

研究ノート

サトウキビにおけるカルスの液体振とう培養と植物体再生

松岡 誠***・寺内方克*・小林 真*・中野 寛*

サトウキビの懸濁培養では, Ho と Vasil¹⁾, Ahloowalia と Maretzki²⁾, Srinivasan と Vasil³⁾, Taylor ら⁴⁾および Fitch と Moore⁵⁾らによって, それぞれ embryogenic cell の懸濁培養系の作出が報告されている。しかし, これらの懸濁培養系の作出にもちいられた品種・系統は限られたもので, 多くの品種・系統に適用できる懸濁培養系は, いまだ確立されていないと言える⁵⁾。全能性をもつ安定した懸濁培養系の作出は, これまでいくつかのイネ科作物のプロトプラストからの再分化系確立に重要な役割を果たしてきた⁶⁾。サトウキビにおいても, 高い再分化能力をもつ安定した懸濁培養系の作出は, プロトプラスト培養系確立のための基礎技術として必要であると考えられる。そこで本研究では, サトウキビにおいて, 全能性が長期間維持可能な, しかも効率的で安定した懸濁培養系を作出することを目的として, 5 品種・系統のカルスの液体振とう培養と再分化の条件について検討した。

サトウキビ品種・系統 農林 4 号(NiF 4), 農林 3 号(NiF 3), NCo 310, F 172 および US 76-9 の稍頭部より無菌的に切り出した幼葉からカルスを誘導した。カルスの誘導および継代培養には修正 N6 培地^{7,8)}(0.025 mg/l CuSO₄ · 5H₂O, 0.025 mg/l CoCl₂ · 6H₂O, 0.25 mg/l Na₂MoO₄ · 2H₂O, 100 mg/l myo-inositol に変更)を基本とし, 2 mg/l 2, 4-D, 3% ショ糖, 1% 寒天を添加した培地を用いた。培地はすべての実験で pH 5.8 に調整した。カルスの誘導および継代培養は 26°C, 暗黒

条件下でおこなった。

供試したいずれの品種・系統においても, 置床した外植体の切断面からカルスが誘導された。得られたカルスは, NCo 310, US 76-9 ではすべて黄白色でコンパクトなものであったが, NiF 4, NiF 3, F 172 では黄白色でコンパクトな部位とフライアブルな部位とが混在していた。カルスは黄白色でコンパクトな部位だけを選抜し, 継代培養した。これらのカルスの外観および特徴は, Ho ら¹⁾, Ahloowalia ら²⁾が報告した embryogenic なカルスときわめて似かよったもので, いずれも高い再分化能力をもっていたが, 再分化の過程で明確に不定胚形成を確認することはできなかった。

つぎに寒天培地上で 3 ヶ月間継代した NiF4 のカルスを供試して, 液体振とう培養に用いる培地の条件について検討した。基本培地として MS 培地⁹⁾と修正 N6 培地, およびそれぞれの培地の窒素源を 1/2 に減じた 4 種の培地(以下, MS, N6-1, 1/2 MS, 1/2 N6-1 とする)を用いた。さらに N6-1 については, 500 mg/l カザミノ酸を添加した培地(以下, N6-2 とする)を調整した。各培地とも 2 mg/l 2, 4-D を添加し, ショ糖の濃度は 3% とした。培地 30 ml を分注した 100 ml 容量三角フラスコに, NiF4 の黄白色でコンパクトなカルス 100 mg を移植し, 90 rpm で 21 日間振とう培養した。培養開始後は 7 日毎に新しい培地に交換し, 14 日目にステンレス網(1 mm pore size)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)^{10,11)}によりカルスを処理した。継代時にはカルスの圧縮細胞容積(遠心条件 1,000 × g, 3 分間)を測定した。N6-2 培地で振とう培養したカルスについては, 引き続き 7 日毎に培地 30 ml あたり 1 ml を継代し, 隔週でうらごし操作を加える方法により維持した後, 再分化に適する培地条件を検討した。まず, ホルモンとカザミノ酸の添加の効果を 4 種の培地(Fig. 3)で, さらに糖類とその濃度を 6 種の培地(Fig. 4)で比較した。実験には液体振とう培養で 6 ヶ月間継代したカルスを供試した。液体振とう培養は約 1,000 lux, 再分化培地に置床後の培養は約 5,000 lux の 12 時間照明下で行った。

NiF 4 のカルスを供試して, 液体振とう培養の培地の

Makoto MATSUOKA*, Takayoshi TERAUCHI, Makoto KOBAYASHI and Hiroshi NAKANO

Plant Regeneration from Suspension Cultures in Sugarcane (*Saccharum* spp.).

* 農林水産省国際農林水産業研究センター沖縄支所
(〒907 沖縄県石垣市真栄里 1091-1)

** 現 農林水産省中国農業試験場
(〒721 広島県福山市西深津町 6-12-1)

* Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Okinawa Sub-tropical Station, 1091-1 Maesato, Ishigaki, Okinawa 907, Japan

** Current address: Chugoku National Agricultural Experiment Station, 6-12-1 Nishifukatsu, Fukuyama, Hiroshima 721, Japan

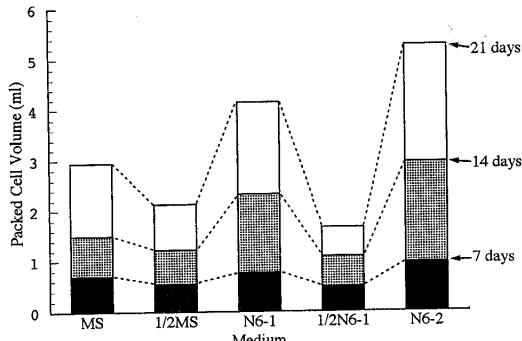


Fig. 1 Effect of basal media and casamino acid on packed cell volume in suspension culture (cv. NiF 4).

Calluses (100 mg) were subcultured for 21 days at 90 rpm in the following media; MS: MS basal salts, 1/2 MS: contained half strength nitrogen sources of MS, N6 - 1: modified N6 salts, 1/2 N6 - 1: contained half strength nitrogen sources of N6-1, N6-2: N6-1 + 500 mg/l casamino acid, and each medium containing 2 mg/l 2, 4-D and 3% sucrose. Packed cell volume was measured after centrifugation at 1,000×g, for 3 minutes. Columns represents the mean values of 5 replicates.

条件について検討した結果を Fig. 1 に示した。21日間の液体振とう培養の結果、圧縮細胞容積がもっとも高い値を示した培地は N6-2 であった。MS と N6-1 の比較では、圧縮細胞容積は N6-1 のほうが高く、また、1/2 MS, 1/2 N6-1 はいずれも MS, N6-1 よりも低い値を示した。培養中に N6-1, N6-2 ではカルスはほとんど褐変しなかったが、MS ではこれより少し褐変し、さらに 1/2 MS, 1/2 N6-1 は著しく褐変した (Fig. 2)。以上の結果は NiF 4 のカルスの液体振とう培養用いる基本培地としては、MS よりも修正 N6 培地の方が良好で、また、カザミノ酸の添加はカルスの増殖を促進することを示していた。したがって以後の実験では、液体振とう培養の培地として N6-2 を用いることにした。

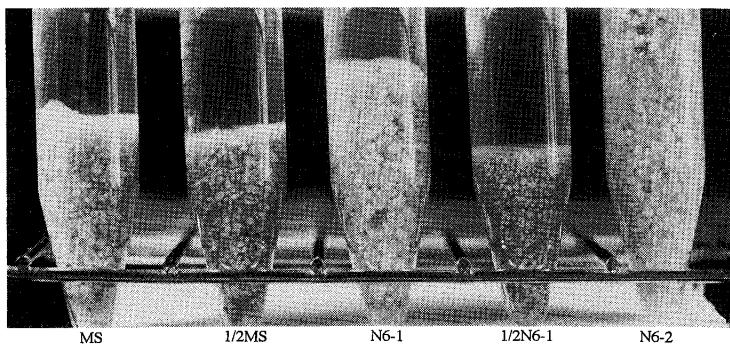


Fig. 2 Comparison of calluses of sugarcane cv. NiF 4, cultured for 21 days in different liquid media.

NiF 4 のカルスは、液体振とう培養による 6 ヶ月間の継代の後にも再分化が可能であった。再分化培地に移植したカルスのうち緑色のシュートを形成したカルスの割合、すなわち、シュート形成率が最も高かったのは 1 mg/l BA, 0.5 mg/l IAA および 1 g/l カザミノ酸を全て加えた R4 培地で 37% であった。ホルモンの比較では、1 mg/l BA を単独で添加した R2 培地よりも 1 mg/l BA, 0.5 mg/l IAA を添加した R3, R4 培地の方がシュート形成率は高かった。この 1 mg/l BA, 0.5 mg/l IAA のホルモン組成は Larkin¹²⁾ がサトウキビ 13 品種のカルスの分化用に有効であると報告しているが、NiF 4 の液体振とう培養で増殖したカルスのシュート形成においても良好な結果が得られた。また、1 g/l カザミノ酸を添加した R4 培地の方が R3 培地よりもシュート形成率は高く、カザミノ酸の添加はシュート形成を促進する効果があるものと考えられた (Fig. 3)。培地に添加する糖類について検討した結果を Fig. 4 に示した。ショ糖だけを添加した培地では、ショ糖濃度が 1.5% の R5 培地のほうが 3% の R4 培地よりもシュート形成率は高かった。ソルビトールを単独で添加した R6, R7 培地は他の培地に比較してシュート形成率が著しく低かった。塚原ら¹³⁾はイネの懸濁培養細胞からの再分化において最適培地を示し、再分化培地には糖類として 3% ショ糖と 3% ソルビトール (浸透圧調節剤として) を添加している。本実験では、ショ糖およびソルビトール濃度が 3% の R8 培地のシュート形成率はショ糖 3% の R4 培地よりも低くなり、3% ソルビトールの添加はサトウキビカルスからのシュート形成にむしろ阻害的であった。一方、ショ糖およびソルビトール濃度が 1.5% の R9 培地のシュート形成率は 61% で、ショ糖 1.5% の R5 培地よりも明らかに高くなり、ショ糖濃度 1.5% においては 1.5% のソルビトールの添加によりシュート形成率は向上した。カルスの再分化におけるソルビトール添加の効果は、浸透圧調節によるものと推測されるが、イネにおいては浸透圧調節以外の要因の存在を示唆した

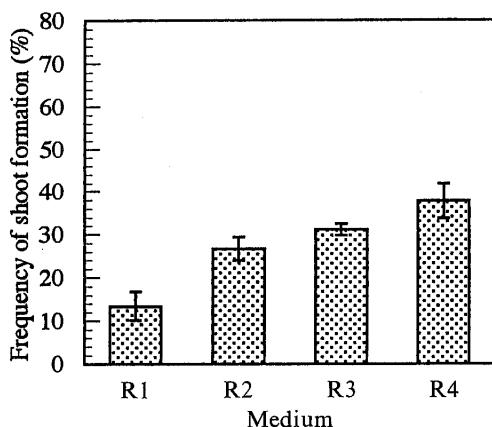


Fig. 3 Effect of plant growth regulators and casamino acid on shoot formation of calluses (cv. NiF 4) subcultured for 6 months in N6-2 liquid media.

Frequency of shoot formation was measured after 40 days of culture on the following media; R1: modified N6 medium containing 3% sucrose and 1% agar, R2: R1+1 mg/l BA, R3: R2+0.5 mg/l IAA, R4: R3+1 g/l casamino acid. Frequency expressed as percentage of calluses regenerating shoots per 18 calluses tested. Bars indicate standard error in 6 replicates.

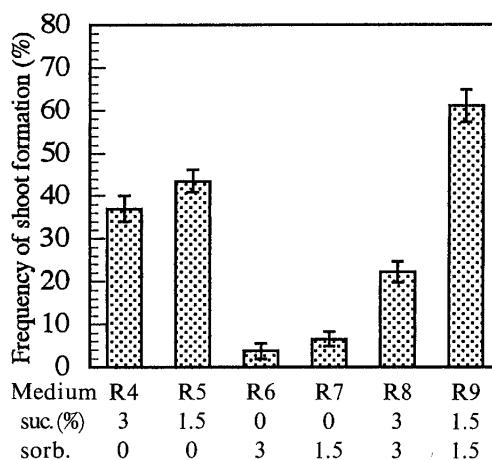


Fig. 4 Effect of concentration of sucrose and sorbitol on shoot formation of calluses (cv. NiF 4) subcultured for 6 months in N6-2 liquid medium.

Frequency of shoot formation was measured after 40 days of culture on the 6 kinds of media containing different concentrations of sucrose (suc.) and sorbitol (sorb.). The frequency calculated with same method as **Fig. 3**, and bars indicates standard error in 6 replicates.

報告もみられる^{13,14)}。再分化培地へのソルビトールの添加については、他の浸透圧調節剤との比較も含め、さらに詳細に検討する必要がある。

NiF 3, NCo 310, F 172 および US 76-9 の寒天培地上で 3 ヶ月間継代したカルスについても、NiF 4 と同様の手法で N6-2 培地による液体振とう培養が可能であった。各品種・系統でカルスの増殖程度などに多少の違いはみられたが、いずれも黄白色、コンパクトなカルスで、うらごし操作後 7 日間の振とう培養によって圧縮細胞容積は約 3 倍に増加した。再分化培地 R9 に移植してから 30 日後の各品種・系統のショット形成率を **Fig. 5** に示した。ショット形成率は品種・系統で大きく異なったが、液体振とう培養で 8 ヶ月間継代した NCo 310, F 172, US 76-9, 6 ヶ月間継代した NiF 3 ともに再分化能力を維持していた。ショット形成率は US 76-9 と NCo 310 がそれぞれ 91, 90% と高く、ついで NiF 3 は 67%, F 172 は 21% であった。今回、液体振とう培養系を作出した 5 品種・系統のうち NiF 4, NiF 3, F 172 および US 76-9 では、これまでに懸濁培養についての報告はみられない。NCo 310 については Taylor ら⁴⁾が 3 mg/l 2, 4-D, 50 mg/l Arginine, 50 ml/l coconut water, 500 mg/l casein hydrolysate を含む MS 培地では、懸濁培養に成功しなかったと報告している。これらの結果より、本実験で用いた液体振とう培養の手法(誘導および継代培

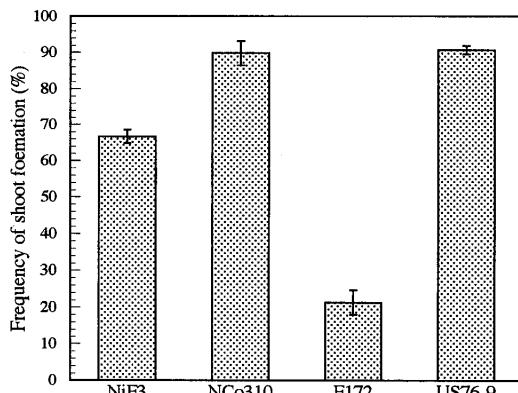


Fig. 5 Comparison of shoot formation of calluses in four sugarcane clones.

Calluses of NiF 3, NCo 310, F 172 and US 76-9 subcultured in N6-2 liquid medium were examined (NiF 3 was subcultured for 6 months, others for 8 months). Frequency of shoot formation was measured after 30 days of culture on the R9 medium. The frequency calculated with same method as **Fig. 3**, and bars indicates standard error in 6 replicates. US 76-9 is F_1 clone of *S. spp. hybrid* \times *S. spontaneum*, and others are *S. spp. hybrids*.

地 N6-2(修正 N6, 3% ショ糖, 2 mg/l 2,4-D, 500 mg/l カザミノ酸), 再分化培地 R9(修正 N6, 1.5% ショ糖, 1.5% ソルビトール, 1 mg/l BA, 0.5 mg/l IAA, 1 g/l カザミノ酸, 1% 寒天)は, サトウキビ属内で広く応用できる可能性が示唆された。一連の実験において, 再分化培地上でシートを形成したカルスは, ホルモンフリーの R1 培地に移植し引き続き培養した。その結果, 90% 以上のカルスから植物体が再生した。

以上, サトウキビ 5 品種・系統において, 長期間にわたり再分化能力を維持できる, 効率的な液体振とう培養系を作出した。本報告に示した培養系は, プロトプラスト培養だけでなく, ストレス耐性細胞の選抜やパーティクルガンを用いた形質転換などの研究に, 広く用いることができるものと期待される。

(1995 年 1 月 14 日受理)

文 献

- 1) Ho, W. J., I. K. Vasil, 1983. Ann. Bot., **51**: 719-726.
- 2) Ahloowalia, B. S., A. Maretzki, 1983. Plant Cell Rep., **2**: 21-25.

- 3) Srinivasan, C., I. K. Vasil, 1986. J. Plant Physiol., **126**: 41-48.
- 4) Taylor, P. W. J., H.-L. Ko, S. W. Atokins, C. Rathus, R. G. Birch, 1992. Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **28**: 69-78.
- 5) Fitch, M. M. M., P. H. Moore, 1993. Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **32**: 335-343.
- 6) Vasil, I. K., V. Vasil, 1992. Physiol. Planta., **85**: 279-283.
- 7) Chu, C.-C., C.-C. Wang, C.-S. Sun, C. Hsu, K.-C. Yin, C.-Y. Chu, F.-Y. Bi, 1975. Scientia Sinica, **18**: 659-668.
- 8) 吉田泰二, 大槻義昭, 小田文明, 高在顥, 1988. 育種学雑誌, **38**(別 2): 140-141.
- 9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Planta., **15**: 473-497.
- 10) 小田文明, 金治龍, 吉田泰二, 大槻義昭, 1989. 育種学雑誌, **39**(別 2): 58-59.
- 11) 大源正明, 阿部聖一, 1993. 植物組織培養, **10**(2): 176-179.
- 12) Larkin, P. J., 1982. Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **1**: 149-164.
- 13) 塚原正義, 廣澤孝保, 1990. 育種学雑誌, **40**(別 2): 54-55.
- 14) 小林等, 廣澤孝保, 1991. 育種学雑誌, **41**(別 2): 254-255.