

## コシヒカリの種子カルス形成・ 懸濁培養と植物体再生

大源正明・阿部聖一

新潟県農業試験場

(〒940 長岡市長倉町 857)

(1993年1月5日受付)

(1993年4月20日受理)

イネの組織培養では品種間における培養難易の存在が指摘されており、種子<sup>1)</sup>、薬<sup>2)</sup>、根<sup>3)</sup>を外植体に用いた組織培養で報告されている。特にコシヒカリはカルスの褐変が著しく、また再分化率がきわめて低いことから、最も培養困難な品種の1つと考えられている<sup>4,5)</sup>。筆者ら<sup>6)</sup>のコシヒカリの懸濁培養の実験においてもカルスの褐変により細胞の維持が困難なため、プロトプラスト培養系の確立に大きな障害となっている。

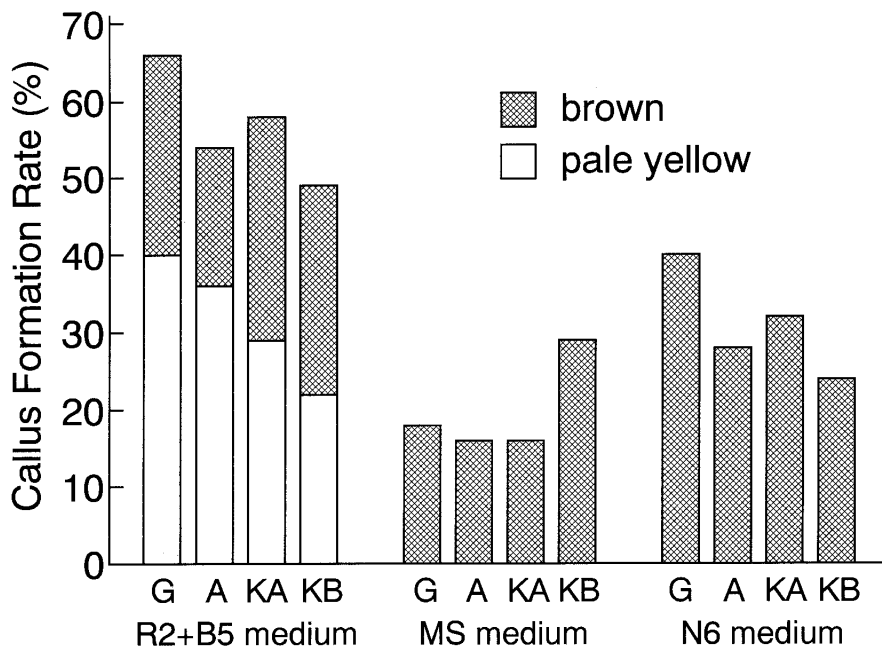
本研究においては、培地成分の希釈によるコシヒカリのカルス褐変の抑制効果を検討し、種子カルスの形成培地、懸濁培養における液体培地および懸濁培養細胞からの植物体再生培地条件を明らかにしたので報告する。

【実験1】コシヒカリの種子カルス形成培地は基本培地と培地固化剤の種類を組み合わせで検討した。すなわち、基本培地にはR2培地<sup>7)</sup>の無機塩にB5培地<sup>8)</sup>のビタミンを加えたR2+B5培地、MS培地<sup>9)</sup>およびN6培地<sup>10)</sup>を用い、各々に2,4-D 2 mg/lとショ糖3%を添加して培地pHを5.8に調整した。培地固化剤としてゲランガム(0.3%;和光純薬工業社製)、アガロース(0.8%;同人化学研究所社製、アガロースI)および寒天2種類(0.8%;清水食品社製、和光純薬工業社製)の4種類を各基本培地と組み合わせで計12種類のカルス形成培地を供試した。コシヒカリの玄米を70%エタノールに3分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で3回水洗して外植体とした。培地25 mlを分注した9 cm径シャーレに5外植体を置床し、各種培地20反復の規模で26°C、300 luxの全日長照明下で30日間培養した。形成されたカルスは色調によって淡黄色のカルスと、濃黄色から茶褐色の褐変し

たカルスに分類し、カルス形成数を測定した。

【実験2】カルスの懸濁培養における液体培地条件を検討するため、カザミノ酸3 g/lを添加したR2+B5培地(RBC培地と略称する)を基本組成として、これを蒸留水で4/5, 3/5, 1/2, 2/5, 1/5および1/10の割合に希釈し(それぞれ4/5 RBC, 3/5 RBC, …と略称する)、無希釈を含めて計7種濃度の液体培地を調製した。各培地に2,4-D 2 mg/lとショ糖3%を添加して、培地pHを5.8に調整した。培地20 mlを分注した100 ml容三角フラスコに、カルス形成培地R2+B5培地(ゲランガム0.3%)で形成された淡黄色のカルス約30 mgを移植して、26°C、90 rpmで14日間振盪培養後、新しい培地と交換してさらに14日間培養し、カルスの褐変程度を観察すると共に圧縮細胞量<sup>11)</sup>を測定した。次に、20メッシュのステンレス網を用いて物理的にカルスを細かくする方法(うらごし操作<sup>12)</sup>)でカルスを処理した後、7日間に一回の割合で継代培養を行い、圧縮細胞量の推移を調べた。なお、圧縮細胞量の測定条件は750×g、2分間とした。培養は各培地とも10反復で行った。

【実験3】再分化培地のホルモン組成を検討するため、1/5 RBC培地を基本組成として、これにNAA濃度を0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5および1.0 mg/lとして、また、Kinetin濃度を0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0および5.0 mg/lとして各々組み合わせて49とおりの濃度区を設けた。それぞれにショ糖3%を加えて培地pHを5.8に調整した後、培地50 mlを直径6 cm、高さ9 cmの円筒状ガラス容器に分注してアガロース1.0%を加えて固化し再分化培地とした。再分化培地に移植するカルスの維持・増殖には2,4-D 2 mg/lとショ糖3%を含



**Fig. 1** Effects of basal medium and gelling agent on callus formation from seed explant. Frequency of callus formation was measured after 30 days of culture on three kinds of basal medium containing 2 mg/l 2, 4-D and 3% sucrose, and expressed as % of no. of seeds with callus formation per 100 seeds tested. Gelling agents : A, Gellan gum 0.3%, B, Agarose 0.8% ; KA, Agar (Shimizu Shokuhin Kaisha, LTD.) 0.8% ; KB, Agar (Wako Pure Chemical Industries, LTD.) 0.8%.

む 1/5 RBC 液体培地を用いて 1 週間毎に継代培養し、かつ 3 週間毎にうらごし操作を行った。うらごし操作後 10 日間培養したカルスを、ホルモンフリーの 1/5 RBC 液体培地で 2 回洗浄してから再分化培地に移植した。移植カルス数は 1 容器につき 10 個とし、各培地とも 3 反復で行った。培養は 26 °C、5000 lux 全日長照明下で 40 日間行った。

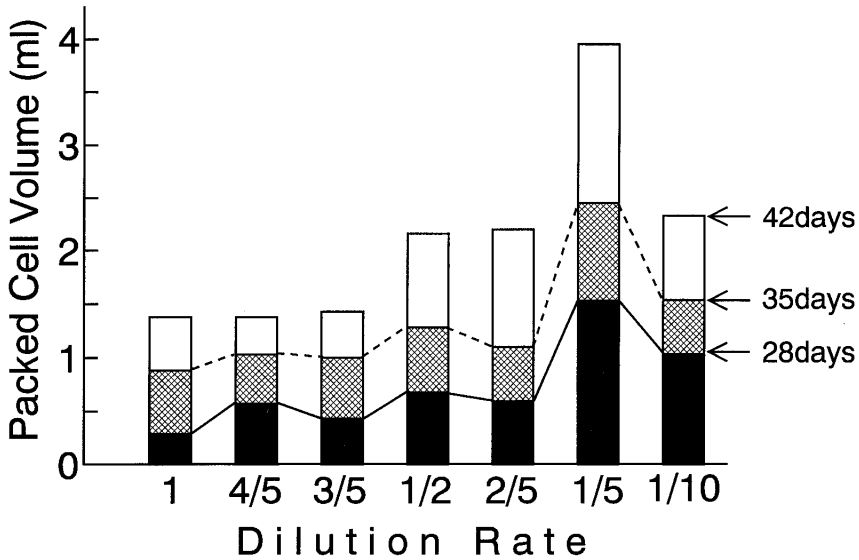
【実験 4】再分化培地のアガロースおよびシヨ糖濃度を検討するため、ホルモンフリーの 1/5 RBC 培地を基本として、シヨ糖濃度が 3% の条件における最適アガロース濃度 (0.8, 1.0, 1.2%)、およびアガロース濃度が 1.2% の条件における最適シヨ糖濃度 (3, 6, 9, 12%) を調べた。最適アガロース濃度を検討した実験には 4 か月間継代培養を行ったカルスを、最適シヨ糖濃度の場合には 6 か月間継代培養したカルスを使用した。移植カルス数および培養条件は実験 3 と同一とし、実験は 10 反復で行った。

種子カルス形成培地を検討した結果を Fig. 1 に示した。3 種類の基本培地を比較すると、MS 培地と N6 培地ではカルス形成率が低く、また、得られたカルスはすべて褐色を呈していた。一方、R2+B5 培地では高いカルス形成率を示し、得られたカルスの半数以上が活発な

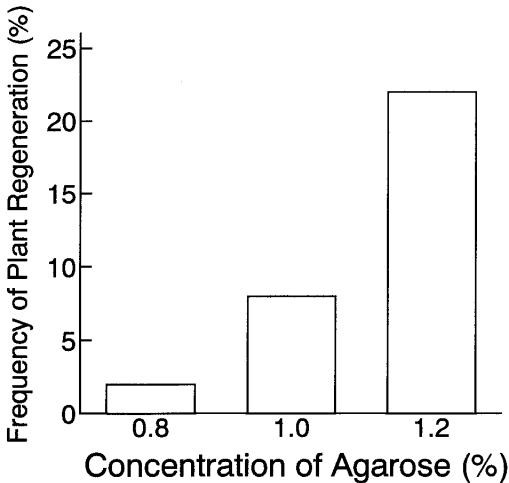
増殖を示す淡黄色のカルスであった。培地固化剤についてはゲランガムを用いた場合に淡黄色カルス形成率が最も高かった。

懸濁培養における培地成分の希釈がカルスの増殖に及ぼす影響を Fig. 2 に示した。最もカルスの増殖率が高かった培地は 1/5 RBC 培地であった。また、振盪培養したカルスを観察すると、無希釈、4/5 および 3/5 RBC 培地において著しい褐変が、また 1/2 および 2/5 RBC 培地ではわずかな褐変が見られた。一方、1/5 および 1/10 RBC 培地ではカルスの褐変が全く認められなかった。

1/5 RBC 培地を基本として NAA と Kinetin を組み合わせた再分化培地上でのカルスの反応は、Kinetin 無添加で NAA を 0, 0.01 および 0.05 mg/l 添加した 3 組み合わせで茎葉分化と共に発根が認められ植物体が再生した。再分化培地に移植したカルス数に対する再生植物体数の割合は 3 組み合わせとも 10% であった。これら以外の 46 組み合わせにおいては植物体再生までに至らなかった。植物体が再生した 3 組み合わせのうち、ホルモンフリー区では再生に要した期間が 2 週間前後と最も短かったため、再分化培地には NAA と Kinetin を添加しない 1/5 RBC 培地が適すると考えられた。次に、

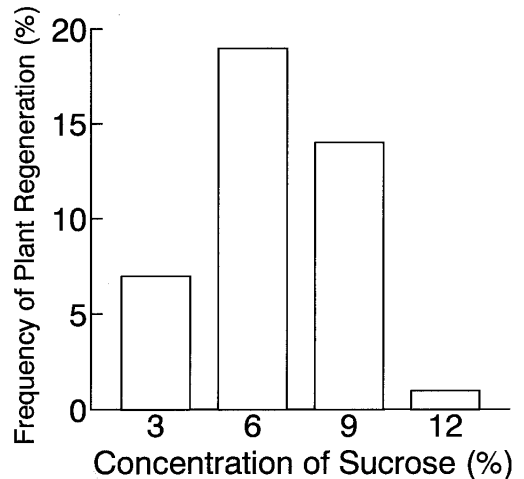


**Fig. 2** Changes of packed cell volume subcultured in various dilutions of RBC liquid medium. About 30 mg of callus tissues formed from seed explant were subcultured for 42 days at 90 rpm in various dilutions of R2 inorganic salts, B5 vitamins, and 3.0 mg/l casamino acids (RBC) liquid medium containing 2 mg/l 2,4-D and 3% sucrose. Packed cell volume was measured after centrifugation at 750×g for 2 min.



**Fig. 3** Effects of agarose concentration on plant regeneration.

Frequency of plant regeneration was measured after 40 days of culture on the 1/5 (R2+B5) hormone-free medium containing 3% sucrose and 0.6 mg/l casamino acids, and expressed as % of no. of calli with plant regeneration per 100 calli tested.



**Fig. 4** Effects of sucrose concentration on plant regeneration.

Frequency of plant regeneration was measured after 40 days of culture on the 1/5 (R2+B5) hormone-free medium containing 0.6 mg/l casamino acids and 1.2% agarose, and expressed as % of no. of calli with plant regeneration per 100 calli tested.

再分化培地に加えるアガロースとショ糖濃度を検討した結果を Fig. 3 と Fig. 4 に示したが、最も高い再分化率を示した組み合わせはアガロース濃度 1.2%、ショ糖濃度 6% であった。

コシヒカリの薬培養において、岩井ら<sup>13)</sup>はカルスの褐変は高濃度のアンモニア態窒素に起因すると考察し、また、安部<sup>14)</sup>はアンモニア態窒素無添加の N6 培地を用いてカルスの褐変を抑制しカルス形成率の向上を図った。

## 文 献

本研究の種子カルス形成においては、R2+B5培地を用いることによりカルスの褐変が抑制され淡黄色のカルスが形成された。供試した3種類の基本培地に含まれるアンモニア態窒素濃度を比較すると、MS培地は20.6 mM、N6培地は7 mM、R2+B5培地は5 mMであり、R2+B5培地が最も低い。しかしながら、R2+B5培地とN6培地の間ではアンモニア態窒素濃度に大きな違いがないことから、種子カルスの褐変は高濃度のアンモニア態窒素だけに起因するものではないことが推察された。また、懸濁培養において、無希釈のR2+B5培地で生じたカルスの著しい褐変が、培地成分を1/5に希釈した場合には観察されないことから、コシヒカリカルスの褐変抑制には培地の塩類濃度を低下することが効果的であると考えられた。

今後は、これらの培養方法を基礎として、コシヒカリの薬培養やプロトプラスト培養の効率化を図れるものと推察される。また、本報告に示した培養系はコシヒカリの細胞選抜にも有効な手段を提供できるものと期待される。

- 1) 前田英三, 1967. 日作紀, **36**: 233-239.
- 2) 大野清春, 1975. 農技研報 D, **26**: 139-222.
- 3) Abe, T., Y. Futsuhara, 1984. Japan. J. Breed., **34**: 147-155.
- 4) 岩井正志, 吉田晋弥, 岩井豊道, 塩飽邦子, 1990. 兵庫中農技研報 (農業), **38**: 13-16.
- 5) 小田文明, 金 治龍, 吉田泰二, 大槻義昭, 1989. 育雑, **39** (別2): p. 58-59.
- 6) 大源正明, 大島澄子, 1992. 北陸作報, **27**: 54-55.
- 7) Ohira, K., K. Ojima, A. Fujiwara, 1973. Plant Cell Physiol., **14**: 1113-1121.
- 8) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. Exp. Cell Res., **50**: 151-158.
- 9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 10) Chu, C. C. *et al.*, 1975. Sci. Sinica, **18**: 659-668.
- 11) 原田 宏, 鎌田 博, 1979. 植物細胞組織培養 (原田宏, 駒嶺 稔編), p. 55, 理工学社, 東京.
- 12) 大槻義昭, 吉田泰二, 山地チカ子, 亀島雅史, 1988. 育雑, **38** (別1): p. 78-79.
- 13) 岩井正志, 吉田晋弥, 渡辺和彦, 1990. 近畿中国農研, **80**: 14-17.
- 14) 安部欣司, 1992. 育雑, **42**: 403-413.

## Summary

Callus Formation from Seed Explant, Growth in Suspension Culture and Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L. cv. Koshihikari)

Masaaki DAIGEN and Seiichi ABE

*Niigata Agricultural Experiment Station,  
Nagakuramachi 857, Nagaoka, 940 Japan*

The tissue culture system of rice (cv. Koshihikari) was investigated. Callus formation from seeds on R2 inorganic salts and B5 vitamins medium containing 2 mg/l 2, 4-D was the most effective. The calli formed proliferated well without browning in R2+B5 liquid medium diluted to 1/5 and containing 2 mg/l 2, 4-D. These calli regenerated efficiently on 1/5(R2+B5) hormone-free medium with 6% sucrose and 1.2% agarose.