

イネの苗条原基由来プロトプラストの再分化

仲野英秋・原田康信*・村山 徹**・佐野智義***

(山形県立農業試験場・*山形県農業経済課・**山形県立園芸試験場・***山形県立農業試験場庄内支場)

Plant Regeneration from Protoplasts Derived from Shoot Primordia in Rice

Hideaki NAKANO, Yasunobu HARADA*, Tohru MURAYAMA** and Tomoyoshi SANO***

(Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station・*Agricultural Economical Section of Yamagata Prefectural Government Office・**Yamagata Prefectural Horticultural Experiment Station・***Shonai Branch, Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

現在、イネは植物体から活性の高いプロトプラストを単離することが困難であるため、植物体の再分化を目的としたプロトプラストは、胚由来の培養細胞から単離している。しかし、培養細胞の分化全能性は継代期間、細胞系、培地組成、継代条件により変動し、長期継代によりその分化全能性を失う。そこで、培養細胞株の更新が容易な培養系と、この培養細胞からのプロトプラストの単離、培養、再分化条件について検討した。

2 試験方法

苗条原基はササニシキ、はなの舞、コシヒカリの完熟胚から修正N6液体培地⁴⁾を用いた回転培養により誘導し、維持、増殖した。苗条原基集塊をR2培地、修正R2培地(R2S²⁾、R2M¹⁾の液体培地に移し、振盪培養を行い

[苗条原基由来の培養細胞作出]

振盪培養 (110 rpm)
16時間照明, 25℃
2~3ヶ月

R2培地
修正R2培地
1週間毎継代

[酵素処理]

30℃, 3時間
暗条件, 静置

Cellulase RS 4%
Macerozyme R10 1%
Mannitol 0.4M, pH 5.6

[プロトプラスト培養]

振盪培養 (30 rpm)
暗条件, 25℃

修正R2培地
プロトプラストの密度を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製し, agarose に包埋後 nurse 培養によりコロニー形成を促した。nurse 細胞はプロトプラスト単離材料と同じとし, agarose block と nurse 細胞を混合して培養した。コロニー形成後カルス増殖培地に移植。

約10日後nurse細胞を除去し継代培養。
約3週

[カルス増殖]

25℃, 16時間照明
(約3,000 lux)
3~5週間

カルスが1mm程度に増殖後, agarose濃度0.5%のN6培地で継代培養。

[再分化]

25℃, 16時間照明
(約3,000 lux)
4~6週間

2mm大のコンパクトなカルスを再分化培地に移植。再分化後ホルモンフリーN6R3培地に移植。

[馴化]

ながら培養細胞を作出した。プロトプラストは Gellulase RS4%, Macerozyme R10 1%, マンニトール0.4Mの酵素処理により単離した。プロトプラストの培養は, Kyo-ukaら²⁾の方法に準じて行ったが, プロトプラストのナース培養は, プロトプラストを単離した培養細胞をナース細胞として, アガロース・ビーズ法³⁾ (Sea Plaque agarose) を用いて行った。コロニー形成後, アガロースブロックを2, 4-D 2 mg/l, ショ糖6%を添加したN6培地に移しカルスの増殖を図った。2mm程度に増殖したコンパクトなカルスをBA 0.1mg/l, NAA 0.01mg/l, ショ糖6%を添加したN6再分化培地N6R1, ビタミン類をMSに変更した修正N6R2とショ糖4%, MSビタミン, MSのCuSO₄・5H₂O, CoCl₂・6H₂O, Na₂MoO₄・2H₂Oを添加し, Feを1/5に変更した修正N6R3培地に移植した。

3 試験結果及び考察

完熟胚由来の苗条原基は, 供試3品種とも2, 4-D 0.1, 0.2mg/lとBA・Kinetin 1, 2, 3mg/lの全組合せで誘導されたが, 長期間の維持, 増殖に適したホルモン組成は, 2, 4-D 0.2mg/lとBA 2.0mg/lの組合せであった。苗条原基は, 培養後3週間ころからカルスとの集合体として誘導される場合が多かったが, 緑色の集合体のみを分離して, 2週間間隔の継代条件で培養すると活発に増殖し, 1年以上の継代が可能であった。なお, 苗条原基はN6再分化培地への移植で再分化した。

苗条原基から直接プロトプラストを単離することが困難であったので, 苗条原基からプロトプラストの単離が可能で培養細胞の作出を試みた。ササニシキでは3種類のR2培地とも, 約2か月間の継代により培養細胞が作出された。しかし, はなの舞とコシヒカリでは培養細胞を得ることが困難であった。

培養細胞が作出されたササニシキのプロトプラストの単離, 培養結果を表2に示した。ナース培養はプロトプラストの初期分裂に必須であることが確認された。プロトプラストの分裂は培養後4~5日目に開始し, 5~20%の効率でコロニーを形成した。肉眼で確認できる程度に増殖したコロニーをショ糖6%, 2, 4-D 2 mg/l, アガロース

図1 イネの苗条原基由来プロトプラストの単離, 培養

表1 完熟胚由来の苗条原基誘導

品 種	ホルモン (mg/l)		苗条原基 誘導程度	品 種	ホルモン (mg/l)		苗条原基 誘導程度
	2, 4-D	BA			2, 4-D	BA	
ササニシキ	0.1	1.0	+++	ササニシキ	0.2	1.0	++
	0.1	2.0	++		0.2	2.0	+
	0.1	3.0	+		0.2	3.0	+
はなの舞	0.1	1.0	+	はなの舞	0.2	1.0	+
	0.1	2.0	+		0.2	2.0	+
	0.1	3.0	-		0.2	3.0	+
コシヒカリ	0.1	1.0	++	コシヒカリ	0.2	1.0	++
	0.1	2.0	+		0.2	2.0	++
	0.1	3.0	+		0.2	3.0	+

注. 苗条原基誘導程度: - : なし, + : 1/9 ~ 3/9, ++ : 4/9 ~ 6/9, +++ : 5/9 ~ 9/9

表2 ササニシキの苗条原基由来プロトプラストの再分化

カルスサ スペン ジョン培地	nurse 細胞 有, 無	コロニー 形成率 (%) a)	カルス 増殖 程度 b)	再分化 培地	再分 化率 (%) c)
R2S	有	22.2	+++	N6R1	36.6
				N6R2	7.5
				N6R3	15.0
R2	無	0	-		
	有	18.8	++	N6R1	24.4
R2M	無	0	-		
	有	5.0	+++	N6R1	1.4
				N6R2	0
				N6R3	12.5
	無	0	-		

注. a) : プロトプラスト培養3週間後の調査
b) : プロトプラスト培養5週間後の調査
c) : 再分化個体数/移植カルス数
プロトプラストの収量: $1 \sim 5 \times 10^6$ /カルス PCV
1 ml

表3 液体振盪培養カルスの比重と再分化率

カルスの 比 重 ※	置床カ ルス数 a	再分 化 カルス数	GS形 成カル ス数	緑体再 分化数 b	再分 化率 (%) b/a
0.4MS<	60	13	21	22	36.7
0.4MS>	60	1	2	1	1.7

注. 再分化培地: N6R3 品種: ササニシキ
※: 0.4 M Suc. 添加再分化液体培地 (0.4MS)
で分画。

0.25~0.5%添加のN6培地に移植すると、カルスの形成が認められた。BA 0.1mg/l, NAA 0.01mg/l を添加したN6再分化培地にカルスを移したところ、細胞培養培地及び再分化培地の種類によって異なったが、高いものでは36%の頻度で再分化した。

一方、コロニー形成後のアガロースブロックを分割し、

R2S液体振盪培養で増殖させたカルスについて、0.4M ショ糖添加の再分化培地を用いて比重分画を行い、再分化培地に移植した (表3)。再分化率は移植カルスの比重により変動したことから、カルスの比重分画操作は再分化率の向上に有効と思われる。

4 ま と め

遺伝的変異が少ないと思われるイネの完熟胚由来の苗条原基から、プロトプラストの単離が可能な培養細胞が作出できた。このプロトプラストはナース培養により活発に分裂し、コロニーを移植することにより、高い頻度で再分化個体を得られた。以上の培養系は、随時に高活性プロトプラストとプロトプラスト由来のカルス及び再分化個体を得る一手法として有効と思われた。

今後、コシヒカリ等の培養細胞が得にくい品種について、活性の高い培養細胞の作出法と効率的なプロトプラストの培養法を検討する必要がある。

引 用 文 献

- 1) Fujimura, T.; Sakurai, M.; AKagi, H.; Negishi, T.; Hirose, A. 1985. Regeneration of Rice Plansts from Protoplasts. Plant Tissue Cult. Lett. 2:74-75.
- 2) 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.
- 3) Shillito, R.D.; Paszkowski, J.; Potrykus, I. 1983. Agarose Plating and a Bead Type Culture Technique Enable and Stimulate Development of Protoplast-Derives Colonies in a Number of Plant Species. Plant Cell Rep. 2: 244-247.
- 4) 吉田泰二, 大槻義昭, 小田文明, 高在 頼. 1988. イネのF₁の in vitro における大量増殖法. 1. 液体培養系の作出と効率的再分化法. 育種 38 (別2): 206-207.