

「コシヒカリ」の葯由来プロトプラストからの植物体再生

仲野英秋・清野栄美・佐藤昌宏・原田康信*

(山形県立農業試験場・*山形県農業経済課)

Plant Regeneration from Protoplasts Derived from Anther of Rice Variety "Koshihikari"

Hideaki NAKANO, Emi SEINO, Yoshihiro SATO and Yasunobu HARADA*

(Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station. *Agricultural)
Economic Section of Yamagata Prefectural Government Office

1 はじめに

近年、イネのプロトプラスト（以下、Ptという）からの植物体再生については多数の品種で成功例が報告されているが、品種によっては、培養細胞の作出が困難なこと^{2, 3)}やPtからの植物体再生の効率の向上が残された問題となっている。そこで、良食味品種の中でも培養が比較的困難なコシヒカリについて、葯由来Ptからの植物体の再生方法について検討したので報告する。

2 試験方法

(1) Pt培養の初代培地とコロニー形成率(1989年)

葯培養カルスは、穂孕期（葉耳間長+5 cm程度）の穂（7日間10℃の低温処理）から採取した葯をN6液体培地（2, 4-D 2 mg/ℓ, イーストエキス 1 g/ℓ, ショ糖 5%）に置床し、1か月間の浮遊培養（25℃, 暗黒下）により作出した。Pt単離用の培養細胞はAA培地を用いた懸濁培養により作出した。

Ptは、酵素液（4%セルラーゼオノズカR10, 0.2%マセロザイムR10, 6.5%マンニトール, 0.1%CaCl₂・2H₂O, pH5.8）で25℃, 3時間処理して単離した。

Ptの培養方法は、アガロースビーズ法と保護培養を併用¹⁾し、2種の初代培地（R2, NO₃培地）と数種の保護細胞を供試し、コロニー形成率を調査した。

(2) Ptからの植物体再生条件の検討(1990年)

1) 培養条件と葯由来カルスの再分化能との関係

5日間10℃で低温処理した葯を供試し、葯の浮遊培養培地（N6培地）のホルモン組成（NAA, 2, 4-D）と誘導カルスの再分化率との関係を調査した。

また、誘導した再分化率の高いカルスについては、懸濁培養条件と再分化能の維持との関係を検討するため、基本培地（R2, N6, B5培地）、ホルモン組成（NAA, 2, 4-D）と糖組成を異にする培地で振盪培養（18日間）を行い、N6再分化培地（0.1 μM NAA, 0.5 μM BA, 2%ショ糖, 3%ソルビトール, 1 g/ℓ カザミノ酸, 1 g/ℓ グルタミン, 1%寒天）に移植して再分化率を比較した。

2) Ptの単離と培養方法

Ptの単離用の培養細胞は、葯培養カルスの中で最も再分化能の高いカルスを材料として、前試験と同様にAA培地

を用いて作出した。Ptの単離、初代培養方法は前試験に準じた。

Ptの初代培地は、ホルモン組成を変えた2種のR2培地を供試、また2種の保護細胞を供試して初代培養を行い、培養26日目にコロニー形成数を調査した。コロニー形成後、アガロースブロックを分割してR2液体培地（6%ショ糖, 8%マンニトール, ホルモン組成は初代培地と同じ）に移植して振盪培養を行い、カルスの形成、増殖を図った。

再分化培養は、振盪培養10日目から経時的（7日毎）に1 mm程度に増殖したカルスをN6再分化培地（前記組成と同じ）に移植して行った。

3 試験結果及び考察

(1) Pt培養の初代培地とコロニー形成率

Ptの分裂とコロニー形成はR2培地で認められたが、NO₃培地ではPtの分裂は見られなかった（表1）。Ptの分裂が見られたR2培地では、コロニー形成率が保護細胞の品種により変動し、コロニー形成率はササニシキ>ハツシモとなる傾向を示した。

このことから、Ptの分裂は保護細胞の分裂促進活性によって左右されるものと考えられる。

(2) Ptからの植物体再生条件の検討

表1 Pt初代培地および保護細胞とコロニー形成率(1989年)

初 代 培 地	保 護 細 胞			コロニー形成率 (%)
	品 種	由 来	培 地	
R2 + 0.4M Suc.	ササニシキ	A	R2	16.3
R2 + 0.4M Suc.	ハツシモ	A	R2	7.6
NO ₃ + 0.4M Suc.	コシヒカリ	A	AA	0
NO ₃ + 0.4M Suc.	ササニシキ	SP	R2	0
NO ₃ + 5% Glu.	コシヒカリ	A	AA	0
NO ₃ + 5% Glu.	ササニシキ	SP	R2	0

注. コロニー形成率: Pt培養3週間後に調査。
A: 葯. SP: 苗条原基。

1) 培養条件と葯由来カルスの再分化能との関係

浮遊培養で誘導された葯由来カルスの再分化率はNAA 10 μM + 2, 4-D 1 μM区で高く、再分化率は浮遊培養培地の2, 4-Dの濃度に左右される傾向が認められ、その最適濃度は1 μM前後と思われる（表2）。

次に、懸濁培養培地と再分化率との関係を調査した結果

表2 培地のホルモン組成と葯培養カルの再分化率

葯培養培地		再分化培地		緑体再分化率
NAA	2, 4-D	NAA	BA	
5.0	0.1	0.5	5.0	—
5.0	0.1	0.1	0.5	—
5.0	1.0	0.5	5.0	—
5.0	1.0	0.1	0.5	++
10.0	0.1	0.5	5.0	—
10.0	0.1	0.1	0.5	+
10.0	1.0	0.5	5.0	++
10.0	1.0	0.1	0.5	+++

注. ホルモン濃度: μM +: 50% $\geq$, ++: 50~100%, +++: 100% $\leq$

表3 懸濁培養培地組成と再分化率

	培地組成			移植 カルス 数	緑体再 分化率 %
	NAA	2, 4-D			
R 2	5.0	0.1	a	60	0
R 2	5.0	1.0	a	60	6.7
R 2	10.0	0.1	a	60	1.7
R 2	10.0	1.0	a	60	18.3
R 2	5.0	0.1	b	80	0
R 2	5.0	1.0	b	53	17.0
R 2	10.0	0.1	b	80	0
R 2	10.0	1.0	b	80	36.3
N 6	5.0	0.1	a	80	5.0
N 6	5.0	1.0	a	80	0
N 6	10.0	0.1	a	80	0
N 6	10.0	1.0	a	80	36.3
N 6	5.0	0.1	c	80	0
N 6	5.0	1.0	c	80	0
N 6	10.0	0.1	c	80	2.5
N 6	10.0	1.0	c	80	1.3
B 5	5.0	0.1	a	80	0
B 5	5.0	1.0	a	NT	—
B 5	10.0	0.1	a	NT	—
B 5	10.0	1.0	a	NT	—

注. ホルモン濃度: μM .a: suc. 2%, sor. 3%, YE 1g/ ℓ .b: suc. 5%, Man. 8%, YE 1g/ ℓ .c: suc. 5%, YE 1g/ ℓ .

NT: カルス褐変化のため未実施。

(表3), 再分化はR 2培地で良好であった。ホルモン組成と再分化との関係では, カルス誘導の場合と同様に, 2, 4-Dの濃度により左右される傾向が認められ, $1\mu\text{M}$ 区 $>0.1\mu\text{M}$ 区の傾向を示した。マンニトールを添加して浸透圧を高めた培地で作出した培養細胞は活性が高く, 再分化能が長期に渡り維持できるといわれている¹⁾が, R 2培地に8%マンニトールを添加した場合, 再分化率が向上することが確認された。このことから, Pt由来カルの懸濁培養による増殖にはマンニトールを添加したR 2液体培地を用いることとした。

2) Ptの培養方法

1990年度のPt培養結果を表4に示した。コロニー形成程度について初代培地のホルモン組成間で比較すると, 2, 4-D $1\mu\text{M}$ 単独区が良好であった。コロニー形成数を保護細胞間で比較すると, アケノホシの胚由来の保護細胞を用いた場合はササニシキの葯由来の保護細胞を用いた区に比べ増加する傾向が認められた。

次に, Pt由来カルスからの植物体再生は, Ptの初代培養でアケノホシの胚由来の保護細胞を用いた区で比較的効率的に認められた。しかし, ササニシキの葯由来の保護細胞を用いた場合は, コロニー形成後のカルス増殖が緩慢で, 植物体の再生には至らなかった。

表4 植物体再生に及ぼすPt初代培地と保護細胞の影響 (1990)

初代培地の ホルモン組成 μM	保護細胞 品 種	コ ロ ニ ー 数 ¹⁾	再分化個体数 ²⁾			
			緑体	アルビノ	計	
2, 4-D 1.0	ササニシキ A	3	0	0	0	
+NAA 5.0	アケノホシ E	51	78	0	78	
2, 4-D 1.0	ササニシキ A	83	0	0	0	
	アケノホシ E	100	155	5	160	

注 A: 葯 E: 完熟胚。1): 培養26日後調査。

2): 培養後104日目までの再分化個体数を示す。

4 ま と め

コシヒカリの葯由来Ptからの植物体再生の条件について検討した結果, 再分化能の高いカルスからPt単離用の培養細胞を作出(AA培地)することと, Ptの初代培養(R 2培地)においてPtの分裂促進活性の高い保護細胞(アケノホシの胚由来)を用いることが重要であると思われる。

引 用 文 献

- 1) Kyojuka, J.; Hayashi, Y.; Shimamoto, K. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206: 408-413.
- 2) 仲野英秋, 原田信康, 村山徹, 佐野智義. 1990. イネの苗条原基由来プロトプラストの再分化. 東北農業研究 43: 1-2.
- 3) 小田文明, 金治龍, 吉田泰二, 大槻義昭. 1989. イネ液体細胞培養系の早期安定化・大量増殖および効率的再分化. 育種 39(別2): 58-59.
- 4) 吉田晋弥, 今村耕平, 岩井正志. 1990. イネ懸濁培養における継代培地へのマンニトール添加の効果. 育種 40(別2): 40-41.