

イネの2倍体, 4倍体間の交雑に関する研究, とくに交配種子の培養結果について

古賀, 義昭
九州大学農学部育種学教室

永松, 土巳
九州大学農学部育種学教室

<https://doi.org/10.15017/23003>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 23 (2), pp.49-53, 1967-07. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

イネの2倍体，4倍体間の交雑に関する研究， とくに交配種子の培養結果について

古賀 義昭・永松 土巳

Studies on the crossing experiments between diploid and auto-tetraploid rice plants, *Oryza sativa* L., with special reference to the results of artificial culture of hybrid seeds

Yoshiaki Koga and Tsutsumi Nagamatsu

緒 言

筆者らは、イネにおいて2倍体と同質4倍体間の交雑により同質3倍体を作成することを計画し、多くの相反交配を行なつてきた。

その概要はすでに報告したように、交配種子はかなり高率に形成されるが胚および胚乳の発達に阻害されており、発芽率は著しく低く、また発芽力を有する種子でも直接播種したのでは発芽後の生育を継続しえないものであつた。また胚の発達は相反交配により異なつたが、4倍体(♀)×2倍体(♂)ではかなり進んだ発育を示し、大部分の観察胚は第1葉ないし第2葉を分化していた。

そこで、これらの相反交配によつてえられたF₁種子を人工培地上に播種しF₁植物の養成を試み、若干の成果を収めたので、以下に概要をのべる。

材料および方法

材料は普通栽培品種の2倍体数品種とこれより誘発された同質4倍体数系統の間に温湯除雄法により相反交配を行ない、受粉後約30日を経たF₁種子を採種保存し、翌年4月に人工培養基上に播種した。F₁種子は完全種子と不完全種子とに分けて播種した。前報¹⁾により、完全種子は大部分が母体の除雄失敗によつて形成された自殖種子であつたが、まれにF₁の3倍体種子が含まれていると考えられた。また、不完全種子はすべて真正のF₁3倍体種子であると推定されたものである。

培地は第1表に示したようにWhiteの処方²⁾に若干の変更を加えて調製し、口径15mmの試験管に8ccを分注し、オートクレーブにより1.5kg/cm²で20分間の殺菌を施し調製した。

Table 1. Composition of medium.

MgSO ₄	360 mg/l
Ca(NO ₃) ₂	200 mg/l
Na ₂ SO ₄	200 mg/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	16.5 mg/l
KNO ₃	80 mg/l
KCl	85 mg/l
Ferric Citrate	Trace
MnSO ₄	4.5 mg/l
KI	0.75 mg/l
ZnSO ₄	1.5 mg/l
H ₃ BO ₃	Trace
Glysin	3.0 mg/l
Nicotinic acid	Trace
VB ₁ (Thiamine)	"
VB ₆ (Pyridoxine)	"
Sucrose	2.0 %
Agar	0.7 %

播種に当つては穎を除去し、75%アルコール10秒、10%クロールカルキ25分、3%過酸化水素水25分で順次殺菌し、あらかじめ調製された培地上に無菌箱内で播種した。

播種後は30°Cの恒温器に入れ、毎日発芽を調査し、第1葉の展開がみられた試験管は適宜ガラス室に移し、試験管内で5~6葉期に達した個体は直ちに1/5000aのポットに移植した。

発芽調査は、発芽すべき種子がほとんど発芽を完了したと思われる置床後10日目まで行なつた。ここでは、鞘葉が種皮を破り、肉眼で認められたものを発芽とみなした。

比較として常法による結果を示したが、これは水道水を用いシャーレ中に播種し30°Cの恒温器内で催芽したのち、土壌苗床に置床した結果である。

結 果

培養結果は第2表に示した通りである。また常法に

Table 2. Results of artificial culture

Cross combination		Seeds sown	Germination No. %		Seedlings	Seedlings seeds %	Seedlings Germinated seeds %	Adults
Imperfect seeds	2X×4X	362	1	0.2	0	0.0	—	—
	4X×2X	347	182	54.4	57	16.4	31.3	39
Perfect seeds	2X×4X	33	32	97.0	30	93.8	93.8	26
	4X×2X	22	21	95.5	20	95.2	95.2	18

Table 3. The results of sowing of crossæd seeds by usual method.

Cross combination		Germination %	Survivals Seeds sown %	Triploids Seeds sown %	Triploids Survivals %	Triploids No. of flowers % pollinated
Imperfect seeds	2X×4X	2.3	0.0	—	—	—
	4X×2X	16.4	0.0	—	—	—
Perfect seeds	2X×4X	76.3	68.4	0.0	—	—
	4X×2X	81.6	67.0	5.9	8.7	0.02

よる結果は第3表に示した。

1) 2倍体(♀)×4倍体(♂)より生じた不完全種子

第2表に示したように、362粒を置床したが1粒(0.2%)だけ発芽した。また発芽した1粒も本葉を展開せずに枯死した。

種子の発達程度についてはすでに報告⁵⁾したが、その結果によると、胚は受精後5~7日目、発達段階で示せば器管分化以前の時期に発育を停止し、成熟期には胚はすでに死滅しており、上記の結果は予測されたものであつた。このような胚の培養を成功させるには、受精後きわめて初期の、おそらく5日目以前の未分化の胚を摘出し培養する方法を採用しなければならないと考えられる。しかし、イネにおいてこのような幼胚の培養に成功した例はみない。幼胚の培養可能限界については雨宮ら(1956)の報告によると第2葉分化期の初期とされており、上記のような未分化の幼胚を培養するのはきわめて困難と考えられる。

2) 4倍体(♀)×2倍体(♂)より生じた不完全種子

培養の結果は第2表に示したように、347粒を置床したうち、182粒(54.4%)が発芽した。

さらに発芽個体のうち31.3%が5~6葉の苗に発育した。これらのものは直ちにポットに移植されたが、移植後活着不良、病虫害等で若干のものが枯死し、成熟期まで生存した植物は39個体であり、移植された苗の68.4%、置床された種子に対して11.2%であつた。

第3表に示したように、常法によつて播種した場合の発芽率は約16%であり、発芽率についてみても培養した場合には著しく向上した。また、常法によつて播種した場合に発芽した個体は鞘葉を伸出しただけで、すべて本葉を展開せずに枯死し、成熟植物がえられなかつた点についてみても、培養した場合の結果は著しい進歩であつた。

つぎに、培養した場合の発芽後枯死した植物がどの程度の段階まで生育したかを、枯死時の葉数によつて示したのが第4表である。表にみられるように、65%は鞘葉を伸出しただけで本葉を展開せずに枯死したが、約35%は本葉を展開した後枯死しており、もつとも進んだ個体は第5葉まで達した。これらのものは、さらに培養方法の改善如何によつては成熟植物にまで達する可能性を含むものと考えられる。

成熟期まで達した39個体の植物は、PMCおよび根端細胞による観察の結果、すべて2n=36の染色体数を有する3倍体植物であつた。また交配花数に対して3倍体がえられた割合は5.3%であつた。今まで報告された最高の割合は、筆者らの知る限りでは1.0%(盛永ら1959)である。

Table 4. Number of leaves of dead seedlings in artificial culture.

No. of leaves	C*	1	2	3	4	5
Frequency	93	15	11	14	7	3
(%)	(65.0)			(35.0)		

* : Coleoptile.

of crossed seeds between 2X and 4X.

Cross combination		Adults	Adults	Triploids	Triploids	Triploids	Triploids
		Seedlings %	Seeds %		Seeds %	Adults %	Flowers crossed %
Imperfect seeds	2X×4X	—	—	—	—	—	—
	4X×2X	68.4	11.2	39	11.2	100.0	5.3
Perfect seeds	2X×4X	86.7	78.8	3	9.1	11.5	0.1
	4X×2X	90.0	81.8	3	13.6	16.7	0.1

3) 完全種子について

第3表に示した完全種子の常法による播種結果は、1959～'62年の4カ年間の結果をまとめて示したものである。ここで完全種子とは外見上正常な大きさに達

した種子である。

その結果によると、発芽率が80%前後でやや低く、しかも発芽後枯死するものがかなりあり、また枯死個体の大部分は鞘葉を伸出しただけで本葉を展開するに

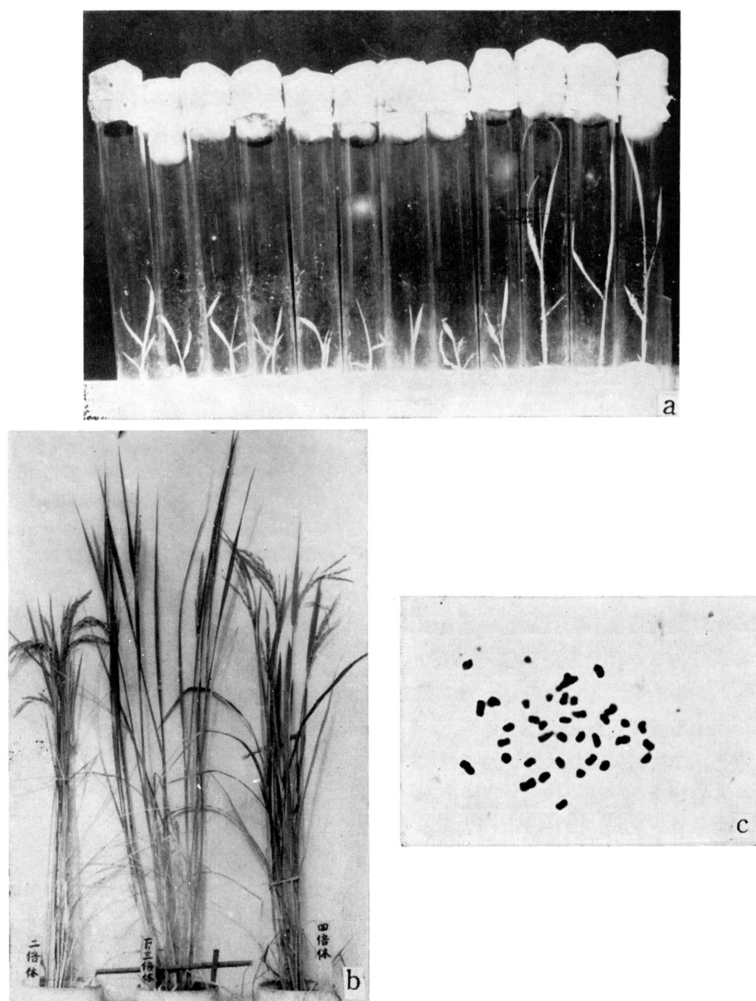


Fig. 1.

a : Seedlings grown on the artificial media.

b : Left ; diploid parent, Middle ; F₁ triploid plant, Right ; tetraploid parent.

c : Somatic chromosomes of F₁ plant (2n=36).

至らなかつた。成熟期まで生存した個体については、大部分が母方の自殖個体であり、温湯除雄の失敗によつて生じたことが明らかであつたが、その他の未発芽ないし発芽後枯死した個体中に雑種 3 倍体種子が含まれていることも考えられる。このような推察のもとに、完全種子も培養に付した。

培養の結果は第 2 表に示したように、発芽率、生存植物数とも常法による場合より増加し、しかも播種々子中に、2 倍体×4 倍体の場合は 9.1%、逆交配の場合は 13.6% の 3 倍体植物を生じた。交配種子が多量にえられないため播種数が少なく、この点正確を欠くくらいはあるが、完全種子中にも 3 倍体種子がかなり含まれておると考えられるが、おそらく 3 倍体種子は発芽ないし初期の生育力が弱いものと考えられる。

考 察

この実験では受粉後約 30 日を経て成熟期まで放置した種子を採種し翌年まで保存して培養し、培地にもとくに工夫は加えなかつたが、少くとも 4 倍体×2 倍体よりえられた不完全種子については、このような方法によつても容易に雑種 3 倍体植物を養成できることが明らかになつた。

しかし、さらに能率を高めるには培養方法について、とくに胚を培養に移す時期および培地について改良の余地があると考えられる。

前報⁵⁾で「巴まさり」を用いて行なつた観察結果によると、胚乳はごく初期に消失するが、胚は発達を続け成熟期まで放置した種子でもなお生活力を保持していた。しかし他方、胚発育の異常は受粉後 5 日目から現われ、時間の経過とともに異常の程度も進行した。この事実からできるだけ発育異常の軽微な胚を培養に移すのが効果的と考えられるが、他方雨宮ら (1956) および山川ら (1959) の報告を参考にすると、第 1 葉分化期の後期以前の胚は培養不可能のようである。

このように考えると、2 倍体×4 倍体胚の培養は不可能と思われるが、4 倍体×2 倍体の胚は第 2 葉の分化が認められる受粉後 9 日目ごろの胚を摘出し培養すれば、さらに容易に雑種 3 倍体植物がえられるようになることが推察される。

つぎに培地については、Overbeek (1941)、中島 (1962) および雨宮らにより胚の発育相と要求物質との関係が明らかにされている。すなはち、Overbeek はココヤシの胚乳中に seedling growth を抑制し embryonic growth を促進する物質が存在することを明らかにし、これを培地に加えて *Datura* の幼胚に

embryonic growth を継続させることに成功し、また中島はカボチャの培養において同様のことを明らかにしている。さらにイネでは雨宮らがカゼイン加水分解物が胚の器管分化を促進することを明らかにしている。

このようなことから、培地の組成を工夫することによつて、さらに異常胚の培養を容易にすることが考えられる。

摘 要

1) イネにおいて、同質 3 倍体植物を作出する目的で 2 倍体と同質 4 倍体間の相反交配を行ない、 F_1 種子を White の培地上に播種し、3 倍体作出の能率化を計つた。

2) 2 倍体×4 倍体により生じた不完全種子はほとんど発芽せず、培養不可能であつた。

3) 4 倍体×2 倍体により生じた不完全種子は約 54% が発芽し 11.2% の成熟植物がえられ、常法により播種した場合に比すると効果的であつた。また、これらの植物はすべて $2n=36$ の雑種 3 倍体であつた。

4) 完全種子についても同様に培養した結果、3 倍体植物が出現した。

参 考 文 献

- 1) 雨宮 昭・明峯英夫・鳥山国士, 1956. イネの胚の培養に関する研究. 農研報告, D (6) : 1-59.
- 2) Blakeslee, A. F. and S. Satina, 1944. New hybrid from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryo on mult media. Science, **99** : 331-334.
- 3) Bouhrmont, J., 1961. Embryo culture of rice on sterile medium. Euphytica, **10** : 283-293.
- 4) 古賀義昭・永松土巳, 1967. イネの 2 倍体, 4 倍体間の交雑に関する研究, とくに交配結果について. 九大農学芸誌, **23** : 43-48.
- 5) 永松土巳・大村 武・古賀義昭, 1964. イネの 2 倍体, 4 倍体間の交雑に関する研究, 特に交雑種子の発達について. 九大農学芸誌, **21** : 25-34.
- 6) 中島哲夫, 1962. 作物の種子形成, とくに胚および胚乳の発育に関する基礎的研究. —とくに胚培養を中心として—. Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B, **13** : 13-48.
- 7) Overbeek, J., M. E. Conclin and A. F. Blakeslee, 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science, **29** : 350-351.
- 8) Overbeek, J., 1942. Hormonal control of embryo and seedling. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **10** : 126-

134. 9) 山川 寛, 岸川英利, 1959. 水稻幼胚の発芽力 を得る最初の時期に及ばず栽培時の影響. 日作九支報, (14): 14-15.

Summary

The present authors have long engaged in crossing experiments between diploid and autotetraploid plants, in order to obtain triploid plants in rice. As already reported, the results were not successful although enormous flowers were pollinated. From the above crossing many F_1 seeds were obtained, but a few of them were perfect seeds and the others were imperfect seeds. The perfect seeds were germinable but almost all of them were selfed seeds of female plants. On the other hand, the imperfect seeds which developed very retardedly, although confirmed to be true hybrid seeds, were less germinable and could not grow to seedlings. In this connection, artificial culture method was conducted and results were as follows.

For culture, modified White's medium was used, and seeds were sown in aseptic condition.

The imperfect seeds that obtained from $4X \times 2X$ germinated at the rate of 54.4% on the artificial medium. This percentage was strikingly high compared with the 16.4% which were shown in germination test using water. And 11.2% of the seeds sown grew to adult plants. All of them were ascertained to be triploid plants.

On the other hand, the imperfect seeds obtained from the crosses $2X \times 4X$ germinated in very low percentage of 0.2%, and effects were not expected.

The perfect seeds that obtained from the crosses of $2X \times 4X$ and $4X \times 2X$ were also sown on artificial media. Out of 55 seeds sown, 53 germinated and 44 grew to adult plants. And 6 triploid plants (10.9%) were obtained. These results were relatively effective comparing with the data resulted from sowing on soil nursery.