

酒米の完熟胚由来プロトプラストからの植物体再生

中 川 文 彦・清 野 栄 美・仲 野 英 秋

(山形県立農業試験場)

Plant Regeneration from Protoplasts of Mature Embryo Callus in Brewers' Rice

Fumihiko NAKAGAWA, Emi SEINO and Hideaki NAKANO

(Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

イネのプロトプラストから再生した個体には、出穂期、稈長、穂長、アミロース含有率など、重要な農業形質において突然変異が生じることが報告されている⁴⁾。プロトプラスト培養変異を酒米の育種に利用し、栽培上問題となる稈長の改良や寒冷地栽培で有利となる早生化等を図ることは、育種の一手法として有効と思われる。しかし、酒米のプロトプラスト培養に関する報告例はない。そこで、主要な酒米について完熟胚由来プロトプラストの培養方法を検討したところ、効率的な植物体の再生が認められたので報告する。

2 試験方法

山田錦、兵庫北錦、山形酒49号を供試し、それぞれの完熟胚から常法によりカルスを誘導した。図1にプロトプラストの単離、培養の方法を示す。誘導したカルスは懸濁培養培地に移植し、培養細胞の作出を図った。プロトプラストの初代培養はKyouzukaら²⁾の方法に準じて行い、2, 4-D濃度とコロニー形成との関係を検討した。ナース細胞にはアケノホシの完熟胚由来の培養細胞を用いた。プロトプラスト培養により得られたコロニーは、アガロースビーズごと液体カルス形成培地に移植してカルスの増殖を図り、1mm程度に増殖したカルスを、N 6培地に1,000mg/1グルタミン、1,000mg/1 カザミノ酸、2%ショ糖、3%ソルビトール、0.1μM NAA、0.5μM BA、1%寒天を添加した再分化培地に移植し、植物体の再生を促した。

(1) 培養細胞の作出培地の検討

プロトプラスト単離用の培養細胞を作出するため、N 6培地の(NH₄)₂SO₄を除き、KNO₃濃度を1,710mg/1に下げ、AA培地のアミノ酸、2, 4-D1.0mg/1を添加した修正N 6培地(以後N 6 A培地とする)及び2,000mg/1 カザミノ酸、1.0mg/1 2, 4-Dを添加したR 2培地の2種の懸濁培地を供試し、培養細胞の増殖の程度及び単離されたプロトプラストの分裂及びコロニー形成状況を比較した。

(2) プロトプラスト培養における液体カルス形成培地の検討

プロトプラスト培養約3週間後のコロニーを、N 6 A培地、有機物をMS培地に変更し、3%ショ糖、5μM 2,4-Dを添加したN 6培地(以後N 6培地とする)、有機物をMS

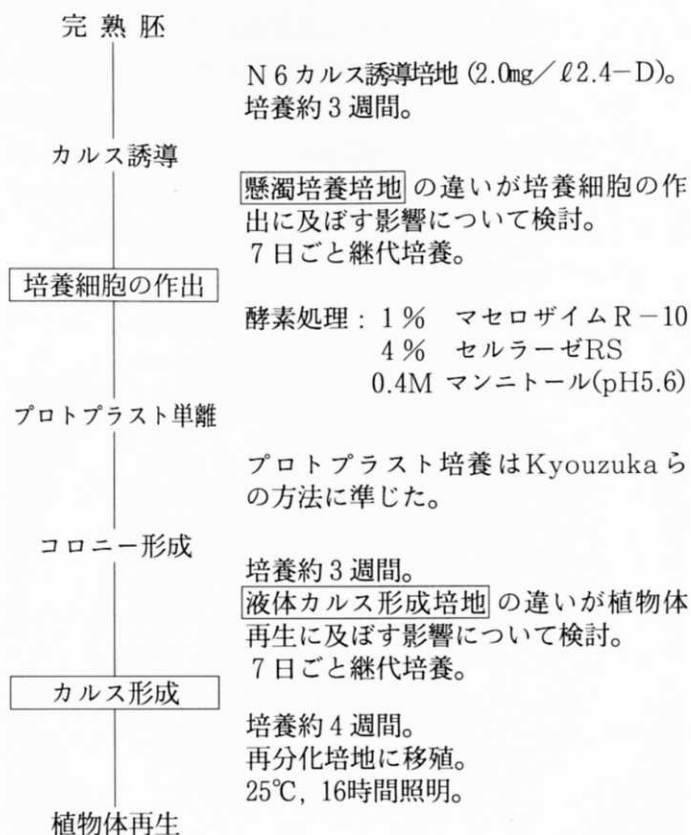


図1 プロトプラストの単離、培養方法

培地に変更し、3%ショ糖、5μM 2,4-Dを添加したR 2培地(以後R 2培地とする)の3種の液体カルス形成培地に移植し、カルスの形成状況とカルスからの植物体の再生効率を検討した。

3 試験結果及び考察

(1) 培養細胞の作出培地

山田錦と兵庫北錦では、N 6 A及びR 2の両懸濁培地で培養細胞の増殖が認められ、プロトプラストの単離に供試できる培養細胞が作出された。山形酒49号では、N 6 A懸濁培地を用いた場合は培養細胞が作出できたが、R 2の懸濁培地では培養細胞の増殖率が低く、プロトプラストの単離には至らなかった。

培養細胞作出培地の相違とプロトプラストからのコロニー形成との関係をみると(表1)、N 6 A懸濁培地由来のプロトプラストでは、山田錦、兵庫北錦、山形酒49号の3品種でコロニー形成が認められた。一方、R 2懸濁培地を用いた場合は、兵庫北錦ではコロニー形成が認められたが、

山田錦ではコロニー形成が認められなかった。以上より、N6 A懸濁培地は3品種に適合することが明らかとなり、汎用性のある培地として他品種にも利用できるものと思われた。

表1 プロトプラストからのコロニー形成に及ぼす懸濁培地及び初代培地の2,4-D濃度の影響

供試材料	懸濁培地	初代培地 2,4-D濃度	コロニー 形成程度*
山田錦	N6A	5(μ M)	+
		10	++
		5	-
兵庫北錦	N6A	10	-
		5	+++
		10	+++
	R2	5	++
		10	++
		5	±
山形酒49号	N6A	10	±
		5	±

注. * 培養1ヶ月後調査

1 シャーレのコロニー数の平均

- : 0 ± : <50 + : <100 ++ : <150

+++ : 200 ≤

イネの培養細胞の作出については、培地中の無機塩組成、特にアンモニア態窒素及び硝酸態窒素の窒素成分及び濃度が、培養細胞の生育及び細胞の褐変に影響を及ぼすことが報告されている^{1, 3, 5)}。本試験においてもアンモニア態窒素を除去し、硝酸態窒素濃度を下げ、AA培地のアミノ酸を添加したN6 A懸濁培地を用いた場合に良好な結果が得られ、窒素成分の重要性が示唆された。しかし窒素成分に関する修正要因と培養細胞の活性との関係は不明である。今後、最適培地を開発するためには更に詳細な検討が必要と思われた。

なお、プロトプラスト初代培養における2, 4-D濃度の相違と、コロニー形成との関係は判断としなかったことから、2, 4-D濃度は重要な要因ではないものと思われた。

(2) 培養細胞作出培地及びプロトプラストからの液体カルス形成培地と植物再生

液体カルス形成培地に移植したコロニーは、すべての区においてカルスの形成が認められ、再分化培地に移植することができた。植物体の再生は、すべての組み合わせで認められたが、植物体再生効率には前培養の影響が認められた(表2)。すなわち、山田錦ではN6 A懸濁培地とR2カルス形成培地、兵庫北錦ではN6 A懸濁培地とR2カルス形成培地、山形酒49号ではN6 A懸濁培地とN6カルス形成培地の組合せにおいて、効率的な植物体の再生が認められた。

イネではプロトプラストからカルスを形成させる培地として、固形培地を用いた報告^{1, 2)}、近年では液体培地を用いた効率的な植物体の再生例が報告されている⁵⁾。本試験において、固形培地と液体培地の比較を行っているが(固形培地のデータは未記載)、液体培地を用いた場合には固

表2 プロトプラストからの植物体再生に及ぼす懸濁培地及びカルス形成培地の影響

供試材料	懸濁培地	カルス形成培地別植物体再生率(%) *		
		N6A	N6	R2
山田錦	N6A	29.0(2.8) **	12.5(1.8)	61.5(5.0)
兵庫北錦	N6A	14.0(1.0)	31.1(1.3)	72.5(1.7)
	R2	43.3(1.2)	30.0(1.0)	10.0(1.0)
山形酒49号	N6A	15.0(1.0)	64.3(2.4)	27.5(1.5)

注. * : {植物体再生カルス数/移植カルス数} × 100 (%)

** : ()内は植物体再生カルス当りの再生個体数(本)

形培地を用いた場合と比較して再分化能を有する斉一なカルスが急速、大量に作出できることを確認している。以上から、プロトプラストからのカルス形成に液体培養を用いることは、再分化能の高いカルスを迅速に作出する手法として有効であり、汎用性も高いものと思われた。

4 ま と め

酒米の完熟胚由来プロトプラストから効率的に植物体を再生する培養条件を確立するため、培養細胞の作出培地及びプロトプラストからのカルス形成培地が植物体の再生に及ぼす影響について検討した。その結果、供試した3品種すべてにおいて、培養細胞の作出にはN6培地の(NH₄)₂SO₄を除き、KNO₃濃度を1,710mg/lに下げ、AA培地のアミノ酸、2, 4-D1.0mg/lを添加した修正N6培地(N6 A培地)が適しており、活性の高いプロトプラストが単離された。プロトプラストからの液体カルス形成培地としては、山田錦、兵庫北錦ではR2培地、山形酒49号ではN6培地が適していた。以上の培養条件により、3品種とも比較的効率的に植物体を再生させることが可能であった。

引 用 文 献

- 1) 飯牟禮和彦, 大野清春. 1992. イネカルスの生育と再分化に及ぼす無機塩の効果. 生物研報 7:79-90.
- 2) Kyoizuka, 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) 小川泰一, 福岡浩之, 大川安信. 1993. イネカルス細胞の増殖に対する無機態窒素源の影響. 第13回植物組織培養学会大会講演要旨集: 127.
- 4) 佐野智義, 佐藤晨一, 仲野英秋, 村山 徹, 原田康信. 1991. 「ササニシキ」のプロトプラスト由来系統の変異. 日作記東北支部報 34:37-38.
- 5) 津川秀仁, 大槻義昭. 1993. イネにおける細胞培養系の汎用性. 1. コシヒカリの懸濁培養及び再分化. 育雑 43(別2):121.