水稻種子根の培養, とくに生育期間中に 胚盤培地の糖条件を変更した場合*

川田 信一郎・松井 重雄

(東京大学農学部)

緒 言

1 株の水稻に形成される個々の冠根 (1 次根) の外部形態については, すでに若干の観察^{3,4,8,9,10,12)} がなされているが, それら, 個々の冠根の形態が, どのような機構に基づいて形成されるに至ったかということについては, ほとんど研究が行われていないといつてよい。著者等は, 前報⁷⁾において, 水稻の“胚盤を有する種子根”を用い, 胚盤側から二, 三の種類の糖 (種々の濃度のもの) を与えた場合, それぞれ異なる生育の様相を示すことを知り, 種子根に対する糖の供給量と種子根の根長・根径・分枝根 (2 次根) 数および伸長量との間に密接な関係があることを明らかにすることができた。この事実は, 水稻冠根の形態形成が行われる場合, 茎葉から冠根に送られてくる糖の量が重要な役割を果していることを暗示していると考えてよいであろう。そこで, この点を明らかにするために, 従来行われてきた水稻の“胚盤を有する種子根”の培養研究^{6,7)}を参照しつつ, 著者等が新たに考案した方法を用いて実験を進めてみた。以下, 報告するところはその結果の概要である。

実験材料および方法

供試した水稻品種は農林 29 号で, “種子”^{註 1)}は脱穎・殺菌後, まず寒天発芽床の寒天の中に, 胚が空気中に位置するようにさし込み, ついで種子根が空気中を“まつすぐ”に伸長するよう発芽させるために, 発芽床全体を, 上下, 逆転して静置した (第 1 図)。発芽は, $27 \pm 0.5^\circ \text{C}$ の恒温・暗黒条件下で行わせ, 種子根が 2~3 cm に伸長した時^{註 2)}, “胚盤を有する種子根”を分離し⁶⁾て培養に供した。

註 1) 厳密に言えば穎果である。

註 2) 適当な長さの“胚盤を有する種子根”が得られなかった場合には, 若干, 長いもの, あるいは短いもの, をも用いた。

* 昭和 50 年 1 月 30 日受理

第 158 回講演会 (昭和 49 年 10 月) において発表。

培養基は, 種子根の先端側から無機成分を供給する培地 (以下, 根培地と呼ぶ) および種子根の基部側から糖を供給する培地 (以下, 胚盤培地と呼ぶ) の 2 種類とした。根培地としては, White の処法を, 一部, 変更したものの⁵⁾うち, クエン酸第 2 鉄を除いて, pH 5.0 に調整したもの, およびクエン酸第 2 鉄の代りにナトリウム-鉄-EDTA^{註 3)}を用意し, 両者をそれぞれオートクレーブした ($2 \text{ kg/cm}^2 \cdot 10$ 分間) 後, 混合したものをを用い, この培地を 100 ml の三角コルベンに 10 ml ずつ分注した。胚盤培地としては, ブドウ糖の水溶液を用い, その濃度は, “胚盤を有する種子根”の生育に最適であつた 7%⁷⁾ およびそれより低い濃度の 0.5% とした。またブドウ糖にマンノースを加えるという実験も行つた。胚盤培地用の容器は, 先端に直径約 0.5 mm の小孔をあけたガラス管 (内径: 6 mm, 長さ: 約 10 cm) で, “胚盤を有する種子根”の根端部を, このガラス管の内側から先端の小孔を通してガラス管の外に出し, 胚盤および種子根の基部 5~10 mm 部分をガラス管内に留めた。この場合, ガラス管と“胚盤を有する種子根” (以下, 培養根, 種子根あるいは単に根と呼ぶ) との間隙は, 汚紙で水分を, 充分, 吸収させた後, グッタペルカ: ラノリン: 松脂を 1:2:2 (重量比) の割合で混合・溶融したものをを用いて充填し^{註 4)}, しかる後に, ガラス管内に胚盤培地を約 0.5 cc ずつ注入した (第 2 図)。

すべて培養は, $27 \pm 0.5^\circ \text{C}$ の暗黒条件下で行い, 培養根は, 培養終了後, ホルマリン・酢酸・アルコール液 (FAA) で固定し, その固定した培養根の印画 (シャドウグラフ) を作成して, 種子根長 (種子根の根冠から, 胚盤との境界までの長さ, 以下同様), 培養根各部位の直径および 2 次根の分枝の様相などについて観察を行つた。なお, 通常のパラフィン法で作成した切

註 3) Murashige および Skoog¹¹⁾ の処方により, Na_2EDTA および FeSO_4 を混合して作成した。

註 4) この充填材料は, 水耕した水稻幼植物の種子根に付着させても, 種子根の伸長に対して影響を与えなかつた。

第1図 種子根を“まつすぐ”に伸長させるために工夫した方法

第2図 新たに考案した培養法

片は、タンニン酸・塩化第2鉄およびファストグリーンを用いて2重染色を行つて組織の観察を進めた。

実験結果

I. 考案した培養法の検討 まず、濃度7%のブドウ糖水溶液を用いて、胚盤側より糖を供給して培養した根と、濃度7%のブドウ糖寒天培地を用いて胚盤側より糖を供給した根とを比較した結果、次のようなことがわかった。すなわち、両者の間には、とくに顕著な生育上の相違はみられず、水溶液の形で胚盤側より糖を供給した場合でも、寒天培地を用いて胚盤側より糖を供給した場合と同様、培養根は順調に生育することを知つたのである^{註5)}。また、胚盤培地の糖の水溶液を、二、三の異なるpHに調整して培養してみたが、

註5) 培養根の中には、時に、培養開始後、間もなく伸長を停止し、異常な形態を示すものがみられた。このような根は、観察の対象から除外した。

第1表 胚盤培地のpHが培養根の伸長量におよぼす影響 (ブドウ糖濃度7%, 14日間培養)

pH		伸 長 量
オートクレープ前	オートクレープ後	
3.2*	3.3	37.1±5.0cm
5.0*	4.8	43.5±1.3
8.5**	5.8	44.8±2.9

* HCl を加えて調整 ** NaOH を加えて調整

pH 3.3 のとき低い pH において、若干の伸長抑制がみられたほかは、顕著な生育上の差異は認められなかった(第1表)。

以上、著者等の考案した培養法を検討した結果、培養根は寒天培地を用いて胚盤側より糖を供給する方法を用いた場合と同様に、順調に生育することがわかつたので、この方法を用いて以下の如き実験(IIおよびIII)を進めることとした。

II. ブドウ糖濃度を高めた場合 培養期間中、胚盤培地のブドウ糖濃度を0.5%(7日間培養)から7%(7日間培養)に変更した場合の培養根と、ブドウ糖濃度を変更せず、0.5%および7%の濃度で、それぞれ14日間培養を続行した場合の根(対照区^{註6)}とを比較・観察した結果、次のようなことがわかつた。

すなわち、イ) 種子根の伸長速度についてみてみると、ブドウ糖濃度0.5%の条件下では、7日間に9cm伸長したに過ぎず、培養開始時からブドウ糖濃度7%で培養した根と比較すると、その伸長速度は著るしく低かつた。これに対し、胚盤培地のブドウ糖濃度を0.5%から7%に変更した後に、新たに伸長した部分は、7日間に19cmという著しい伸長速度を示したのであつた。一方、胚盤培地のブドウ糖濃度を変更せず、0.5%で培養を続行した場合(14日間)には、培養根の伸長速度には変化が認められなかつた(第3図のAおよびC)。

ロ) ブドウ糖濃度を0.5%から7%に変更すると、ブドウ糖濃度7%の条件下で新たに伸長した部分の種子根の直径は、急速に大となることがわかつた。たとえば、種子根が3cm伸長する間に、直径は平均70 μ mの増加を示したのであつて、ブドウ糖濃度が0.5%の場合に伸長した部分の直径が平均230 μ mであつたのに対して、濃度7%の条件下で新たに伸長した部分の種子根の直径は、平均300 μ mとなつたのであ

註6) いずれの対照区においても、7日目に、胚盤培地をそれぞれ同濃度の新しいブドウ糖水溶液に更新した。

第3図 生育期間中，胚盤培地の糖条件を変更して培養した根

A: ブドウ糖濃度 0.5% 条件下で 14 日間培養した根. B: ブドウ糖濃度 7% 条件下で 14 日間培養した根. C: ブドウ糖濃度 0.5% 条件下で 7 日間，ついでブドウ糖濃度 7% 条件下でさらに 7 日間培養した根. C': C の一部を拡大したもの. D: ブドウ糖濃度 7% 条件下で 7 日間，ついでブドウ糖濃度 0.5% 条件下でさらに 7 日間培養した根.

C' 以外はいずれも同じ縮尺. 矢印は糖濃度変更時における根端の位置を示す.

第4図 胚盤培地のブドウ糖濃度を0.5%から7%に変更して培養した根。
矢印はそれぞれ、培養開始時および糖濃度変更時における根端の位置を示す。

る。これに対して、ブドウ糖濃度0.5%で培養を続行した根の直径は、さらに減少を示したのであつた(第3図のAおよびC, 第4図)。

ハ) 2次根の分枝の様相についてみると、ブドウ糖濃度0.5%で14日間培養した場合には、ブドウ糖濃度7%で14日間培養した場合に比較して、2次根の伸長が著しく劣つていた。これに対し、胚盤培地のブドウ糖濃度を0.5%から7%に変更した根は、ブドウ糖濃度7%で継続して(14日間)培養した根と同様、その伸長は良好であつた(第3図のC)。また、ブドウ糖濃度を変更した時点において生長点であつた部位近傍における2次根密度^{註7)}は、局部的に、低くなつたが、逆に、3次根を“分枝している”2次根の密度は高くなつた(第4図)。

二) 培養根の横断切片の組織などを観察した結果、次のようなことがわかつた。すなわち、培養開始時にすでに伸長していた培養根基部の皮層の細胞層数(外皮および内皮を含む)は10~11で、表皮より第3層目の細胞、あるいは第3および第4層目の2層の細胞は、小型の厚膜細胞となつており^{註8)}、中心柱の原生木部は6原型であつた。これに対して、ブドウ糖濃度0.5%の条件下で伸長した部分についてみると、皮層

の細胞層数は6~7に減少し、表皮より第3層目の細胞の壁はほとんど肥厚を示さず、皮層の個々の細胞も著しく小となつていた。

一方、胚盤培地のブドウ糖濃度を7%に変更した後には伸長した部分についてみると、種子根の直径は、ブドウ糖濃度0.5%条件下で伸長した部分に比較して著しく増大していたにもかかわらず、皮層の細胞層数は6~7であり、表皮より第3層目の細胞の細胞壁は肥厚せず、中心柱の原生木部は5原型または4原型であつた。しかし、個々の細胞の大きさには顕著な差異がみられたのであつて、そのため、中心柱の直径および皮層の厚さ(内皮細胞の中心柱側の壁から、外皮細胞の外側の壁までの距離)はいずれも大となつたのである(第5図および第2表)。

III. ブドウ糖濃度を低めた場合 培養期間中、胚盤培地のブドウ糖濃度を7%(7日間培養)から0.5%(7日間培養)に変更した場合の培養根と、ブドウ糖濃度を変更せず、7%の条件下で、培養を14日間続行した根(対照区)とを比較・観察した結果、次のようなことを知つた。

すなわち、1) ブドウ糖濃度を7%から0.5%に変更しても、根の伸長速度はほとんど変化せず、ブドウ糖濃度7%の条件下における7日間の伸長量も、ブドウ糖濃度0.5%に変更した後の7日間における伸長量

註7) 種子根1cm当りの2次根数。

註8) 土壌で生育した根と同様である。

第5図 ブドウ糖濃度 0.5% で7日間，ついでブドウ糖濃度 7% でさらに7日間培養した根の横断面の組織

A および a: 培養開始時にすでに伸長していた部分. B, b1 および b2: ブドウ糖濃度 0.5% 条件下で伸長した部分. C および c: ブドウ糖濃度 7% 条件下で伸長した部分.

下段は上段と同じ部分の中心柱近傍を拡大したもの. b1 および b2 は互いに接近した部分でありながら，原生木部が b1 の場合は5原型，b2 の場合は4原型である. 矢印は原生木部を示す.

も，いずれも，ほぼ 16 cm であつた。

□) しかし，培養根の直径には変化が認められたのであつて，ブドウ糖濃度を 0.5% に変更すると，種子根が 4 cm 伸長する間に直径は約 40 μm 減少したのであつた。すなわち，ブドウ糖濃度 7% で培養した場合の直径は約 320 μm であつたが，ブドウ糖濃度を 0.5% に変更した後の直径は，280 μm となつたのである。一方，ブドウ糖濃度を変更せず，7% 条件下で

培養を続行した場合は，種子根が 4 cm 伸長する間にその直径は 320 μm から 305 μm となり，やや小となる（約 15 μm の減少である）に過ぎなかつた。

ハ) ブドウ糖濃度を 7% から 0.5% に変更して培養した根における2次根の分枝の様相と，ブドウ糖濃度 7% で継続して培養した根のそれとを比較してみると，ブドウ糖濃度を変更して培養した種子根の場合には次のような特徴があることがわかつた。すなわち，

第2表 ブドウ糖 0.5% 濃度で7日間、ついで
ブドウ糖濃度 7% でさらに7日間培養した
根の横断面の観察

観察部分	A	B	C
根の直径	430 μm	210	300
皮層の細胞層数*	10~11	6~7	6~7
皮層の厚さ*	150	70	110
中心柱の直径	97~100 μm	48	53~57
厚膜組織の有無	有	無	無
原生木部数	6	4~5	4~5

* 外皮および内皮を含む。

A: 培養開始時にすでに伸長していた部分。 B:
ブドウ糖 0.5% 濃度条件下で伸長した部分。 C:
ブドウ糖濃度 7% 条件下で伸長した部分。

種子根の基部から根端にわたって出現した2次根をみると、伸長量が多いもの (5~6cm 以上) と伸長量の小さいもの (1cm 以下) とにほとんど区別できるということであり、とくに、ブドウ糖濃度変更後に新たに伸長した種子根上に出現した2次根の伸長量は著るしく小であるということであつた。この場合、5~6cm 以上に伸長した2次根は、直径が大で3次根を分枝していたが、伸長量が 1cm 以下のものは、直径が小で3次根を分枝していなかつた。

これに対して、ブドウ糖濃度 7% で継続して培養した根においては、根端に近い、出根後間もない2次根を除くと、ほとんどの2次根は 2~3cm 以上に伸長していた (第3図の B および D)。

IV. マンノースを加えた場合 以上の結果 (II および III) から、生育期間中にブドウ糖濃度を変更すると、培養根の生育反応に差異が現れることがわかつた。そこで、糖の正常な代謝を阻害するといわれているマンノース^{註9)}を用いて、次のような実験を行った。

まず、I) ブドウ糖濃度 5% およびマンノース濃度 2% の組成の胚盤培地、ブドウ糖濃度 6.5% およびマンノース濃度 0.5% の組成の胚盤培地、さらにブドウ糖濃度 7% のみの胚盤培地 (いずれも寒天培地) の計3区を設けて14日間培養を行い、次のような結果を得ることができた。すなわち、ブドウ糖のみの培地で培養した根は順調に生育したが、マンノースを加えた培地で培養した根は、顕著な生育阻害を受けることを知つたのである。とくに、濃度 2% のマンノースを加えた区における培養根の14日間の伸長量は平均 1.7

註 9) トマトの分離根培養において、少量のマンノースを蔗糖を糖源とする培地に加えると、生育に阻害の現れることが知られている²⁾。

第6図 マンノースを加えた培地で培養した根
A: マンノース濃度 0.5% およびブドウ糖濃度 6.5% の組成の培地で14日間培養した根。
B: マンノース濃度 2% およびブドウ糖濃度 5% の組成の培地で14日間培養した根。 C:
ブドウ糖濃度 7% で7日間、ついでマンノース濃度 0.5% およびブドウ糖濃度 6.5% の組成の培地で7日間培養した根。
矢印は7日目の根端の位置を示す。

cm であり、2次根の分枝もほとんど認められなかつた。これに対して、濃度 0.5% のマンノースを加えた区の培養根の14日間における伸長量は平均 5.0cm で、2次根も数多く分枝していた (密度: 10本/1cm 以上)。しかし、いずれの場合も、マンノースを加えた培地で生育した場合には、種子根の直径は著るしく小となつていた (第6図の A および B)。

□) 最初の7日間、ブドウ糖濃度 7% の胚盤培地で培養し、ついでブドウ糖濃度 6.5% およびマンノース濃度 0.5% の組成の培地に変更して、さらに7日間培養するという実験を行い、次のような結果を得た。すなわち、マンノースを加えた胚盤培地で生育した部分は、根の伸長量、直径および2次根の伸長量などに顕著な阻害的影響が現れることを知つたのである。たと

えば，根の伸長量についてみると，ブドウ糖濃度7%の条件下では，7日間に平均18cm伸長したのに対して，胚盤培地をマンノースおよびブドウ糖の組成のものに変更した後における伸長量は，7日間に僅か平均5cmであり，根の直径も急速に減少したのである（第6図のC）。

考 察

得られた結果の概要は以上のごときものであつた。以下，一，二，考察を行つてみたい。

一般に，水田等に現実に栽培されている水稻が生育してゆく場合，個々の水稻冠根は，当然，茎葉から糖の供給を受けつつ生育していると考えてよいであろうが，個々の冠根に対する糖の供給の様相については，ほとんど知られていないのが現状といつても言い過ぎではあるまい。この場合，冠根に対する糖の供給量は，冠根が出現する“要素”¹⁰⁾によつて，また，水稻の“令”あるいは種々の環境条件の相違によつても相違するであろうし，経時的にみても常に変化していると考えてよいのではあるまいか。

著者等は，このような考えに立つて，前報⁷⁾において明らかになし得た，“胚盤を有する種子根”の培養に有効と認められるブドウ糖を用い，基部側から供給するブドウ糖の条件，とくにその濃度条件を変更させ得るような方法を考案して実験をすすめたのである。その結果，すでに記したように，基部側からの糖の供給量如何が，培養根の形態形成に顕著な影響を与えることの一端を明らかにすることができたのであつた。すなわち，基部より供給する糖の濃度を培養根の生育期間中に変更したり，糖の正常な代謝を阻害するといわれているマンノースを添加することに相対応して，培養根は，伸長量および直径，2次根の密度，2次根の伸長量および3次根を“分枝している”2次根の形成（とくにその密度）に明らかな反応を示すことを知つたのである。とくに，胚盤培地の糖濃度を高めて，低濃度（0.5%）から最適の糖濃度（7%）に変更すると，根の伸長量および直径は急激に増大することを明らかにすることができた（実験結果 II）のであり，最適濃度（7%）から低濃度（0.5%）に変更すると，種子根および直径の大な2次根（3次根を分枝している）の伸長量は低下しないが，直径の小さな2次根（3次根を分枝していない）の伸長量は著しく低下するということを明らかにすることができた（実験結果 III）のである。これらの事実は，基部からの糖の供給量如何が，種子根の伸長・肥大，3次根を“分枝している”

2次根の形成，および3次根を“分枝していない”2次根の伸長に関係していることを示しているのであつて，水稻冠根の形態形成を考えてゆく上で，極めて興味深い問題を提起していると思わざるを得ないのである。

周知のごとく，水稻の冠根は，それぞれの冠根が出現する“要素”，水稻の生育段階あるいは土壌条件等によつて，異つた形態を示すのであり^{8,10,12)}，また，1本の冠根に着目してみると，根軸方向の部分によつて，直径あるいは2次根の形成・生育の様相なども異つていのであるが^{4,8)}，これ等の事実およびすでに著者等が前報⁷⁾において明らかにした，基部側から供給する糖の種類・濃度が培養根の伸長量・直径および2次根の密度などに著しい影響を与えるという事実，さらに，著者等が本研究で明らかになし得た事実——生育期間中に糖濃度を変更すると，それに対応して根の生育反応に差異が認められるという事実——を併せて考えてみると，水稻において個々の冠根の形態形成が行われる場合，茎葉から冠根に供給される糖の量が，極めて重要な要因となつていことを認めざるを得ないのである。著者等の知る限り，このような見解を実験的に明らかにしたものは他にないが，Evans¹⁾の業績などは，著者等の見解に近い研究の一例としてあげられようか。すなわち，氏は *Lolium perenne* を用いて剪葉処理実験を行い，剪葉による根の生育低下は，外部から根に糖を与えることによつて完全ではないが回復することを見出し，根に供給される糖の減少がその生育低下をもたらしたのだとしている。しかし，この場合，根の外部から糖を与えることと，根の基部から糖を供給することとは区別して考えなければならぬことは，いうを待たぬところである。いずれにしても，水稻冠根の形態が形成される場合，茎葉から冠根に供給される糖の量が重要な一要因であることを著者等は明らかにすることができたのである。

しかし，冠根の基部から供給された糖が冠根の各部分に如何に配分され，如何なる機構で冠根の伸長や肥大，2次根の形成などに関与しているのか，また，その等の生育諸反応には糖以外の如何なる物質が関与しているのか，といったことなどは，さらに検討しなければならないことで，現在のところ不明のところがお少くない。今後の研究に期待したい。

なお，本論文を草するにあたり，石原愛也助教授（現岩手大教授）より種々の助言をいただいた。厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) EVANS, P. S. 1972. Root growth of *Lolium perenne* L. III. Investigation of the mechanism of defoliation-induced suppression of elongation. New Zealand J. Agr. Res. 15: 347—355.
- 2) FERGUSON, J. D. and H. E. STREET 1958. The carbohydrate nutrition of tomato roots. VI. The inhibition of excised root growth by galactose and mannose and its reversal by dextrose and xylose. Ann. Bot. 22: 525—538.
- 3) 藤井義典 1961. 稲・麦における根の生育の規則性に関する研究. 佐賀大農彙報 12: 1—117.
- 4) 川島長治・石原 邦・小倉忠治 1973. 異なる生育段階に発根した水稻冠根の発育について. 日作紀 42: 197—206.
- 5) 川田信一郎・石原愛也・角田昌一 1967. 水稻種子根の培養における培地の組成について. 日作紀 36: 68—74.
- 6) ————・————— 1968. 水稻種子根の培養, とくに胚盤を有する種子根などを用いた場合について. 日作紀 37: 447—453.
- 7) ————・—————・松井重雄・咲花茂樹 1975. 水稻種子根の培養, とくに糖の種類, 濃度および供給方法が培養根の生育に及ぼす影響. 日作紀 44: 93—108.
- 8) ————・芝山秀次郎 1966. 水稻冠根における2次根の分枝の様相. 日作紀 35: 59—70.
- 9) ————・副島増夫 1974. 水稻における“うわ根”の形成過程, とくに生育段階に注目した場合の一例. 日作紀 43: 354—374.
- 10) ————・山崎耕宇・石原 邦・芝山秀次郎・頼 光隆 1963. 水稻における根群の形態形成について, とくにその生育段階に着目した場合の一例. 日作紀 32: 163—180.
- 11) Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473—497.
- 12) 副島増夫・川田信一郎 1969. 水稻の“うわ”根における“ししの尾状”根の形成と土壤環境について. 日作紀 38: 442—446.

The Morphogenetic Responses of Excised Seminal Roots of Rice Plants to the Changing Conditions of Sugar Supply

Shin-ichiro KAWATA and Shigeo MATSUI

(Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo)

Summary

Excised rice seminal roots with scutella were cultured aseptically *in vitro* by means of “bi-media culture” method. The morphogenetic responses of roots to the changes of the concentration of sugar supplied as glucose solution through the basal parts of the roots were studied. The sugar concentration of the media was changed after the roots were pre-cultured for 7 days and then cultured for succeeding 7 days.

When the concentration of glucose was changed from 0.5% to 7%, the elongation rate of primary roots and lateral roots increased immediately after the treatment. The increase in diameter of primary roots which owed to the expansion of individual cortical cells was also observed.

On the other hand, when the concentration of glucose was changed from 7% to 0.5%, the elongation rate of primary roots and the thicker laterals did not decrease, but the elongation of the thinner laterals was restricted. The addition of 0.5% of mannose to 6.5% of glucose following the pre-culture with 7% of glucose strictly restricted the elongation of primary roots and laterals.

The results indicate the important role of sugar provision from shoot to root in determining the length, diameter and branching patterns of crown roots of rice plants.