

## 省力採取したイネ葯の液体一固形重層培養によるカルス形成

藤 沢 修・百足幸一郎・小川勝美

(岩手県立農業短期大学校)

Callus Formation by Liquid-Solid Double Layer Culture of  
Mass Extracted Anthers in Rice  
Osamu FUJISAWA, Koichiro MUKADE and Katsumi OGAWA  
(Iwate Agricultural Junior College)

### 1 はじめに

イネの葯培養法は育種技術として広くとり入れられているが、操作の省力化と培養の効率向上が依然として残されている問題である。

現在、一般に行われている穎花ごとの葯摘出を省力化するため穂培養の検討も続けられているが、本研究では、培養葯数を飛躍的に増加させる手段として、葯の省力採取法を検討するとともに、シャーレを用いて液体一固形重層培養を試み、好結果を得たので、カルス形成、増殖段階までの新しい葯培養操作手順について報告する。

### 2 試験方法

(1) 材料にはイネF<sub>1</sub>の2組合せ(コガネヒカリ/ササニシキ, コガネヒカリ/あきたこまち)と東北143号を用いた。

(2) 葉耳間長4~8cmの幼穂を採取し、10°Cで20日間の前処理を行った。主材料のF<sub>1</sub>については、葉耳間長1cmごとに穂を固定し検鏡した結果、1核期花粉を含む摘期葉耳間長は5~6cmであった。しかし、同じ長さの葉耳間長でも幼穂採取日によって適する枝梗順位が異なり、8月2~4日採取分は上位第1~第7枝梗を、8月8日~10日分では第6~第10枝梗を供試した。

(3) 供試培地と培養条件を表1に示した。カルス形成固形培地②を対照とし、カルス形成液体培地①、カルス増殖固形培地③とともに、同一シャーレの下層に③、上層に①を重層とした培地④を供試した。

表1 供試培地と培養条件

培地の種類	基本	2,4-D	NAA	キネチン	カサミノ酸	備 考
② カルス形成固形(対照)	N <sub>6</sub>	2 mg/l	-	-	-	9cm及び6cmシャーレを用いそれぞれ15ml及び10mlを単一培地量とした。
① 液体	N <sub>6</sub>	2 mg/l	-	-	-	26°C、暗黒下で静置培養。
③ カルス増殖固形	N <sub>6</sub>	-	4 mg/l	2 mg/l	3 g/l	固形：寒天0.8%
④ ①+③重層						

### 3 試験結果及び考察

#### (1) 葯の大量、省力採取法の検討

イネ穂の各穎花からピンセットで葯を摘出する一般法を省力、効率化し、培養葯数の増加をはかることを第一のねらいとした。

Raina, Hadi<sup>2)</sup>はスリット(1.5mm幅)をつけた動物用給水瓶(ポリプロピレン製)を液体培地に入れ、上下端を切断した穎花を集め、スターラー回転で葯を大量採取する方法を報告した。

この方法に注目し、ポリプロピレン給水瓶のスリット作りを試みたが、作製が困難であったので、1.5mm目の金網で円筒かごを手製した。また、一方向のみのスターラー回転よりは逆転が可能な模型船用の小型スクリューに着目して図1の操作手順を案出した。

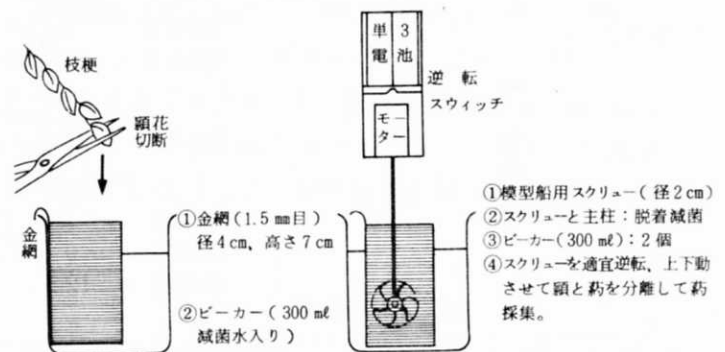


図1 小型逆転スクリューを用いた葯大量採取法の操作手順

この操作手順によれば、葯の採取率は80%前後であり、1人で400穎花を切断し、1900葯の培養操作を2時間以内で終了することができ、一般の培養操作に比較して大幅な省力化が期待された。

#### (2) カルス形成、増殖の効率化をはかる液体一固形重層培養法の検討

根岸ら<sup>1)</sup>の3段階法に注目するとともに、その省力化をねらいとして、1段階(カルス形成用液体培地)と2段階(カルス増殖用固形培地)をまとめた液体一固形重層培地を提案し、カルス形成、増殖状況を従来の培養法と比較検討した。

東北143号を供試し、前項の葯採取法により、6cmシャーレを用いた培養結果を表2に、また、F<sub>1</sub>について9cmシャーレの培養結果を表3に示した。

本試験で用いた液体培地①は2,4-D(2mg/l)を含んでおり、カルス形成率をみると表2のとおり、カルス全算定葯率は383.1%を示し、対照区の固形培地②より極めて高率な結果が得られることを確認した。

表 2 固形及び液体培地によるカルス形成率の比較

培地	培養葯数	カルス形成葯数	シャーレの底に沈下したカルス数	カルス形成率(%)	カルス全算定葯率(%)
① 固形	199	70	—	35.2	(35.2)
② 液体	172	98	561	57.0	383.1

注. 材料: 東北143号, 葯省力採取, 6cmシャーレ各5個を検鏡算定; 培養32日後  
 カルス全算定葯率(%) =  $\frac{\text{カルス形成葯数} + \text{沈下したカルス数}}{\text{培養葯数}} \times 100$

根岸ら<sup>1)</sup>はN<sub>6</sub>を基本培地とし, 2, 4-D (2 mg/l)のみ含む培地のカルス形成率が, NAA (4 mg/l), キネチン (2 mg/l) を含む培地より高率であるが, 再分化率は逆に低率であることを報告している。本研究では, カルス形成段階までを当初の目標としたので, 2, 4-Dのみを含む培地を用いた。

表3の重層培地では, 小カルス(径2mm前後)形成後, 上層の液体培地を注射器で吸引, 除去し, 下層の固形培地でカルス形成, 増殖をはかった。各種培地でのカルス形成, 増殖状況は表3のように, それぞれ特徴を示すが, 重層培養によっても十分なカルス形成数と増殖肥大をはかれることが観察された。

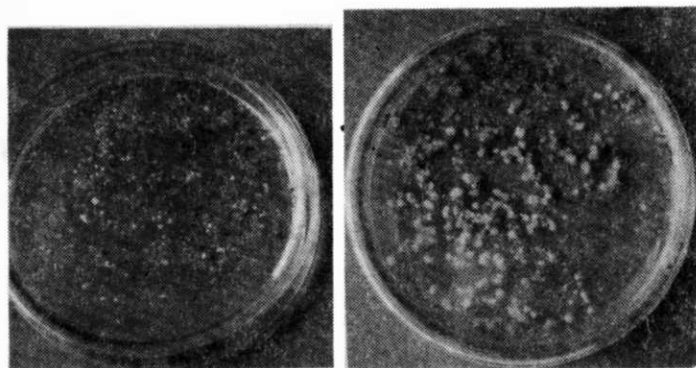


写真: F<sub>1</sub>(コガネヒカリ×あきたこまち)の重層培養

- 注. 1) 培養27日後のカルス形成状況  
 培養葯数 137  
 沈下カルス数 235  
 2) カルス形成後, 液体培地を吸引, 除去し, 固形増殖培地としてカルス増殖8日後の状況  
 カルス数 ÷ 273

表 3 各種培地におけるカルス形成状態の比較

培地	カルス形成数	カルス肥大	観察概要
① 固形	+	+++	カルスサイズ大型
② 液体	+++	+	粒揃いの良い小型カルス, 多数
④ 重層	+++	+~++	カルス形成数②と同等, カルスサイズ揃い

注. 材料: F<sub>1</sub>2組合せ, 葯省力採取, 9cmシャーレ各区8個, 培養27日後

上記の結果を総合的に組合せた新しいイネ葯培養(カルス形成, 増殖段階まで)操作手順を図2に示した。

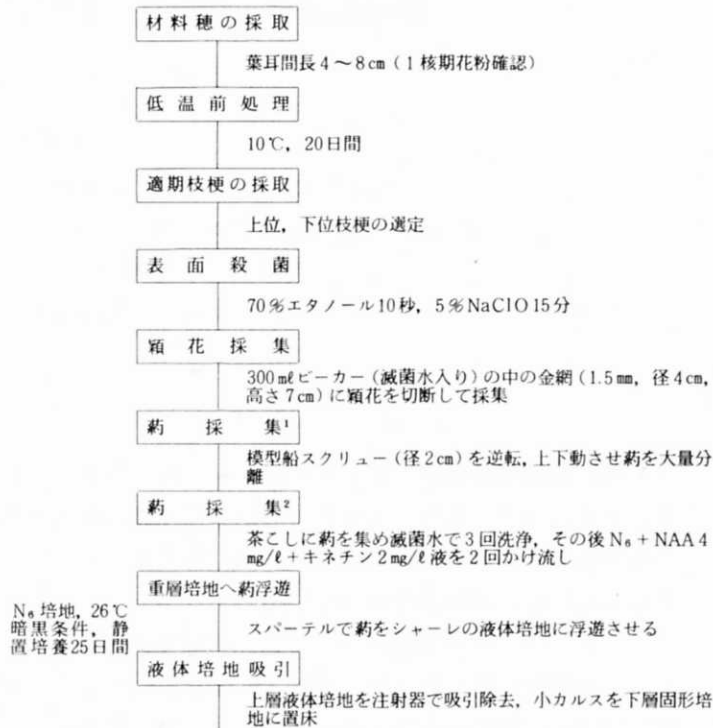


図 2 省力を目的としたイネ葯の液体—固形重層培養の操作システム

なお, カルスからの再分化率は主材料F<sub>1</sub>でそれぞれ30.4%, 12.9%を示したが, 今後はひきつづきNAA, キネチンを含むカルス形成培地を用い, 再分化率の向上技術を検討する必要がある。

#### 4 ま と め

- イネ葯培養技術の開発を目的に, 各穎花からの葯摘出作業を省き, 培養葯数を増加させる葯の大量採集法を考案した。金網かごと模型船用逆転スクリーを用い, 省力的に大量の葯を穎花から分離することができた。
- 液体浮遊培養の3段階法を能率化するため, 液体—固形重層培養を試み, 多数の小カルスを形成するとともに, カルスを極めて効率的に増殖することができた。

#### 引用文献

- 根岸とも子, 桜井 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葯培養からの半数体の作出. 第10回植物組織培養学会大会シンポジウム講演要旨集: 26-27.
- Raina, S. K.; Hadi, S. 1978. A Simple device for mass extraction of rice anthers. IRRN (International Rice Research Newsletter) 12(3): 23-24.