



イネ葯培養における培地へのアミノ酸およびカゼイン加水分解物の添加効果

平林, 泰平
三十尾, 修司
上島, 脩志
澤野, 稔

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 20(1):23-29

(Issue Date)

1992-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00198224>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00198224>



イネ葯培養における培地へのアミノ酸および カゼイン加水分解物の添加効果

平林 泰平*・三十尾 修司*・上島 脩志*・澤野 稔*

(平成3年8月9日受付)

EFFECTS OF VARIOUS AMINO ACIDS AND CASEIN HYDROLYSATE ON ANther CULTURE OF RICE (*Oryza sativa* L.)

Taihei HIRABAYASHI, Shuji MISOO, Osamu KAMIJIMA and Minoru SAWANO

Abstract

Influences of aspartic acid(Asp), glutamine(Gln), glutamic acid(Glu), tryptophan(Trp) and casein hydrolysate(CH) added to N6 basal medium on rice anther culture were studied.

About half of the media, containing these amino acids or CH at 1, 10, 100, or 1,000mg/l individually, raised not only the frequency of callus formation and plant regeneration but also number of regenerating calli per 100 anthers inoculated. Especially, CH at 1,000mg/l promoted plant regeneration remarkably. The increase of the frequency of plant regeneration by amino acids or CH is considered to depend on callus induction media including them. Also, by combining Gln, Trp, and CH, their effect on anther culture was further promoted.

It is suggested from these results that we may find out more suitable medium for rice anther culture by improving the methods concerning the addition of amino acids and CH.

緒 言

半数体は純系を短期間で育成できるため、育種の利用価値が高い。GUHAとMAHESHWARI(1964)⁴⁾が*Datura innoxia*の培養葯からの半数性植物体の再分化に成功して以来、多くの植物で葯培養が試みられ、花粉起源植物の再分化に成功している⁷⁾。

イネ(*Oryza sativa* L.)でもNIIZEKIとOONO(1968)⁹⁾が葯培養による半数性植物の作出に成功して以来、より効率的、安定的な花粉起源植物獲得技術の開発に研究が注がれており、低温前処理法¹⁾、液体浮遊培養法⁵⁾、一次成苗法^{6,8)}等がこれまでに開発されている。特にCHUら(1975)³⁾により開発されたN6培地の利用により、イネの葯培養は飛躍的に効率化された。このN6培地は高濃度の硝酸態窒素と低濃度のアンモニア態窒素を含んでいることから、イネ葯培養における培地内窒素組成の重要性が示唆されている。

よって本研究では、N6基本培地に数種のアミノ酸およびビタミンフリーカゼイン加水分解物を窒素成分として添加することにより、さらに効率的なイネ葯培養用培地の開発を図った。

材料および方法

供試材料：イネ(*Oryza sativa* L., $2n=24$)の栽培品種である、日本晴およびレイメイを実験に用いた。

供試材料の栽培方法：1/5,000aワグネルポットに1ポットあたり4gの土壤改良剤(ミリオン)および化成肥料(12・12・12)を入れ、8粒ずつ播種した。発芽後しばらくしてから間引きにより生育の良好な植物体を1ポットあたり4個体残し、本葉6枚の頃からポット内を湛水状態にした。なお、栽培は全期間を通してガラス室内で行った。

穂の採取および低温前処理：イネ葯培養では1核中～後期の小胞子を含む葯が一般に用いられているが、この時期の穂はまだ葉鞘中にあるため、止め葉とその直下の葉の葉耳間長より穂の発育ステージを判断し、葉鞘ごと採

* 作物育種学研究室

取した。なお、供試品種の採取適期葉耳間長は日本晴が4-7cm、レイメイの場合は1-3cmであった。止め葉を残したままの穂にラップを掛け、10℃、暗黒条件下で8-12日間の低温前処理を施した。

基本培地： 蔗糖50g/l、寒天8g/lを含むN6培地を基本とし、カルス誘導用培地には2,4-D 10^{-5} Mを、植物体再分化用培地にはNAA 5×10^{-7} Mとカイロチン 5×10^{-6} Mを添加した。培地のpHは全て5.8に調整し、カルス誘導用培地は50ml三角フラスコに10mlずつ、植物体再分化用培地は20×120mm試験管に8mlずつ分注した後、120℃、1 atmで15分間オートクレーブ滅菌を施した。

培養手順： 低温前処理を終えた穂の中から外穎長：雄ずい長がほぼ5：2の穎花を採取し、これらを70%エタノール中で10秒間、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液中で12分間滅菌した後、クリーンベンチ内で薬を取り出した。1フラスコあたり約30薬を培地に置床し、26±1℃、暗黒条件下でカルス誘導培養を行った。上記手法により誘導されたカルスが薬置床4週間以後、2~4mm径に生長した時点で、再分化用培地に1試験管あたり2-3カルスを移植し、26±1℃、2,000lux(14hr/day)照明条件下で植物体再分化培養を行った。

調査方法： カルス誘導培養は薬置床後6週間目まで行い、その期間内に形成されたカルス数をカルス形成数とした。一方、植物体再分化培養はカルス移植後8週間目まで行い、その期間内に植物体を再分化したカルスを植物体再分化カルスとした。

実験区： [実験1] 日本晴およびレイメイを用い、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、トリプトファン(Trp)およびDifco社製ビタミンフリーカゼイン加水分解物(CH)をカルス誘導、植物体再分化双方の培地に、1、10、100、1,000mg/lの濃度で添加し、カルス形成および植物再分化に対する効果を検討した。

[実験2] 各アミノ酸およびCHを植物体再分化に対し最も有効であった濃度で用い、無添加区、カルス誘導培地のみへの添加区、植物体再分化培地のみへの添加区、および両培地への添加区を設定し、植物体再分化に対するアミノ酸およびCHの添加時期の効果を検討した。なお、この実験ではレイメイのみを用いた。

[実験3] 実験1、2より、特に有効性の認められたGln、TrpおよびCHを組み合わせる培地に添加し、最も効果的な添加方法を検討した。すなわち、CHはカルス誘導培地に500、植物体再分化培地に1,000mg/lを、Glnは双方の培地に0、100または1,000mg/lを、Trpはカルス誘導培地のみに0、10または100mg/lを添加し、カルス形成および植

物体再分化への影響を調査した。なお、この実験でもレイメイのみを用いた。

実験結果

[実験1] カルス形成は日本晴のTrp1,000mg/l添加区を除く全ての区において観察された。カルスの多くは乳白色で崩れやすいものであったが、Trp10、および100mg/l添加区では比較的固く、ち密なものが形成された。供試した2品種ともAsp1,000、Glu100、Trp1、CH10mg/l添加区などで無添加区よりわずかにカルス形成率が上昇したが、Trp1,000 mg/l 添加区を初めとして、特に高濃度区において阻害的な影響を及ぼす場合がいくつか確認された。

一方、Trp1,000mg/l添加区を除く全ての区において植物体再分化試験を行ったところ、供試2品種ともAsp10、Gln1,000、Glu1、Trp100、CH1,000mg/l添加区などで、無添加区より高い植物体再分化率が得られた。特にCH1,000 mg/lを添加した場合の効果が高く、日本晴で49.0%、レイメイでは57.8%のカルスから植物体の再分化がみられた。また、再分化植物体中にアルビノ(白子)が観察された。その頻度は日本晴で59%、レイメイでは65%であった。

各アミノ酸およびCHの最適濃度がカルス誘導培養と植物体再分化培養の間で異なっていたため、カルス形成率と植物体再分化の積より置床100薬あたりの再分化カルス数を算出し、全培養期間を通じての各アミノ酸およびCHの効果を比較したところ、Asp10、Glu1、Trp1、CH1,000 mg/l添加区などで無添加区より高い値が得られた。特にCH1,000mg/l添加の効果が顕著で、両品種とも無添加区の6ないし10倍の効率向上が認められた。

本実験では、供試した2品種間に品種間差がみられ、全ての区においてカルス形成率ではレイメイが、植物体再分化率では日本晴がそれぞれ高い値を示した。ただし、この2品種間では添加したアミノ酸の種類、濃度の効果の傾向に大きな差は認められなかった(Table1、2およびFig. 2)。

[実験2] Gln1,000およびCH1,000mg/lは、カルス誘導と植物体再分化双方の培地に添加した場合に顕著に高い植物体再分化率が得られた。これに対して、Asp1、Glu1およびTrp100mg/lはカルス誘導培地のみに添加したときに最も高い植物体再分化率が得られた。また、いずれのアミノ酸の場合も、植物体再分化培地のみに添加するより、カルス誘導培地のみに添加した場合に植物体再分化率が高くなる傾向がみられた。ただし、Trp100mg/lの場合、植物体再分化培地への添加は、無添加の場合と比較し、

Table 1. Effects of concentrations of various amino acids and casein hydrolysate on callus induction and plant regeneration in anther cultuer of rice (cv. Nipponbare)

Amino ¹⁾ acid	Concentration (mg/l)	A ²⁾	B	B / A (%)	C	D	D / C (%)	E
Control	—	710	218	29.9	88	8	9.1	2.8
Asp	1	340	104	30.6	52	6	11.5	3.5
	10	332	106	31.9	54	6	11.1	3.5
	100	337	120	35.6	54	0	0.0	0.0
	1,000	331	127	38.4	54	0	0.0	0.0
Gln	1	287	85	29.6	57	1	1.8	0.5
	10	334	90	26.9	54	1	1.9	0.5
	100	330	104	31.5	54	5	9.3	2.9
	1,000	298	94	31.5	54	7	13.0	4.1
Glu	1	323	96	29.7	66	10	15.2	4.5
	10	304	97	31.9	63	4	6.3	2.0
	100	327	119	36.4	71	9	12.7	4.6
	1,000	300	50	16.7	49	3	6.1	1.0
Trp	1	325	129	39.7	69	9	13.1	5.2
	10	346	96	27.7	69	7	10.1	2.8
	100	323	34	10.5	34	7	20.6	2.2
	1,000	323	0	0.0	—	—	—	—
CH	1	308	144	46.8	51	9	17.6	8.3
	10	334	155	44.9	51	14	27.5	12.7
	100	308	133	43.2	54	18	33.3	14.4
	1,000	312	100	32.1	51	25	49.0	15.7

1) Amino acids were added to both callus induction and plant regeneration media.

2) A : number of anthers inoculated, D : number of calli regenerating plants,
 B : number of calli obtained, D / C (%) : frequency of plant regeneration,
 B / A (%) : frequency of callus formation, E : number of regenerating calli per 100 anthers
 C : number of calli inoculated, inoculated (BD / AC × 100).

移植したカルの褐変が目立つなど再分化に対してむしろ阻害的であった (Fig. 1および3)。

〔実験3〕CHにGlnおよびTrpを組み合わせて添加した各区は、CHのみの添加区と比較し、いずれの区でもカルス形成率が高くなった。特に、Gln1,000 mg/lとTrp10 mg/lまたはGln100mg/lとTrp100 mg/lを組み合わせて添加したときに高い効果が得られた。

植物体再分化率は、すべての区のカルス誘導および植物体再分化培地にCHを添加したため、いずれの区でも高い値が得られた。中でも、カルス誘導培地にTrpを10 mg/l添加した区、およびカルス誘導、植物体再分化双方の培

地にGlnを1,000 mg/l添加した区において、より高い植物体再分化率が得られた。

置床100葯あたりの植物体再分化カルス数は前述の2区およびカルス誘導培地にGln100、Trp100 mg/lを、植物体再分化培地にGln100 mg/lを添加した場合に、CHの単独添加区より高くなった。しかし、一方では、カルス誘導培地にTrpを100 mg/l添加した区など、CHの単独添加区より低い値を示す区もいくつか見られた (Table3)。

考 察

本研究では、生体内における他のアミノ酸の生合成に

Table 2. Effects of concentrations of various amino acids and casein hydrolysate on callus induction and plant regeneration in anther culture of rice (cv. Reimei)

Amino ¹⁾ acid	Concentration (mg/l)	A ²⁾	B	B / A (%)	C	D	D / C (%)	E
Control	—	460	270	57.9	110	5	4.5	2.7
Asp	1	298	176	59.1	51	3	5.9	3.5
	10	330	212	64.2	60	5	8.3	5.4
	100	343	231	67.3	51	2	3.9	2.6
	1,000	296	202	68.2	51	0	0.0	0.0
Gln	1	331	221	66.8	60	2	3.3	2.2
	10	255	147	57.6	60	2	3.3	1.9
	100	338	182	53.8	57	1	1.8	0.9
	1,000	327	153	46.8	60	3	5.0	2.3
Glu	1	331	185	55.9	60	10	16.7	9.3
	10	260	176	67.7	60	9	15.0	10.2
	100	318	223	70.1	60	1	1.7	1.2
	1,000	131	71	54.2	42	1	2.4	1.3
Trp	1	291	175	60.1	48	3	6.3	3.8
	10	304	117	38.5	63	3	4.8	1.8
	100	290	61	21.0	54	9	16.7	3.5
	1,000	339	3	0.9	0	—	—	—
CH	1	263	139	52.9	45	8	17.8	9.4
	10	298	214	71.8	51	4	7.8	5.6
	100	302	196	64.9	48	6	12.5	8.1
	1,000	165	81	49.1	45	26	57.8	28.4

1) and 2) See Table 1.

において重要な役割をもつAsp、Gln、Glu、インドール酢酸の前駆物質であるTrp、および20数種のアミノ酸を含有するCHを培地添加物として用いた。これらのうちGlnはタバコ葯培養における花粉起源胚様体の形成に対して¹⁰⁾、Trpはイネ種子培養におけるembryogenic callusの作出に対して¹²⁾有効性が認められている。また、CHについてはイネ葯培養でもこれまでに添加を試みた報告があるが^{5, 11, 13)}その効果については明確ではない。本研究ではアミノ酸の効果をもより明確にするため、ビタミンフリーのCHを用いた。これらのアミノ酸およびCHを用いて、実験1では、各アミノ酸およびCHの最適濃度について検討した。実験2では、実験1の結果、同じアミノ酸でもカルス形成と植物体再分化において最適濃度が異なっていたため、添加時期の影響について調査した。実験3では、実験1および2の結果、最適と思われた添加方法、または

それに準じた添加方法によりアミノ酸およびCHを組み合わせて添加した場合の効果について検討を行ったわけである。

実験1では、アミノ酸およびCHを添加した20区のうち、カルス形成率では日本晴で13区、レイメイで10区、植物体再分化率では日本晴で13区、レイメイで12区、置床100葯あたりの植物体再分化カルス数でも日本晴の11区、レイメイの10区で、無添加より高い値が得られた。これらのことより、種類と濃度が適度であれば、アミノ酸またはCHの培地への単独添加はイネの葯培養の全段階において有効な手段であることが示唆される。また、無添加区よりも高い値が得られた区のうち、カルス形成率では9、植物体再分化率では11、置床100葯あたりの植物体再分化カルス数でも8の区が両品種に共通であったことから、少なくともこの2品種間にはアミノ酸の効果に

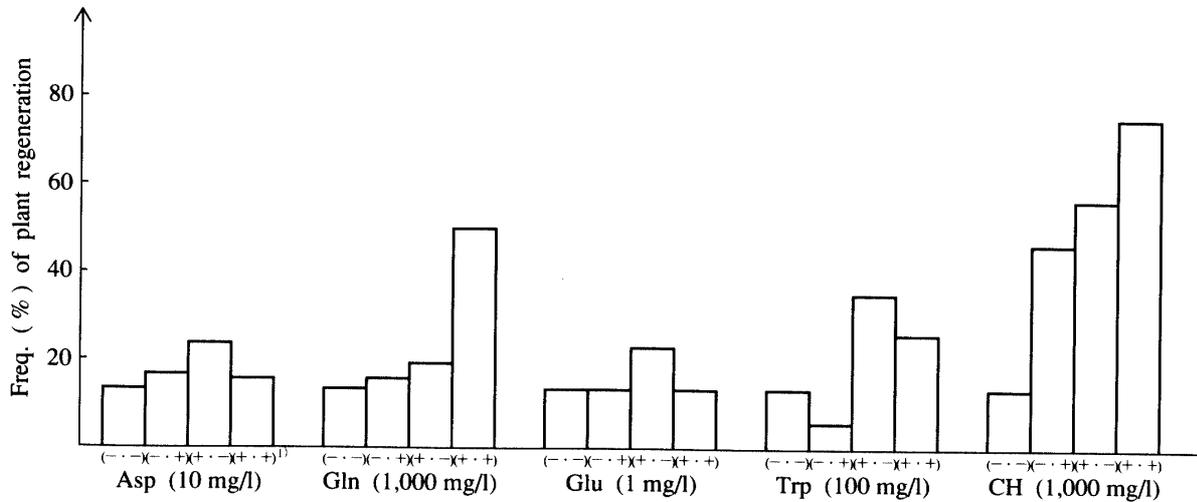


Fig 1. Effects of periods of amino acid addition on the plant regeneration in anther culture of rice (cv. Reimei).

- 1) (): + = with amino acid,
 - = without amino acid,
 left = callus induction medium,
 right = plant regeneration medium.

Table 3. Effects of combined additions of amino acids and casein hydrolysate on callus induction and plant regeneration in anther culture of rice (cv. Reimei)

Concentration (mg/l) ¹⁾		A ²⁾	B	B / A (%)	C	D	D / C (%)	E
Gln	Trp							
0	0	309	178	57.6	50	18	36.0	20.7
100	0	311	189	60.8	54	16	29.6	18.0
1,000	0	319	197	61.8	56	24	42.9	26.5
0	10	305	203	66.6	52	25	48.1	32.0
100	10	319	209	65.5	52	16	30.8	20.0
1,000	10	314	218	69.4	54	16	29.6	20.6
0	100	309	201	65.0	54	13	24.1	15.7
100	100	323	224	69.3	52	17	32.7	22.7
1,000	100	320	204	63.8	50	14	28.0	17.9

- 1) Gln : added to both callus induction and plant regeneration media,
 Trp : added to only callus induction medium,
 All media contain CH (callus induction medium : 500mg/l, plant regeneration medium 1,000mg/l).
 2) See Table 1.

関する品種間差が非常に少ないものと考えられる。よって実験2、3ではレイメイのみを用いた。

イネの葯培養では、カルスの植物体再分化能力が、カルス誘導時に用いるオーキシンの種類に支配されることが知られている^{2,13)}。実験2より、アミノ酸およびCHの添加による植物体再分化率の向上も、主にカルス誘導培

地への添加に起因していることが明らかになった。これらのことから、今後イネの葯培養においてさらに植物体再分化率の向上を図るためには、再分化能力の高いカルスの誘導方法について特に検討を進めていくことが重要であると思われる。また、GlnおよびCHは植物体再分化培地への添加により、さらに高い植物体再分化率をもた

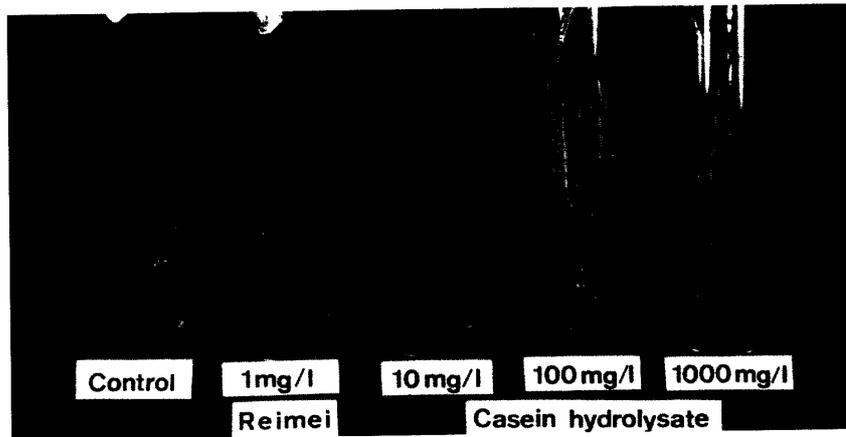


Fig 2. Plant regeneration from calli cultured on the media containing casein hydrolysate at various concentrations (8 weeks after trans-planting to plant regeneration medium, cv. Reimei).

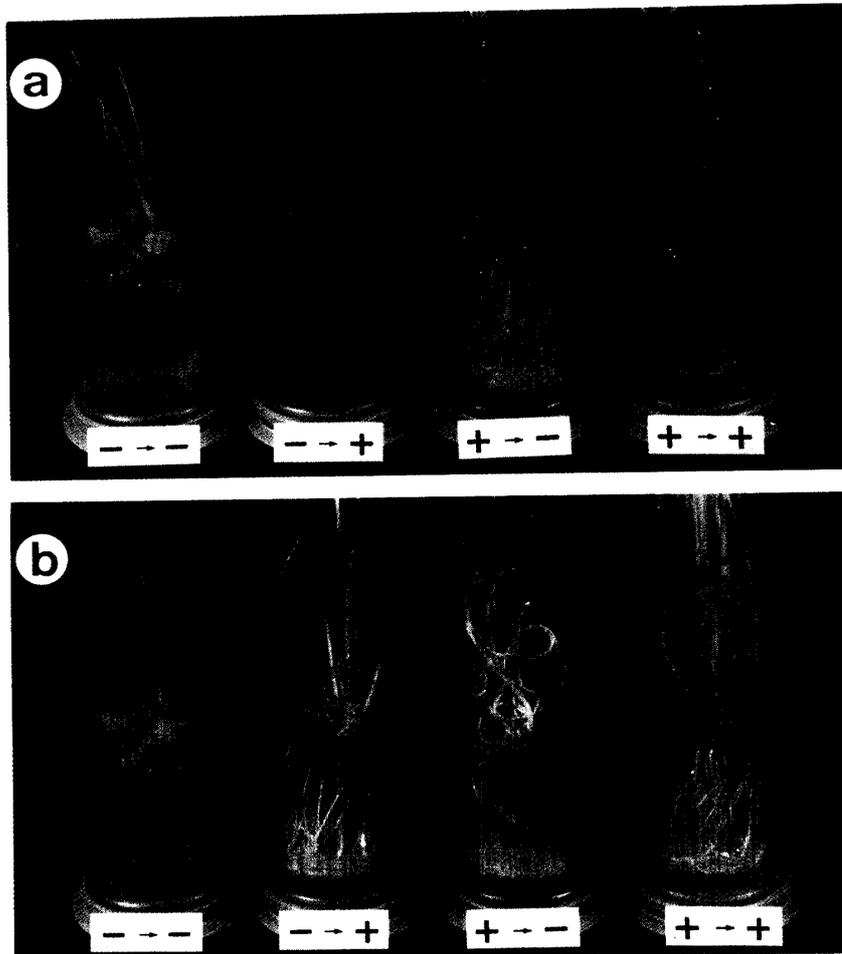


Fig 3. Plant regeneration from calli cultured on the media with (+) and without (-) amino acids (8 weeks after transplanting to plant regeneration medium, cv. Reimei).
 (a) : tryptophan at 100mg/l,
 (b) : casein hydrolysate at 1,000mg/l,
 left in label shows callus induction medium and right plant regeneration medium.

らしているが、両者はいずれも実験1の結果より1,000mg/lを最適濃度と仮定したものであるため、さらに高濃度の添加について試験を行う必要がある。

植物体再分化において高い効果のあったCHと、GlnおよびTrpを組み合わせて添加した場合、その組み合わせ方法により、CHの単独添加よりもその効率がさらに向上することが実験3より明らかになった。このことから、CHの単独添加が必ずしも最適なアミノ酸の添加方法ではなく、イネの薬培養においてさらに適したアミノ酸の添加方法が存在することが示唆される。

本研究の結果より、アミノ酸およびCHの培地への添加がイネ薬培養において有効な手段であることが明らかになった。今後、さらに多くのアミノ酸についてその添加方法を検討し、CHまたは他のアミノ酸と組み合わせて添加を行えば、イネ薬培養のより一層の効率化が図られるものと思われる。

摘 要

イネ薬培養において数種のアミノ酸およびカゼイン加水分解物(CH)をN6基本培地に添加したところ以下の結果を得た。

1. アミノ酸およびCHを種々の濃度で単独添加したところ、約半数の区でカルス形成とカルスからの植物体再分化に対して有効性が認められた。特にCH1,000mg/lでは植物体再分化に対して著しい効果が認められた。
2. アミノ酸およびCHの植物体再分化に対する効果は、主にそれらのカルス誘導培地への添加に起因していることが明らかになった。
3. CHと他のアミノ酸を組み合わせて添加することにより、さらに薬培養の効率が向上した。

以上の結果より、アミノ酸およびCHの添加方法にさらに検討を加えることにより、イネ薬培養の効率化がより一層図られるものと思われる。

引用文献

- 1) CHALEFF, R. S., S. R. HILL and J. M. DUNWELL : *The John Innes Inst.* (England), 66, 64-66, 1975.
- 2) CHEN, L. J., P. C. LAI, C. H. LIAO and H. S. TSAY : In *Plant Tissue Culture*, pp. 551-552, Published the Japan association for plant tissue culture, Tokyo, 1982.
- 3) CHU, C. C., C. C. WAN, C. S. SUN, C. H. SU, K. C. YIN, C. Y. CHU and F. Y. BI : *Scientia Sinica*, 18, 659-668, 1975.
- 4) GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI : *Nature*, 204, 497, 1964.
- 5) 原田辰也・大野清春：育雄. 34(別1), 28-29, 1984.
- 6) LIN, G. S., S. Y. ZHUO and Z. G. WANG : *Acta Phytophysiologia Sinica*, 10, 285-289, 1984.
- 7) 中島哲夫：組織培養, 9, 411-415, 1983.
- 8) 中村幸生・広田年信・藤巻宏：育雑35(別1), 70-71, 1985
- 9) NIIZEKI, H. and K. OONO : *Proc. Japan Acad.*, 44, 554-557, 1968.
- 10) NITSCH, C. : In *Haploids in higher plants, Advance and Potential*, ed. by K. J. KASHA, pp.123-135, Univ. Guelph, Guelph, 1974.
- 11) 大野清春：農技研報D, 26, 139-222, 1975.
- 12) SIRIWARDANA, S. and M. W. NABORS : *Plant Physiol.*, 73, 142-146, 1983.
- 13) 若狭暁：農技研報D, 33, 121-200, 1982.