

研究ノート

イネカルスからの形態形成と植物体再分化

阿部利徳*

イネのカルスもしくは培養細胞から植物体を効率的に再生させることは、イネの育種にバイオテクノロジーを導入するうえで非常に重要なことである。とりわけ、これからイネでも行われるであろう細胞融合や遺伝子組換による育種を考えるときに、植物体に復元されてはじめて実際の意義を持つ。

筆者らは、多数のイネ品種と異なる組織部位を用いてカルス形成と再分化の実験を行い、日本型やインド型などの亜種間で、同じ亜種内でも品種間で異なる傾向を示すこと¹⁻³⁾、また根由来カルス組織からの再分化では2とおりの再分化様式が観察されることを報告した²⁾。すなわちイネでは従来から多数の報告がある不定器官形成と、胚様体を分化する不定胚形成である。

筆者らの観察では、不定器官形成は種子由来カルスからの再分化で一般に認められる分化様式である(第1図)。この場合は緑色の葉状のものがまず分化し、ある程度、茎葉を発達させてから不定根が分化して植物体へと生長する。イネの不定胚形成については、報告事例は少ないが、これまでに、花粉⁴⁾、葉⁵⁾、種子や未熟胚⁷⁾、幼穂⁹⁾などから embryogenic なカルスを作り、胚様体の形成を経て植物体を再生させたという報告がある。しかしながら組織学的観察を行っているものは1例しかなく、研究者により不定胚についてのとらえ方がやや異なるようであり、あいまいな部分も多い。

筆者らの実験では、根由来カルスから不定胚形成が認められ、あるインド型の品種では特に多数の不定胚を形成し、効率的に植物体を再生させることが可能であった。以下、イネにおける不定胚形成の概略について述べる。

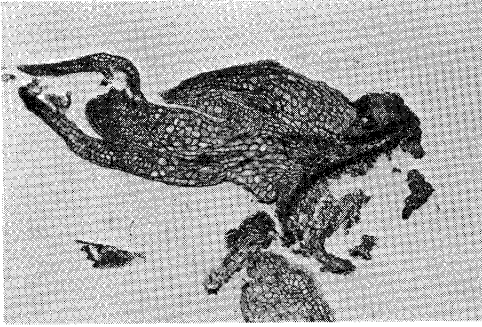
イネの種子を滅菌しシャーレの中で発芽させ 25°C で 5~7 日間生育させると種子根や数本の冠根が生じ、長さが 3~6 cm に伸長する。形成された根の根端を約 1

cm 除いて切りとり、3 mg/l の 2,4-D を含む MS の寒天培地上に置床すると10日目頃から側根原基の部分が丸く突出してきてカルス化する。置床後約 20~30 日後には、透明な粘液質の物質で包まれた小球状カルスの集合体を形成するが、そのまま培養を続けると緻密で白色から淡黄色の embryogenic なカルスが生じる。それをそのままかあるいは 1~2 回継代培養し増殖させて、2,4-D を 0~0.05 mg/l に減じ新たに 0.5~10.0 mg/l のカイネチンを加えた培地に移すと胚様体が生じ発達する(第2図)。イネの胚様体は白色から緑色の胚盤の部分(第2図の右)に隣接して鞘葉があり、内には葉原基と根原基を合わせ持つ二極性の構造となっている。なお胚様体は embryogenic なカルス内に数個から数十個生じるので不定胚が発達するような条件におけば、きわめて効率的に、しかも高頻度で再分化させることができる(第3図)。第4図には異なる passage での胚様体を形成したカルスの頻度を示す。もちろん、品種による違いはあるが、この場合40日ごとに継代培養しているのだから、培養開始してから4カ月目のものでも不定胚形成の頻度は低下していない。ただし不定胚形成の率を低下させないためには、継代培養の際に embryogenic なカルスを選び移植することが大切である。

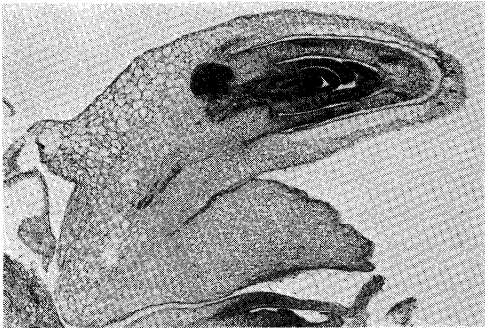
次に不定胚形成のための培養条件についてであるが、筆者の実験では embryogenic なカルスを得るためには Vasil ら⁹⁾が指摘していると同様にオーキシンとして 2,4-D が有効であり、不定胚を形成し発達させるためには、2,4-D の濃度を低め、サイトカイニンとしてカイネチンを添加してやればよい。サイトカイニンをまったく加えない場合は不定胚もできるが、不定根を多く形成する傾向にあるようである。

不定胚形成によって復元した幼植物は種子から発達した幼植物と非常に類似している(第3図)。ただ種子から生じた鞘葉はクロロフィルを持たないが、きわめて少ないのに対し不定胚形成により再分化したのものでは、鞘葉に相当するものは緑色をしている。アルビノ変異もほとんどなく、再分化当代の数十の成熟した植物体でも、

* Toshinori ABE: Morphogenesis and Plant Regeneration from Callus Tissues in Rice
名古屋大学農学部(〒464 名古屋市千種区不老町)
Faculty of Agriculture, Nagoya University (Furo-cho,
Chikusa-ku, Nagoya, 464)



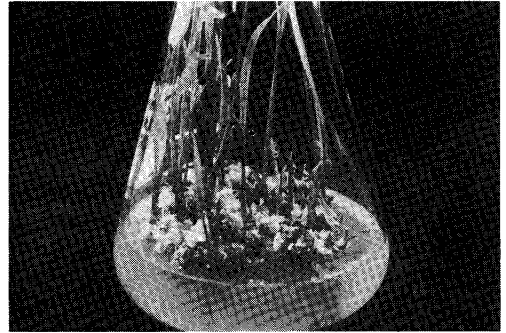
第1図 イネの種子由来カルスからの再分化で不定芽を形成している。



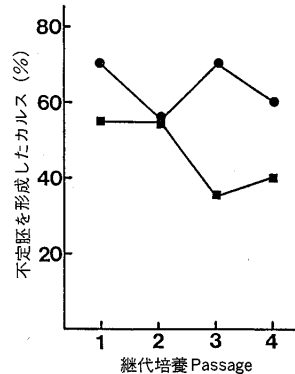
第3図 イネの根由来カルスから分化した不定胚で、鞘葉の下方に隣接して胚盤に相当するものがある。

さらに再分化当代の個体を自殖して得た D_2 系統の植物体でも外部形態も種子稔性の点でも変異は観察されなかった。このことは、カルスから再分化した植物に変異が多数出現するという知見と一致しない。変異が生じないのは不定胚形成という再分化様式をとるためであろうと考えられる。このようにイネの不定胚形成では変異を生ぜず、効率的に多数の植物体を再生することが可能なことから、同じ遺伝子組成のクローン植物の増殖系として利用できる可能性がある。

イネの不定胚形成についての問題点としては次のようなことが指摘できよう。まず第一に、イネの根由来カルスからの再分化では、すべての品種で不定胚を形成するのではなく、品種によっては不定胚形成と不定器官形成が混在していたり、もっぱら不定器官形成のみを行うものもあるということである。さらに同じ品種でも由来組織の違いによっても異なる。筆者らの研究ではイネの不定胚形成は根由来カルスと未熟胚カルスからは生じるが、種子由来カルスからは生じなかった。これらの点は再分化培地に移す前にいかに多くの embryogenic なカ



第2図 不定胚形成により分化したイネの幼植物。5個の embryogenic なカルスから再分化したもので、種々の発達段階のものが認められる。



第4図 イネ根由来カルスの異なる継代培養 passage での不定胚を形成したカルスの割合
● Gaiya Dhan Tosar. ■ Chyokoto

ルスを形成できるかにかかっているように思われる。現在イネの懸濁培養細胞やプロトプラストから不定胚形成を試みている。第二にイネにおける不定胚の組織構造についてである。厳密な意味では不定胚は1細胞から発達し、細胞が分裂し増殖するにしたがって胚様体となるように分化していき、胚盤に附着して鞘葉と根鞘があり、内部に幼芽と幼根が二極性に位置するという構造をとるはずであるが、多数の不定胚と思われるものを組織学的に観察するとコムギでの報告¹⁰⁾にもあるように典型的なものからの例外も多い。筆者らの観察によると、根鞘や胚盤の部分が明確には認められないものとか、幼根の分化がなく二極性になっていないものも存在する。

イネ科の不定胚形成についての報告は著者らの手元にある資料だけでも17種に及んでいるが、もっぱら現象面での研究に重点が置かれてきた。形態形成の一形態として、これからは組織学的にもっと深めるばかりでなく、細胞学的、生理学的、さらには応用面での研究がなされ

なければならぬと思われる。

(1985年2月2日受理)

文 献

- 1) Abe, T., T. Sasahara, 1982. *Jpn. J. Breed.*, **32** : 53-60.
- 2) Abe, T., Y. Futsuhara, 1984. *Jpn. J. Breed.*, **34** : 147-155.
- 3) 阿部利徳, 蓬原雄三, 1984. 育種別 1. **34** : 16-17.
- 4) Guha-Mukherge, S., 1973. *J. Exp. Bot.*, **24** : 139-144.
- 5) Genovesi, A.D., C.W. Magill, 1982. *Plant Cell Rep.*, **1** : 257-260.
- 6) Wernicke, W., R. Brettl, T. Wakizuka, I. Potrikus, 1981. *Z. Pflanzenphysiol.*, **103** : 361-365.
- 7) Heyser, J.W., T.A. Dykes, K.J. Demott, M.W. Nabors, 1983. *Plant Sci. Lett.*, **29** : 175-182.
- 8) Ling, D.H., W.Y. Chen, M.F. Chen, Z. R. Ma, 1983. *Plant Cell Rep.*, **2** : 169-171.
- 9) Vasil, V. and I.K. Vasil, 1984. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (ed. by Vasil, I.K.), p. 36-42.
- 10) Ozias-Akins, P. and I.K. Vasil, 1982. *Protoplasma*, **110** : 95-105.