

ワイルドライスのカルスの懸濁培養系による 増殖と植物体の効率的な再分化

橋爪不二夫・平野三男

Callus Proliferation in the Suspended Culture System and
Efficient Plant Regeneration of Wild-rice, *Zizania palustris* L.

Fujio HASHIZUME and Mitsuo HIRANO

緒言

ワイルドライス (American Wild-rice) は、北アメリカ原産のイネ科ジザニア属の一年生植物で、食用とする穀粒は高蛋白、高ビタミンで古くから北アメリカ大陸の先住民の重要な食料として珍重されてきた。また本種は、低温発芽性や水中発芽性等が有用な遺伝資源として注目されている。しかしながら、野生形質、特に穀実の成熟期が不揃いであることや脱粒性を強く残しているため、種子の管理、苗移植による栽培及び種子収穫には多大な労力を要する。そこで本種を水稻に代わる新しい作物として導入するために、組織培養を利用した増殖技術の開発を試みてきたが、これの成熟胚から 2,4-D を含む MS 固体培地においてカルスを誘導し、それらのカルスから胚様体を経て植物体を得たことを報告した^{3,4)}。これらの報告では、カルスの誘導及び増殖、再分化系において寒天を含む固体培地を利用しており、カルスの増殖が遅く、カルスからの植物体再分化も不揃いであった。カルス等の細胞培養は、組織培養を利用した種苗増殖の中で最も増殖率の高い手法として期待されており、多くの植物種で不定胚の誘導が報告されている⁵⁾。特にニンジンでは不定胚が高頻度にかつ同調的に誘導される培養系が確立され^{6,10)}、不定胚形成に関する生理生化学研究にも役立っている⁶⁾。これらの中で細胞又は少数の細胞塊からの同調的な増殖、胚様体の誘導及び植物体の再分化が報告されている。そしてイネ科植物でも、イネにおいて同様に液体培地によるカルスの振とう培養法が報告され^{8,10)}、多くの品種で大量増殖が可能となっている。そこでこの液体振とう培養法を利用して、ワイルドライスのカルスの増殖率、更に植物体の再生率を向上させるための培養条件について検討した。

材料と方法

1. ワイルドライス：当所において継続して保存している系統（三重系統, *Zizania palustris* L.）。
2. 供試カルスの誘導及び増殖：前報に示したように種子胚を外植体として用い、2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) を含む MS 固体培地 (Murashige and Skoog, 1962⁹⁾、以下 MS と略す) でカルスを誘導した。本報告では、これらのカルスの一部を 1 mg/ℓ の 2,4-D、及び 1 mg/ℓ の NAA (Naphthyl acetic acid) を含む B5 液体培地⁹⁾ に移植し、維持・継代しているカルスを試験に供した。カルスの継代に用いた培養容器は 100ml の三角フラスコで、100rpm で水平ロータリー振とうし、2 週間毎に継代を行った。また継代から再分化に至る培養を、20°C で 10 時間照明 (約 2,000 ルクス) に設定した培養室もしくは人工気象器内で行った。
3. 胚様体誘導時における前培養：2 週間毎の継代の際にはカルス塊の小粒化を行った。これは粒径が大きくなったカルス塊をピンセットで軽く押しつぶし、小粒にする方法で、その後培地に浮遊した比重が小さい細胞屑を除去することにより均一な小細胞塊 (粒の直径が約 1 mm) を選抜する操作である。カルス塊を小粒化した後、1 mg/ℓ NAA を含む MS 液体培地で 1 日、3 日、7 日間培養した。この前培養後、カルス塊をカルスピペットを用いて、同じ組成で 0.2% ジェランガムを含む再分化培地上に均一に置き、30 日間培養し誘導された胚様体数及び再生した植物体数を調査した。
4. 胚様体の誘導及び植物体の再生：再分化培地のジェランガム濃度を、0.2, 0.4, 0.8, 1.0 (重量%/容積) としてそれぞれの培地に前培養したカルス塊を移植し、15 日後に胚様体の数を調査し、更にジェランガムの濃

度を0.2%とした再分化培地に移植して16日後に再生した植物体の数を調査した。また再分化培地中に添加するNAA濃度を、1.0, 2.0, 3.0mg/lにして、培養約1ヶ月後に葉の伸長（奇形の程度）及び発根の有無を調査した。

5. 植物体の順化：再分化培地上で草丈が4-5cmに伸長した幼苗を植物ホルモンを含まないMS培地（NH₄NO₃及びKNO₃の濃度を1/2とした）に移植し、明期（25℃, 9,000ルクス, CO₂1,000ppm）14時間/暗期（25℃, 暗黒, CO₂自然状態：200~400ppm）10時間に設定したインキュベーターで育成した。この条件をCO₂施用区とし、CO₂無施用区は炭酸ガス以外の条件を同様にした人工気象器に置いた。湿度をそれぞれ終日80%に設定した。培養容器は、容量200mlのプラントボックスとし、上ぶたの2ヶ所に直径5mmの穴をあけてミリシール（φ7mm）を貼付して通気性を確保した。培養2週間後、草丈、茎の太さ、直立性（湾曲の大小）、葉数、葉色、発根数、根長、生体重を調査した。

また予備試験の段階で、滅菌水に再分化したシュートの発根を促進する効果が見られたので、MS培地との組み合わせを第1表のとおり設定し、各時期に水もしくはMS培地で培養し、合わせて6週間培養した後、生育の程度、奇形の有無をもとに、第2表に示した様に個々の苗の健全度を6段階で評価した。

結果及び考察

1. 懸濁培養系の作出

前報ではワイルドライスの種子胚より誘導したカルスから胚様体を誘導し、更に再分化植物を得たことを報告したが、その増殖率については1ヶ月で2~3倍程度であり種苗の大量増殖技術としては不十分であると考えられた。そこで本報告では、カルスを液体振とう培養することで増殖率を従来の数~十倍に高めるとともに、胚様体誘導率・再分化率を向上させるための培養条件を明らかにすることを試みた。

懸濁培養に適した培地の種類を明らかにするため、組織培養によく用いられる代表的な培地の中で第3表に示す8種類の培地を検討した。その結果、それぞれの培地間においてカルスの増殖率に顕著な差は認められなかったが、B5培地でカルスの形状が優れていた。このことから以後の試験ではカルスの増殖培地をB5基本培地とした。次に継代培地に添加する2,4-D濃度について検討したところ2mg/lの場合に培養期間の早い時期に増殖率が高かった（第4表）。これらのカルスには、前報で報告したように2種類の形態が認められた。すなわち液体振とう培養において増殖率が低い胚様体を誘導できるコンパクトな粒状のカルスと、増殖率が高い胚様体を誘導できないフライアブルな（崩れやすい）細かなカルスであった（写真1、第1図）。更に前者のカルスから胚様体の誘導率をより高めるために、2,4-Dのみ

第1表 再分化したシュートを移植する培地及び移植時期の組み合わせ

移植方法	移植時	1週間目	2週間目	3週間目	6週間目
全期間MS	MS培地	→	MS培地	→	調査・順化
1週間水→5週間MS	滅菌水	MS培地	→	→	〃
2週間水→4週間MS	滅菌水	→	MS培地	→	〃
3週間MS→3週間水	MS培地	→	→	滅菌水	〃
2週間MS→4週間水	MS培地	→	滅菌水	→	〃
全期間水	滅菌水	→	滅菌水	→	〃

注) 各週で表記した培地に移植し、矢印は、左記の培地のままで培養を継続することを表す。

第2表 再分化した植物体の奇形を示す数値による評価

培養後の外観評価	評価数値
奇形が全く認められない健全な苗	5
葉色の薄さ、発根の少なさ等、僅かに生長不良が認められる苗	4
軟弱葉、硬化葉、湾曲、矮化のうち1つが認められる苗	3
軟弱葉、硬化葉、湾曲、矮化のうち2つが認められる苗	2
軟弱葉、硬化葉、湾曲、矮化がすべて認められる苗	1
極めて著しい奇形あるいは枯死	0

表2 葉部から抽出したAAIの割合と葉部から抽出したAAIの割合

AAIの抽出率 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)
8.9	16.1	無
13.3	29.9	(1mg/g)

(注) AAIは、葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

表3 葉部から抽出したAAIの割合と葉部から抽出したAAIの割合

抽出されたAAIの割合 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)
1.87 [2.18]	1.97 [2.07]	1.97 [2.07]
2.87 [4.70]	2.07 [2.07]	2.07 [2.07]
3.50 [2.46]	2.07 [2.07]	2.07 [2.07]

(注) AAIは、葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

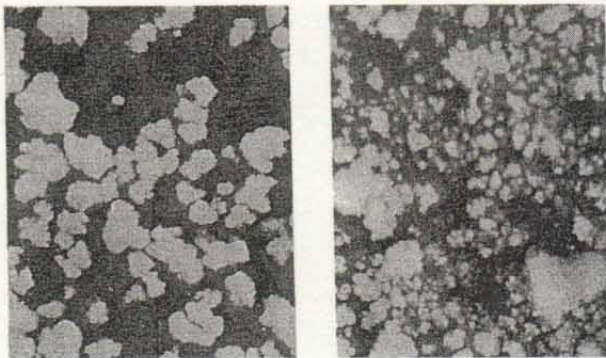


図1 真鍮製のストライク時の果樹の葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合

果樹の葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

果樹の葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

表4 葉部から抽出したAAIの割合と葉部から抽出したAAIの割合

抽出されたAAIの割合 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)	抽出されたAAIの割合 (%)
1.46	1.81	1.86
1.48	1.81	1.86
1.48	1.81	1.86

(注) 基本部は、B2部を用いた。

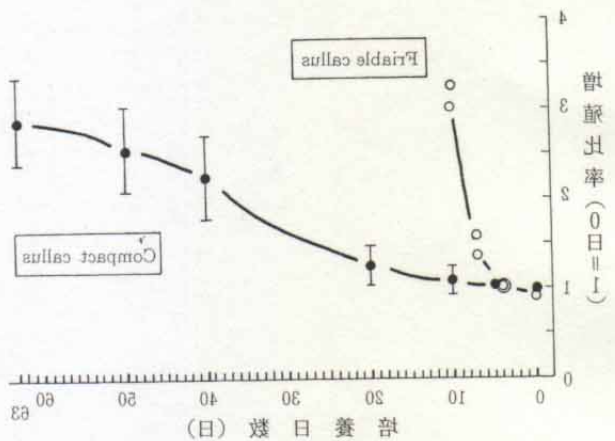


図1 葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合

果樹の葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

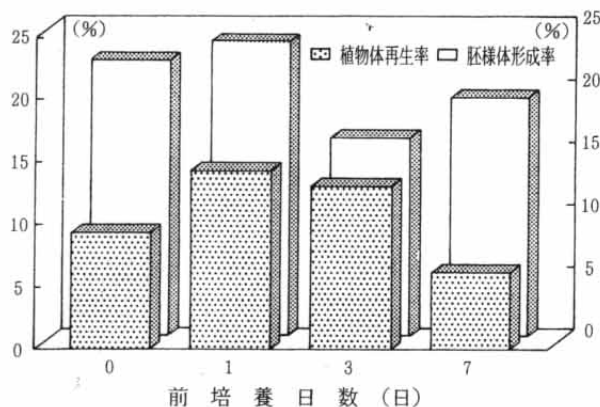
果樹の葉部から抽出したAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。抽出されたAAIの割合は、抽出されたAAIの割合と抽出されたAAIの割合の比を求め、抽出されたAAIの割合を100%とした場合の抽出されたAAIの割合を求めた。

ルスを20メッシュの金網で細かく分割したところ、褐変するカルス塊が多く、増殖を開始するまでに更に2～3回、回復のための継代が必要であった。そのためカルスに対するダメージをできる限り与えずに細かくする方法として、方法の項で述べた「小粒化」を行い、その効果について調査した。小粒化したカルスの増殖率は、2週間の培養により新鮮重で2倍になり、より成熟した胚様体を誘導できるため、植物体再分化率の向上が認められた（第6表）。小粒化処理をしない場合、再分化培地に移植した胚様体は緑化はするものの生長が停止した。小粒化したカルスから誘導した胚様体は移植しないでも茎葉を分化するものもあり、植物体再生が容易であった。しかしながら、この小粒化処理でもいくらかのダメージが残るため、移植後3分の1のカルス塊が褐変した（第6表）。そこで小粒化したカルス塊の液体培地で前培養

第6表 小粒化による胚様体の誘導及び植物体の再生に及ぼす影響

小粒化処理	胚様体誘導率 (%)	植物体再生率 (%)	カルス枯死率 (%)
有	33.2	11.9	33.2
無	8.5	1.8	62.8

注) 継代中のカルス塊を小粒化処理（有、無）後、再生培地（1/2 MS培地に3%ショ糖、0.5gグルタミン、0.2%ジェランガム、0.5mg/l NAA及び0.5mg/l BAを添加した）に移植し、28日後に胚様体数及び植物体再生数を調査。供試したカルス塊（小粒化したものは粒を1個と数えた）の数を、有区を193個、無区を164個とした。各数値は供試カルス粒数を分母とした百分率。



第2図 胚様体の形成及び植物体再生に及ぼす前培養の影響

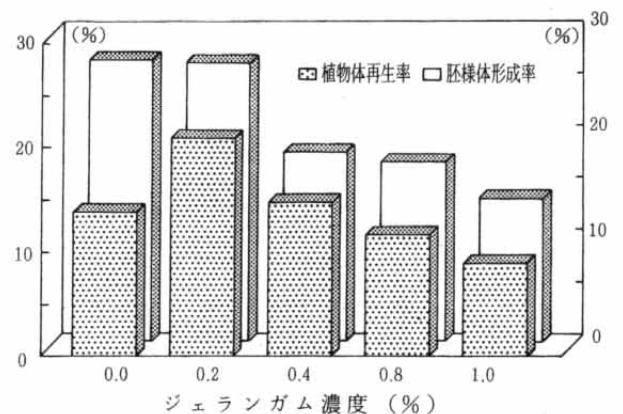
前培養培地：MS培地、1mg/l NAA、3%ショ糖、0.5g/lグルタミン。

胚様体誘導培地：上記の培地に、0.3%ジェランガムを添加した（この試験では、再分化培地も同様の組成とした）。各培養日数、前培養した後、胚様体誘導培地に移植し14日後に胚様体数を調査し、更に、1ヶ月後に再生した植物体数を調査した。各試験区で、小粒化したカルス塊を、150-200個を供試した。

することにより褐変を緩和し、更に植物体の再分化率を向上させることを検討した。1mg/l NAAを含むMS液体培地による前培養期間は1日間が最も良く、胚様体形成率、植物体再生率ともに高かった（第2図）。この小粒化操作を継代のときに適宜加えることが、懸濁カルスの増殖率の向上、更には形成される胚様体の同調化・成熟に有効であることがわかった。

次に誘導した胚様体から効率よく再分化植物を得るための培養条件について検討した。まず胚様体誘導に及ぼすジェランガムの濃度の影響をみると、高濃度区ではカルスの枯死が多く、低濃度区で胚様体形成率が高かった。胚様体形成率及び植物体の再生率は0.2%区で最も高くなったが、その後の胚様体の分化・生長まで含めると0.4%区で、形成した胚様体が植物体にまで生長する率が最も高くなった（第3図）。再分化培地中のNAAの濃度については第4図に示したように0～1mg/lで健全な植物体の得られる割合が高かった。高濃度のNAAでは褐変防止と発根促進効果は認められず、むしろ奇形株の割合が高くなった。この培養苗に認められる奇形には、茎葉部では、軟弱なための湾曲、矮小化、そして花部では花軸の徒長あるいは雌花の萎縮等がみられた。

一般に胚様体を利用した懸濁培養系では供試するカルス（エンブリオジェニックカルス）の選抜が重要である。ワイルドライスにおいても細胞生理活性及び再分化能の高い系統を厳選し、これらを継代によって低下させない維持方法をとる必要がある。そのため、継代培地の2,4-D濃度を軽減する（もしくはNAA等に置き換える）、



第3図 胚様体形成及び植物体の再生に及ぼす再分化培地中のジェランガム濃度の影響

基本培地：MS培地、1mg/l NAA、3%ショ糖、0.5g/lグルタミン。

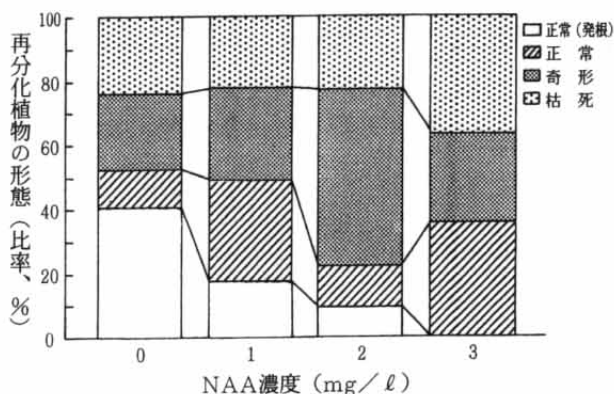
ジェランガム濃度を変えた培地に、各区150-200個の小粒化したカルス塊を移植し、15日後形成した胚様体の数を調査した。更にジェランガム濃度を0.2%とした再分化培地に移植して16日後に再生した植物体の数を調査した。

継代間隔の長期化を避ける（1週間程度）、定期的にカルスを更新できるよう常に高再分化能系統を選抜し続け、固体培地（1ヶ月程度の継代培養期間）で維持しておくなどの措置が必要である。また高い再分化能を持つカルスを凍結などにより長期間保存する方法を明らかにすることも重要なことと考えられる。

2. 順化に適した再分化苗の育成

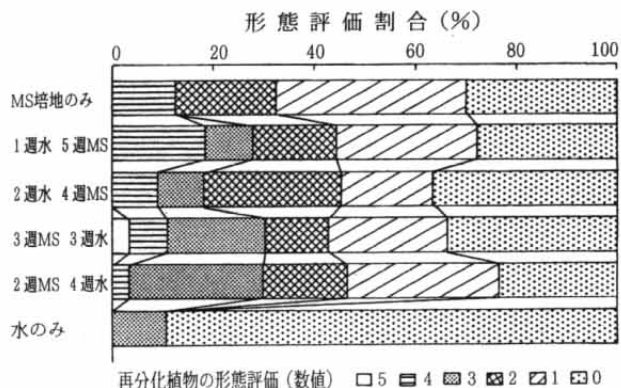
ワイルドライス再分化系において、再分化植物の奇形を抑制し、順化に適した培養苗に成長させるための培養環境条件について検討した。まず二酸化炭素（CO₂）を自然条件に比べ約3倍濃度に高めた場合の生育について調査した。その結果、CO₂施用区では、無施用区に比べて草丈、生体重をはじめすべての項目で高い値を示した（第7表）。特に、ワイルドライスの幼植物体に多くみられる茎の湾曲を直立に矯正することに極めて有効であった（写真2）。また発根促進効果がみられる滅菌水の処理時期及び期間について検討した。その結果、1週間滅菌水-5週間MS区、すなわち最初の1週間だけ滅菌水処理して発根を促進させた後、MS培地にすると、順化に出せる苗、すなわち奇形が少ない苗（指数が5及び4）の割合が最も高かった（第5図）。

培養苗の順化ではビトリフィケーションと呼ばれる試験管内での水浸化が問題となるが、ワイルドライスではこれがさらに顕著で、植物体の軟弱・葉の湾曲といった奇形が多いことが指摘されている。本報告では、炭酸ガス施用により奇形を緩和できることが明らかになった。しかしながら、なお成苗化にまで至る苗の割合は十分とは言えない。順化の難易はいかにして健全な再分化個体を育成するかにかかっているが、奇形が著しく発生すれば健全な植物への回復は不可能であった。一方、再分化苗が健全であれば、順化培養が多少不十分であっても、



第4図 胚様体からの植物体の生長に及ぼすNAA濃度の影響

胚様体誘導培地：MS培地，1mg/l NAA，3%ショ糖，0.5g/l グルタミン，0.3%ジェランガム。
既述したように前培養した後、胚様体誘導培地に移植し14日後に、更にNAA濃度を変えた再分化培地に移植し、1ヶ月後に再生した植物体の形態を調査した。各試験区で、小粒化したカルス塊を、150-200個を供試した。



第5図 再分化苗の奇形抑制に滅菌水処理が及ぼす影響

再分化した幼苗（展開した葉，3-4枚）をX軸（縦）に表示した期間、水、またはMS培地に移植し（第1表）、6週後に形態（奇形の度合いを5段階に評価、第2表）を調査した。各区に30-50個体を供試した。MS培地：3%ショ糖，0.5g/l グルタミン。

第7表 CO₂施用がワイルドライス再分化植物の生長に及ぼす影響

CO ₂ 1000 ppm	草丈 (cm)	茎太さ (mm)	直立性 ^{a)} (枚)	葉数	葉色 ^{b)}	根数(本)		根長 (cm)	生体重 (g)	
						白	緑			
施用	植付時	6.3	1.1	2.7	3.2	3.0	1.2	3.0	0.6	0.21
	調査時	21.0	1.8	4.2	3.5	4.7	2.8	5.0	3.8	0.47
	調査時-植付時	14.7	0.7	1.5	0.3	1.7	1.6	2.0	3.2	0.26
無施用	植付時	5.8	1.6	3.7	2.7	2.5	1.2	3.7	2.5	0.17
	調査時	16.9	1.6	3.7	2.7	2.5	1.2	3.7	2.5	0.21
	調査時-植付時	11.1	0.2	0.7	0.2	0.0	0.5	0.7	1.4	0.04

a) 直立性：植物体の湾曲程度の大小を5段階（5が直立）で評価した平均値

b) 葉色：葉の緑を濃淡により5段階（5が濃い緑色）で評価した平均値

注) 1試験区当たり6株の3~4葉を展開した幼苗を用いた。

試験管外に出した後の生育は順調であった。これらの点も留意してワイルドライスの特性に適合した培養系を確立する必要がある。

以上、本報告に記したワイルドライスのカルス培養、植物体の再分化、及び順化の各段階における結果から、ワイルドライス・カルスの懸濁培養系及び順化方法を第8表にまとめた。

摘 要

本研究では、多くの植物種で行われているカルス培養における懸濁培養系をワイルドライスのカルスにおいて確立するために液体振とう培養における2、3の条件について検討した。更にこれらから得られた再分化植物の試験管内における幼植物段階における培養環境条件について検討したところ以下の結果を得た。

1. ワイルドライスのカルスを小粒化し、更にNAAを含むMS液体培地で前培養（1日）することにより胚様体の誘導率を高め、植物体の再分化に有効であった。

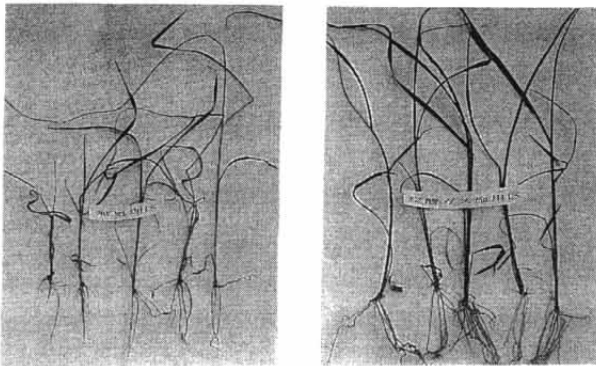


写真2 二酸化炭素を1,000ppmに設定した人工気象器で生育したワイルドライスの幼苗
左：無施用区，右：施用区

2. 胚様体を誘導する培地に1 mg/ℓ NAA及び0.4% ジェランガムを添加することは、胚様体誘導率の向上及び再分化植物の奇形緩和に効果的であった。

3. 再分化した植物体の炭酸ガス施用による生長促進を行ったところ、再分化植物の奇形を軽減することができ、順化適応性が向上した。

4. 再分化した幼植物体を滅菌水で1週間培養することにより、発根が促進された。

引用文献

- 1) Fujimura, T. and A. Komamine (1979) : *Plant Physiol.*, **64**, 162-164
- 2) Gamborg, O., R. A. Miller and K. Ojima (1968) : *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158
- 3) Hirano, Mitsuo and Mitsuru Khono (1990) : *Plant Tissue Culture Letters*, **7** (2), 69-73
- 4) 平野三男・立松伸夫・服部英樹・橋爪不二夫・河野満 (1993) : 三重県農業技術センター研究報告, **21**, 41-50
- 5) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : *Physiol. Plant*, **15**, 473-497
- 6) 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子 (1990) : *バイオホルティ*, **5**, 9-15
- 7) Nomura, K. and A. Komamine (1985) : *Plant Physiol.*, **79**, 98-991
- 8) 大槻義明 (1990) : 実験映像マニュアル イネ・プロトプラスト培養系 (解説), 東京, 社団法人農林水産技術協会
- 9) Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara (1973) : *Plant Cell Physiol.* **14** : 1113-1121
- 10) 小沢憲二郎・駒嶺 穆 (1991) : *植物組織培養*, **8** (3), 147-151

第8表 ワイルドライス・カルスの懸濁培養系

項目		基本培地	2,4-D (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	ジェランガム (%)
カルスの誘導	2ヶ月	MS	4	0	0.2
増殖 (継代)	2週間	B5	1	1	0
小粒化处理 [継代, 胚様体誘導]					
前培養	1日	MS	0	1	0
胚様体の誘導	2週間	MS	0	1	0.4
植物体再分化	1ヶ月	MS	0	1	0.2
順化適応培養	1ヶ月				

{ 滅菌水で1週間培養後、植物ホルモンを含まないMS固体培地に移植、炭酸ガス濃度を1,000 ppmに設定した人工気象器において5週間培養 }

Callus Proliferation in the Suspended Culture System and Efficient Plant Regeneration of Wild-rice, *Zizania palustris* L.

Fujio HASHIZUME and Mitsuo HIRANO

SUMMARY

The callus, being able to regenerate the plantlets of wild rice, was successfully obtained in the suspended culture system. The deformities of the shoot and the flowers were often observed within the regenerated plants of wild rice. As the growth of regenerated plantlets, any treatment didn't suppressed the foregoing deformities in the programmable incubation chamber. Experimental results are summarized as follows.

1. Preincubation in liquid medium for one day after dividing the large calli into small callus was effective for the somatic embryogenesis and the plant regeneration.
2. Regenerated plants were successfully obtained from the somatic embryos on MS medium containing 1 mg/l NAA and 0.4% gelangum.
3. Regenerated plants showed normal appearance when 1,000 ppm carbonic acid gas was supplied for 14 hours a day.
4. The rooting was improved by the incubation of young plantlets in sterile water for 1 week.