℃に固定して昼夜温較差が 5℃、10℃、15℃となる 3 区（昼/夜=27.5℃/22.5℃、30℃/20℃、32.5℃/17.5℃）、1998 年の 2 回目の実験（両品種とも 7 月播種・9 月薬置床）では昼夜温度較差を 10℃に固定して日平均温度が 22.5℃、25℃、27.5℃となる 3 区（昼/夜=27.5℃/17.5℃、30℃/20℃、32.5℃/22.5℃）を設けた。1999 年（両品種とも 4 月播種・6 月薬置床）には前年の結果をもとに 3 区（昼/夜=30℃/20℃、32.5℃/17.5℃、32.5℃/22.5℃）を設けた。昼温と夜温の切り替えは毎時 10℃の速度で変温させた。ただし、昼 32.5℃/夜 17.5℃区のみ毎時

15℃の速度で変温させた。

ここに記していない条件および方法は実験 1 と同じ方法で実施した。ただし、1998 年の実験では直径 0.5 mm 以上のカルス数を調査し、1999 年の実験では肉眼で確認できる大きさのカルス数を調査してカルス形成率を求めた。

1 区当たり蒔数は「キタアケ」が 933~1251 蒔、「きらら 397」が 716~1146 蒔であった。

2) カルスからの植物体再分化に対する昼夜変温の効果

実験 4 脱分化期と再分化期の全期間の昼夜変温

実験 1 で誘導した「キタアケ」、「きらら 397」、「ゆきひかり」および「彩」のカルスを供試した。

液体培地で誘導した実験 1 のカルスをカルス増殖培地（寒天）で 7 日間、植物体再分化培地（寒天）で 60 日間培養した。カルス誘導から植物体再分化までの全期間を昼 25℃/夜 25℃で培養した恒温区と昼 30℃/夜 20℃で培養した変温区の 2 区を設け、植物体再分化率を調べた。

1 区当たりカルス数は「キタアケ」が 150~200、「きらら 397」、「ゆきひかり」および「彩」が 200 カルスであった。

実験 5 脱分化期と再分化期の時期別の昼夜変温

実験 1 において昼 25℃/夜 25℃および昼 30℃/夜 20℃の温度条件で誘導した「キタアケ」の 1995 年と 1996 年のカルスを供試した。

この 2 種類のカルスを増殖培地に移植し、カルス誘導期と同じ温度条件で 7 日間培養した。このようにして脱分化期（カルスの誘導と増殖の期間）に昼 25℃/夜 25℃および昼 30℃/夜 20℃で培養した 2 種類のカルスを植物体再分化培地に移植し、それぞれを 2 分して昼 25℃/夜 25℃および昼 30℃/夜 20℃の温度条件で 60 日間培養した。その後、植物体再分化率を調査した。すなわち、脱分化期の恒温、変温と再分化期の恒温、変温を組合せた 4 区を設けて、植物体再分化におよぼす時期別変温の効果を明らかにしようとした。

1 区当たりカルス数は 1995 年が 150、1996 年が 200 カルスであった。

結 果

1) カルス形成に対する昼夜変温の効果

Fig. 5 に液体培養でカルスを誘導した時の昼夜変温の効果を示した。「キタアケ」を用いて 4 年間繰り返し実験を行った結果、カルス形成率はどの年次においても、変温区が恒温区より高く、変温区の 4 年間平均のカルス形成率（102%）は恒温区のそれ

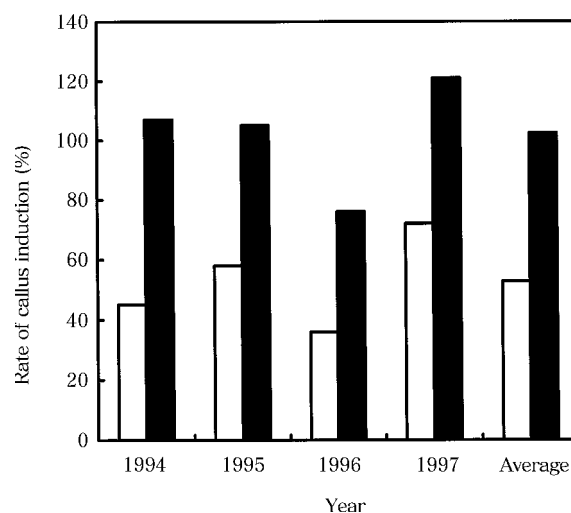


Fig. 5. Rate of callus induction (percentage of the number of calli to that of anthers) in the anthers inoculated at constant and alternating temperatures. A Japonica rice cultivar, Kita-ake, was used in each year. Time of seeding and anther inoculation were Aug. and Sept., respectively, in 1994, and April and July, respectively, in 1995, and June and Aug., respectively, in 1996 and 1997.

□ : Constant temperature (day/night = 25°C/25°C).

■ : Alternating temperature (day/night = 30°C/20°C).

(53%)の 1.9 倍であった。カルス形成率を向上させる昼夜変温の効果は、「キタアケ」だけでなく、「きらら 397」、「ゆきひかり」および「彩」においても認められた (Fig. 6)。

Fig. 7 には同じ材料を寒天培地と液体培地でカルスを誘導した時の昼夜変温の効果を示した。寒天培養した時の変温区のカルス形成率は恒温区のそれより高く、昼夜変温によるカルス形成率の増加程度は、「キタアケ」では 1.2 倍、「きらら 397」では 2.3 倍であった。すなわち、カルス形成率を向上させる変温の効果は、液体培養に限らず寒天培養でも認められた。

このように変温区のカルス形成率は年次、品種、培地を変えたすべての実験区で恒温区よりも高く、変温効果の再現性は極めて高かった。

次に、昼 30℃/夜 20℃の変温に優る昼夜変温の組合せを探す目的で、5 種類の昼夜変温培養を行ってカルス形成率を比較した。人工気象器の使用制限のため、常に昼 30℃/夜 20℃を対照区として他の変温区と比較し、3 回に分けて実験した。Table 5 に示すように、対照区のカルス形成率は 3 回の実験の中では 1998 年 - II の実験値が最も低く、1999 年の実験値が最も高かった。最低値に対する最高値の比率は「キ

タアケ」で11.9倍,「きらら397」で7.5倍もあった。このように対照区の値は3回の実験の間で大きく変動したので,個別の実験ごとに昼30℃/夜20℃区を基準にしてカルス形成率を比較すると,昼27.5℃/夜22.5℃区(日平均温度25.0℃)および昼27.5℃/夜17.5℃区(日平均温度22.5℃)のカルス形成率は両品種とも対照区のそれより低かった。次に,昼32.5℃/夜17.5℃区(日平均温度25.0℃)のカルス

形成率は「キタアケ」では1998年および1999年の両年とも対照区のそれより低かったのに対し,「きらら397」では両年とも対照区より高く,品種間で結果が一致しなかった。また,昼32.5℃/夜22.5℃区(日平均温度27.5℃)のカルス形成率は,「キタアケ」では対照区に比べてやや優るか(1998年)やや劣るか(1999年)で年次間で優劣が一致しなかったが,「き

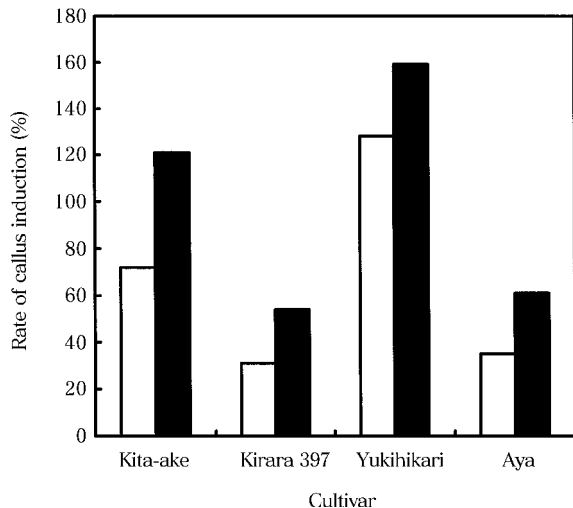


Fig. 6. Rate of callus induction (percentage of the number of calli to that of anthers) in the anthers inoculated at constant and alternating temperatures. Time of seeding and anther inoculation were June and Aug., respectively, in 1997.

□ : Constant temperature (day/night=25°C/25°C).
 ■ : Alternating temperature (day/night=30°C/20°C).

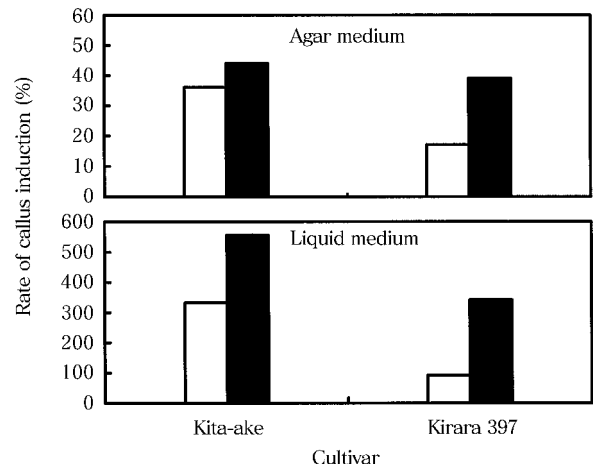


Fig. 7. Rate of callus induction in the anthers inoculated at constant and alternating temperatures. Rate of callus induction in agar medium represent percentage of the number of anthers inducing callus or calli to that of anthers and that in liquid medium represent percentage of the number of calli to that of anthers. Time of seeding and anther inoculation were July and Sept., respectively, in 1999.

□ : Constant temperature (day/night=25°C/25°C).
 ■ : Alternating temperature (day/night=30°C/20°C).

Table 5. Comparison of callus induction rate under five alternating temperature conditions.

Year	Culture temperature				
	Day (°C)/Night (°C)				
	30/20 (25.0) ¹⁾	27.5/22.5 (25.0)	32.5/17.5 (25.0)	27.5/17.5 (22.5)	32.5/22.5 (27.5)
Rate of callus induction (%) ²⁾					
Kita-ake					
1998-I	109	63	81		
1998-II	31			13	43
1999	370		286		339
Kirara 397					
1998-I	90	51	127		
1998-II	35			22	99
1999	262		329		348

Note: 1) Value represents the daily average temperature.

2) Rate = total number of calli induced/number of anthers inoculated.

Time of seeding and anther inoculation were May and July, respectively, in 1998-I, July and Sept., respectively, in 1998-II, and April and June, respectively, in 1999.

らら 397」では兩年とも対照区に比べて高かった。

以上の結果から、カルス形成率が両品種を通して対照区に優るような昼夜温の組合せは認められなかったが、「きらら 397」では昼 32.5℃/夜 17.5℃区および昼 32.5℃/夜 22.5℃区が対照区よりも優った。

同一品種を同一条件で培養したのに、Fig. 7 の液体培地のカルス形成率は Fig. 5, Fig. 6 のカルス形成率に比べて何倍も高かった。これはカルス形成率の調査法の差に基づくものである。すなわち、肉眼で確認できるすべてのカルスを数えた 1999 年のカルス形成率 (Fig. 7) が、0.5 mm 以上のカルスだけを数えた 1994 年～1998 年のカルス形成率 (Fig. 5, Fig. 6) に比べて顕著に高い値を示した。Table 5 において 1999 年のカルス形成率が 1998 年に比べて著しく高いのも同じ理由による。

2) カルスからの植物体再分化に対する昼夜変温の効果

Table 6 に蒴置床から植物体再分化までの全期間を昼 25℃/夜 25℃および昼 30℃/夜 20℃で培養した区の植物体再分化率を示した。「キタアケ」の 3 年間および「きらら 397」、「ゆきひかり」、「彩」の単年度の計 6 回の実験のすべてにおいて、変温区の緑色植物再分化率 (Table 6 の A) および再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (同 A/(A+B)) は恒温区を上回った。植物体再分化率 (同 A+B) は、1995 年の「キタアケ」を除く 5 例において、変温区が恒

温区を上回った。アルビノ植物再分化率 (同 B) は、6 回の実験の中で「きらら 397」を除く 5 回で変温区が恒温区より低かった。カルス形成率 (同 C) と緑色植物再分化率 (同 A) の積として算出した葯当たり緑色植物再分化率 (同 A×C) は、6 回のすべてにおいて変温区が恒温区を上回った。

これら培養効率の差を 6 回の実験の平均値で示すと、変温区のカルス形成率 (C) は恒温区に比べて 36% (1.6 倍) 高く、この差は 0.1% 水準で統計的に有意であった [$t=8.050>6.869=t_5(0.001)$]。また、変温区の緑色植物再分化率 (A)、再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (A/(A+B)) および葯当たり緑色植物再分化率 (A×C) は、恒温区に比べてそれぞれ 11% (1.4 倍)、10% (1.2 倍) および 24% (2.4 倍) 上回り、これらの差はいずれも 5% 水準で統計的に有意であった [$A:t=2.831>2.571=t_5(0.05)$, $A/(A+B):t=3.618>2.571=t_5(0.05)$, $A\times C:t=3.563>2.571=t_5(0.05)$]。一方、変温区の植物体再分化率 (A+B) は恒温区に比べて 6% (1.1 倍) 高く、変温区のアルビノ植物再分化率 (B) は恒温区に比べ 5% (0.9 倍) 下回ったが、いずれも変温区と恒温区との間に有意な差は認められなかった。

上述の実験では、脱分化期と再分化期の全期間を通して昼夜変温および昼夜恒温で培養しているので、変温による植物体再分化率の向上が、脱分化期の変温によるのか再分化期の変温によるのか明らか

Table 6. The rate of plant regeneration from calli exposed to constant and alternating temperature throughout the period from anther inoculation to plant regeneration.

Cultivar	Year	Culture temperature	No. of anthers inoculated	Rate of ¹⁾ callus induction (%)	No. of calli inoculated	Rate of plant regeneration from calli (%)			Green plants /All plants (%)	Green plant regeneration rate per anther (%)
		(Day (°C)/Night (°C))				Green	Albino	All		
						plants (A)	plants (B)	plants (A+B)		
						(A/A+B)	(A×C)			
Kita-ake	1995	25/25	1575	58	150	51	29	80	64	30
		30/20	1880	105	150	56	19	75	75	59
Kita-ake	1996	25/25	1800	36	160	45	14	59	76	16
		30/20	1686	76	160	73	4	77	95	55
Kita-ake	1997	25/25	1009	72	200	40	49	89	45	29
		30/20	826	121	200	60	37	97	62	73
Kirara 397	1997	25/25	945	31	200	10	58	68	15	3
		30/20	1031	54	200	12	62	74	16	6
Yukihikari	1997	25/25	1603	128	200	13	80	93	14	17
		30/20	1575	159	200	21	78	99	21	33
Aya	1997	25/25	1030	35	200	24	60	84	29	8
		30/20	1274	61	200	31	57	88	35	19
Average		25/25	—	60	—	31	48	79	41	17
		30/20	—	96***	—	42*	43	85	51*	41*

Note: 1) Rate = total number of calli induced/number of anthers inoculated.

For time of seeding and anther inoculation, see the captions of Figs. 5 and 6.

*, ***, Significantly different from control (25/25) at 5 and 0.1% level.

でない。この点を解析するために行った時期別変温培養の実験結果を Table 7 に示した。この実験では、処理 1 (脱分化期を昼 25℃/夜 25℃で培養し再分化期を昼 25℃/夜 25℃で培養する、以下 25/25-25/25 と記す)、処理 2 (30/20-25/25)、処理 3 (25/25-30/20)、処理 4 (30/20-30/20) の 4 処理区を設け、処理 2 と処理 1 の差、処理 4 と処理 3 の差により脱分化期の変温効果を、処理 3 と処理 1 の差、処理 4 と処理 2 の差により再分化期の変温効果を分析した。Table 8 に明らかなように、脱分化期の変温培養はアルビノ植物再分化率 (B) の減少と再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 ($A/(A+B)$) の増加に効果を示したのに対し、再分化期の変温は緑色植物再分化率 (A) の増加と再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 ($A/(A+B)$) の増加に効果を示した。脱分化期の変温培養の緑色植物再分化率に対する効果、および再分化期の変温培養のアルビノ植物再分化率に対する効果に関しては、年次間の結果が

相反して結論が得られなかった。

考 察

試験管内での植物組織培養は恒温下で行うのが常法とされ、イネの芽培養では 25~28℃の範囲内の恒温培養が一般的である。若狭 (1982) は 24℃, 28℃, 32℃の 3 段階、亀島ら (1994) は 25℃, 27 あるいは 28℃, 29℃の 3 段階の恒温条件でイネの芽を培養したが、温度区間のカルス形成や植物体再分化に大きな差は認められなかった。若狭 (1982) は培養効率に関する総合論議の中で、「高温条件がアルビノ個体の発生を促進的に作用する」と言及したのみで、カルス形成や緑色植物再分化に対する培養温度の影響については特に論じていない。

著者は日平均温度が同じ 25℃であっても、昼 30℃/夜 20℃の変温条件で培養すると昼夜 25℃の恒温条件で培養した場合に比べてカルス形成率が顕著に高まることを初めて実証した。この変温の効果は

Table 7. Rate of regeneration of four plots which were combined two temperature conditions of alternating temperature and constant temperature with two culture periods of dedifferentiation and plant regeneration.

Experimental plots	Culture temperature		Rate of plant regeneration from calli (%)				Green plants/All plants (%)	
	Day (°C)/Night (°C)		Green plants (A)		Albino plants (B)		plants (%) (A/A+B)	
	Dedifferentiation period	Plant regeneration period	Year		Year		Year	
			1995	1996	1995	1996	1995	1996
I	25/25	25/25	51	45	29	14	64	76
II	30/20	25/25	43	69	15	12	74	85
III	25/25	30/20	61	63	30	11	67	85
IV	30/20	30/20	56	73	19	4	75	95

Note: A Japonica rice cultivar, Kita-ake was used.

Rates of regeneration were obtained from cultures of 150 calli in 1995 and 160 calli in 1996.

The dedifferentiation and plant regeneration periods were 42 and 60 days, respectively.

For time of seeding and anther inoculation, see the caption of Fig. 5.

Table 8. Effect of alternating temperature applied during dedifferentiation and plant regeneration periods on the rate of regeneration from calli.

Effect of alternating temperature	Rate of plant regeneration from calli (%)				Green plants/All plants (%)	
	Green plants (A)		Albino plants (B)		(A/A+B)	
	1995	1996	1995	1996	1995	1996
Dedifferentiation period						
II - I	-8	24	-14	-2	10	9
IV - III	-5	10	-11	-7	8	10
Regeneration period						
III - I	10	18	1	-3	3	9
IV - II	13	4	4	-8	1	10

I ~ IV show the experimental plots in Table 7.

Difference between the rates of plant regeneration from calli in the two experimental plots in table 7.

供試した北海道のイネ 4 品種で認められ、さらに液体培地、寒天培地のいずれでも認められた (Fig. 5~Fig. 7)。脱分化期の変温はカルス形成率を向上させただけでなく、そのカルスからはアルビノ植物の発生が減少した。一方、再分化期の変温は緑色植物再分化率を増加させた (Table 7, Table 8)。カルス誘導から植物体再分化までの全期間を変温で培養することにより、カルス形成率、緑色植物再分化率、葯当たり緑色植物再分化率は、品種と年次を込みにした 6 回の実験の平均で、それぞれ 96% (恒温区の 1.6 倍)、42% (同 1.4 倍)、および 41% (同 2.4 倍) に増加した (Table 6)。本研究で供試したのは北海道のイネ 4 品種なので、異なる品種における変温培養の効果については今後の課題である。

イネの葯培養におけるアルビノ植物の発生は、再分化植物の約 50% もしくはそれ以上という高率で起こり、緑色植物再分化率の向上を阻む大きな要因になっている。しかし、アルビノを抑制する有効な方策がなく、育種現場における現在のアルビノ発生率 (木内ら 2000) は十数年前のそれ (佐々木 1984, 新橋・相川 1986) とほとんど変わらない。このような状況のなかで、アルビノ発生率を減少させた昼夜変温培養は、現実的なアルビノ軽減策として注目される。

5 種類の昼夜変温培養条件で効率を比較した結果、「キタアケ」では昼 30℃/夜 20℃に優る昼夜温の組合せを見いだせなかったが、「きらら 397」では昼温を 32.5℃にした 2 つの変温区 (昼 32.5℃/夜 17.5℃, 昼 32.5℃/夜 22.5℃) のカルス形成率が昼 30℃/夜 20℃区のそれを上回った (Table 5)。品種によって好適な昼夜温の組合せが異なるのかどうかは、実験回数が十分とはいえないので断定できない。

変温培養において培養効率が向上するメカニズムは明らかでないが、脱分化期に変温条件で誘導されたカルスにアルビノ植物の発生が少ないこと、再分化期に変温条件で培養されたカルスに緑色植物の発生が多いことは、このメカニズムを解明する手がかりになる。このような昼夜変温の効果の仕組みはさておき、昼 30℃/夜 20℃の昼夜変温は葯培養効率の向上を図る手段として利用できる。その一例として、木内ら (2000) は著者 (岡本ら 2001) の昼 30℃/夜 20℃培養を育種現場の葯培養に適用して効率を上げ、その結果に基づいて葯置床作業に関わる人員の 25% を軽減できると試算している。

第 2 節 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

培養環境の通気性を高めることによって、培養植物の生育がよくなったり、カルスからの植物体再分化が高まることが知られている (高澤・古在 1992, 新発田ら 1989, Yomoda and Hinata 1991)。

本節では、イネの葯培養効率に対し、培養容器の蓋の周囲をパラフィルムで封じないことによる通気性改善の効果を明らかにする。

材料および方法

実験 I カルス誘導期の実験

「きらら 397」を供試し、1999 年に 2 回 (4 月播種・6 月葯置床, 7 月播種・9 月葯置床) 実験を行った。

著者の標準培養法では培養容器の蓋をパラフィルムで封じているが、パラフィルムで封をしない場合には培地のコンタミネーションと乾燥が懸念される。そこでパラフィルムで封をしない場合に培地の蒸発・乾固とコンタミネーションを防ぐ方法として、二重チャンバー法を案出した (Fig. 8)。

すなわち、滅菌水 5 ml をしみ込ませた ϕ 110 mm の ADVANTEC No.2 (東洋濾紙株式会社) の濾紙 1 枚を ϕ 116 mm \times 24 mm のガラスシャーレの底に敷き、その上にプラスチックシャーレ (培養シャーレ) を置き、ガラスシャーレの蓋をして培養した。培養期間中に濾紙が完全に乾くことのないように適時滅菌水を補給した。このようにして二重チャン

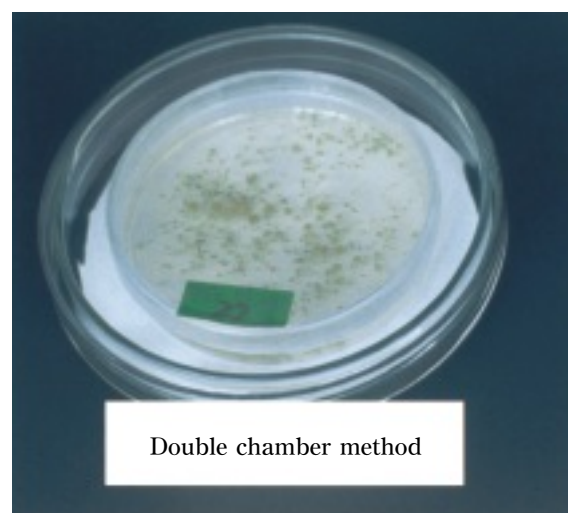


Fig. 8. Double chamber method used to prevent contamination and evaporation of the medium in the unsealed inner plastic Petri dish (90 \times 20-mm). Outer glass dish (116 \times 24-mm) contains wet filter paper on the bottom.

バーで培養した区をパラフィルムで封じなかった区（不使用区）とし、パラフィルムで封じた慣行区とのカルス形成率を比較した。さらに両区のカルスを標準培養で増殖および再分化させ、植物体再分化率を調べた。

1区当たり葯数は695～1391、1区当たりカルス数は249～250であった。

実験2 カルス増殖期の実験

「キタアケ」を供試し、2001年（6月播種・8月葯置床）に実験した。液体培地で誘導したカルスを、固形のカルス増殖培地に移植した。

予備実験では、パラフィルムで封をしないプラスチックシャーレの培地は培養7日目（増殖培養終了日）でもコンタミネーションを全く起こさなかった。したがってカルス増殖期の実験では、特にコンタミネーション対策をすることなく、単にプラスチックシャーレの蓋の周囲をパラフィルムで封じないで培養した区（不使用区）と封じて培養した区（慣行区）を設けた。その後、両区のカルスを標準培養で再分化させ、植物体再分化率を調べた。

1区当たりカルス数は207～249であった。

実験3 植物体再分化期の実験

1999年に「キタアケ」を葯培養して再分化させた10系統（7月播種・9月葯置床）を、2000年に「キタアケ」（4月播種・6月葯置床）を供試した。なお、10系統のうち、A系統は脱分化期を昼25℃/夜25℃で培養し、植物体再分化期を昼25℃/夜25℃で培養（以下25/25-25/25と記す）して得た倍加半数体の穂別系統、C系統は30/20-25/25で培養して得た倍加半数体の穂別系統、D系統は30/20-30/20で培養して得た倍加半数体の穂別系統である。

標準培養法に従って誘導・増殖したカルスを植物体再分化培地に移植した。植物体再分化培地の入った試験管のキャップの周囲をパラフィルムで封じて培養した区（慣行区）と封じないで培養した区（不使用区）を設け、植物体再分化率を調べた。

1区当たりカルス数は1999年が100～150、2000年は499～500であった。

結 果

1) 液体培地のコンタミネーション防止と蒸発抑制に対する二重チャンバーの効果

パラフィルムで封をしない場合には、培地のコンタミネーションと蒸発・乾固が問題になる。予備実験を行った結果、封をなかったシャーレでは培養開始7日目に全てがコンタミネーションを起こし、また、ほぼ一定速度で水分が蒸発して培養開始28日

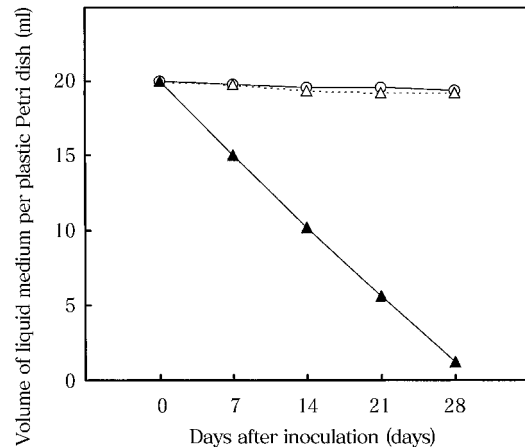


Fig. 9. Changes in the volume of liquid medium in a plastic Petri dish sealed with Parafilm or not sealed during incubation. Plastic Petri dishes of 90×20mm, each containing 20 ml of liquid medium, were incubated at 25℃.

○ : Sealed with Parafilm (conventional method).

▲ : Not sealed.

△ : Not sealed but covered with a glass Petri dish (double chamber method).

目の培地量は当初の8%にまで減少し、乾固寸前の状態になった（Fig. 9）。しかし、二重チャンバーにして封をなかったシャーレでは、培地のコンタミネーションはほとんど見られず、水分蒸発も抑制されてシャーレ内の培地の残存量はパラフィルムで封をした慣行区と全く差がなかった（Fig. 9）。予備実験で確認されたこの事実に基づき、カルス誘導期のパラフィルム不使用の効果を二重チャンバー法を用いて実験した。

2) カルス誘導期のパラフィルム不使用の影響

三段階培養法のカルス誘導期に、プラスチックシャーレの蓋をパラフィルムで封じて培養した区と封じないで培養した区のカルス形成率をFig. 10に、それぞれの区で形成されたカルスの植物体再分化率をFig. 11に示した。Fig. 10に示すように、不使用区のカルス形成率は、慣行区のそれに比べて実数値で212%（比率で1.6倍）～289%（3.8倍）増加した。この結果は反復実施した2回の実験に共通して認められた。

一方、カルスの緑色植物再分化率への影響はこの逆で、Fig. 11に示すように、2回の実験を通して不使用区の緑色植物再分化率（B）は慣行区のそれよりもやや低かった。不使用区の植物体再分化率（A）および再分化した全植物中に占める緑色植物の割合（B/A）は、実験により慣行区に比べて減少した場合と差がなかった場合とがあり、2回の実験を通して

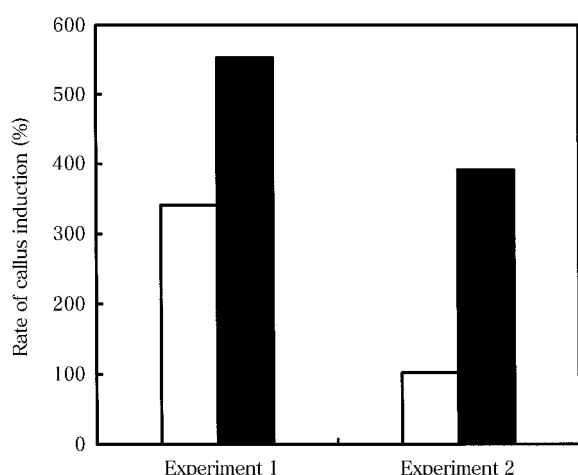


Fig. 10. Rate of callus induction (percentage of the number of calli to that of anthers) in a plastic Petri dish sealed with Parafilm or not sealed during the callus induction, in anther culture of a Japonica rice cultivar, Kirara 397 in 1999. Time of seeding and anther inoculation were April and June, respectively, in experiment 1, and July and Sept., respectively, in experiment 2.

□ : Sealed with Parafilm (conventional method).
 ■ : Unsealed but covered with a glass Petri dish (double chamber method).

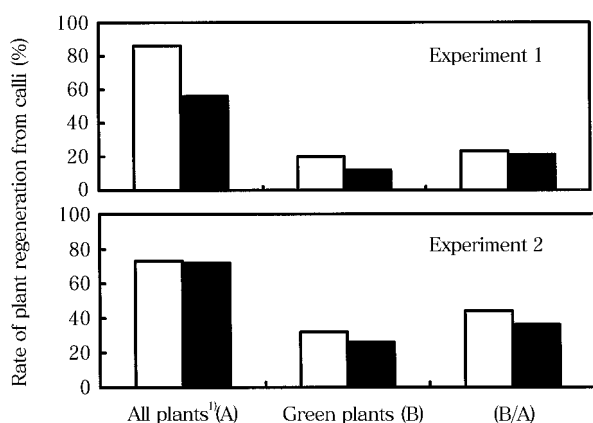


Fig. 11. Rate of plant regeneration from the calli in a plastic Petri dish sealed with Parafilm or not sealed during the callus induction period, in anther culture of a Japonica rice cultivar, Kirara 397 in 1999. Time of seeding and anther inoculation were April and June, respectively, in experiment 1, and July and Sept., respectively, in experiment 2.

1) All regenerated plants include both green and albino plants.

□ : Sealed with Parafilm (conventional method).
 ■ : Not sealed but covered with a glass Petri dish (double chamber method).

一致した傾向が見られなかった。

3) カルス増殖期のパラフィルム不使用の影響

予備実験ではパラフィルムで封をしないで培養したシャーレの培地に全くコンタミネーションが発生しなかったが、本実験では封をしなかった 16 シャーレのうち 3 シャーレにコンタミネーションが発生した。その結果、供試カルス数は慣行区の 249 に対し不使用区は 207 に減少した。

Fig. 12 に示すように、三段階培養法のカルス増殖期にパラフィルムで封じないで培養すると、緑色植物再分化率 (B) は慣行区に比べて 8 % (1.1 倍) 増加した。植物体再分化率 (A) および再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (B/A) は、パラフィルム不使用によってやや増加した。

4) 植物体再分化期のパラフィルム不使用の影響

三段階培養法の植物体再分化期に、試験管の蓋をパラフィルムで封じて培養した区と封じないで培養した区の植物体再分化率を Table 9 に示した。パラフィルム不使用の影響は供試系統によって若干の差はあるが、不使用区の緑色植物再分化率 (Table 9 の A) は慣行区のそれに比べ 10 系統の平均で 8.8% (1.2 倍) 高く、この差は 5 % 水準で統計的に有意であった ($t=3.095 > 2.262 = t_9 (0.05)$)。また、不使用

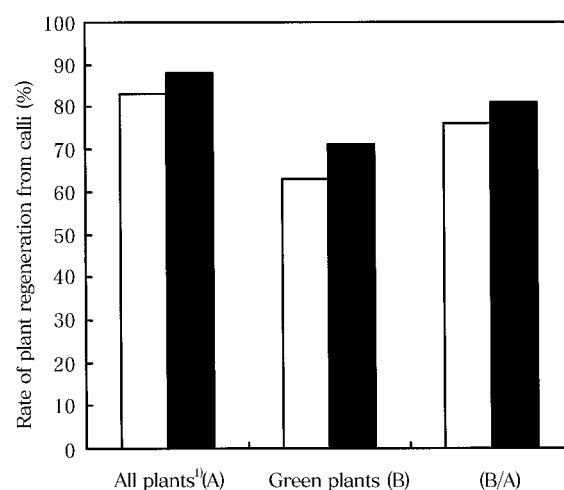


Fig. 12. Rate of plant regeneration from the calli cultured in a plastic Petri dish sealed with Parafilm or not sealed during the callus proliferation period, in anther culture of a Japonica rice cultivar, Kita-ake. Time of seeding and anther inoculation were June and Aug., respectively, in 2001. 1) All regenerated plants include both green and albino plants.

□ : Sealed with Parafilm (conventional method).
 ■ : Not sealed.

Table 9. Effect of the avoidance of Parafilm sealing for test tubes during the plant regeneration period on the green plant regeneration from the calli derived from the anther culture of different dihaploid lines of a Japonica rice cultivar, Kita-ake.

Line ¹⁾	Rate of plant regeneration from calli (%)						Green plants/All plants (A/B, %)			Rate of contamination (%)	
	Green plants (A)			All plants ²⁾ (B)							
	(S) ³⁾	(N) ³⁾	(N-S)	(S)	(N)	(N-S)	(S)	(N)	(N-S)	(S)	(N)
A- 7	57	63	6	72	84	12	79	75	— 4	0	0
A- 8	60	70	10	71	85	14	85	82	— 3	0	0
A-10	70	79	9	86	92	6	81	86	5	0	0
C-24	22	16	—6	42	25	—17	52	64	12	0	11
C-25	61	73	12	70	85	15	87	86	— 1	0	4
D-12	57	81	24	67	89	22	85	91	6	0	0
D-25	62	60	—2	75	86	11	83	70	—13	0	0
D-26	58	68	10	72	89	17	81	76	— 5	0	1
D-29	66	71	5	87	88	1	76	81	5	0	3
D-30	30	50	20	55	87	32	55	57	2	0	0
Average	54.3	63.1	8.8*	69.7	81.0	11.3*	76.4	76.8	0.4	0	1.9

Note: 1) Dhaploid strains derived from 'Kita-ake'.

2) All regenerated plants include both green and albino plants.

3) S: sealed with Parafilm, N: not sealed.

Time of seeding and anther inoculation were July and Sept., respectively, in 1999.

* Significant at the 5% level.

区の植物体再分化率（同B）は慣行区のそれに比べ10系統の平均で11.3%（1.2倍）高く、この差も5%水準で統計的に有意であった〔 $t=2.738>2.262=t_{0.05}$ 〕。これに対して、再分化した全植物中に占める緑色植物の割合（同A/B）は両区の間には有意な差が認められなかった。

Table 9の実験では1系統当たり100～150カルスで10系統を供試したが、その翌年、1区当たり500カルスを供試した「キタアケ」の実験によって、上述のパラフィルム不使用の効果が再確認された（Fig. 13）。

植物体再分化期の不使用区の培地のコンタミネーションの割合は、慣行区に比べてやや増加したが、実用的にはほとんど無視できる程度であった（Table 9）。

考 察

新発田ら（1989）はシャーレの蓋をパラフィルムで封じないで培養すると、イネのプロトプラスト由来カルスの植物体再分化率が、パラフィルムで封じて培養した場合に比べて向上することを報告した。本実験では、カルス誘導期のパラフィルム不使用によってカルス形成率が向上し、カルス増殖期と植物体再分化期それぞれのパラフィルム不使用によって、植物体再分化率が向上した（Fig. 10, Fig. 12, Fig. 13, Table 9）。植物体再分化期の実験における

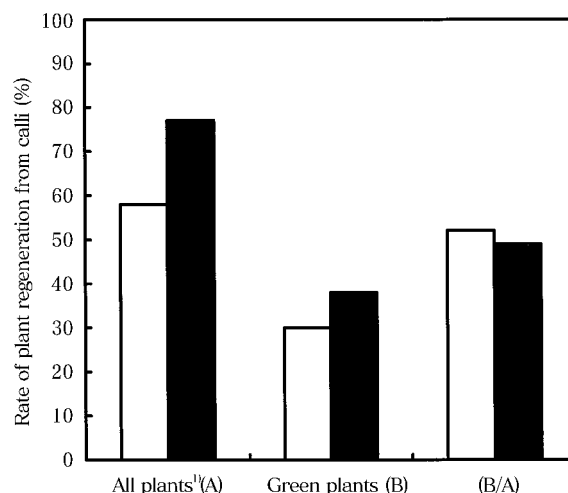


Fig. 13. Rate of plant regeneration from the calli cultured in a test tube sealed with Parafilm or not sealed during the plant regeneration period, in anther culture of a Japonica rice cultivar, Kita-ake. Time of seeding and anther inoculation were April and June, respectively, in 2000.

1) All regenerated plants include both green and albino plants.

□ : Test tube was sealed with Parafilm (conventional method).

■ : Test tube was not sealed.

植物体再分化率の向上は、新発田ら（1989）の結果と一致する。

Yomoda and Hinata (1991) は試験管の口を通気性のよいミリラップ (日本ミリポア) で覆うことにより、イネの種子由来カルスからの植物体再分化率がアルミホイルで覆った場合の 1.6~2.6 倍に達したことを報告した。さらに、彼らはミリラップで覆った区に炭酸ガスを施用した場合、種子由来カルスからの植物体再分化率が、ミリラップで覆った場合に比べて 1.3~1.4 倍、アルミホイルで覆った場合に比べて 2.1~3.4 倍に達したことを報告し、カルスの再分化率向上に対する培養容器の通気と炭酸ガス施用の効果を実証した。高澤・古在 (1992) は通気性のある培養容器を用いるとカーネーション幼植物の生育が従来の容器におけるよりも良好になることを実証し、その原因は培養容器内の空気流動、CO₂ 濃度、相対湿度が異なることによると述べている。パラフィルム不使用によるカルス形成率の向上 (Fig. 10) および緑色植物再分化率の向上 (Fig. 12, Fig. 13 および Table 9) のメカニズムは明らかでないが、Yomoda and Hinata (1991) や高澤・古在 (1992) が指摘した培養容器の通気性改善の効果が主因と考えられる。今後は培養効率向上の観点から、通気性のよい培養容器の研究も必要である。

緑色植物再分化率 (B) を植物体再分化率 (A) と再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (B/A) の積と考えてパラフィルム不使用の効果を分析すると、カルス増殖期のパラフィルム不使用による B の増加は A と B/A の両方の増加によると見られる (Fig. 12)。しかし、A と B/A のそれぞれの増加程度が小さく、それが有意であるかどうかは明らかでない。一方、植物体再分化期のパラフィルム不使用による B の増加は A の増加によるものであり、B/A はパラフィルムの使用・不使用の間で差が認められなかった (Fig. 13 および Table 9)。この場合、再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (B/A) に差がないことはアルビノ発生率に差がないことと同義であるので、上記の結果は、植物体再分化期のパラフィルム不使用による容器の通気性改善ではアルビノ発生率を軽減できなかったことを意味する。

Fig. 11 において、パラフィルムで封じないシャーレで誘導したカルスの緑色植物再分化率はパラフィルムで封じたシャーレのそれよりもやや低かった。このことはカルス誘導期にパラフィルムを使用しなかった場合の唯一のマイナス効果である。ただし、Fig. 11 の実験ではパラフィルム使用区のカルスも不使用区のカルスも植物体再分化期には試験管の蓋をパラフィルムで封じて培養しているが、カルス誘

導と植物体再分化の全期間を通してパラフィルムで封じないで培養した場合には、上述のようなマイナス効果は消失する可能性も考えられる。この点については今後さらに検討を要する。

Fig. 12 において、カルス増殖期のパラフィルム不使用によって、培養シャーレの一部 (16 シャーレ中の 3 シャーレ) でコンタミネーションが発生した。この結果からみると、予備実験で二重チャンバー法を用いないでコンタミネーションがみられなかったのは好運だっただけで、今後、パラフィルム不使用のときはカルス誘導期もカルス増殖期も二重チャンバー法で実施するのがよい。

培地の蒸発防止やコンタミネーションの防止のために培養容器の蓋をパラフィルムで封じることが一般的な方法として行われている。著者はカルス誘導期のプラスチックシャーレをパラフィルムで封じなくても培地のコンタミネーションや蒸発を起こさない二重チャンバー法を案出 (Fig. 8) して、パラフィルム不使用がカルス形成率を向上させることを実証した。また、カルス増殖期のプラスチックシャーレをパラフィルムで封じないで培養すると緑色植物再分化率が増加することおよび植物体再分化期の試験管をパラフィルムで封じないで培養すると緑色植物再分化率が高まることを実証した。培養容器をパラフィルムで封じないで培養することは培養効率を高めるだけでなく、パラフィルムを培養容器に巻きつけたり外したりする手間を省き、資材の節約にもなる。本実験では、Fig. 9 に示したように、培地のコンタミネーションと蒸発・乾固を防ぐため、湿った濾紙を敷いた直径 12 cm のガラスシャーレの中に直径 9 cm のプラスチックシャーレを 1 個ずつ入れて培養した。この方法では非常に手間がかかるが、実際に応用する場合は大きめの蓋つき容器にある程度まとまった数の 9 cm シャーレを入れ、二重チャンバー方式にして培養すれば手間は省ける。

以上の結果より、パラフィルムで容器を封じないことは、カルス誘導期にはカルス形成率を、カルス増殖期および植物体再分化期には植物体再分化率を向上させる技術として利用できる。

第 3 節 薬密度の低下によるカルス形成率の向上

培地の中の細胞密度は培養細胞の増殖や形態形成に強く影響するが (Huang *et al.* 1990, Debeaujon and Branchard 1992, Shigeta *et al.* 1996, Li *et al.* 1999), 薬培養においても薬密度 (培地 1 ml 当たりの薬数) がカルスの形成率に強く影響することが知られている。ナタネ、ブロッコリーおよびオオム

ギにおいて薬密度の最適値が報告されているが、その値は種によって異なる (Sopory and Munshi 1996)。イネの浮遊薬培養で用いられている薬密度は研究者により 2 薬/ml~27 薬/ml と大差があるが、供試密度の根拠は明らかでない。本節ではカルス形成率に対する薬密度の効果を実験して、イネの浮遊薬培養における適正密度を明らかにする。

材料および方法

実験 1 薬数変動実験

「キタアケ」を供試し、1997 年に 2 回 (7 月播種・9 月薬置床, 8 月播種・10 月薬置床), 1999 年に 1 回 (8 月播種・9 月薬置床) の計 3 回実験した。

カルス誘導培地をシャーレ当たり 20 ml に固定し、置床薬数を 18, 30, 60, 120 および 240 に変えることによって薬密度を 5 段階 (0.9, 1.5, 3, 6, 12 薬/ml) に変え、置床 35 日後にカルス形成率を調査した (以後薬数変動実験と呼ぶ)。さらに各密度区のカルスを標準培養で増殖および再分化させ、植物体再分化率を調査した。培地 1 ml 当たり 0.9 の区は 1997 年 8 月に播種し 10 月に薬を置床した実験にのみ設けた。

1 区当たり薬数は 462~1402 薬, 1 区当たりカルス数は 199~250 であった。

実験 2 培地量変動実験

「キタアケ」を供試し、1999 年に 1 回 (8 月播種・9 月薬置床) 実験した。

シャーレ当たりの薬数を 60 薬に固定し培地量を 40, 10 および 5 ml に変えることによって薬密度を 3 段階 (1.5, 6, 12 薬/ml) に変え、置床 35 日後にカルス形成率を調査した (以後培地量変動実験と呼ぶ)。さらに各密度区のカルスを標準培養で増殖および再分化させ、植物体再分化率を調査した。

1 区当たり薬数は 976~1147 薬, 1 区当たりカルス数は 250 であった。

結 果

薬数変動実験 3 回の結果および培地量変動実験 1 回の結果が同一の傾向を示したので、前者を白抜き記号 (Δ \square \circ), 後者を黒塗り記号 (\bullet) で Fig. 14 に示した。薬密度が 0.9 薬/ml~6 薬/ml の範囲では、全ての実験で薬密度の低下に伴ないカルス形成率は増加した。これに対し薬密度が 6 薬/ml と 12 薬/ml との間では、薬密度の低下によってカルス形成率が増加した場合と減少した場合とがあり、4 回の実験の間で一定の傾向が認められなかった。同じ材料を用いた 1999 年の薬数変動区と培地量変動区を比べ

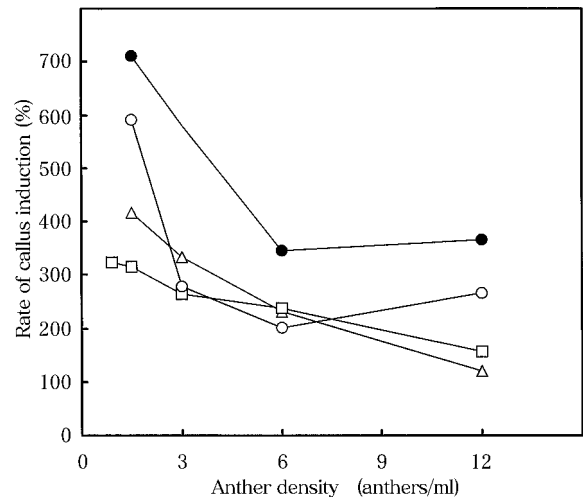


Fig. 14. Relationship between anther density and the rate of callus induction (percentage of the number of calli to that of anthers) in a Japonica rice cultivar, Kita-ake. In experiments 1-3 (Δ \square \circ), the number of anthers was changed in a fixed volume (20ml) of liquid medium in the 90×20mm plastic Petri dish. In experiment 4 (\bullet), the number of anthers was fixed to 60 and the liquid volume in the Petri dish was changed. Time of seeding and anther inoculation were July and Sept., 1997, respectively, in experiment 1 (Δ), Aug. and Oct., 1997, respectively, in experiment 2 (\square), Aug. and Sept., 1999, respectively, in experiment 3 (\circ), and Aug. and Sept., 1999, respectively, in experiment 4 (\bullet).

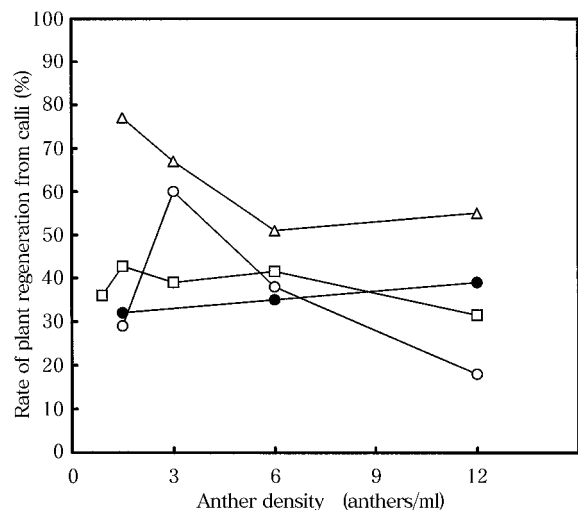


Fig. 15. Relationship between anther density and the rate of plant regeneration from calli (percentage of the number of the calli which produced green plants to that of total calli). Symbols are the same as in Fig. 14.

ると、3つの密度区(1.5, 6, 12 葯/ml)のすべてにおいて培地量変動区のカルス形成率が葯数変動区のそれを上回った。

葯数変動実験(3回)および培地量変動実験(1回)によって得られたカルの緑色植物再分化率をFig. 15に示した。この図で見られるように、培養開始時の葯密度と緑色植物再分化率との間には4回の実験を通して一定の関係が認められなかった。すなわち、カルス誘導時の葯密度はカルス形成率には明らかに影響したが、緑色植物再分化率にまで影響するかどうかは明らかでなかった。

考 察

ナタネ、ブロッコリー、オオムギでは葯培養効率に対する葯密度の適値が報告されているが(Sopory and Munshi 1996)、イネでは葯培養効率に対する葯密度の報告がない。イネの浮遊葯培養の研究報告に見られる葯密度は2 葯/ml~27 葯/mlで、研究者によって大きく異なっている(Table 10)。岡本(未発表)は2001年3月、イネの育種事業に葯培養を利用している国内の25の農業研究機関に対して葯密度とパラフィルムに関するアンケート調査を行い、17機関から回答を得た(回収率68%)。その結果、イネ育種現場の葯密度は1.0 葯/ml~12.5 葯/mlで、機関によって異なっていた。各機関の葯密度は、その大半が葯置床時およびカルス移植時の作業性に基づく経験に由来し、1場所のみが葯密度を変えた実験に基づくものであった。

Fig. 14はイネの浮遊葯培養において、カルス形成に対する葯密度効果をはじめて実証したものである。Fig. 14によれば、培地1 ml当たりの葯数が6 葯

以下では密度の低下に伴ってカルス形成率が増加し、6 葯以上では密度効果がはっきりしなかった。Table 10に示したイネの浮遊葯培養の研究報告では、津川(1992)、Daigen *et al.* (2000)と著者を除く他の研究者の葯密度はいずれも6 葯/ml以上であり、Fig. 14の密度効果より見て、これらの研究においては葯密度を下げることによってカルス形成率の増加が期待される。著者の標準培養法における葯密度3.6 葯/mlでもなお、密度の低下によってカルス形成率の増加が可能である。たとえば、Fig. 14において3 葯/mlから1.5 葯/mlに密度を下げたときのカルス形成率の増加は、少ないときで1.2倍、多いときで2.1倍に達した。

葯壁または葯嚢(anther sac)には花粉からの胚形成を抑制する物質があると考えられている(Sunderland and Wicks 1971)。Wernicke and Kohlenbach(1976)はタバコの葯の液体培地における植物体再分化率が寒天培地におけるよりも顕著に高かった理由として、葯壁組織に含まれる阻害物質が液体培地の中に拡散して葯内の濃度が薄まること、および寒天に含まれる阻害物質の影響を受けないことをあげている。Tyagi *et al.* (1979)は*Datura innoxia*の液体培地による葯培養において、葯を5日ごとに新しい培地に移植すると胚様体形成率が顕著に向上することを実証し、その理由を葯壁に含まれる阻害物質が新しい培地に拡散して希釈されるためと考えた。Cho and Zapata(1990)はインディカイネの小孢子培養において、小さくて胚様体形成能のない小孢子は早期に死に、その死んだ小孢子から放出される有毒物質が胚様体形成能のある小孢子的発育を阻害すると考察した。上述の抑制物質あるいは有毒物

Table 10. Anther density in the floating anther culture of rice reported.

Reference		Condition of callus induction				
Author	Published year	No. of anthers (A)	The amount of liquid medium (ml) (B)	Anther density (per ml) (A/B)	Culture vessel	
					Size (mm×mm)	Type
Tian and Chen	1983	100	5	20	50ml	Flask
Ozaki	1986a	20	2	10	φ30	Plastic Petri dish
Kobayashi <i>et al.</i>	1992	30	4	7.5	φ60	Plastic Petri dish
Tsugawa	1992	50	20	2.5	100ml	Flask
Sato	1993	80	3~4	20~27	φ60	Plastic Petri dish
Ozawa <i>et al.</i>	1999	30	4	7.5	φ35×15	Plastic Petri dish
Daigen <i>et al.</i>	2000	50	25	2.0	φ90	Petri dish
Guzman and Arias	2000	100	5	20	φ50	Petri dish
My conventional method		72	20	3.6	φ90×20	Plastic Petri dish

Note: Harada and Oono (1984), Negishi *et al.* (1987) and Hoshi and Daigen (1999) performed the floating anther culture but anther density was not described.

質は化学的には同定されていないが、Fig. 14 において薬密度の低下に伴ってカルス形成率が向上したのは、密度の低下に伴ってこの種の抑制物質の濃度が低下したことが一因と考えられる。

イネの浮遊薬培養のカルス形成率は薬密度によって大きく影響されることが本研究で明らかにされたが、どのような密度で培養するかは研究の目的や条件によって異なる。同数の薬を培養する場合は、密度の低下は必然的に培養容器の増加を伴うので、必要な数のカルスが得られている限り敢えて低密度で培養する必要はない。しかし、労力不足のため培養する薬数をできるだけ少なく抑えたいとき、あるいは材料植物の個体数が少なくして置床する薬数が少ししか得られないときなどには、低密度で培養してカルス形成率を高めるのが得策である。イネの育種現場における薬密度は、これまでは主として作業上の理由で決められてきたが、今後は作業性と培養効率の両面から適正な薬密度を決めるべきである。

以上の結果より、イネの浮遊薬培養のカルス誘導期に 6 薬/ml 以下の薬密度で培養することにより、カルス形成率を向上できることが確認された。カルス誘導期の薬密度が緑色植物再分化率にまで影響するかどうかはなお明らかでなく (Fig. 15)、今後の研究課題として残された。

第 4 節 カルスに付着した液体培地除去による植物体再分化率の向上

イネの浮遊薬培養は通常の寒天培養に比べて、カルスが多数できるのはよいが、カルスからの植物体再分化がわるいのが欠点である。したがって、浮遊薬培養の効率を向上させるためには植物体再分化率の高いカルスを如何にして培養するかということが先決問題である。イネの種子由来カルスを用いた実験により、植物体再分化率を向上させるカルスの培養条件や植物体を再分化するカルスの性状に関して、濾紙上での乾燥 (Tsukahara and Hirose 1992)、培地組成による水分ストレス (Lai and Liu 1988, Higuchi and Maeda 1990, 1991)、形態観察 (中野・前田 1974, Inoue and Maeda 1980) とそれぞれ方法は異なるが、いずれもカルスの乾燥が植物体再分化と密接に関連していることを示唆している。本節では、イネの浮遊薬培養によって誘導されたカルスを液体培地から寒天培地に移植するとき、カルス表面に付着した液体培地を濾紙で瞬間的に除去するという極めて簡易な乾燥処理が植物体再分化におよぼす効果を明らかにする。

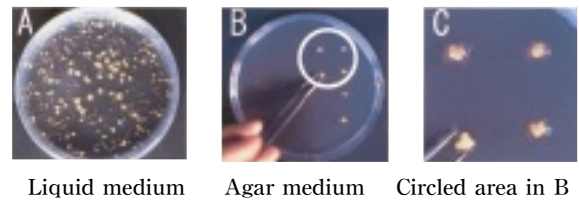


Fig. 16. Calli floating on liquid medium (A) and the calli transplanted onto agar medium (B, C). C is a magnified figure of the circled area in B showing liquid medium attached to the surface of calli (C).

材料および方法

「きらら 397」を供試して 1999 年 (4 月播種・6 月薬置床) に 1 回、「キタアケ」を供試して 2000 年 (5 月播種・7 月薬置床) および 2001 年 (4 月播種・6 月薬置床) に 2 回、計 3 回実験した。

標準培養ではカルスを液体培地の中からピンセットでつまんで直接固形のカルス増殖培地に移植したが、このときカルスの表面に付着した液体培地はそのまま増殖培地に持ちこまれた (Fig. 16 の B, C)。これに対しピンセットでつまみあげたカルスを 1～2 秒間濾紙の上に置いてカルス表面の液体培地を除去してから増殖培地に移植する区を設けた (液体培地除去区)。液体培地を除去するための濾紙は、 ϕ 90 mm の ADVANTEC No.2 (東洋濾紙株式会社) 5 枚を ϕ 90 mm のガラスシャーレに入れ、予めオートクレーブで滅菌しておいた。その後、両区のカルスを標準培養で増殖および再分化させ、植物体再分化率を調べた。

1 区当たりカルス数は 1999 年が 250～253、2000 年が 477～478、2001 年が 175～207 であった。

結 果

Fig. 17 に示したように、液体培地から寒天培地へカルスを移植する時に、カルスに付着した液体培地を濾紙で除去すると、除去しない場合 (慣行区) に比べて緑色植物再分化率 (B) が明らかに向上した。この効果は 3 年間に反復実施した 3 回の実験を通して一致して認められ、その程度は年次により 13～18% であった。液体培地除去区の植物体再分化率 (A) および再分化した全植物中に占める緑色植物の割合 (B/A) は、年次により慣行区に比べて増加した場合と差がなかった場合とがあり、3 回の実験を通して一致した傾向が見られなかった。

考 察

イネの薬培養効率を表す薬当たり緑色植物再分化

率は、カルス形成率と緑色植物再分化率の二つの要素に分解できる。浮遊培養と寒天培養の培養効率を比べるため、既報の報告からこの二つの要素値を抽出して Table 11 に示した。この表で明らかなように、浮遊培養は寒天培養に比べて、カルス形成率は3倍以上もあるのに緑色植物再分化率は0.5倍かそれ以下しかない。したがって、イネの浮遊葯培養においては、緑色植物再分化率を向上させる培養法の改善が当面の問題である。

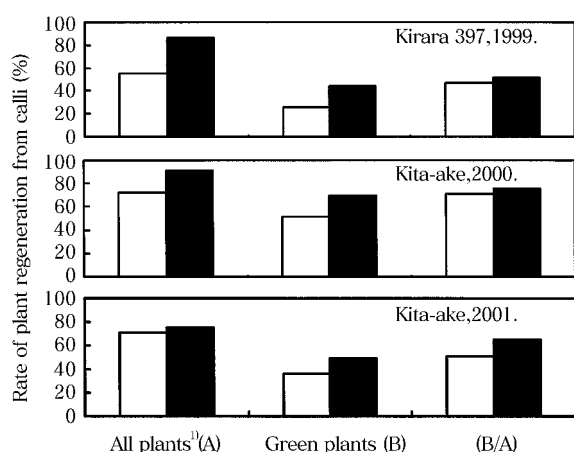


Fig. 17. Effect of the removal of liquid medium attached to the calli before transfer to agar medium for plant regeneration. Time of seeding and anther inoculation were April and June, respectively, in 1999, May and July, respectively, in 2000 and April and June, respectively, in 2001. 1) All regenerated plants include both green and albino plants.

□ : Wet callus (conventional method).

■ : Callus blotted liquid medium with filter paper.

Tsukahara and Hirose (1992) は液体培地で培養したイネの種子由来カルスを濾紙上で一定時間乾燥させてから固形の再分化培地に移植し、植物体再分化率の向上に対する乾燥処理の効果を実験した。乾燥時間が1時間では効果がなく、3時間以上では処理時間の長さに伴って再分化率が増加し、24時間処理では無処理に比べて再分化率が42%も増加した。これに対しカルスの水分含有率は1時間処理で無処理区の約1/2（水分含有率30%）にまで減少し、処理時間がそれ以上に長くなっても水分含有率に変化はなかった。彼らはこの結果から、乾燥処理による植物体再分化率の向上を水分含有率の減少だけでは十分に説明できないと考えた。本実験ではカルスに付着した液体培地を濾紙で1～2秒間吸い取るだけの操作で緑色植物再分化率が13～18%増加した (Fig. 17) ので、この効果がカルスの乾燥によるものでないことは明らかである。したがって、カルスに付着した液体培地を除去したことが緑色植物再分化率を向上させたと考えねばならない。Fig. 16 に示すように、カルスの移植にともなって増殖培地（寒天）に持ち込まれる液体培地の量はごく少量である。しかし、少量とはいえこの液体培地の2,4-Dの濃度（2 mg/l）は増殖培地の2,4-D濃度（0.4 mg/l）の5倍もあるので、このことが緑色植物の再分化に影響したかもしれない。この点の解明は脱分化から再分化に切り替わる時期の培地のオーキシン濃度の問題として今後の研究に残された。また、植物体再分化率を向上させるためにカルスを濾紙上に置く時間は、Tsukahara and Hirose (1992) が3時間以上必要としたのに対し、著者の場合は1～2秒間で有効であった。両者の実験材料も培地の組

Table 11. Comparison of the culture efficiency between the cultures of rice anther with solid medium and those with liquid medium.

Author	Published year	Callus induction medium	Rate of callus ¹⁾ induction (%)	Rate of plant ²⁾ regeneration from calli (%)	Materials
Ozaki	1986b	Solid	15	52	Four Japonica cultivars including Nipponbare.
		Liquid	72	20	
Tsugawa	1992	Solid	8	88	A F ₁ cultivar, K8.
		Liquid	154	42	
Saka <i>et al.</i>	1995	Solid	39	7	F ₃ plants from one cross.
		Liquid	120	0.3	
Ozawa <i>et al.</i>	1999	Solid	24	47	F ₁ plants from 6 crosses.
		Liquid	100	26	

Note: 1) Rate in solid medium = number of anther that produced callus or calli/number of anthers inoculated.

Rate in liquid = total number of calli induced/number of anthers inoculated.

2) Rate = number of the calli which produced green plants/total number of calli.

成も異なるのでこの処理時間の差の理由を説明するのは困難であるが、液体培地の瞬間的除去で効果のある著者の方法は、一連の培養操作を中断せずに実施できるので現実的な方法として優れている。

本研究では液体培地で誘導されたカルスをシャーレの中から無作為に選んで寒天培地に移植したが、この段階で緑色植物再分化能の高いカルスを外観で選別できれば培養効率を確実に向上させることができる。カルスの形状に関しては「白色・compact・乾燥気味」のカルスに茎葉の分化が多いことが観察されている(中野・前田 1974, Inoue and Maeda 1980, Higuchi and Maeda 1990, 1991)。イネの薬由来カルスの色に関しては、黄色のカルスは緑色植物を分化しやすく、白色のものはアルビノ植物を分化しやすいことが経験的事実として知られている(小牧私信)。カルスの大きさに関しては直径 2 mm 前後の中程度の大きさのカルスの植物体再分化率が高いこと(小澤ら 1998)が報告されている。ここに引用したカルスの形状や大きさは再分化能の高いカルスを選別する指標となるが、最近この種の研究が少ない。効率の高い薬培養法を確立するためには、カルスの誘導と植物体再分化を促進する培養法の研究とともに、優良なカルスを選別するための質的な研究が必要である。

以上の結果より、イネの浮遊薬培養において、液体培地で誘導したカルスを寒天培地に移植するときカルスに付着した液体培地を濾紙で 1～2 秒間除去すると、緑色植物再分化率が向上することが明らかにされた。

第 5 章 浮遊薬培養における花粉起源カルスと分割起源カルスの増殖の実態

イネの浮遊薬培養法は大量のカルスを容易に誘導できるという理由で推奨されてきたが、そのカルスがいつ、どのような速度で誘導されたかに関しては研究報告がない。液体培養中に出現してくるカルスには、個々の花粉から由来したカルスと、それが分割して増えたカルスとがあり、それらを区別するためにこの論文では前者を「花粉起源カルス」、後者を「分割起源カルス」と呼ぶ。本章では花粉起源カルスと分割起源カルスの時期別の発生数を調査し、浮遊薬培養におけるカルス増殖の実態を明らかにする。

材料および方法

実験 1 カルスの数と大きさの推移

「キタアケ」を供試し、2000 年 5 月に播種した材料で葉耳間長が -2 cm と -1 cm の 20 穂を用いた。特

定穎花から採取した 72 薬を穂別に標準培養し、置床後 7, 15, 22, 28 および 35 日目にそれぞれ肉眼でカルス数を数えた。

上記の実験とは別に 1999 年 7 月播種の材料で葉耳間長が 0 cm の 20 穂を供試し、特定穎花から採取した薬を穎花別に培養した。すなわち、培地 1.5 ml を入れた ϕ 35 mm \times 10 mm のプラスチックシャーレに 1 穎花から採取した 6 薬を置床し、標準培養と同じ条件で培養した。置床後 35 日目まで 7 日ごとに実体顕微鏡の下で全カルスの大きさ(長径)を計測した。計測操作によってカルスの崩壊やコンタミネーションを起こす恐れがあったので、個々のシャーレにおけるカルスの計測は 1 回限りとし計測終了後の試料は毎回廃棄した。毎回の計測に 60 シャーレ(360 薬)を供試し、カルスの生長の度合を推定するため、大きさ別カルス数の全カルス数に対する割合を求めた。

実験 2 花粉起源カルス数の推移

「キタアケ」を供試し、1999 年 7 月に播種した材料で葉耳間長が 0 cm の 8 穂を供試し、実験 1 と同じ方法で 1 穎花から採取した 6 薬を、培地 1.5 ml を入れた ϕ 35 mm \times 10 mm のプラスチックシャーレで培養した。置床後 35 日目まで 7 日ごとに実体顕微鏡の下でカルス数を数えた。カルスの計数後に実体顕微鏡で確認できた全カルスをシャーレから除去し、シャーレを再びパラフィルムで封をしてさらに培養を継続した。このようにして 7 日目ごとに計数されたカルスは、7 日間かかって顕微鏡下で視別できる程度に生長したカルスであるのでその間の分割はなかったと考え、それぞれの計測日の前 7 日間に新たに形成された花粉起源カルスとみなした。供試した薬の総数は 557 薬で、95 穎花から 1 穎花につき 5～6 薬を摘出し 95 シャーレに培養した。

実験 3 分割起源カルス数の推移

培地 1.5 ml を入れた ϕ 35 mm \times 10 mm のシャーレの中に 1 個のカルスを入れて単独培養し、培養開始後 28 日目まで 7 日ごとにカルス数を数え、カルスの分割による増加率を求めた。このために、実験 2 の置床後 21 日目に計数を終了したカルスの中から 0.1～0.4 mm のカルス 18 個、0.5～0.9 mm のカルス 18 個、計 36 個のカルスを無作為に選んで実験に供した。

薬置床後 35 日目における 100 薬当たりカルス数(Z)を、実験 2 で求めた花粉起源カルスの時期別の発生数(X)と実験 3 で求めた分割によるカルス数の経時的増加率(Y)を変数とする計算式で表し、全カルス数中に占める分割起源カルス数の割合を求め

た。

結 果

1) カルス数の推移

Fig. 18 に培養中におけるカルス数増加の推移を示した。葯置床後 7 日目に一部の葯が裂開して液体培地中に放出された小孢子が観察されたがカルスは認められなかった。カルスが初めて観察されたのは 1999 年の実験では 14 日目, 2000 年の実験では 15 日目で, その数はそれぞれ置床総葯数 557 葯から 25 個 (100 葯当たりにして 5 個) および 1341 葯から 28 個 (100 葯当たりにして 2 個) で, その大きさは 0.1 ~ 0.4 mm であった。そして 21 日目 (1999 年の実験) ~ 22 日目 (2000 年の実験) にはシャーレを一瞥して識別できるほどにカルスの数と大きさが増加した。その後カルスはさらに数を増し, 2 回の実験における 35 日目のカルス数はそれぞれ 100 葯当たり 170 および 269 に達した。

一方カルスの大きさについて見ると, 葯置床後 14 日目には 0.1~0.4 mm の小さなカルスのみであったが, 21 日目には全カルスの 60% を 0.5~0.9 mm および 1.0~1.9 mm のカルスが占め, 35 日目には 0.1~0.4 mm の小さなカルスは全体の 30.1%, 0.5 ~ 0.9 mm のカルスは 25.3%, 残りの 44.6% が 1 mm 以上のカルスであった (Fig. 19)。

2) 花粉起源カルスの時期別発生数

Table 12 に花粉起源カルスの時期別の発生数を

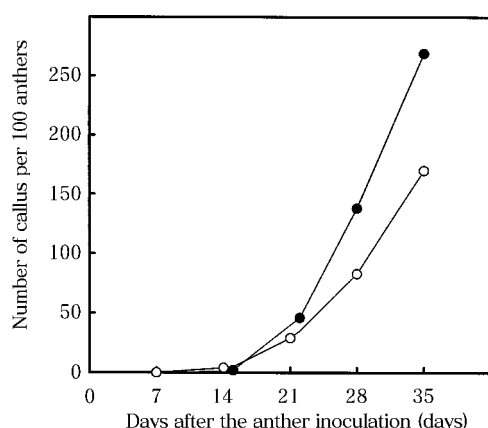


Fig. 18. Increase in the number of calli after the anther inoculation on liquid medium.

● : Number of calli scored in a standard anther culture (1st experiment in May 2002).

○ : Total number of calli estimated from the number of calli of pollen-origin and that of the division-origin during callus culture (2nd experiment in July 1999).

示した。花粉起源カルスは葯置床後の最初の 7 日間には全く発生せず, 7~14 日の期間に総置床葯数 557 葯から 25 個のカルスが生じた。これを 100 葯当たりには換算すると 5 個のカルスが形成されたことになる。その後 35 日目までの期間に毎週 100 葯当たりにして 23~35 個のカルスが持続的に形成された。すなわち, 花粉起源カルスは培養開始の第 2 週目に発生し始め, その後も毎週新たに発生して 35 日間の総数で 100 葯当たりには換算して 93 個に達した。

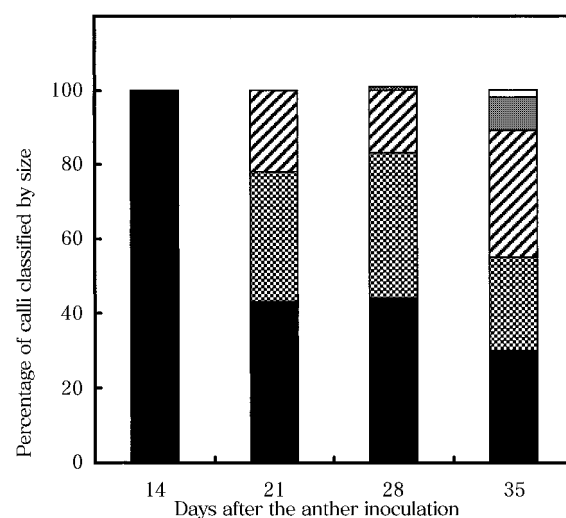


Fig. 19. Increase in the size of calli after the anther inoculation on liquid medium.

Diameter of calli

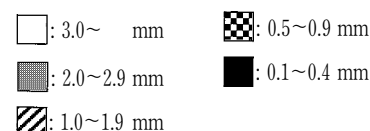


Table 12. The number of calli induced from pollen grains at different period after the start of anther culture on liquid medium.

Period (Days after inoculation)	Number of pollen- originated calli induced in each period from 557 anthers inoculated	Calculated number of ¹⁾ pollen-originated calli per 100 anthers
0 ~ 7	0	0 ± 0.0
7 ~ 14	25	5 ± 0.9
14 ~ 21	128	23 ± 5.5
21 ~ 28	197	35 ± 9.7
28 ~ 35	169	30 ± 6.3
Total	519	93 ± 22.4

Note: A Japonica rice cultivar, kita-ake was used.

Time of seeding and anther inoculation were July and Sept., respectively, in 1999.

1) The values are means ± S. E. (n=95).

3) 分割起源カルス数の推移

1 シャーレ 1 カルスの単独培養実験により、カルスが生長の過程で分割して数を増やすことが以下のように確認された。分割の時期、回数、分割後のカルスの大きさ等は元のカルスによって様々でその実態を類型化するのは困難なので、調査した 36 カルスの中から分割回数の異なる 3 例を選んで Fig. 20 に示した。Fig. 20 の A は培養中に 1 回だけ分割して 4 週間後に 2 個に、B は毎週分割して 4 週間後に 8 個に、C は B よりもさらに数多く分割して 4 週間後に 23 個にカルス数が増えた例である。

このようにカルス分割の様相はカルスによって大きく異なるが、カルス数増加の平均的な推移を Table 13 に示した。この表によれば、液体培地で単独培養されたカルスは分割して 1 週間後には 1.6 倍、2 週間後には 2.8 倍、3 週間後には 4.8 倍、4

週間後には 7.8 倍に数が増えた。この分割起源カルス数の平均的な増加率は、単独培養開始時に大きなカルスの方が小さなカルスに比べて大きく、置床時に 0.5~0.9 mm のカルスは 0.1~0.4 mm のカルスに比べて、4 週間後のカルス数の増加率が約 50% 多かった。

4) 置床後 35 日目におけるカルス数と分割起源カルスの割合

Table 12 および Table 13 の数値を用いて置床後 35 日目（標準培養法においてカルスを増殖培地に移植する日）におけるカルス数とその中に占める分割起源カルスの割合を推定した。

置床後 7~14 日目、14~21 日目、21~28 日目、28~35 日目の期間に形成された花粉起源の 100 葯当たりカルス数をそれぞれ X_1 , X_2 , X_3 , X_4 とし、これらの 35 日目における増加率をそれぞれ Y_1 ,

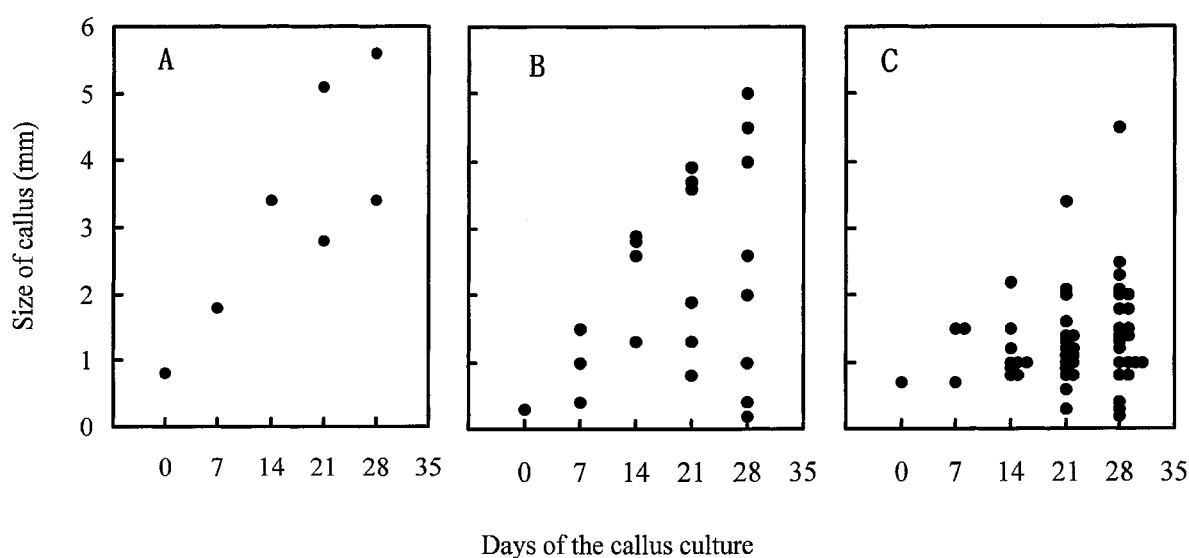


Fig. 20. The size and number of calli increased by the division of a single callus cultured on liquid medium. Three representative examples of the callus division are shown. A single callus increased to 2 calli in A within 28 days of the callus culture, to 8 calli in B and to 23 calli in C, respectively.

Table 13. The increased ratio of number of calli increased by their division after the single callus culture on liquid medium.

Size of callus transplanted (mm)	No. of calli transplanted	The increased ratio to the original number				
		Days after the start of callus transplantation				
		0	7	14	21	28
0.1~0.4	18	1.0±0.0	1.4±0.1	2.2±0.3	3.7±0.7	6.6±1.6
0.5~0.9	18	1.0±0.0	1.7±0.2	3.4±0.6	5.9±1.1	9.0±1.3
Total	36 ¹⁾	1.0±0.0	1.6±0.1	2.8±0.3	4.8±0.7	7.8±1.0

Note: A Japonica rice cultivar, kita-ake was used. Time of seeding and anther inoculation were July and Sept., respectively, in 1999. The values are means ± S.E.

1) Thirty six calli were arbitrarily chosen out of the calli formed for 7 days from 14 th. to 21 st. after anther inoculation.

Y_2 , Y_3 , Y_4 とすると, 35 日目における総カルス数 Z は

$$Z = X_1 Y_1 + X_2 Y_2 + X_3 Y_3 + X_4 Y_4$$

で表される。この式の $X_1 \sim X_4$ に対しては Table 12 の時期別の花粉起源カルス数の平均値 5, 23, 35, 30 を適用する。置床後 7~14 日目に形成されたカルス X_1 は形成されてから 3 週間後に増殖培地への移植期に達するので, その間の分割による増加倍率 Y_1 に対しては Table 13 の 3 週間後の平均値 4.8 を適用する。同じ考えで Y_2 , Y_3 , Y_4 に対して Table 13 の 2.8, 1.6, 1.0 を適用すると

$$\begin{aligned} Z &= 5 \times 4.8 + 23 \times 2.8 + 35 \times 1.6 + 30 \times 1.0 \\ &= 174.4 \end{aligned}$$

すなわち, 35 日目の総カルス数は 100 葯当たり 174.4 個であり, この中で分割起源カルスが占める割合は

$$\frac{174.4 - (5 + 23 + 35 + 30)}{174.4} \times 100 = 46.7(\%)$$

これにより, 葯置床後 35 日目の分割起源カルスの割合は 46.7% と推定された。

35 日目の場合と同じ方法で 28 日目の値を算出した結果, 100 葯当たりのカルス数は 85.5 (35 日目の値の 49%), その中に占める分割起源カルスの割合は 26.6% (35 日目の値の 57%) であった。

考 察

イネの浮遊葯培養の最大の特徴は多量のカルスを容易に誘導できることである。このことは多くの研究者によって報告されてきたが, 多量のカルスがいづ, どのようにして誘導されたのかは全く不明である。カルスの出現時期については葯置床後 20 日 (原田・大野 1984, 根岸ら 1987), 25 日 (尾崎 1986a), 30 日ころ (小林ら 1992) という報告があるが, これらは肉眼で一見してカルスの存在がわかる程度に増加した時期を示したものと考えられる。葯置床後 7 日目ごとに実体顕微鏡で観察した結果によれば, 液体培地の中でカルスが最初に観察されたのは 14 日目であり (Fig. 18), このことは置床後 7~14 日の期間に花粉起源カルスが発生し始めたという結果 (Table 12) ととも符合する。また単離した未熟花粉が液体培養開始 7 日後に多細胞塊 (multicellular masses) となり, 10 日後にカルスに発育したという Ogawa *et al.* (1992) の観察も上記の結果とよく符合する。

カルスの発生経過に関して, 尾崎 (1986a) は「葯上に形成されたカルスが直ちに分散して液体中に落下し, 大量のカルスが形成された」と述べ, 藤村

(1994) は「培地の上で葯の中の花粉が分裂し, 葯からこぼれ落ち, 小カルスがシャーレの底に出現してくる」と述べている。著者の観察によれば, 裂開した葯から液体培地中に放出された花粉 (または分裂して多細胞化した花粉) から形成されたカルスと, 浮遊している葯の中で形成された後に液体培地中にこぼれ落ちたカルスと, 発生経過の異なる 2 種類のカルスがある。

培養開始後 14 日目に少数の小さなカルスが出現し, 21 日目以降にカルスの数の顕著な増加 (Fig. 18) と大きさの増加 (Fig. 19) が見られた。そして, これらのカルスには個々の花粉から形成されたカルスのほかに, 一旦形成されたカルスから分割して増えたカルスが含まれている (Table 12, Table 13, Fig. 20)。すなわち, 花粉起源のカルスと分割起源のカルスが並行的に連続発生して数と大きさを増している。Fig. 19 において 1 mm 未満の小カルスが 35 日目でも 50% 以上を占めるのは, 発生起源の異なる 2 種類のカルスが連続発生した結果である。この 2 種類のカルスは外観や形状では区別できない。

津川 (1992) は三段階培養におけるカルス誘導に関して「葯の培養期間を 35 日ころに限定してカルスを採取しているため, 一つのカルスから 2 次的に発生したカルスはほとんど含まれていないと考えている」と報告している。しかし本実験によれば, 0.1~0.4 mm の小さなカルスでさえ 7 日間の間に分割して 2 次的なカルスを生じており, 全カルス数に対する分割起源カルス数の割合は葯置床後 35 日目で 46.7%, それより 1 週間早い 28 日目でも 26.6% と推定された。これは 1 品種のみの実験結果であるが, カルス形成率が高いという液体培養の特性がカルスの分割増殖に大きく負っていることを示唆している。

小牧ら (1998) は「液体培養ではカルス誘導の段階で同一カルスの断片から生ずる遺伝的重複を避けることはできない」と言及し, 浮遊葯培養の導入に慎重な姿勢を示した。本実験では全カルスの中の約半数が分割起源カルスと推定されたが, 分割起源カルスが元のカルスと遺伝的に重複しているか否かに関しては全く明らかでない。今後は遺伝子型の異なる多くの材料を用いて分割起源カルスの発生頻度とそれが元のカルスと遺伝的に同じかどうかを調べ, 浮遊葯培養の利用法を再検討することが必要である。

第6章 総合考察

第1節 培養効率の向上

Chen (1986a) は薬培養の効率に影響する要因として、花粉発育ステージ、ドナー植物の遺伝子型・栽培条件、薬の前処理、培地の組成、培養環境、アルビノ発生などをあげている。本研究ではこれらの要因のうち、花粉の発育ステージおよび培養環境（培養温度、培養容器の通気性、薬密度、カルスに付着した液体培地の除去）が培養効率におよぼす影響について実験した。

日本の育種現場で行われているイネ薬培養の手順としては、まず薬を培養してカルスを誘導し、次にカルスから緑色植物を再分化し、再分化した緑色植物の中から染色体が自然倍加した2倍体を選んで系統を育成するのが一般的であり、コルヒチンによる半数体の倍加はほとんど行われていない。したがって、イネの事業育種における薬培養の効率は、薬のカルス形成率、カルスの緑色植物再分化率および染色体の自然倍加率の三つに分けられる。本研究ではこの三つの中の最初の二つの効率に対する花粉の発育ステージと培養環境の影響を検討した。

1) 培養適期の花粉発育ステージと適期の薬の採取

カルス形成に最適のステージは1核中期（光学顕微鏡で花粉の内外の膜が二重に見え、細胞質が充実していて核が細胞の中心に位置する時期）、それに次いで1核後期（光学顕微鏡で花粉内に1個の大きな液胞が形成され、核は液胞の外側に位置する時期）で、1核中期の薬のカルス形成率を100としたときの1核後期の薬のカルス形成率は60～80、2核前期や1核前期の薬のそれは40以下であった（Table 1）。

カルス形成率は花粉発育ステージによってこのように大きく異なるので、適期の薬を培養することは培養効率を向上させる上で極めて重要な最初のステップである。効率向上の観点から言えばもちろん1核中期の薬だけを培養するのが望ましいが、1穂から採取できる1核中期の薬数には限りがあるので、1核中期～後期の薬を適期の薬として培養するのが実用的である。

育種現場では検鏡によって花粉発育ステージを確認する時間的・労力的余裕がないので、ステージと相関の高い穎花長や雄ずい長を指標にして適期の薬を採取する（Fig. 3）。「きらら397」の場合には穎花長が5.3 mm以上で雄ずい長/穎花長の比が0.42以下という二つの指標値を併用することにより、1

核中期～後期の薬を約90%の確率で選ぶことができた（Table 4）。しかし、多様な遺伝子型の交雑から成る育種材料では、「きらら397」の指標値をそのまま適用できないので、これを一つの目安にして材料ごとに選抜の指標値を決め、さらに穎の色や柔らかさなども加味した総合的な指標で適期の薬を採取するのがよい。

育種の場合は培養する薬の花粉の発育ステージにばらつきがあっても、結果的に必要数のカルスが得られれば目的は達成される。しかし、カルス形成率の良否を比較する研究の場合は、花粉の発育ステージを揃えてカルス形成能が同程度の薬を供試することが必要である。多くの研究では育種の場合と同様に1核中期～後期の薬を穎花長や穎色を指標にして選んでいるが、この方法でどの程度まで試料の発育ステージを揃えることができたのかは定かでなく、また複数の人が実験に関わる場合は肉眼判別の個人差もステージの揃った薬の選定に不安を残す。第2章第1節で述べた薬の採取法（円形16粒播きポット栽培したイネの、同じ止葉葉数個体で同じ葉耳間長を持った主稈穂の、特定位置の穎花から薬を採取する）は、個人の肉眼判別による不確かさを排除して花粉の発育ステージの揃った薬を機械的に選定する方法として推奨できる。

2) 培養環境の改善

イネの浮遊薬培養の標準法（慣行法）では、液体培地で薬を35日間培養してカルスを誘導し、そのカルスを増殖培地（寒天）で7日間培養して肥大させ、肥大したカルスを植物体再分化培地（寒天）で60日間培養して植物体を再分化させている。この間、培養容器の蓋をパラフィルムで封じ、昼夜25℃・昼12時間3000 lx照明下で培養する。この標準培養法において、薬密度、パラフィルム、カルスの脱水および培養温度が培養効率におよぼす影響を個別に実験し下記の結果を得た。

すなわち、カルス誘導期において、薬密度を6薬/ml以下の低い密度で培養する、シャーレの蓋をパラフィルムで封じないで培養する、昼30℃/夜20℃の昼夜変温条件で培養すると、それぞれの慣行培養法に比べてカルス形成率が向上した（Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 10, Fig. 14）。また、カルス増殖期において、シャーレの蓋をパラフィルムで封じないで培養する、液体培地から寒天培地へ移植する直前にカルスに付着している液体培地を濾紙で瞬間的に吸収してから培養すると、それぞれの慣行培養法に比べて緑色植物再分化率が向上した（Fig. 12, Fig. 17）。さらに、植物体再分化期において、試験管の蓋をパ

ラフィルムで封じないで培養する、昼 30℃/夜 20℃の昼夜変温条件で培養すると、それぞれの慣行培養法に比べて緑色植物再分化率が向上した (Fig. 13, Table 7, Table 8, Table 9)。

培地改善を主流とする研究の蓄積によって 10℃・10 日間の低温前処理と N₆ 培地 (またはその改良培地) を基本とする標準的なイネの薬培養法が確立されたが、この標準化された培養法の普及に伴って培養技術改善の研究は減少した。本研究で取り上げたのは標準培養法の中の小さな技術的改善であるが、いずれの改善によっても培養効率を向上させることができた。培養効率に大きく影響する培地改善の研究はもちろん今後も重要であるが、本研究で着手したような小さな技術的改善にもっと注目すべきであると考え。本研究では技術改善の効果を個別に確認するとどまったが、これらの技術改善を総合的に組み合わせることにより相加的あるいは相乗的な効果が期待される。本研究で効果を認めた技術の改善はいずれも実施が容易であるので、育種現場はもちろん研究の場でも薬培養の効率向上策として推奨できる。

第 2 節 育種技術としての薬培養の今後の研究課題

イネの薬培養は育種年限を短縮する技術として事業育種に利用され、現在までに 25 を越す品種・系統が育成されている。イネの薬培養育種はこの実績を基に今後も発展すると考えられるが、今、育種現場で最も切実な問題は培養効率の向上である。イネの育種現場における最近の培養実績から求めた薬当たり稔実植物再分化率は、培養成績のよい北海道立上川農業試験場でも 2.65% で、全国平均では 1.30% である。この技術水準で上川農業試験場が実施している薬培養の規模は、1 組み合わせ当たりの平均置床薬数 37,300、移植カルス数 9,572、再分化稔実植物体数 988 で、これらの数値を見れば薬培養育種に多大の労力を投入している現実と、培養効率の向上による労力削減が育種現場の切実な問題であることを理解できる。小牧ら (1998) は F₁ における染色体の組み替え率を基礎にして、必要な再分化稔実植物体数 (緑色植物を再分化した植物のうち自然倍加したもの) を通常の交雑で 50~100 個体、遠縁の交雑では 100~200 個体とし、これから逆算して移植カルス数や置床薬数を設定している。必要な再分化稔実植物体数を 100 個体とすると、上川農業試験場の培養は必要な規模の約 10 倍の培養をしていることになるが、適正な培養規模については理論と実際から今

後さらに検討する必要がある。現在の培養規模が適正かどうかはともかく、培養効率を高めて投入労力を軽減できなければ薬培養育種を継続できない状況に置かれている試験場もあり、培養効率の向上が当面の最重要課題である。

培養効率を向上させるためには、三つの効率について個別に研究することが必要である。この三つの効率、すなわちカルス形成率、緑色植物再分化率および染色体の自然倍加率は、上川農業試験場の値でそれぞれ 26%, 26%, 40%, 全国平均値でそれぞれ 18%, 23%, 32% で、いずれの効率もなお向上の余地がある。カルス形成率の向上に関しては、従来から行われてきた培地や培養法改善のほかに、ドナー植物の栽培条件や遺伝子型の違いの研究が必要である。また浮遊薬培養法に関しては、分割起源カルスが元のカルスと遺伝的に同じかどうかを解明してこの培養法の育種への利用を再検討することが必要である。緑色植物再分化率の向上に関しては培地や培養法の改善のほかに、アルビノ抑制法の研究が必要である。また、緑色植物再分化率の高いカルスの選抜法や再分化率の高いカルスの培養法のようなカルスの質に関する研究も、緑色植物再分化率を向上させるための重要な側面である。染色体の自然倍加率の向上に関してはほとんど情報がなく、当面は実験データを集めて倍加率向上の要因を探索することが必要である。

Niizeki and Oono (1968) がイネの薬から半数体を得ることに初めて成功してから 30 数年が経過した。この間の多くの研究によって、薬培養は育種の実用技術として定着し優良品種育成の実績もあげてきた。薬培養育種は育種法の一つとして今後も利用され続けるであろう。しかし、近年、薬培養の研究は衰退傾向にあり、それに伴って培養技術も停滞している。培養効率を向上して薬培養育種をさらに発展させるためには、基礎部門の研究者の協力が今以上に必要である。

摘 要

わが国では 1980 年代から、イネの育種に薬培養が取り入れられるようになり、現在までに全国の農業試験場で 25 を超える品種・系統が育成されている。イネの薬培養ではカルスの誘導から植物体再分化まで寒天培地が多く用いられているが、この方法はカルス形成率が低いのが欠点である。このため、カルス誘導に液体培地を用いる方法 (浮遊薬培養法) が一部で用いられているが、浮遊薬培養法はカルス形成率は高いが、カルスの緑色植物再分化率が低い。

本研究は、イネの浮遊薬培養における培養効率の向上を目的として、培養効率に影響する花粉の発育ステージ、培養温度、培養容器の通気性、薬密度、カルスに付着した液体培地の除去について検討した。また、浮遊薬培養法のカルスの発生と増加の実態を調査し、カルスの増殖の実態を解明した。

- 1 北海道の水稲品種「キタアケ」, 「きらら 397」, 「ゆきひかり」および「彩」を供試した。円形 16 粒播きポット栽培したイネをガラス室で主稈穂のみを養成し、一定範囲の葉耳間長をもった穂の特定位置の 12 穎花から 72 薬を採取した。薬をカルス誘導（液体培地で 35 日間）－カルス増殖（寒天培地で 7 日間）－植物体再分化（寒天培地で 60 日間）の三段階培養法で、25℃・3000 lx・12 hr の照明下で培養した。
- 2 培養に最適の花粉の発育ステージを明らかにするために、はじめに発育ステージを光学顕微鏡の観察から 1 核前期、1 核中期、1 核後期、2 核前期、2 核後期、3 核期の 6 段階に区分した。カルス形成率が最も高かったステージは、花粉の内外の膜が二重に見え、細胞質が充実していて核が細胞の中心に位置する 1 核中期であった。ついで花粉内に 1 個の大きな液胞が形成され、核が液胞の外側に位置する 1 核後期であった。1 穂から採取できる 1 核中期の薬は少ないため、育種現場では 1 核中～後期の薬を培養するのがよいと考えられた。このステージの薬を簡便で効率よく選ぶ方法として、「きらら 397」では穎花長 5.3 mm 以上で雄ずい長/穎花長の比が 0.42 以下を指標に用いることができる。これにより 1 核中～後期の花粉を含む薬を 81～88% の高い確率で選ぶことができた。
- 3 現行法では、培養を昼夜恒温条件で行っているが、昼夜変温条件での培養効率を検討した。カルス誘導期に昼 30℃/夜 20℃の変温条件で培養すると、カルス形成率が恒温に比べて 1.2～1.9 倍に向上した。さらにアルビノ植物の発生が少なかった。再分化期の昼夜変温は緑色植物再分化率を 1.1～1.4 倍に増加させた。カルス誘導から再分化までを昼夜変温で培養するとカルス形成率が 1.6 倍、緑色植物再分化率は 1.4 倍、両者を乗じた薬当たりの緑色植物再分化率は 2.4 倍に向上した。
- 4 通常、培養容器のシャーレをパラフィルムで封じて培養が行われるが、カルス誘導期にパラフィルムを使わず培養したところ、カルス形成率は 1.6～3.8 倍に増加した。同様にカルス増殖期のシャーレと再分化期の試験管をパラフィルムで封

じないで培養すると、緑色植物再分化率が 1.1～1.3 倍に向上した。シャーレをパラフィルムで封じないと、培地のコンタミネーションと蒸発・乾固が生じるが、ひとまわり大きなガラスシャーレに濾紙を敷き、その上に培養シャーレを置いて、適宜滅菌水を補給し、ガラス蓋をする二重チャンバー法でコンタミネーションと蒸発・乾固を防止できる。

- 5 培地当たりの置床薬数が多すぎると薬壁からの阻害物質がカルス形成を抑制することが知られている。イネの浮遊薬培養における最適な薬密度を明らかにするために、培地 1 ml 当たりの薬数を変えて培養した。カルス誘導期の薬密度が 0.9～6 薬/ml の範囲では密度の低下に伴いカルス形成率は高くなり、3 薬から 1.5 薬に下げるとカルス形成率は 1.2～2.1 倍に向上した。
- 6 液体培地で誘導したカルスをカルス増殖の寒天培地に移植する時にカルスに付着した液体培地を 1～2 秒間濾紙で除去することによって、緑色植物再分化率が 1.4～1.7 倍に向上した。この理由として、液体培地の 2,4-D 濃度が増殖培地の 5 倍も高いことが関係していると考えられるが、今後の検討課題である。
- 7 液体培地中に出現するカルスには、花粉に由来する花粉起源カルスとそれが分割して増えた分割起源カルスの 2 種類があった。置床後 7 日目には実体顕微鏡下ではカルスの形成が認められなかったが、14 日目に初めて花粉起源カルスが観察された。これ以降、分割起源カルスも形成され両者が増加した。分割起源カルスの割合は置床後 28 日目には 26.6%, 35 日目には 46.7% と推定された。分割起源カルスが半分近くを占めていることが浮遊薬培養のカルス形成率の高いことと関係があると考えられるが、一方、分割起源カルスは元のカルスと遺伝的に重複している可能性があり、今後の検討課題である。
- 8 本研究では培養技術の改善の効果を個別に確認するにとどまったが、これらを組み合わせることでより大きな効果が期待される。本研究で得られた技術的改善はいずれも実施が容易なので、育種現場ばかりでなく研究の場でも培養効率の向上に有効な手段である。

謝 辞

本研究は 1993 年から 2002 年にわたり拓殖大学北海道短期大学において実施したものである。本研究の取りまとめにあたり、帯広畜産大学畜産学部沢田

壮兵教授には終始懇切なるご指導とご助言をいただき、さらに本稿のご校閲をいただいた。弘前大学農学生命科学部新聞 稔教授、岩手大学農学部高畑義人教授ならびに帯広畜産大学畜産学部加藤清明助教授には本稿のご校閲をいただいた。拓殖大学北海道短期大学では、佐竹徹夫教授、石村 櫻教授および木下 厚助教授のもとで研究する機会を与えられ、特に佐竹徹夫教授には研究者としての姿勢をはじめ、研究活動全般にわたり終始懇切なるご指導とご助言をいただき、さらに本稿のご校閲をいただいた。石村 櫻教授および木下 厚助教授には終始ご協力とご援助をいただいた。恩師である酪農学園大学土橋慶吉名誉教授ならびに故海野芳太郎助教授、また、我妻尚広助教授（前幌加内町農業技術センター）には終始激励とご助言をいただいた。

石川県農業総合研究センター育種科の小牧正子科長には、本稿のご校閲をいただくと共に、貴重な示唆とご助言をいただいた。北海道立上川農業試験場水稻科木内 均氏には、変温培養を事業育種に利用した際の貴重な情報のご提供をいただいた。北海道と各県の農業試験研究機関の育種担当各位には、薬培養利用に関する煩雑なアンケートに協力していただき、貴重なご意見と提言をいただいた。拓殖大学外国語学部田中信一教授には中国語で記載された薬培養研究文献の和訳をしていただいた。拓殖大学北海道短期大学図書館司書堤 香苗氏には本研究に関わる引用文献の検索作業と複写依頼に多大な協力をいただいた。拓殖大学北海道短期大学バイテク実験室の寺下由紀氏、和田則子氏、福岡由美子氏、中沢幸子氏には材料養成から薬培養実験の全般にわたり多大なご協力をいただいた。拓殖大学北海道短期大学付属農場の石田 潔氏、直井弘典氏には試験水田での再分化個体の一般管理および栽培の面でご協力いただいた。

このようなご指導、ご協力のたまものとして本研究があることをおぼえ、ここに記して心からの感謝の意を表する。

引用文献

- Chen, C. C. (1977) In vitro development of plants from microspores of rice. *In Vitro* 13:484-489.
- Chen, Y. (1986a) 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.
- Chen, Y. (1986b) The inheritance of rice pollen plant and its application in crop improvement. *In* "Haploids of Higher Plants in Vitro." Hu, H. and H. Yang(eds.) China Academic Publishers, Beijing, 118-136.
- Cho, M. S. and F. J. Zapata (1990) Plant regeneration from isolated microspore of Indica rice. *Plant and Cell Physiology* 31: 881-885.
- 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.
- Chuong, P. V., C. Deslauriers, L. S. Kott and W. D. Beversdorf (1988) Effects of donor genotype and bud sampling on microspore culture of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Botany* 66: 1653-1657.
- Daigen, M., O. Kawakami and Y. Nagasawa (2000) Efficient anther culture method of the Japonica rice cultivar Koshihikari. *Breeding Science* 50: 197-202.
- Debeaujon, I. and M. Branchard (1992) Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast-derived colonies of melon(*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports* 12: 37-40.
- 藤村達人 (1994) イネ育種への細胞工学の応用. 組織培養 20 : 3-5.
- Genovesi, A. D. and C. W. Magill (1979) Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Science* 19: 662-664.
- Guha, S. and S. C. Maheshwari (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
- Guha, S. and S. C. Maheshwari (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature* 212: 97-98.
- Guha, S. and S. C. Maheshwari (1967) Development of embryoids from pollen grains of *Datura in vitro*. *Phytomorphology* 17: 454-461.
- Guzman, M. and F. J. Z. Arias (2000) Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant Science* 151: 107-114.
- 原田辰也・大野清春 (1984) 薬の浮遊培養による高頻度のイネ花粉起源カルの誘導. 育種学雑誌 34 (別 1) : 28-29.

- Higuchi, N. and E. Maeda (1990) Enhanced plant regeneration in rice callus cultures following abscisic acid treatment. *Japanese Journal of Crop Science* 59: 359-368.
- Higuchi, N. and E. Maeda (1991) Effect of pre-treatment with excess sucrose or mannitol on plant regeneration from rice callus cultures. *Japanese Journal of Crop Science* 60: 122-129.
- 星 洋介・大源正明 (1999) イネ三段階薬培養の簡便化. *育種学研究* 1 (別 1): 213.
- 星 洋介・橋本憲明・池田真紀子・阿部聖一・大源正明 (2000) イネ薬培養における体細胞由来個体の有無. *育種学研究* 2 (別 2): 194.
- Huang, B., S. Bird, R. Kemble, D. Simmonds, W. Keller and B. Miki (1990) Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Reports* 8: 594-597.
- 蘭牟田 泉・菊池文雄・生井兵治・鶴飼保雄 (1991) イネ薬培養によるカルス形成率のダイアレル分析. *育種学雑誌* 41: 153-162.
- Inoue, M. and E. Maeda (1980) Effects of auxins and cytokinins on the occurrence of green regions in rice callus cultures. *Japanese Journal of Crop Science* 49: 167-174.
- 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薬培養 (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.
- 木内 均・新橋 登・沼尾吉則 (2000) コルヒチン処理と昼夜変温培養によるイネ薬培養の効率向上. *日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会会報* 41: 29-30.
- 小林好次・丸田一成・大野青春 (1992) イネの薬浮遊培養による高頻度の植物体復原. *植物組織培養* 9: 109-113.
- 小牧正子・中村啓二・小澤隆司・大西良祐 (2001) 水稻 F_1 薬培養で得られた倍加半数体の穂系統内に発生する分離および変異について. *石川県農業総合研究センター研究報告* 23: 1-14.
- 小牧正子・島田多喜子・大谷基泰・小澤隆司・中村啓二・黒田 晃・江崎真理子・吉秋 斎・松本範裕 (1998) 水稻育種における F_1 薬培養の利用……過去 8 年間のとりまとめ. *石川県農業総合研究センター研究報告* 21: 11-18.
- Lai, K. L. and L. F. Liu (1988) Increased plant regeneration frequency in water-stressed rice tissue cultures. *Japanese Journal of Crop Science* 57: 553-557.
- Li, Y. G., P. A. Stoutjestijk and P. J. Larkin (1999) Somatic hybridization for plant improvement. In "Morphogenesis in Plant Tissue Cultures." Soh, W. Y. and S. S. Bhojwani (eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 363-418.
- 松島省三・角田公正 (1957) 水稻収量の成立と予察に関する作物学的研究. X L. 水稻の登熟機構の研究(6). 生育各期の気温較差が水稻の登熟に及ぼす影響. *日本作物学会紀事* 25: 203-206.
- Miah, M. A. A., E. D. Earle and G. S. Khush (1985) Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 70: 113-116.
- 三十尾修司 (1995) 薬培養 (イネ), "植物遺伝育種学実験法" 谷坂隆俊編, 朝倉書店, 東京, 81-83.
- 中村啓二・小牧正子・黒田 晃・大谷基泰・小澤隆司・島田多喜子 (1999) 水稻 F_1 薬培養で得た倍加半数体 (A_2 世代) の穂系統内分離. *北陸作物学会報* 34: 79-81.
- 中村幸生・広田年信・藤巻 宏 (1985) イネ薬培養における 1 次成苗法について. *北陸作物学会報* 20: 1-4.
- 中野 寛・前田英三 (1974) イネカルスの茎葉形成過程に関する形態学的研究. *日本作物学会紀事* 43: 151-160.
- Nakano, H. and E. Maeda (1989) Ultrastructure of inoculated anthers in relation to the frequency of induction of pollen callus in anther culture of *Oryza sativa* L. *Japanese Journal of Crop Science* 58: 204-211.
- 根岸とも子・櫻井 基・藤村達人 (1987) フローティングカルチャー法を用いたイネ薬培養からの半数体の作出. 第 10 回植物組織培養学会講演要旨: 26.
- 新関宏夫 (1990) 薬 (花粉) 培養, "稲学大成 第 3 巻 遺伝編" 松尾孝嶺ら編, 農文協, 東京, 543-553.
- Niizeki, H. and K. Oono (1968) Induction of haploid rice plants from anther culture. *Proceedings of the Japan Academy* 44: 554-557.
- Niizeki, H. and K. Oono (1971) Rice plants obtained by anther culture. In "Les cultures de tissue de plantes." Colloques inter-

- nationaux C. N. R. S. 193, Paris: 251-257.
- 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. 石川農業短期大学農業資源研究所報告 1: 1-7.
- Ogawa, T., T. Hagio and Y. Ohkawa (1992) Plant regeneration from isolated pollen grains in Indica type rice (*Oryza sativa* L.). Japanese Journal of Breeding 42: 675-679.
- 岡本吉弘・木下 厚・石村 櫻・佐竹徹夫 (2000) 育種学雑誌の論文・講演発表数からみたイネ薬培養研究の年次推移. 育種学研究 2: 105-107.
- 岡本吉弘・木下 厚・佐竹徹夫 (2001) イネ薬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.
- 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. 農業技術研究所報告 D 26: 139-222.
- 大野清春 (1983) 薬培養法 イネ, “植物組織培養の技術” 竹内正幸ら編, 朝倉書店, 東京, 111-113.
- 大里久美・浜地勇次・今林惣一郎 (1999) 水稻における薬培養法と通常育種法による育成系統の農業形質の比較及び薬培養法による有望系統の育成. 日本作物学会紀事 68: 440-443.
- 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.
- 尾崎厚一 (1986a) 水稻薬培養におけるカルス形成率並びに植物体再分化率の向上対策 (第 1 報) カルス形成率について. 近畿中国農業研究 71: 22-26.
- 尾崎厚一 (1986b) 水稻薬培養におけるカルス形成率並びに植物体再分化率の向上対策 (第 2 報) 植物体の再分化率について. 近畿中国農業研究 71: 27-31.
- 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率に及ぼす影響. 北陸作物学会報 33: 13-16.
- 小澤隆司・小牧正子・大谷基泰・島田多喜子 (1999) イネ薬培養において液体培地によるカルス誘導が植物体再分化に及ぼす影響. 北陸作物学会報 34: 82-85.
- Reed, S. M. (2000) Haploid cultures. In “Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises Second Edition” Trigiano, R. N. and D. J. Gray(eds.), CRC Press LLC, Florida, 285-290.
- 坂 紀邦・井上正勝・小島 元 (1995) 水稻薬培養のための簡易薬摘出法. 愛知県農業総合試験場研究報告 27: 33-40.
- 佐々木武彦 (1984) 薬培養のイネ育種への利用 第 1 報 培養技術の現状と問題点. 日本作物学会東北支部報告 27: 75-78.
- 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 —. 日本作物学会紀事 41: 361-362.
- Satake, T. and H. Hayase (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants.V. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. Proceedings of the Crop Science Society of Japan 39: 468-473.
- Satake, T. (1974) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants.IX. Revision of the classification and terminology of pollen developmental stages. Proceedings of the Crop Science Society of Japan 43: 31-35.
- 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.
- Sato, S., N. Katoh, S. Iwai and M. Hagimori (2002) Effect of low temperature pretreatment of buds or inflorescence on isolated microspore culture in *Brassica rapa*(syn. *B. campestris*). Breeding Science 52: 23-26.
- 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.
- 佐藤 毅・玉掛秀人・鈴木慶次郎・菊地治己 (1993) 水稻薬培養における二層培養法の開発. 育種学雑誌 43 (別 1): 45.
- 柴田和博・佐々木一男・島崎佳郎 (1970) 時期別の気温・水温処理が水稻の生育に及ぼす影響 第 1 報 昼夜別気温・水温および処理日数と不稔歩合との関係. 日本作物学会紀事 39: 401-408.
- 新発田修治・田林紀子・須藤 亮・新橋 登・入谷正樹 (1989) イネプロトプラスト由来カルスの再分化率の向上. 育種学雑誌 39(別 2): 38-39.

- Shigeta, J., K. Sato and M. Mii (1996) Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115: 109-114.
- 新橋 登・相川宗蔵 (1985) 水稻育種における葯培養法の利用. 育種学最近の進歩 27: 13-18.
- Sopory, S. K. and M. Munshi (1996) Anther culture. In "In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Volume 1: Fundamental Aspects and Methods." Jain, S. M., S. K. Sopory and R. E. Veilleux (eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 145-176.
- Sopory, S. K. and S. C. Maheshwari (1976) Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. *Journal of Experimental Botany* 27: 49-57.
- Sugimoto, K., H. Miyake and Y. Takeoka (1999) Somaclonal variation in regenerants derived from anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* 2: 71-76.
- Sugimoto, K., H. Miyake and Y. Takeoka (2000) Genetic diversity of regeneration ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* 3: 387-391.
- Sunderland, N. and M. Roberts (1977) New approach to pollen culture. *Nature* 270: 236-238.
- Sunderland, N. and F. M. Wicks (1971) Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany* 22: 213-226.
- 高澤明子・古在豊樹 (1992) 培養器・支持材の種類がカーネーション培養小植物体の生長に及ぼす影響. 生物環境調節 30: 65-70.
- Tian, W. and Y. Chen (1983) The factors affecting induction and differentiation of callus in rice anther float culture (In Chinese with an English abstract). *Acta Genetica Sinica* 10: 362-368.
- Toriyama, K. and K. Hinata (1985) Panicle culture in liquid media for obtaining anther calli and protoplasts in rice. *Japanese Journal of Breeding* 35: 449-452.
- 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.
- Tsukahara, M. and T. Hirose (1992) Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Reports* 11: 550-553.
- Tyagi, A. K., A. Rashid and S. C. Maheshwari (1979) High frequency production of embryos in *Datura innoxia* from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial culture of anthers in liquid medium. *Protoplasma* 99: 11-17.
- 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 —. 農業技術研究所報告 D 33: 121-200.
- Wang, C. C., C. S. Sun and Z. C. Chu (1974) On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction (In Chinese with an English abstract). *Acta Botanica Sinica* 16: 43-54.
- Went, F. W. (1944) Plant growth under controlled conditions. II. Thermo-periodicity in growth and fruiting of the tomato. *American Journal of Botany* 31: 135-150.
- Wernicke, W. and H. W. Kohlenbach (1976) Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 79: 189-198.
- 許 世寰 (1988) 中国北方におけるイネ葯培養育種の現状. 農業および園芸 63: 365-373.
- 山岸真澄 (1997) イネの葯培養能力を支配する染色体領域. 育種学最近の進歩 39: 29-32.
- Yomoda, A. and K. Hinata (1991) Effects of CO₂ gas supply on shoot regeneration in rice callus. *Japanese Journal of Breeding* 41: 41-47.

Summary

Since the 1980's, anther culture has been used as a technique in rice breeding, and over 25 cultivars and lines from anther culture have been developed in Japan. However, the efficiency of anther culture in Japan is extremely low. In this study, the effects of the developmental stage of pollen, culture temperature, aeration of culture vessels, anther density and callus dehydration on the efficiency of anther culture were examined, and the actual state of callus proliferation in floating anther culture was analyzed.

1. Four Japonica rice cultivars, Kita-ake, Kirara 397, Yukihihikari and Aya were used in this study. Rice plants with only the main culms were densely planted in pots, and the anthers with mid- to late-uninucleate pollen grains were collected from a restricted position of the ear. The anthers were cultured by a three-step method; callus induction in liquid medium for 35 days, callus proliferation on agar medium for 7 days and plant regeneration on agar medium for 60 days. Anthers and calli were incubated in a growth chamber at 25°C under 12hr light at 3,000 lx.
2. Mid-uninucleate pollen grains were induced to calli at the highest frequency and followed by the late-uninucleate pollen grains. The mid-uninucleate microspores can be identified by the presence of double membranes, exine and intine, and by the location of the nucleus in the center of pollen cells filled with dense cytoplasm under a microscope. The late-uninucleate microspores can be identified by the presence of one large vacuole occupying most of the cell, and by the nucleus located outside of the vacuole. Anthers at the mid to late uninucleate stages could be selected with an efficiency of 81~88% by using a combination of two indexes; one is the glume length longer than 5.3mm and the other is the ratio of the length of the stamen to that of glume less than 0.42.
3. The rate of callus induction was increased 1.2~1.9 times by culturing the anthers at 30°C/20°C (12L:12D) compared with the culture at 25/25°C. In addition, the rate of albino in the plants regenerated from the calli was decreased by culture at 30/20°C compared culture at 25/25°C. The rate of green plant regeneration from calli cultured at 30/20°C during the regeneration period was 1.1~1.4 times of that cultured at 25/25°C. The rates of callus induction, green-plant regeneration from calli and green-plant regeneration per anther when cultured at 30/20°C throughout the period from anther inoculation to plant regeneration were 1.6, 1.4 and 2.4times, respectively, of those when cultured at 25/25°C.
4. The rate of callus induction was 1.6~3.8 times when an unsealed culture vessel was used during the callus induction period. The rate of green-plant regeneration from calli was 1.1~1.3 times by using an unsealed culture vessel during the callus proliferation and plant regeneration.
5. The rate of callus induction was increased by reducing the density of anthers in the range of anther density from 0.9 to 6 anthers/ml. The rate of callus induction was increased 1.2~2.1 times by reducing the density from 3 to 1.5 anthers/ml.
6. The rate of green-plant regeneration from calli was increased 1.4~1.7 times by blotting the liquid medium attached to the calli with filter paper for a few seconds before transfer to agar medium for plant regeneration.
7. Two types of calli, one was derived from pollen and the other was from the division of pollen-originated callus, were observed in the floating anther culture. The division-originated calli were estimated to comprise 46.7% of the total calli at 35 days after the start of culture. The genotype of division-originated calli may be the same as that of the original calli, but this must be verified in the future.
8. Thus, the anther culture techniques used in this study should be useful for both breeders and researchers.