

## カルの細粒化によるイネ再分化培養の効率化

岡本彰宏\*・岸根しのぶ・廣澤孝保

(株)ナーサリーテクノロジー

(〒329-14 栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚 3377)

\* 現在：キリンビール(株)名古屋工場

(〒452 愛知県西春日井郡新川町大字寺野字花笠 100)

(1996年3月25日受付)

(1996年8月22日受理)

イネ(*Oriza sativa* L.)カルスからの液体再分化培養において、効率的に再分化植物体を得るために、培養途中でのカルの細粒化について検討した。細粒化の方法はブレンダーを使用する方法が良かった。細粒化した後、ホルモンフリー培地で培養してから後培養培地で培養することにより、カルの褐変を防止し、細粒化処理しない場合よりも安定した高い効率で再分化植物体を得ることが可能となった。また、通気攪拌培養槽を使用した場合には、細粒化後に通気中の二酸化炭素を富化(5%)することによって、空気および酸素だけの通気の場合よりも再分化効率が向上し、9700個/lの再分化植物体が得られた。細粒化後の1000~1700  $\mu\text{m}$  および1700~2360  $\mu\text{m}$  のカルス粒径分画から得られた再分化植物体が他の粒径分画よりも顕著に多く、この範囲の粒径で安定した細粒化方法を開発することによってさらに再分化効率が向上する可能性が示唆された。

### 1. 緒言

植物の優良品種を得るためには、従来では、交配から固定までに長期の歳月を要したり、ハイブリッドの $F_1$ の採種をするために多くの労力をかけたりしなければならなかった。ところが、近年では一部の植物において組織培養によるマイクロプロパゲーションにより、優良品種を短期間に効率良く増殖させることが可能となった。しかし、この方法でもまだ短期間で一度に大量の苗を供給するためには、労力やコストの点で問題がある。そこで、注目されるのが植物の外殖片より脱分化細胞(カルス)を誘導し、そのカルスを増殖させた後に植物が本来持つ性質である分化全能性を利用して植物体を再分化させる方法である。この考え方は、Murashigeら<sup>1)</sup>によって提唱された人工種子の基本にもなっている。脱分化したカルスは分化した器官を培養するよりもはるかにその増殖速度が大きいので、クローン苗の生産期間が短い場合には有利な方法である。近年、様々な植物においてその外殖片より誘導したカルスから植物体を再分化させることの成功例が報告されている。著者らはイネ(*Oriza sativa* L.)の優良品種(特に $F_1$ )をクローン苗により供給

するシステムを開発することを目的に研究を進めてきた。最近では、イネにおいても液体振盪培養により効率良く再分化培養系が確立されるとともに培養槽(いわゆる、バイオリアクターまたはファーマンター)での再分化培養も可能となってきている<sup>2-6)</sup>。さらに著者らは培養槽を用いた再分化培養において、酸素を富化した空気を通気することによりその効率がフラスコ培養よりも高くなることを報告した<sup>7)</sup>。著者らが用いた再分化培養系では、まず再分化に先だってカルの増殖過程が存在する。その際にカルスが細かな細胞塊の状態を保ちながら増殖する、すなわち細胞塊内の細胞が増殖して細胞塊が肥大した状態から次に小さな細胞塊に分割しながら増殖するのが望ましい。というのは、増殖した各々の細胞塊から再分化植物体が得られるため、細胞塊数が多いほど多くの再分化植物体が得られるからである。ところが、実際には分割による細胞塊数の増加は増殖途中で頭打ちになり、その後は1個1個の細胞塊の粒径が肥大化してしまう。そのために培養容積当りの再分化効率、すなわち一定の容量を持つ培養容器で得られる再分化植物体数には限度がある。そこで筆者らは培養容器当りの再分化効率向

上を目的として、培養中にカルスを物理的に細粒化する方法を試み、いくつかの知見が得られたのでここに報告する。

## 2. 材料および方法

カルスはササニシキ種子より松野らの方法で誘導した<sup>8)</sup>。ササニシキ玄米を70%アルコールおよび次亜塩素酸ソーダにて殺菌後、N6+Sucrose 10 g/l, Sorbitol 30 g/l, Proline 12 mM, Casein 加水分解物 100 mg/l, 2, 4-D 4 mg/l, MES 5 mM, ゲルライト 2 g/l (pH 5.8)の培地(培地1とする)をいれたシャーレ上に播種し、25°C 暗黒下にて培養した。8日後、生じたカルスのみをはぎ取り、新鮮な培地1上(シャーレ)に移植した。移植して2週間後、肥大したカルスを培地1よりゲルライトを除いた液体培地(培地2とする)100 mlの入った500 ml 容三角フラスコ(底パツフル付)に5 g/lで植え付け、25~27°C, 80 rpm, 照明下で振盪培養した。培養7日毎にナイロン製メッシュで選別した100~1000  $\mu\text{m}$ のサイズのカルスを継代培養した。

再分化培養は継代培養時に、ナイロン製メッシュで選別した1000  $\mu\text{m}$ 以上のサイズのカルスを1 g/lで植え付けた。再分化培養は2段階培養で行い、前培養培地として1/2 N6+Sucrose 10 g/l, Sorbitol 30 g/l, Proline 12 mM, Casein 加水分解物 2 g/l, NAA 0.4 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, MES 5 mM, pH 5.8(F1培地とする)またはN6多量成分+MS微量成分+Sucrose 10 g/l, Sorbitol 30 g/l, Proline 12 mM, Casein 加水分解物 2 g/l, NAA 0.4 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, MES 5 mM, pH 5.8(RIM培地とする)、後培養培地として1/2 N6+Sucrose 15 g/l, Sorbitol 15 g/l, Casein 加水分解物 1 g/l, NAA 1 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, MES 2.5 mM, pH 5.8(F2培地とする)またはN6多量成分+MS微量成分+Sucrose 15 g/l, Sorbitol 15 g/l, Casein 加水分解物 1 g/l, NAA 1 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, MES 2.5 mM, pH 5.8(RAM培地とする)を使用した。(RIMおよびRAM培地は、それぞれF1およびF2培地を再分化期間が短縮されるように改良した培地である。)100 ml 容三角フラスコを使用した場合には、25~27°C, 120 rpm, 約2000 luxの照明下で振盪培養した。また、通気攪拌培養では、全容500 ml(仕込容量250 ml)のガラス製培養槽(柴田ハリオ製)を使用し、30°C, 通気量0.1 vvmで、攪拌速度は前培養40 rpm, 培地交換後(後培養)停止とした。

### (1) カルスの細粒化方法の検討

カルスを細粒化する方法について検討した。2種類の方法を行い、一つは、ステンレス製のメッシュにカルスを強制的に通過させる方法、すなわち、裏ごしを行う方

法で、もう一つは、料理用のブレンダーを用いて細かくする方法である。裏ごしには200, 425, 600, 840, 1000  $\mu\text{m}$ のサイズのステンレス製メッシュを使用し、スパチュラを用いて裏ごしを行った。ブレンダー処理にはOster社(米)のOsterizerを用いて、2および3秒間処理した。再分化培養には100 ml 容三角フラスコを使用し、F1培地20 mlに1000  $\mu\text{m}$ 以上のサイズのカルスを1 g/lで植え付けた。25~27°C, 120 rpm, 照明下で4週間振盪培養後、細粒化処理を行い、F2培地40 mlに交換後さらに2週間振盪培養し、得られた幼植物体をカウントした。

### (2) 細粒化後のホルモンフリー培地による培養の検討

100 ml 容三角フラスコを使用し、F1培地20 mlで4週間培養後、ホルモンを含まない培地(1/2 N6+Sucrose 10 g/l, Sorbitol 30 g/l, Casein 加水分解物 1 g/l, MES 5 mM, pH 5.8, HF培地とする)20 mlに1000  $\mu\text{m}$ 以上のサイズのカルスを1 g/lで植え付け、1週間培養してからF2培地40 mlに交換し、さらに1.5週間培養して得られた幼植物体をカウントした。対照として、4週間F1培地20 mlで前培養後、細粒化しないでF2培地40 mlに交換し、さらに2.5週間培養したものと4週間F1培地20 mlで前培養後、細粒化してすぐにF2培地40 mlで2.5週間後培養したものを行った。なお、細粒化はブレンダーで2秒間処理した。

### (3) 通気攪拌培養での通気条件の検討

通気攪拌型培養槽を用いた再分化培養で、カルスの細粒化を検討した。F1培地125 mlに1000  $\mu\text{m}$ 以上のサイズのカルスを1 g/lで植え付けて3週間培養後、ブレンダーで2秒間処理し、HF培地125 mlで2週間培養した後F2培地250 mlに交換し、さらに2週間培養して得られた幼植物体をカウントした。通気条件は、F1培地による前培養はいずれも酸素100%で、細粒化処理後に酸素100%、酸素40%(純酸素と空気を1:3で混合した)、空気および酸素95%+二酸化炭素5%(純酸素に二酸化炭素5%混合した)の4通りとした。

### (4) 細粒化前後でのカルス粒径とその再分化効率

通気攪拌培養槽を使用し、RIM培地に1000  $\mu\text{m}$ 以上のサイズのカルスを1 g/lで植え付けて酸素100%通気で2週間培養後、増殖したカルスの粒径分布を測定した。粒径分布はメッシュサイズにより105~600  $\mu\text{m}$ , 600~1000  $\mu\text{m}$ , 1000~1700  $\mu\text{m}$ , 1700~2360  $\mu\text{m}$ , 2360~2800  $\mu\text{m}$ , 2800  $\mu\text{m}$ 以上の6分画とした。各分画の生重量を測定後、再度カルスを均等に混合し、その一部をRAM培地40 ml入った三角フラスコで2週間培養し、得られた植物体数をカウントした。また残りのカルスはブレンダーで細粒化した後、再度粒径分布を測定し、それぞ

れの分面を HF 培地 20 ml の入った 100 ml 容三角フラスコで 1 週間培養した後、RAM 培地 40 ml に交換しさらに 1 週間培養後、得られた植物体数をカウントした。尚、三角フラスコに植え付ける時には、カルス生重量と培地量の比率が通気攪拌培養槽における前培養終了時の比率と等しくなるようにした。

### 3. 結果および考察

#### (1) カルスの細粒化方法の検討

結果を **Table 1** に示す。ステンレスメッシュを用いて裏ごしを行ったものは、ほとんど再分化植物体が得られなかった。ブレンダーを用いた場合には、細粒化処理を行わなかった場合よりも、多くの再分化植物体が得られ

た。そこで、細粒化処理としてはブレンダー処理 2 秒で行うこととした。

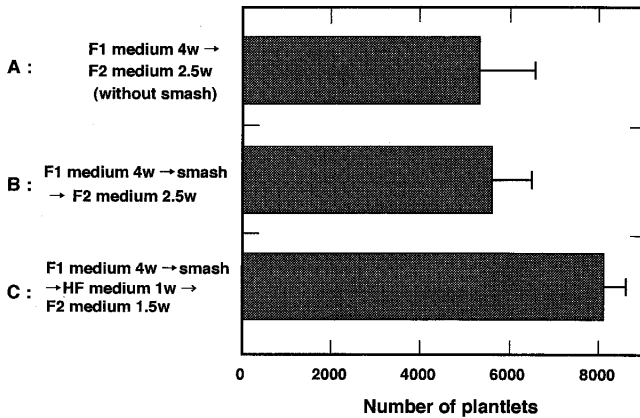
#### (2) 細粒化後のホルモンフリー培地による培養の検討

**Table 1** の実験ではブレンダーによる細粒化で効果が見られたが、ブレンダーで細粒化する実験を繰り返したところ、細粒化後の F2 培地による後培養直後にカルスの一部が褐変して再分化しない場合が多数見られ、培養終了時に細粒化をしない場合とほぼ同数の再分化植物体しか得られない場合が頻繁に発生した。後培養時に褐変が見られない場合には、細粒化による再分化効率の向上効果が確認された。カルスの褐変が生じるのは、ブレンダーによる物理的なダメージをカルスが受けた直後に高濃度のホルモンを含有する培地で培養したストレスのためと推察された。そこで、細粒化後、そのストレスを抑制するため、まずホルモンフリー培地で培養した後に、後培養培地で培養を行った。結果を **Fig. 1** に示す。細粒化後、すぐに後培養培地で培養した場合には、カルスの褐変が顕著で、再分化植物体数は細粒化を行わなかった場合とほぼ同じであった。ところが、細粒化後にホルモンフリー培地で培養してから後培養培地に培地交換した場合には、細粒化後のカルスの褐変があまり認められず、細粒化しなかった場合よりも多くの再分化植物体を得ることができた。いずれの場合にも、褐変を生じたカルスからは植物体は再分化せず、褐変しなかったカルスのほぼすべてから植物体が再分化した。したがって、細粒化直後にホルモンフリー培地で培養することによ

**Table 1** Effect of smashing methods on the regeneration of rice calli.

smashing method	number of regenerated plantlets(/l)
blender 2 sec.	4950
blender 3 sec.	4275
screen ( 200 $\mu$ m)	0
screen ( 425 $\mu$ m)	0
screen ( 600 $\mu$ m)	0
screen ( 840 $\mu$ m)	0
screen (1000 $\mu$ m)	125
without smash	3475

These were cultured in flasks. After 4-weeks culture in F1 medium, calli were smashed and then cultured further for 2 weeks in F2 medium.



**Fig. 1** Effect of the culture in hormone free medium after smashing the calli.

A : Calli were cultured in 100 ml-flasks with 20 ml of F1 for 4 weeks, then cultured in 40 ml of F2 medium for 2.5 weeks without smash.

B : Calli were cultured in 100 ml-flasks with 20 ml of F1 for 4 weeks, then calli were smashed in a blender and cultured in 40 ml of F2 medium for 2.5 weeks.

C : Calli were cultured in 100 ml-flasks with 20 ml of F1 for 4 weeks, then calli were smashed in a blender and cultured with 20 ml of hormone free (HF) medium for 1 week and then in 40 ml of F2 medium for 1.5 weeks.

Bars indicate S. D. ( $n=4$ ).

で細粒化処理で受けた物理的なダメージを回復し、安定して再分化効率を向上することが可能となった。

### (3) 通気培養での通気条件の検討

著者らはすでに通気攪拌培養槽を使用した再分化培養での酸素富化の効果について報告しているが<sup>7)</sup>、細粒化を行った場合の通気条件を検討した。通気中の酸素濃度の効果と二酸化炭素の富化効果について検討した。結果を Fig. 2 に示す。得られた再分化植物体数は通気中の酸素濃度が 40% および 100% の場合では約 7000 個/l、空気の場合には約 6500 個/l とほぼ同じであった。一方、酸素 95%+二酸化炭素 5% の通気の場合には、約 9700 個/l で、二酸化炭素を富化しない場合よりも明らかに多くの再分化植物体を得られた。この実験では細粒化をしないカルのデータがないが、通気攪拌培養槽で酸素濃度 40~100% の通気の場合、細粒化しなくても 5000~6000 個/l の再分化植物体を得られている<sup>7)</sup>。さらに、細粒化しないカルスで二酸化炭素の富化を行った場合を確認していないが、酸素富化通気で 6000 個/l の再分化植物体を得られた場合にはほとんどすべてのカルス塊から再分化植物体を得られていることから、その数を増加させるためには細粒化なしでは不可能と推察される。二酸化炭素がカルの再分化に促進的に働く原因として

は、一つには細粒化直後における物理的なダメージからの回復を促進する効果があるものと推測される。また、イネ幼植物体を無糖培地で育苗する場合に空気のみ(炭酸ガス濃度 0.03%)では生育しないが、炭酸ガス 5% の施用により幼植物体の約 80% が苗に生育することが報告されている<sup>9)</sup>。育苗段階では炭酸ガスは光合成効率を向上させる効果があったものと推察されるが、形態的にまだ発達していないために光合成を行わず、従属栄養であると考えられる再分化段階でもその効果が認められたことは興味深いことである。現時点では詳細は不明であり、今後の研究課題である。

### (4) 細粒化前後でのカルス粒径とその再分化効率

細粒化する前後での粒径分布(生重量分布)を Fig. 3 に示す。細粒化する前はほとんどが 2800  $\mu\text{m}$  以上であるのに対し、細粒化後には依然 2800  $\mu\text{m}$  以上のものが大半ではあるが、カルス径が小さい方にシフトしていることが確認された。次に細粒化しないカルスおよび細粒化後の各分画から得られた再分化植物体数を Fig. 4 に示す。細粒化した場合には、105~600  $\mu\text{m}$  の分画を除き、すべての分画で細粒化しない場合よりも再分化植物体数は多かったが、特に 1000~1700  $\mu\text{m}$  および 1700~2360  $\mu\text{m}$  の分画で顕著に多かった。また、1000  $\mu\text{m}$  以上の分画ではカルス粒径の小さい分画ほど再分化植物体数が多い。これは、フラスコ内の一定量の培地中に増殖可能なカルの生重量は粒径にかかわらずおよそ一定で、この再分化系では 1 個のカルス塊からは 1 個体の植物体が再分化するのが通常なため、一定容積中に占めるカルス数が多い細かな分画ほど植物体数も多くなったものと推測される。105~600  $\mu\text{m}$  の分画で殆ど再分化個体が得られなかったのは、カルスを細かく切断しすぎたために細胞

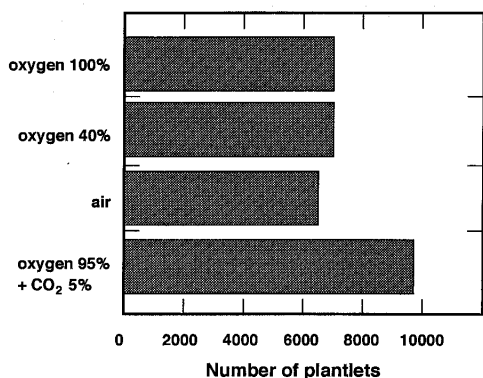


Fig. 2 Effect of the concentration of oxygen or carbon dioxide after smashing the callus in bioreactor culture.

These were cultured in bioreactor with working volume of 250 mL. After 3-weeks culture in F1 medium, callus were smashed and then cultured for 2 weeks in HF medium and then further 2 weeks in F2 medium.

They were aerated with pure oxygen before smashing, and with oxygen 100% (pure oxygen), oxygen 40% (pure oxygen 25%+air), air or oxygen 95%+CO<sub>2</sub> 5% (pure oxygen 95%+carbondioxyde 5%) afterward.

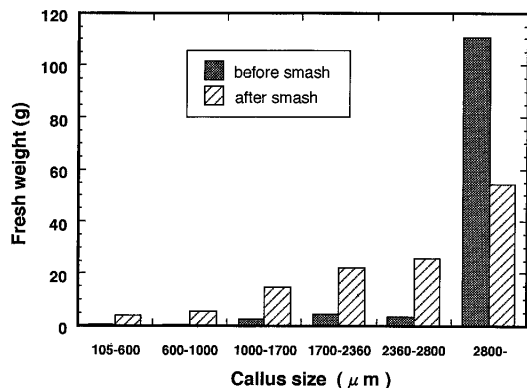


Fig. 3 Classification of callus size before/after smashing the calli.

Calli were classified using sieves after 2-weeks culture in bioreactor with RAM medium under pure oxygen aeration.

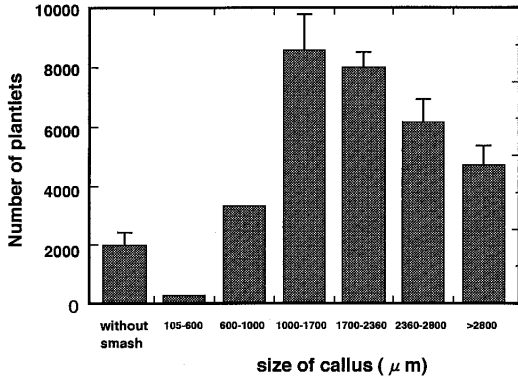


Fig. 4 The efficiency of regeneration in each size of callus after smashing the calli.

Calli were cultured in bioreactor with RAM medium under pure oxygen aeration for 2 weeks and smashed. After classification of smashed calli using sieves, they were cultured in flasks with HF medium for 1 week, followed by the culture with RIM medium for 1 week. Bars indicate S. D. ( $n=2\sim 8$ ).

に与えた物理的ダメージが大きすぎ再分化しなかったものか、あるいは再分化が生じるには1つのカルス塊に一定数以上の細胞数が必要であるものと推測される。また、600~1000 μmの分画では600 μm近辺の細かなカルスが物理的ダメージのため再分化しなかったために全体として再分化個体が少なかったものと推測される。この結果から明らかなように、前培養の終了したカルスを

1000~2500 μm程度の均一な粒径で細粒化できればさらに安定して効率良く再分化植物体を得ることが可能となる。ブレンダーで2秒間という不確実な方法ではなく、安定して一定の粒径が得られる細粒化方法の開発が望まれる。

以上のように、フラスコおよび通気攪拌培養槽による再分化培養で、前培養後に増殖したカルスを物理的に細かくしてから再度培養することで、再分化効率をおよそ1.5倍にすることが可能となった。この方法は、再分化培養においてまずカルス増殖過程があり、かつそれにカルス粒径の肥大が伴う場合に応用可能であると思われる。

#### 文 献

- 1) Murashige, T., 1978. *Frontiers of plant tissue culture* 1978, p. 15-26.
- 2) Yoshida, T., 1988. *Jpn. J. Genet.*, **63**: 611.
- 3) Ozawa, K., A. Komamine, 1989. *Theor. Appl. Genet.*, **77**: 205-211.
- 4) 塚原正義, 廣澤孝保, 1991. 日本植物生理学会 1991 年度年会講演要旨集, p. 90.
- 5) Kobayashi, H., M. Okii, T. Hirose, 1992. *Japan. J. Breed.*, **42**: 583-594.
- 6) 滝川健次, 小西晴夫, 内堀博雄, 曾我部陵, 館山重春, 中園敦之, 1992. *育種学雑誌*, **42**(別冊 1): 18-19.
- 7) Okamoto, A., S. Kishine, T. Hirose, A. Nakazono, 1996. *Plant Cell Reports*, **15**: 731-736.
- 8) 松野司法, 村山治子, 1990. *育種学雑誌*, **40**(別冊 2): 50-51.
- 9) 瀬古往子, 西村正和, 1992. 日本作物学会第 194 回講演会要旨集, No. 92-17.

#### Summary

### Efficient Plant Regeneration by Smashing Callus in Rice (*Oriza sativa* L.) Cell Culture

Akihiro OKAMOTO\*, Shinobu KISHINE and Takayasu HIROSAWA

First Research Center, Nursery Technology Inc., Kitsuregawa-machi, Shioya-gun, Tochigi 329-14, Japan

\* Present address: Nagoya Plant, Kirin Brewery Co. Ltd., Terano, Shinkawa-cho, Nishikasugai-gun, Aichi 452, Japan

Smashing of callus before regeneration in rice (*Oriza sativa* L.) cell culture was studied for the purpose of increasing plant regeneration efficiency. Using a blender was efficient as the method for smashing callus. The culture in hormone free medium for a week after smashing was efficient for decreasing the browning of callus and increasing the number of regenerated plantlets. In the culture using bioreactor with aeration of enriched carbon dioxide (5%), 9700 plantlets were obtained. The number of plantlets regenerated from the callus which size were 1000-1700 and 1700-2360 μm were much more than that regenerated from another size of callus. From this result, more efficient regeneration would be obtained, if a method of smashing the callus uniformly into those sizes could be developed.