

## 水稲新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」の葯培養効率

岡本吉弘<sup>1)</sup>・河口武<sup>2)</sup>・我妻尚広<sup>3)</sup>

Anther culture efficiencies of rice new variety 'Jouiku 453' and line 'Jouiku 455'

Yoshihiro OKAMOTO<sup>1)</sup>, Takeshi KAWAGUCHI<sup>2)</sup> and Takahiro WAGATSUMA<sup>3)</sup>  
(Accepted 23 July 2008)

### 緒言

我が国では、イネの葯培養は育種年限を短縮させる技術の一つとして水稲育種の実用技術として定着している。1987年に北海道立上川農業試験場で国内最初の葯培養品種「上育 394 号」が育成された(佐々木ら 1988)。それ以来、今日までに多くの葯培養品種が国内の農業試験研究機関で育成され、その成果が報告されている(佐竹 1999, 三上ら 2004, 三ッ川ら 2005, 高田ら 2007)。

育種の実用技術として定着している葯培養技術ではあるが、培養効率は低く、育種の現場では多大な労力をかけている。そのため、葯培養効率に影響する要因を解明する研究が行われ、その要因の一つに遺伝子型があげられている(Chen 1986)。遺伝子型の違いは品種の差に反映するため、葯培養効率の構成要素であるカルス形成率やカルスからの植物体再分化率についての品種間差異が報告されている(Yamaguchi *et al.* 1990, 安部 1992, 古野ら 1992, 佐藤 1993, 安部・上曾山 1994)。最近では、分子生物学的手法により、カルス形成率やカルスからの植物体再分化率に関与する遺伝子領域についても明らかにされている(山岸 1997, He *et al.* 1998, Kwon *et al.* 2002)。

水稲新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」は極良食味品種・系統で、特に「上育 453 号」は 2008 年に品種登録され、北海道の良食味品種の「おぼろづき」並かそれ以上の食味を有する新品種である(尾

崎 2008)。これら極良食味品種・系統は今後の新たな品種育成の育種素材として利用される可能性は高く、育種年限を短縮する葯培養技術の利用が考えられる。しかし、イネの葯培養効率の品種間差異に関する研究は、近年、特に少なく、北海道の水稲新品種・系統の葯培養効率については明らかにされていない。

本実験では、北海道の水稲新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」の葯培養効率を明らかにするため、葯培養効率の高い北海道水稲品種「キタアケ」および葯培養効率の低い「きらら 397」を比較品種に用い、これら新品種・系統の葯培養能力を評価した。

### 材料および方法

#### 1. イネの栽培法と葯の採取法

北海道立上川農業試験場で育成された水稲新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」と、葯培養効率の高い北海道水稲品種「キタアケ」と、「キタアケ」に比べて葯培養効率の低い「きらら 397」とを供試した。なお、北海道立上川農業試験場から「上育 453 号」および「上育 455 号」の種子を分譲していただいた。

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 の化成肥料くみあい複合塩化磷安 622 (N : 0.8 g, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 0.6 g, K<sub>2</sub>O : 0.6 g) とをよく混合し

<sup>1)</sup> 酪農学園大学短期大学部酪農学科植物育種学研究室

Plant Breeding, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 2007 年度酪農学園大学酪農学部酪農学科植物育種学研究室卒業

Plant Breeding, Department of Dairy Science, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>3)</sup> 酪農学園大学短期大学部酪農学科資源植物学研究室

Plant Genetics and Physiology, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

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酪農学園大学実験圃場のガラス温室で栽培した。ガラス温室のスペースの制限により、2007年6月9日に「上育453号」を、同年6月25日に「上育455号」を播種した。両系統の薬培養効率を評価する比較品種として「キタアケ」と「きらら397」を用い、両系統と同一日にそれぞれ播種した。2葉期に灌水し、分けつは出現後ただちに切除して主穂だけを生育させた。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、ガラス温室内の微気象の差を考慮し、毎日、ポットの位置を変えた。

生理的素質の均一な薬を供試するため、上位3枝梗のそれぞれの先端から1, 3, 4, 5番目の穎花を特定穎花とし、止葉葉数の同じ主穂の特定穎花だけから薬を採取した。ただし、特定穎花のうち、花粉の発育時期が最も進んでいる穎花（第1枝梗の先端から5番目）と、発育時期の最も遅い穎花（第3枝梗の先端から3番目）を花粉発育ステージの検鏡の材料とし、残りの10穎花60薬を培養に用いた。穂ばらみ期に葉耳間長を1 cm単位で分級し、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を決定し、その花粉発育ステージの前後のステージを含む葉耳間長の範囲4 cm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20日間行った。その後、葉鞘の中から穂を取り出し、特定穎花だけを残して他のすべての穎花を切除した。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、特定穎花から薬を摘出して葉耳間長ごとに薬を培養した。

## 2. 薬の培養法

イネの二段階薬培養法を改変した液体前培養法(岡本 2005)で薬を培養した。すなわち、薬を液体のカルス誘導培地で14日間浮遊培養した後、同一組成の固形培地に再度置床し、21日間培養した。その後、得られたカルスを、カルス誘導培地と組成が異なる固形の植物体再分化培地に移植し、60日間培養した。培養全期間を通じて25℃、昼白色蛍光灯で約3000 lx・12時間照明下で培養した。

カルス誘導培地には、N<sub>6</sub>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を添加し、培地pHを5.5に調整した。液体培地では培地固化剤を用いなかったが、固形培地では寒天10 g/lを用い、培地を固化した。葉耳間長別に1穂当たり10個の特定穎花から採取した60薬を、20 mlの培地を含むφ90 mm×20 mmのプラスチックシャーレ(岩城硝子株式会社)で培養した。

植物体再分化培地には、N<sub>6</sub>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、培地pHを5.5に調整した。φ25 mm×100 mmの試験管に寒天培地15 mlを入れ、この中にカルス1個を移植した。試験管の蓋としてφ25 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。なお、カルス形成率の最も高い葉耳間長で得られたカルスをすべて培養した。

## 3. カルス形成率および植物体再分化率の調査

液体のカルス誘導培地から固形培地に再度薬を置床後21日目(カルス誘導より35日目)に、直径0.5 mm以上のカルスを形成した薬数を調査し、カルス形成率(カルスを形成した薬数を、置床した薬数で除した)を求めた。植物体再分化培地にカルスを移植後60日目に緑色植物を分化したカルス数およびアルビノ植物を分化したカルス数を調査した。移植カルス数に対する緑色植物を再分化したカルス数の割合(%)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再分化率(移植カルス数に対するアルビノ植物を再分化したカルス数の割合, %)を加え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分化した場合でも分化カルス数は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。

## 結果および考察

各品種・系統のカルス形成率、カルスからの植物体再分化率および薬当たり緑色植物再分化率を表1に示した。比較品種のカルス形成率は、「キタアケ」が「きらら397」より低く、カルスからの緑色植物体再分化率は「キタアケ」が「きらら397」より明らかに高かった。その結果、薬培養の最終効率である薬当たり緑色植物再分化率(カルス形成率とカルスからの緑色植物再分化率の積で求められる)は、「キタアケ」で25.1~28.2%を、「きらら397」では5.7%を示し、比較品種間に明らかな差が認められた。

表 1 薬培養効率の高い「キタアケ」と低い「きらら 397」との比較による水稻新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」の薬培養特性

播種日	品種・系統	葉耳間長 (cm)	置床薬数	カルス 形成薬数	カルス 形成率 (%, A)	移植 カルス数	植物体再分化率 (%)			再分化した全植 物体に占める緑 色植物の割合 (%, B/(B+C))	薬当たり綠色植物 再分化率 (A×B, %)
							全植物 (B+C)	綠色植物 (B)	アルビノ植物 (C)		
6月9日	上育453号	±0	878	280	31.9	—	—	—	—	—	—
		-1	466	196	42.1	196	72.9	16.8	56.1	23.0	7.1
		-2	766	246	32.1	—	—	—	—	—	—
		-3	335	100	29.9	—	—	—	—	—	—
	キタアケ	+1	428	184	43.0	—	—	—	—	—	—
		±0	334	150	44.9	150	91.3	56.0	35.3	61.3	25.1
		-1	488	218	44.7	—	—	—	—	—	—
		-2	152	23	15.1	—	—	—	—	—	—
	きらら397	+1	440	266	60.5	266	72.2	9.4	62.8	13.0	5.7
		±0	613	309	50.4	—	—	—	—	—	—
		-1	539	309	57.3	—	—	—	—	—	—
		-2	405	187	46.2	—	—	—	—	—	—
6月25日	上育455号	+2	738	236	32.0	—	—	—	—	—	—
		+1	690	323	46.8	—	—	—	—	—	—
		±0	736	396	53.8	396	57.6	8.6	49.0	14.9	4.6
		-1	753	376	49.9	—	—	—	—	—	—
	キタアケ	+2	286	147	51.4	—	—	—	—	—	—
		+1	277	144	52.0	144	93.8	54.2	39.6	57.8	28.2
		±0	113	52	46.0	—	—	—	—	—	—
		-1	274	135	49.3	—	—	—	—	—	—
	きらら397	+2	456	266	58.3	266	69.2	9.8	59.4	14.2	5.7
		+1	563	327	58.1	—	—	—	—	—	—
		±0	343	163	47.5	—	—	—	—	—	—
		-1	426	166	39.0	—	—	—	—	—	—

このような薬培養効率に差のある2品種と比較し、北海道の水稻新品種「上育 453 号」および系統「上育 455 号」の薬培養効率を評価した。その結果、カルス形成率は両新品種・系統ともに「きらら 397」より低いものの、「キタアケ」との差はわずかであった。これに対して、カルスからの綠色植物再分化率は両新品種・系統とも「キタアケ」に比べて著しく低い値を示したが、「きらら 397」との比較において新品種・系統間で傾向が異なった。すなわち、「上育 453 号」では「きらら 397」より高い値を示したのに対し、「上育 455 号」では「きらら 397」よりわずかに低い値を示した。薬当たり綠色植物再分化率は両新品種・系統ともに「キタアケ」に比べて明らかに低く、「きらら 397」の効率に近い値を示し、「上育 453 号」で 7.1%（「きらら 397」の 1.2 倍）、「上育 455 号」で 4.6%（同 0.8 倍）となった。これは、新品種・系統におけるカルス形成とカルスからの綠色植物再分化の、二つの培養特性のうち、後者の特性が薬当た

り綠色植物再分化率に大きく影響したものと考えられる。以上の結果から、水稻新品種・系統の薬培養効率は効率の低い「きらら 397」並みの薬培養能力であることが分かった。

育種素材としてよく利用される品種やその品種を交雑親に利用した F<sub>1</sub> に適した培地が開発されている（島田ら 1999, Daigen *et al.* 2000ab）。特に、Daigen *et al.* (2000a) は難培養性品種「コシヒカリ」専用の DKN 培地を開発し、1/2 に希釈した R 2 培地で薬培養した場合に比べ、薬当たり綠色植物再分化率が温室で養成した材料を用いた場合で 4.3 倍、水田で養成した材料を用いた場合で 21.4 倍となることを報告し、DKN 培地が「コシヒカリ」やその近縁品種を交雑親に用いた F<sub>1</sub> 薬培養の効率化に寄与している（Daigen *et al.* 2000b）。一方、北海道の水稻品種を用い、培地組成以外の培養条件に関する研究も行われている。出原ら（2005）はカルス誘導期に暗黒で培養すること、吉田ら（2006）は 0.2% ゲラ

ンガムで固化したカルス誘導培地と1%寒天で固化した再分化培地で培養することが「キタアケ」と「きらら397」の葯培養効率を向上させることを明らかにした。

本実験において、水稻新品種「上育453号」および系統「上育455号」の葯培養効率は「きらら397」程度と低いことが明らかとなったが、葯培養効率が低くとも、上述した専用培地や照明条件、培地固化剤など培養条件の改善により、葯培養効率の向上の余地はあると考えている。現行以上の葯培養効率とするためには、「上育453号」および「上育455号」のカルス形成率は葯培養効率の高い「キタアケ」と同程度であったことから、カルス形成率を向上させるよりも、カルスからの緑色植物再分化率を向上させることが当面の課題であろう。

### 要 約

本研究では、水稻新品種「上育453号」および系統「上育455号」の葯培養効率を明らかにするため、葯培養効率の高い水稻品種「キタアケ」と、「キタアケ」に比べて培養効率の低い「きらら397」を比較品種に用い、これら新品種・系統の葯培養効率を評価した。その結果、葯培養効率の比較品種「キタアケ」と「きらら397」の葯当たり緑色植物再分化率はそれぞれ25.1~28.2%と5.7%を示した。「上育453号」の葯当たり緑色植物再分化は7.1%を示し、「キタアケ」の0.3倍、「きらら397」の1.2倍であった。一方、「上育455号」では4.6%を示し、「キタアケ」の0.2倍、「きらら397」の0.8倍であった。以上の結果、「上育453号」と「上育455号」の葯培養効率は、ともに「きらら397」と同程度であることが明らかとなった。

### 引用文献

- 安部欣司 (1992) コシヒカリ育成系譜上の水稻品種の葯培養におけるカルス形成能. 育種 42: 403-413.
- 安部欣司・上曾山茂 (1994) 水稻の葯培養におけるカルス形成の品種・系統間差異と植物体再分化率の向上. 大分県農業技術センター研究報告 24: 1-17.
- 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  $N_6$  medium and its applications to anther culture of cereal crops. In "Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture." Science Press, Peking, China, 43-50.
- Daigen, M., O. Kawakami and Y. Nagasawa (2000a) Efficient anther culture method of the Japonica rice cultivar Koshihikari. Breed. Sci. 50: 197-202.
- Daigen, M., Y. Hoshi, N. Hashimoto and Y. Nagasawa (2000b) Efficient anther culture of F1 plants derived from Koshihikari and its related cultivars in the Japonica rice. Breed. Sci. 50: 203-206.
- 古野久美・浜地勇次・今林惣一郎・西山 壽 (1992) 葯培養における最近の水稻品種・系統とF1のカルス形成率及び植物体再分化率. 九州農業研究 54: 1.
- He, P., L. Shen, C. Lu, Y. Chen and L. Zhu (1998) Analysis of quantitative trait loci which contribute to anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Breeding 4: 165-172.
- 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.
- Kwon, Y. S., K.M. Kim, M.Y. Eun and J.K. Sohn (2002) QTL mapping and associated marker selection for the efficacy of green plant regeneration in anther culture of rice. Plant Breeding 121: 10-16.
- 三上泰正・高館正男・横山裕正・小林 渡・館山元春・前田一春・川村陽一・中堀登示光・小山田善三 (2004) 水稻新品種「ふゆげしき」の育成. 青森農林総研研報 40: 23-37.
- 三ツ川昌洋・畠山誠一・倉田和馬・田中正美・荒木誠士・松本崇士・小代寛正・古賀 進・泉 恵市 (2005) 葯培養法利用による低アミロース水稻品種「秋音色」の育成. 育種学研究 7: 41-44.
- 岡本吉弘 (2005) イネの葯培養においてカルス形成率および植物体再分化率を向上させる培養操作. 育種学研究 7 (別 1・2): 206.
- 尾崎洋人 (2008) 水稻新品種「上育453号」. 北農 75: 135.
- 佐々木一男・新橋 登・佐々木多喜雄・相川宗巖・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) イネ育種における葯培養の利用 — 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) 水稻の効率的葯培養技術の開発. 平成 4 年度 新しい研究成果 — 北海道地域 —: 37-41.
- 島田多喜子・大谷基泰・生田陽子 (1999) イネ葯培養におけるカルス誘導培地と再分化培地の検討. 日作紀 68: 151-154.
- 高田 聖・溝淵正晃・亀島雅史・岩崎昭雄・中村幸生 (2007) 水稻極早生新品種 ‘南国そだち’ の育成. 高知農技セ研報 16: 59-70.
- 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.
- Yamaguchi, M., A. Yomoda and K. Hinata (1990) Varietal differences in the response to low temperature treatment for callus formation in anther culture of rice. Japan. J. Breed. 40: 193-198.
- 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

The anther culture efficiencies of two new rice variety ‘Jouiku 453’ and line ‘Jouiku 455’, were examined with the comparison of high ability variety in green plant regeneration from anther, ‘Kita-ake’ and that of low ability one, ‘Kirara 397’. Rate of green plant regeneration per anther of ‘Jouiku 453’ was determined to be 7.1%. This value is equal to 0.3 folds of ‘Kita-ake’ and 1.2 folds of ‘Kirara 397’. On the other hand, that of ‘Jouiku 455’ was 4.6%. This value is equal to 0.2 folds of ‘Kita-ake’ and 0.8 folds of ‘Kirara 397’.

From the results of this study, we concluded that the anther culture efficiencies of the examined two new rice varieties are similar to ‘Kirara 397’ ’s one.