

コシヒカリのプロトプラスト培養系を利用した突然変異育種 (第2報) コシヒカリのプロトプラスト培養由来植物自殖後代の特性

森 真理・谷口 真一・野田 秀樹・北村 治滋・渡辺 健三

Studies on Breeding using Protoplast-derived Plants in Rice (*Oryza sativa* L.), Koshihikari Variety II. Somaclonal Variation in the Seed Progeny of Protoplast-derived Rice Plants

Mari MORI, Shinichi TANIGUCHI*, Hideki NODA
Harushige KITAMURA and Kenzo WATANABE

キーワード: イネ, コシヒカリ, 培養変異, プロトプラスト培養, レトロトランスポゾン

我々は、コシヒカリのプロトプラスト由来植物の特性を調査し、その育種的利用の可能性を検討するため、プロトプラスト由来植物自殖第1代植物 (Pt2植物) および自殖第2代植物 (Pt3植物) について特性を調査した。

培養によって得られたプロトプラスト由来植物体 (Pt1植物) 158個体から稔性のある50個体をランダムに選び1個体を基に1系統として計50系統のPt2植物について圃場での栽培特性の調査およびDNA分析を行った。その結果、コシヒカリと比較して変異の認められなかった系統は50系統中1系統だけであり、他の49系統は、出穂期、稈長、穂長、穂数、葉毛、草姿、発芽率、稔性、DNA (レトロトランスポゾン) などのいずれかの形質について変異が認められた。

変異には、出穂期については遅くなる方向性が、稈長および穂長については短くなる方向性が認められた。穂数には変異の方向性は認められなかった。また、変異形質について系統内での分離を立毛で調査した結果、5系統で分離が認められなかった。

Pt3植物計69系統 (基はPt1植物69個体由来) について葉いもち抵抗性検定試験を行った結果、59系統が対照コシヒカリと比較して同程度と考えられたが、10系統には変異が認められ、1系統は抵抗性が強い方向に、9系統は抵抗性が弱い方向に変異していた。

Pt3植物を調査した結果、Pt2植物で発現した変異はPt3植物に遺伝していることが明らかとなった。

以上の結果、プロトプラスト由来植物は農業上重要な形質である出穂期、稈長、葉毛などに培養変異が出ること、および変異形質が遺伝することなどから、育種に利用可能と考えられた。

1. 緒 言

1980年代後半から、イネにおけるプロトプラスト培養系が確立され^{1, 4, 6, 11, 13, 14, 19, 20}、いくつかの研究グループによって、プロトプラスト由来植物体は出穂期、稈長、穂長や稔性などの形質に変異がみられることが報告さ

れてきた^{2, 9, 10, 16, 17}。小倉ら¹⁷は、プロトプラスト培養による培養変異は実用育種に使える可能性が高いと報告している。実際、現在までにこれらの変異を利用したいくつかの品種が育成されている¹⁸。

我々は、前報¹⁴において158個体のコシヒカリのプロトプラスト由来植物体 (以下Pt1植物と略す) の再

*現 湖南地域農業改良普及センター

生に成功したことを報告した。これまでコシヒカリについては、少数のプロトプラスト由来植物体再生の例はあるが、多数の植物体再生の例が少なく、それらの植物に発現する培養変異については、あまり報告されていない。

そこで、今回、我々はコシヒカリのプロトプラスト由来植物の特性を調査することを目的に、プロトプラスト由来植物自殖第1代植物（以下Pt2植物と略す）について圃場での特性調査を行い農業上重要形質である稈長、穂長、穂数、出穂期、草姿、葉いもち抵抗性などの特性の調査を行った。続いて、Pt2植物で認められた変異形質の自殖後代植物（以下Pt3植物と略す）への遺伝について調査し、コシヒカリのプロトプラスト由来植物の育種的利用の可能性について検討した。また、Pt2植物のDNAの変異、特にレトロトランスポゾンについても分析を行った。

2. 材料および方法

2.1 Pt2植物の生育特性

試験は、農業試験場内の試験圃場で行った。材料は、前報の培養条件¹⁰で得られたPt1植物158個体のうち、冬期、温室で10粒以上稔実した73個体の中からランダムに選んだ50個体を基とし、それらのPt2植物を50系統として、1系統につき10粒以上最高25粒を供試した（図1）。対照にはコシヒカリを用いた。

1992年5月15日に播種し、6月11日に本田に移植した。栽植密度は22株/m²で、1系統1条、1株1本植えた。肥料は、基肥窒素4 kg/10aとし、追肥および穂肥は無施用とした。

成熟期に、稈長、穂長、穂数について調査した。稈長、穂長については、株の中で最長稈を選び、連続す

る10株の平均値で比較した。出穂期は、全基数の約50%が出穂した日を調査した。その他、生育期間中を通して、草姿、葉毛の有無、稔性、変異形質の系統内分離の有無等を立毛で調査した。

2.2 Pt3植物の葉いもち抵抗性

試験は、1993年、農業試験場内で畑晩播法により2反復で行った。供試材料は、Pt1植物体1個体につきランダムに選出したPt2植物1株から採種して得られたPt3植物69系統（基はPt1植物69個体由来する）を用いた。対照はコシヒカリを用いた。その他、比較品種に、日本晴、ほまれ錦、農林22号、トドロキワセ、イナバワセを供試した。

播種は、5月24日に条長40cm、条間12cmで各系統1区約120粒播きとした。肥料は基肥窒素10kg/10a、追肥として7月5日と9日に各窒素5kg/10aを施用した。試験区の周囲にイナバワセを播き、農業試験場における葉いもち抵抗性検定試験の慣行に従って行った。病原菌は、イネいもち病菌(*Pyricularia oryzae* C *avara*)レース007を用いた。接種方法は、病葉散布法で行い、6月25日に接種源用のイナバワセ幼苗に菌を接種後、7月9日にその罹病葉を検定圃場に散布した。

調査は浅賀の調査基準⁹に従い、7月14、21、27、8月5、11日の計5回、観察により行った。

2.3 Pt2植物で認められた変異形質のPt3植物への遺伝

Pt2植物でみられた培養変異形質が、Pt3植物に遺伝するかどうかを調査するため、Pt3植物の特性調査を行った。供試材料は、4系統のPt2植物（No 1, No 15, No 25, No 28）から、各4、10、10、19株を選出、採種し、それら1株の後代を1系統として、4系統群43系統を用いた（図1）。供試系統の特性は、表1に示した。

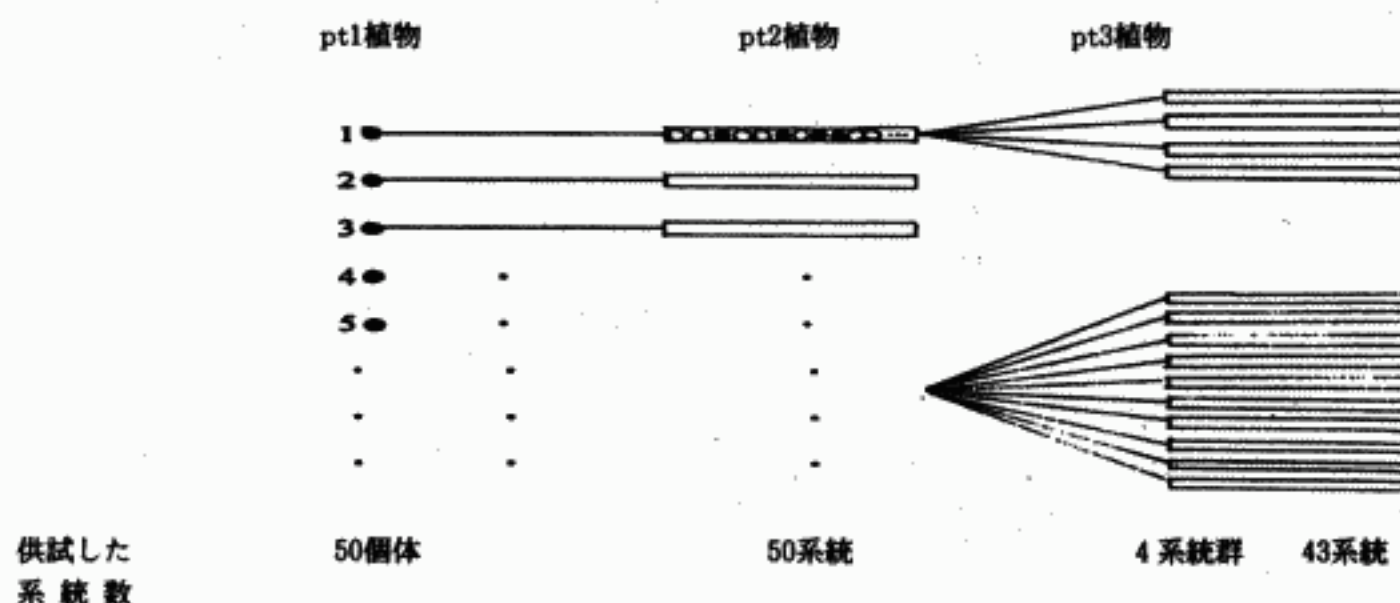


図1. 供試材料の展開方法

表1. 供試した Pt3植物の特性

系統群	Pt2植物での特性	系統数
1	培養変異が認められず	4
15	短稈変異が系統内で分離せずに認められた	10
25	短稈変異が系統内で分離して認められた	10
28	無毛性変異が系統内で分離して認められた	19

試験は1993年、農業試験場内の試験圃場で行った。播種は3月31日、本田移植は4月30日に行った。栽植密度は16.7株/m²、1系統1条、1株1本植えて行った。肥料は、基肥窒素3 kg/10a、追肥、穂肥は無施用とした。

成熟期に、稈長、穂長、穂数について調査した。稈長、穂長については株の中で最長稈を選び、連続する10株の平均値で比較した。葉毛の有無は連続する10株について観察により調査した。また、系統内分離の有無、草姿、稈性等を立毛で調査した。

2. 4 Pt2植物のDNA分析

試験は、農林水産省農業生物資源研究所分子育種部形質転換研究室（現：ゲノム動態研究室）で行った。

材料は、1992年、圃場で栽培中のPt2植物50系統の葉を用いた。なお、対照にはコシヒカリと日本晴を用いた。DNAは、MURRAY and THOMPSON の方法¹⁰⁾で抽出した。プローブは、農林水産省農業生物資源研

究所分子育種部形質転換研究室の廣近洋彦博士が単離したイネレトロトランスポゾンTos17を用いた。

本葉から精製した5 μgのDNAをHindIII, EcoRVの制限酵素で消化し、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。その後、SAMBROOKらの方法¹⁰⁾でナイロンメンブレンにトランスファーしたあと、HIROCHIKAらの方法⁷⁾でプローブとハイブリダイゼーションを行った。イネレトロトランスポゾンの検出は、³²Pを用いて行った。プローブのラベルはFEINDERG and VOGELSTEINのランダムプライマー法⁹⁾を用いた。

3. 結 果

3. 1 Pt2植物の生育特性

供試した50系統のうち、1系統は全く発芽しなかった。残り49系統のうち、育苗時、5系統において正常な苗中にアルビノイネが数本出現した。また、4系統で発芽率の低下が認められた。圃場に移植後、10株以上が正常に生育したのは29系統で、出穂期、稈長、穂長および穂数を29系統について調査した。その他の形質の調査については、49系統について行った。

29系統について、出穂期、稈長、穂長、穂数を調査した結果を表2に示した。29系統中、No 1の1系統は変異が認められなかったが、他の28系統はいずれかの形質について変異が認められ、統計処理上でも差は認

表2. コシヒカリのプロトプラスト由来植物自殖後代 (Pt2植物) の出穂期および成熟期の生育調査結果

系統 No	出穂期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	分離の有無 ⁰⁾	系統 No	出穂期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	分離の有無 ⁰⁾
1	8.15	90.0±3.4	19.8±1.2	17.2±2.4	無	18	8.23	74.2±7.5*	16.7±1.5*	20.4±2.3*	有
2	8.22	70.0±3.6*	15.7±1.4*	20.3±4.4	有	19	8.22	66.7±3.0*	16.4±1.2*	25.1±5.1*	有
3	8.22	75.6±4.4*	14.6±1.2*	18.7±5.8	有	20	8.22	68.3±6.0*	16.9±1.3*	19.1±7.9	有
4	8.23	75.3±3.6*	16.6±1.0*	21.6±3.6*	有	22	8.25	74.5±3.2*	15.7±1.3*	19.8±6.0	有
5	8.24	68.9±3.1*	16.0±1.1*	21.6±2.9*	有	25	8.24	63.7±6.6*	15.2±1.7*	20.5±7.5	有
6	8.24	62.5±2.7*	15.7±1.2*	18.8±5.6	有	27	8.23	72.5±3.9*	17.3±0.4*	24.6±4.7*	有
7	8.25	73.9±2.8*	17.1±1.5*	20.1±5.8	有	28	8.23	75.9±2.9*	15.9±0.9*	22.3±6.1*	有
9	8.26	70.0±5.2*	16.1±1.4*	20.9±4.1	有	30	8.24	72.2±4.3*	16.8±1.5*	25.6±9.0*	有
10	8.24	63.6±9.7*	17.4±1.9*	18.7±9.5	有	32	8.23	64.1±3.0*	16.5±1.0*	22.2±3.1*	無
11	8.23	65.8±3.4*	17.6±1.3*	23.4±6.2*	有	33	8.27	70.2±5.1*	17.1±1.1*	20.2±5.2	有
12	8.24	66.5±4.3*	16.1±1.2*	22.2±7.2	有	35	8.24	65.4±6.1*	15.3±1.5*	25.4±11.3	有
13	8.25	67.2±5.8*	16.5±1.8*	22.9±5.2*	有	44	8.23	81.6±5.6*	15.3±1.8*	25.6±3.9*	無
15	8.13	73.4±3.6*	19.8±1.7	23.5±5.5*	無	48	8.25	80.8±4.1*	17.7±1.6*	19.2±6.0	無
16	8.24	74.0±5.2*	17.2±1.1*	19.8±4.5	有	49	8.24	76.4±1.7*	17.4±0.7*	27.6±8.8*	有
17	8.23	75.2±4.7*	17.5±1.2*	20.6±4.9	無	コシヒカリ	8.13	92.7±3.5	20.8±1.5	17.5±2.6	無

稈長、穂長および穂数の値は、調査した10株の平均値±S.E.

*コシヒカリに対して5%水準で有意

1)系統内分離を立毛で観察した。

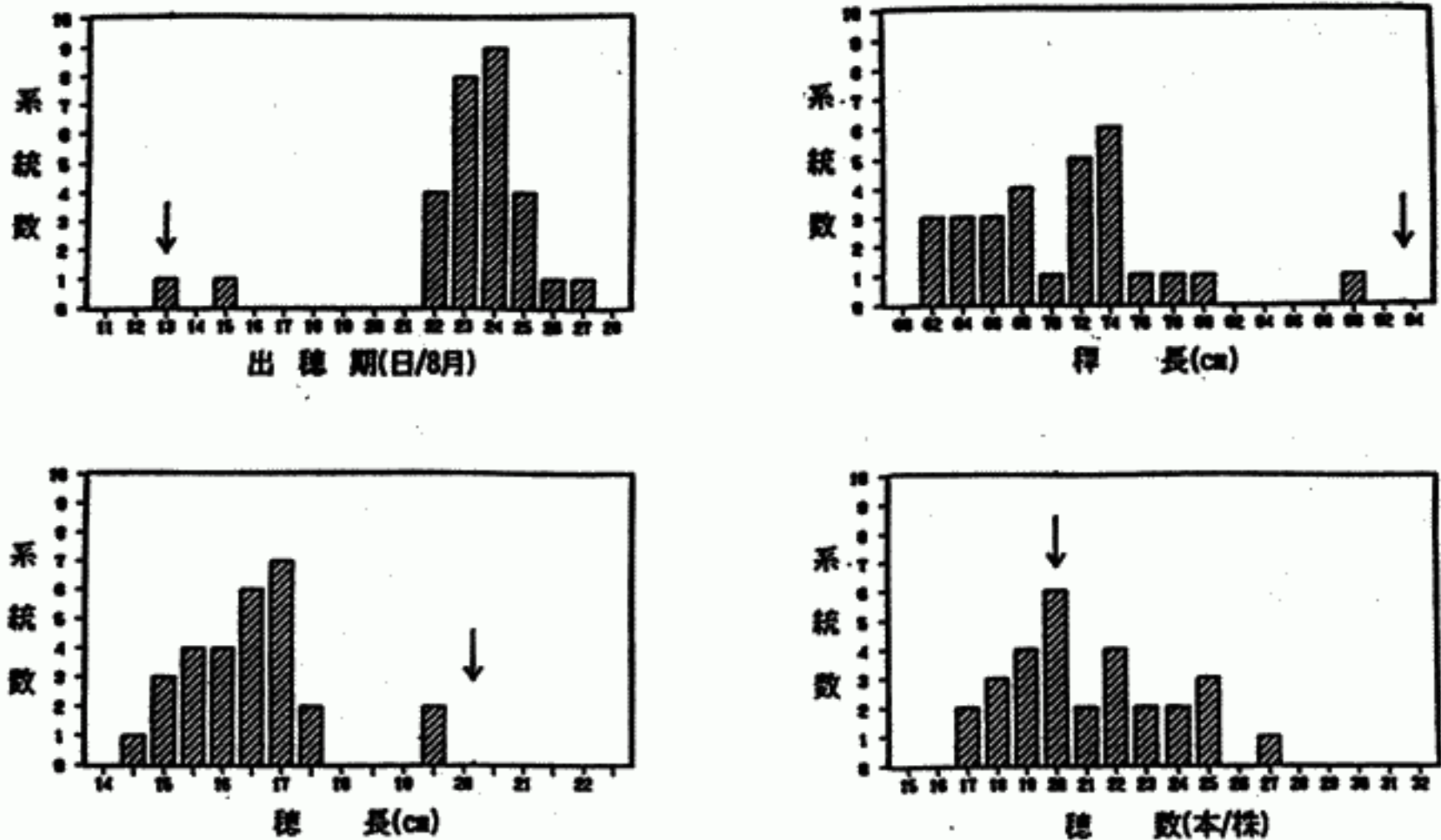


図2. コシヒカリのPt2植物の出穂期、稈長、穂長および穂数の平均値の度数分布 (↓は対照コシヒカリの値)

められた (表2).

変異は、コシヒカリと比較して、出穂期は遅く、稈長、穂長は短くなる方向が認められた (図2)。また、穂数には方向性が認められず、17.2本/株から27.6本/株の変異の幅が認められた (図2)。これらの変異は、No15, 17, 32, 44, 48の5系統では、系統内の個体間でばらつきが見られず分離は観察されなかったが、他の系統については変異形質の分離が認められた。

その他、49系統中、無毛性変異個体が13系統で、稈性の低下した個体が19系統で認められ、変異形質はいずれも系統内の個体間で分離していた。また、コシヒカリと比較して止め葉が立ち、受光態勢の良い草姿の個体が3系統、また、大粒化、円粒化といった粒形の変異個体が各3系統で認められた。

これらの結果、調査した49系統中、外観からは、変異の認められなかった系統は1系統 (No1) だけであり、他の系統は様々な特性について変異が認められた。なお、49系統はすべて採種できた。

3. 2 Pt3植物の葉いもち抵抗性

5回の調査のうち、各系統の発病程度に最も差が認められたのは、4回目 (菌接種後27日目) の調査時であり、その値を図3に示した。発病程度の値は、各系統および比較品種とも2反復の平均値である。対照コシヒカリは、供試材料間に等間隔で3カ所に入れ検定

した。その結果、Pt3植物は、全69系統中59系統が対照コシヒカリの発病程度の値の範囲内であった (図3)。残りの10系統はコシヒカリと比べて葉いもち抵抗性に差がみられた。これらのうち、1系統は発病程度が低い方向に、9系統は発病程度が高い方向に変異していた。中でも、3系統の発病程度は、特に高い値を示した。

3. 3 Pt2植物で認められた変異形質のPt3植物への遺伝

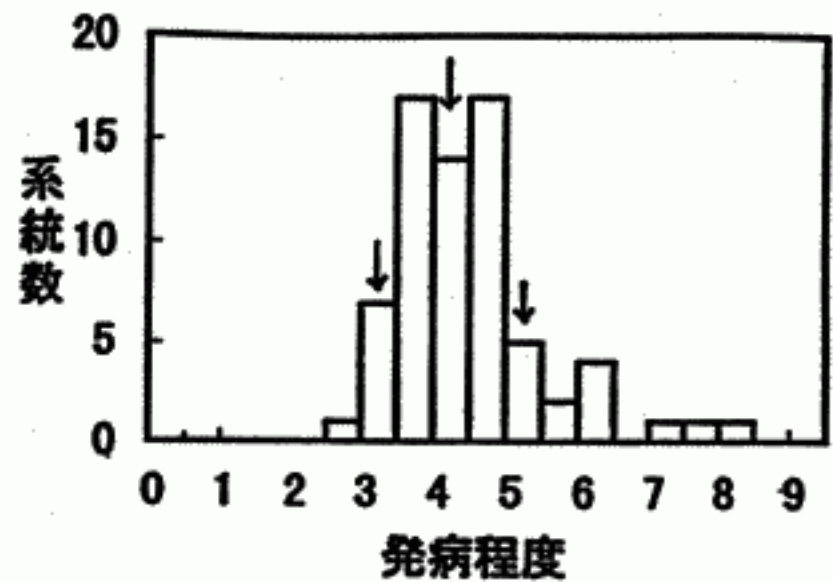


図3. コシヒカリのPt3植物における葉いもち抵抗性検定

↓は対照コシヒカリの値 (3箇所)

比較品種の発病程度は、ほまれ錦2.0, 農林22号3.0, トドロキワセ3.5, 値は2反復の平均値

表3. Na1のPt3植物における出穂期および成熟期の生育調査結果

系統 Na	出穂期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	分離の有無*
1-1	8.2	88.7±2.2	19.1±1.1	21.2±3.2	無
1-2	8.2	89.4±2.3	18.4±1.2	22.0±4.1	無
1-3	8.2	91.3±3.0	19.5±1.2	22.4±2.4	無
1-4	8.2	89.8±3.0	19.1±1.1	21.7±3.0	無
コシヒカリ	8.3	88.7±2.2	18.0±1.0	23.1±4.1	無

稈長、穂長および穂数の値は、調査した10株の平均値±S.E.
 稈長、穂長、穂数の各値についてコシヒカリと平均値の差の検定を5%水準で行ったところ、有意差は認められなかった。
 1)系統内分離を立毛で観察した。

表4. Na15のPt3植物における出穂期および成熟期の生育調査結果

系統 Na	出穂期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	分離の有無*
15-1	8.4	72.3±2.0*	17.6±0.8	25.2±3.0	無
15-2	8.4	71.8±2.6*	17.8±2.6*	22.8±3.1	無
15-3	8.3	72.7±1.4	17.6±0.6	24.1±3.2	無
15-4	8.3	71.6±2.0*	17.6±0.7	26.0±4.8	無
15-5	8.4	71.6±1.6*	17.8±0.6	24.1±3.3	無
15-6	8.4	70.7±1.9*	17.3±0.6	22.9±2.5	無
15-7	8.6	71.1±1.0*	17.4±1.0	19.9±3.8	無
15-8	8.6	70.7±1.2*	18.0±0.6	23.1±6.0	無
15-9	8.6	72.6±1.5*	17.8±0.6	22.1±3.6	無
15-10	8.4	71.8±3.2*	17.4±0.5	21.3±4.4	無
コシヒカリ	8.3	88.7±2.2*	18.0±1.0	23.1±4.1	無

稈長、穂長および穂数の値は、調査した10株の平均値±S.E.
 *コシヒカリに対して5%水準で有意
 1)系統内分離を立毛で観察した。

Pt2植物で培養変異が認められなかったNo.1に由来する4系統(Na1-1, Na1-2, Na1-3, Na1-4)は、Pt3植物においてもコシヒカリと比較して稈長、穂長、穂数については差が認められなかった(表3)。また、系統内の個体間および4系統間ともにばらつきが認められず、コシヒカリと比較して変異が認められなかった。

Pt2植物において系統内において短稈の変異が分離せずに認められたNa15は、Pt3植物各10系統(Na15-1からNa15-10)すべてにおいてもコシヒカリと比較して短稈の変異が認められた(表4)。

また、この短稈の変異は、系統内の個体間および10系統間においてばらつきが認められず分離が観察されなかった。

Pt2植物で短稈の変異が系統内で分離して認められたNo.25は、Pt3植物10系統においてもコシヒカリと比較して短稈の変異が認められた(表5)。この変異は系統内個体間および系統間でばらつきが認められ、

表5. Na25のPt3植物における出穂期および成熟期の生育調査結果

系統 Na	出穂期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	分離の有無*
25-1	8.20	45.1±9.6*	13.7±3.4*	27.6±7.9	有
25-2	8.16	52.9±6.0*	15.7±1.1*	32.0±5.7	有
25-3	8.16	65.1±9.4*	16.3±2.8*	26.6±7.1	有
25-4	8.15	71.7±6.2*	17.8±1.0	25.8±3.1	有
25-5	8.16	73.4±8.0*	18.0±1.5	24.6±10.0	有
25-6	8.15	63.2±10.3*	16.5±1.5*	27.4±3.5	有
25-7	8.17	70.9±9.0*	18.2±1.3	25.3±10.8	有
25-8	8.15	69.5±3.3*	16.4±0.8*	25.8±5.0	有
25-9	8.16	64.8±10.8*	17.4±1.3	27.8±6.0	有
25-10	8.14	57.4±11.6	15.2±1.5*	23.5±6.4	有
コシヒカリ	8.3	88.7±2.2*	18.0±1.0	23.1±4.1	無

稈長、穂長および穂数の値は、調査した10株の平均値±S.E.
 *コシヒカリに対して5%水準で有意
 1)系統内分離を立毛で観察した。

表6. Na28のPt3植物における出穂期および成熟期の生育調査結果

系統 Na	葉毛 ¹⁾			分離の有無 ²⁾	系統 Na	葉毛 ¹⁾			分離の有無 ²⁾
	無	中間	有			無	中間	有	
28-1	8	1	1	有	28-11	0	4	6	有
28-2	6	4	0	有	28-12	3	5	2	有
28-3	4	3	3	有	28-13	10	0	0	無
28-4	6	2	2	有	28-14	8	1	1	有
28-5	10	0	0	無	28-15	9	1	0	有
28-6	0	7	3	有	28-16	3	5	2	有
28-7	8	1	1	有	28-17	3	4	3	有
28-8	5	3	2	有	28-18	4	4	2	有
28-9	0	3	7	有	28-19	2	3	5	有
28-10	10	0	0	無	コシヒカリ	0	0	10	無

1)葉毛の基準 有…コシヒカリと同程度の葉毛がある
 中間…完全な無毛性
 無…完全に無毛

分離していた。

Pt2植物で葉毛の変異が系統内で分離して認められたNo.28は、Pt3植物19系統(Na28-1からNa28-19)においても葉毛の変異が認められた(表6)。そのうち、3系統(Na28-5, Na28-10, Na28-13)では、系統内の全個体が無毛性であった。その他の16系統では系統内の個体間で葉毛について分離が認められた。

3.4 Pt2植物のDNA分析

イネレトロトランスポゾンTos17をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、Hind, EcoRVのどちらの制限酵素で消化した場合においても、Na1の1系統ではコシヒカリと同じバンドパターンを示し、変異が認められなかった(図4)。

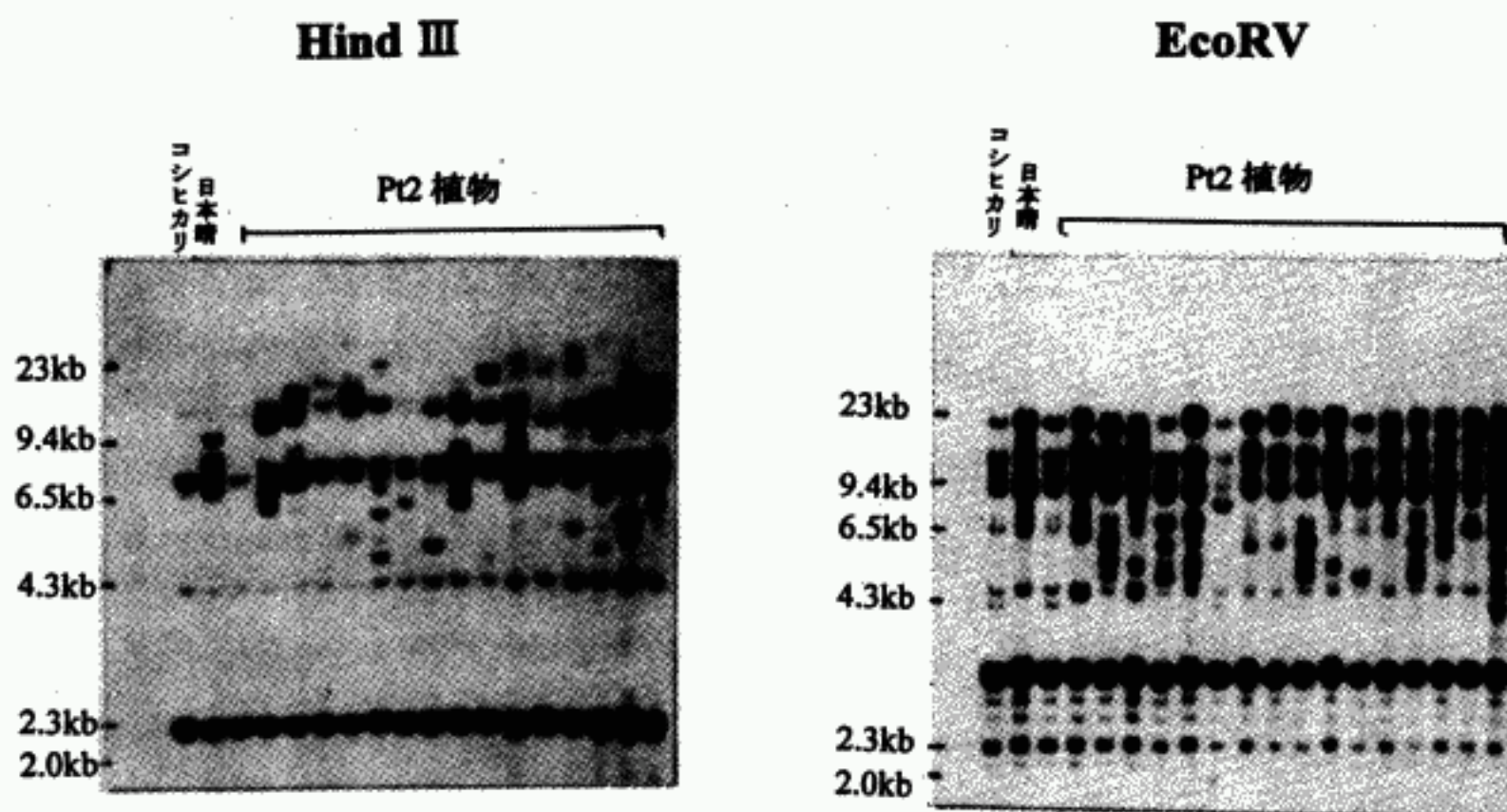


図4. コシヒカリのPt2植物におけるサザンハイブリダイゼーション分析
Pt2植物のデータは、一部のみ掲載（各データともPt2植物の左端レーンが系統No.1）

他の48系統では、コシヒカリと比較して異なるバンドパターンを示したことから、DNAレベルで変異が起きていることが明らかとなった（図4）。

4. 考 察

小倉ら¹⁷⁾は、藤坂5号、日本晴、祝禰などのPt2植物において、出穂期、稈長、穂長、穂数などの農業上重要な形質に培養変異が出現することを報告している。また、ADBULLAHら²⁾は、台北309などのPt2植物において同様の培養変異が出現することを報告している。

我々は、コシヒカリのプロトプラスト由来植物体自殖後代植物を用い、圃場での特性調査、葉もち抵抗性検定試験、DNA分析を行い、培養変異について調査した。その結果、供試したPt2植物50系統中、変異の認められなかった系統は1系統だけであり、他の49系統は出穂期、稈長、穂長、穂数、葉毛、草姿、発芽率、稔性、DNA（レトロトランスポゾン）等のいずれかの形質において変異が認められた。今回、コシヒカリのPt2植物で培養変異の発現したイネの割合は、98%であった。この率は、小倉ら¹⁷⁾の報告の藤坂5号、日本晴および祝禰のPt2植物で見られた培養変異の率と比べて高いと思われる。さらに、我々の行った日本晴のPt2植物に見られた培養変異の率（データ略）と

比べても高かった。これらの試験の培養法に大差がないことから、培養変異の発現率は品種の遺伝子型に影響されることが示唆された。

一般的に突然変異では、変異はランダムに引き起こされるといわれており、その変異形質は自殖後代植物で分離することが知られている。しかし、小倉ら¹⁷⁾はPt2植物の系統内の個体間に、いくつかの変異形質の均一性が保持されていたことを報告し、変異形質の遺伝子型が再生植物体当代でホモになっていたのではないかと推察している。今回のPt2植物においても、培養変異が見られた49系統中、10%にあたる5系統で出穂期、稈長、穂長、穂数等の変異形質における系統内個体間での明らかな分離は認められず、変異形質の均一性が保持されていたことを観察した。このことから、この現象は他の突然変異には見られない培養変異の大きな特徴の1つであると考えられた。

Pt3植物を調査した結果、Pt2植物で発現した形質はPt3植物に遺伝していることが明らかになった。このことから、培養変異形質は遺伝形質であると考えられ、育種に利用することができると考えられる。No. 15では、Pt2植物の系統内個体間およびPt3植物の各系統間、系統内個体間においても短稈の変異の分離が観察されなかった。このことから、培養変異の育種への利用を考えるとき、Pt2植物において分離が認めら

れなかった変異形質は、Pt2世代において早期に選抜できる可能性がある。Pt2植物の系統内で分離が認められたNo. 25の短稈の変異形質およびNo. 28の葉毛の変異形質は、Pt3植物においても認められ、系統間、系統内で分離して出現した。このことから、分離が見られる変異形質を育種に利用する際には、分離した個体の中から有用な個体を選抜し形質の固定を行っていく必要がある。

イネいもち病は、イネにおける最重要病害であり、いもち病抵抗性は育種を行っていく上で重要な選抜項目の1つである。これまで、培養由来イネにおける耐病性等の特性の変化を調査した報告はほとんど知られていない。本試験の結果、供試したPt3植物69系統中59系統ではコシヒカリと比較して葉いもち抵抗性について変異が認められなかったが、10系統で変異が認められた。変異が認められた10系統のうち、1系統はいもち病に強くなっている可能性が考えられた。しかし、今回の検定法ではPt3植物を供試していることからPt1植物で抵抗性付与が起こっていても、形質が遺伝していない可能性があり、今後この点を考慮し検討をする必要がある。今回、特異的にいもち病に弱くなっている系統が3系統得られた。この系統は、さらに次代植物についても検定したところ、コシヒカリと比較して弱かった(データ略)。このように、培養変異が形態的な特性だけではなくいもち病抵抗性のように目に見えない性質にも起こっていたことが確認され、培養変異は様々な変異を引き起こす可能性があることが示唆された。今後、培養変異個体の実用育種への利用を考える時、この点についても考慮する必要がある。

最近、廣近ら⁹⁾は、レトロトランスポゾンTos17が培養ストレスによって活性化されること、培養期間の延長に伴ってコピー数が増加することおよびプロトプラスト培養由来植物にTos17のコピー数の増加が認められることなどを報告し、レトロトランスポゾンが培養変異の原因の一つになっているのではないかと指摘している。今回、Pt2植物のDNAにおけるTos17を分析した結果、コシヒカリと比較して培養変異を示さなかったNo.1, 1系統はレトロトランスポゾン分析においても違いが認められなかったが、圃場で変異が認められた48系統すべてにおいてTos17のDNAパターンに変異が認められたことから、培養によってコピー数が増加したと考えられた。現在においては、培養変異の発現率や変異の幅をコントロールする技術は確立

されていないが、今後、培養由来植物におけるレトロトランスポソンのコピー数が、変異の出現率の指標として利用できる可能性が考えられた。

以上のことから、コシヒカリのプロトプラスト培養由来植物自殖後代は出穂期や稈長などの農業上重要な形質に変異が認められたことおよびそれらの変異形質がPt3植物に遺伝したことから、実用育種に利用できる可能性があると考えられる。今回、調査した形質の中では、稈長、出穂期および葉毛に変異が出やすい傾向にあった。これらの形質を改善することによって、稈長では短稈化による耐倒伏性の改善、出穂期では熟期の移動による作期の分散、葉毛では無毛性品種によるコンバインでの収穫時の塵発生量の減少などが期待できる。また、プロトプラスト培養によってアミロース含量に変異が起こり、良食味品種が育成された例もある。他の形質は変える必要がなく、数少ない形質だけを改善していく育種目標の場合、培養変異を利用していくことは有効であると考えられる。しかし、今回のコシヒカリのPt2植物の変異発現率は高く、中には農業形質上好ましくない稈性の低下などが発現した個体が存在した。今後は、変異の発現率や変異の幅をコントロールする技術の開発が必要であろう。また、実用育種に向けては、さらに培養効率を上げ、扱うスケールを増やしていくことも必要であろう。

今回、調査したコシヒカリのプロトプラスト由来植物自殖後代の中から、他の形質はコシヒカリとあまり変わらず短稈に変異した系統No.15が得られており、その特性は非常に興味深い。No.15は短稈の変異が固定しており、次報でこの系統について詳細に調査し、報告する。

謝 辞

植物のDNA分析を行うにあたり、農林水産省農業生物資源研究所ゲノム動態研究室廣近洋彦室長には大変丁寧な御指導と終始有益な御助言をいただいた。また、同研究室の杉本和彦研究員ならびに大槻寛氏(現農林水産省北陸農業試験場稲育種研究室)、花井祐子氏には、多くの援助をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) ADBULLAH, R., EDWARD C. COCKING and J.A. THOMPSON : Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Tecnol* 4, 1087-1090, 1986.
- 2) ADBULLAH, R., J. A. THOMPSON, G. S. KHUSH, R. P. KAUSHIK and E. C. COCKING : Protoclonal variation in the seed progeny of plants regenerated from rice protoplasts. *Plant Sci.* 65, 97-101, 1989.
- 3) 浅賀宏一 : イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究 *農事試研報*35, 51-138, 1981.
- 4) COULIBALY, M. Y. and Y. DEMARLY : Regeneration of plantlets from protoplasts of rice, *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 96, 79-81, 1986.
- 5) FEINDERG A. P. and B. VOGELSTEIN: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13, 1983.
- 6) FUJIMURA, T., M. SAKURAI, H. AKAGI, T. NEGISHI and A. HIROSE : Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Culture Lett.* 2, 74-75, 1985.
- 7) HIROCHIKA, H., FUKUCHI, A. and F. KIKUCHI: Retrotransposon families in rice. *Mol. Gen. Genet.* 233, 209-216, 1992.
- 8) HIROCHIKA, H., SUGIMOTO, K., OTUKI, Y., TSUGAWA, H. and M. KANDA, : Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 7783-7788, 1996.
- 9) KANDA, M., S. KIKUCHI, F. TAKAIWA and K. OONO : Regeneration of variants plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long term cultures. *Japan. J. Genet.* 63, 127-136, 1988.
- 10) KAWATA M., S. HARADA, B. ANTONIO and K. OONO : Protoclonal variation of plant regeneration in rice. *Plant Cell, and Organ Culture* 28, 1-10, 1992.
- 11) KYOZUKA, J., Y. HAYASHI and K. SHIMAMOTO : High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* 206, 408-413, 1987.
- 12) LI, Z. and N. MURAI : Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Rep.* 9, 216-220, 1990.
- 13) 丸山清明 : バイオテクノロジーによる稲品種の開発の現状と将来. *続図説米の品種.* 83-88. 日本穀物検定協会, 東京, 1995.
- 14) 森真理・北村治滋・宇野弘子・渡辺健三 : コシヒカリのプロトプラスト培養系を利用した突然変異育種 (第1報) コシヒカリの培養細胞由来プロトプラストからの植物体再生 *滋賀農試研報*38, 1997
- 15) MURRAY M.G. THOMRSON W.F. : Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4325, 1980.
- 16) OGURA, H., J. KYOZUKA, Y. HAYASHI, T. KODA and K. SHIMAMOTO : Field performance and cytology of protoplast derived rice (*Oryza sativa*) : high yield and low degree of variation off our japonica cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 74, 670-676, 1987.
- 17) OGURA, H., J. KYOZUKA, Y. HAYASHI and K. SHIMAMOTO : Yielding ability and phenotypic traits in the selfed progeny of protoplast derived rice plants. *Japan. J. Breed.* 39, 47-56, 1989.
- 18) SAMBROOK, J., FIRITCH, E. F. and T. MANIATIS, : *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 19) TORIYAMA, K. and K. HINATA : Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41, 179-183, 1985.
- 20) YAMADA, Y., Z. Q. YANG and D. T. TANG : Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 4, 85-88, 1986.

Summary

We investigated morphological variations in the field using 50 lines of the progenies of protoplasts-derived plants(Pt2 plants), chosen at random among 73 fertile protoplast-derived plants.

The plants of 48 Pt2 lines among 49 Pt2 lines showed various morphological variations in culm length, panicle length, panicle number, and heading date. In the plants of one Pt2 line, all morphological characters were the same as those of Koshihikari. Heading date was significantly delayed in 47 lines, no lines showed an earlier heading date when compared to Koshihikari. In general, culm length and panicle length in the Pt2 plants were slightly shorter than that of the control plants. Regarding panicle number, however, direction of change was variable. In addition, disease resistance tests to leaf blast showed differences among 10 pt2 lines compared to Koshihikari.

These variant characters were also observed in the next generation. Moreover, DNA polymorphisms were detected in 48 Pt2 lines by Southern blotting analysis using DNA fragments of retrotransposon.

These findings indicate that the breeding of protoplasts is useful in producing new rice varieties.