

## イネ懸濁培養細胞, プロトプラスト由来カルの植物体再分化能力と稔実性

津川 秀 仁

(青森県グリーンバイオセンター)

Plant Regeneration Ability and Fertility of Rice Suspension Cultured Cells  
and Callus Derived Protoplasts

Hidehito TSUGAWA

(Aomori Green Bio Center)

### 1 はじめに

イネではエレクトロポレーション法による遺伝子導入の材料として完熟種子胚由来の懸濁培養細胞を用いている。その導入効率はかなり安定してきた。しかし、稔実性のある組換え体の作出は期待どおりには作出できていないのが現状である。その原因は、組換えカルスからの植物体再生が低率だったり、組換え植物の種子稔性が消失しているためである。そこで、用いる材料である懸濁培養細胞及びプロトプラストの再分化率、培養再生系統ごとの稔実性について調査し、材料による特性を把握することによって、組換え体作出などの材料選定の資料とする。

### 2 試験方法

(1) 「日本晴」懸濁培養細胞及びプロトプラスト由来カルの再分化

「日本晴」完熟種子胚を滅菌後、MS基本培地(2, 4・D 2 mg/l)でカルスを誘導し、N<sub>0</sub>基本培地(2, 4・D 1 mg/l)の液体培地で振盪培養した。1週間ごとに継代培養を繰り返し、4ヵ月頃の懸濁培養細胞を集魂ごとに分けて1系統とし、再び液体培養で増殖させた。うらごし3日目に再分化前培養培地(P培地)に展開し、1週間後のカルスを再分化培地に移植した。1シャーレについて25個のカルスを置床し、2枚ずつ移植した。再分化調査は50日目頃に行った。

プロトプラストは上記に用いた懸濁細胞から常法にしたがって単離し、コンディショニング培地(アケノホシの細胞をプロトプラスト用培地で4日間培養し、上澄み液を採取、フィルター滅菌したもの)を用いて培養した。コロニーが形成され、0.5mm程度に生育したものをゲルライト培地でさらに3mmほど生育させ、再び三角フラスコで液体培養し、増殖させた後、「うらごし」した細胞を再分化に移した。各プロトクローンごとに再分化率を調査した。

(2) 「コシヒカリ」懸濁培養細胞の再分化率と稔実率

「日本晴」と同様に種子胚からカルスを誘導し、懸濁培養細胞を作成した。液体培地はコシヒカリ専用培地(KSP培地<sup>1)</sup>)を用いた。

培養2ヵ月目の細胞を集魂ごとに増殖し、再分化処理を行った。各系統41カルスから再分化個体を得た。ハウス内

で栽培し、稔実率を調査した。

(3) 「コシヒカリ」再生第2世代の稔実調査

上記の「コシヒカリ」培養再生個体で稔実率の良かった系統の1穂種子をは種し、第2世代目の稔実率を調査した。

(4) 「コシヒカリ」プロトクローンの当代及び第2世代の稔実率

「コシヒカリ」のプロトクローンを養成した。稔実は極めて不良であったが採取できた株の種子を用い、生育させ、稔実率を調査した。

### 3 試験結果及び考察

(1) 「日本晴」サスペンジョンクローンとプロトクローンの再分化の違い(図1, 図2)

サスペンジョンクローン19系統のうち30%以上の再分化率を示したのが6割で、ほとんどが植物体を再生していたが、1系統がまったく再分化しなかった。また、再分化率が80%以上のものと10%以下を示すものがあったことから、継代培養中の懸濁培養細胞は異なる再分化能を持つものが

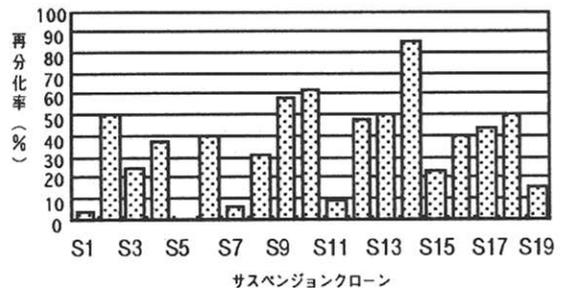


図1 日本晴サスペンジョンクローンの再分化率

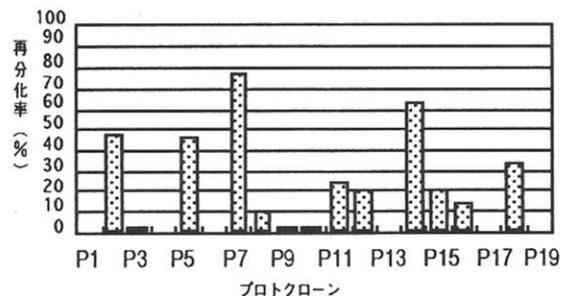


図2 日本晴プロトクローンの再分化率

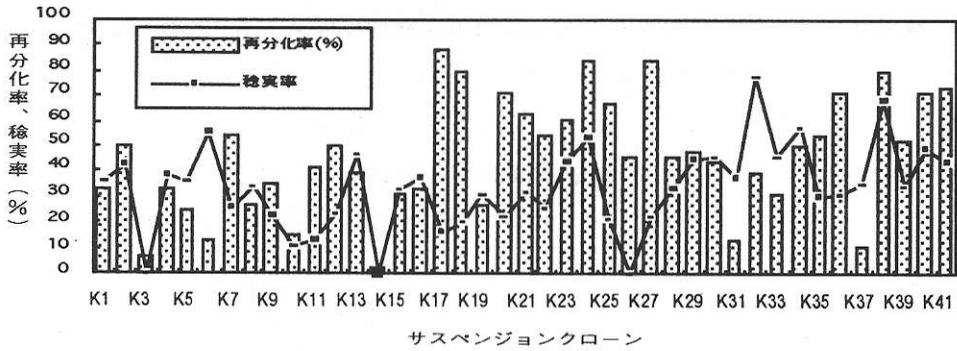


図3 コシヒカリサスペンジョンクローンの再分化率と稔実率の関係

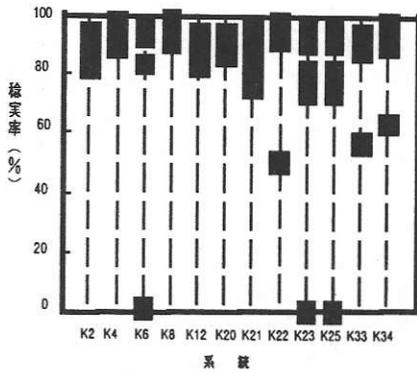


図4 コシヒカリ第2世代個体の稔実率

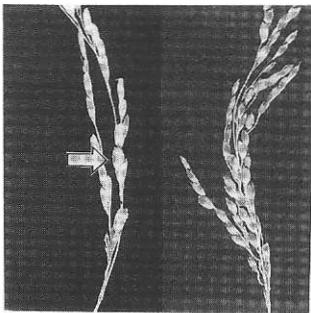


図5 コシヒカリプロトクローン当代及び次世代の稔実性  
左：当代，穎花異常，1粒のみ稔実（矢印）  
右：次世代，稔実率80%

混在していると判断された。

一方、プロトクローンはサスペンジョンクローンより明らかに全体の再分化率が低下しており、まったく再分化しない系統が6系統（全体の31.6%）認められた。このことから、プロトプラスト培養を行うことで、再分化能は低下したり、再分化能を失うことが多くなることが認められた。

(2) 「コシヒカリ」懸濁培養細胞の再分化率と稔実率(図3)

「コシヒカリ」は「日本晴」に比べて、再分化率が低いと報告されているが、2カ月間の培養期間では、全般に非

常に高い再分化率を示していた。「日本晴」と同様、サスペンジョンクローン間には大きな違いがあり、3～90%の幅があった。これらの個体の種子稔性にも、系統間差があり、0～80%であった。特に、再分化率が極めて高いにもかかわらず稔実率が低い系統（K17, K18）があった。また、再分化率が12%と高くなくても、稔実率が58%の系統（K6）もあった。これまで、培養系を改良して、再分化率を高める選抜法を開発してきたが、稔実率は再分化率とは別の要因が関与していることが判明した。したがって、今後は稔実率を考慮した培養法を開発する必要がある。

(3) 第2世代の稔実率

次世代では、当代植物よりも全般に非常に高い稔実率を示していたが、系統の中には数個体完全不稔及び極めて低率の株が含まれていた(図4)。このことから、培養個体の稔実性は遺伝的に安定していないことを示唆していた。培養変異について未知な点が多いが、稔実性も遺伝的に不安定要因の一つになっていることが考えられた。

(4) 稔性不良プロトクローンの回復

「コシヒカリ」プロトクローンのうち、非常に生育が不良で、稔性も極めて悪い株から採取した種子の次世代は、生育量も回復し、稔性も回復(稔実率80%程度)していた(図5)。生育不良個体のすべてが、世代を進めることで稔実性が回復するとは言いきれないが、培養当代が不良な株でも回復する可能性が認められた。

4 まとめ

以上のように、培養することによって再分化率及び稔実率が大きく変動することが明らかとなり、培養に注意が必要であることが再認識できた。また、次世代における稔実性の不安定さ、あるいは、稔実性回復の可能性も同時に示唆された。

引用文献

1) 津川 秀仁, 廣近 洋彦, 杉本 和彦, 山崎 宗郎, 大槻 義昭. 1994. コシヒカリへのイネ縞葉枯病ウイルスコートタンパク質遺伝子の導入. 育種 44(別2) : 49.