

コシヒカリのプロトプラスト培養系を利用した突然変異育種 (第1報) コシヒカリの培養細胞由来プロトプラストからの植物体再生

森 真理・北村 治滋・宇野 弘子・渡辺 健三

Studies on Breeding Using Protoplast-derived Plants in Rice (*Oryza sativa* L.), Koshihikari Variety I. Fertile Plant Regeneration via Rice Protoplasts Isolated from Suspension Cultures

Mari MORI, Harushige KITAMURA, Hiroko UNO* and Kenzo WATANABE

キーワード: イネ, コシヒカリ, 再生植物, 培養細胞, 培養変異, プロトプラスト

培養変異を利用した突然変異育種を行うことを目的に, コシヒカリの培養細胞系を用いたプロトプラスト培養を試みた。

カルスは, N6培地で60日間培養することによって誘導した。培養30日目では誘導されたほとんどの完熟胚由来カルスの褐変が観察されたにもかかわらず, さらに20~30日間培養することにより黄色のフライアブルなカルスが褐変カルスに隣接して形成された。培養細胞は, 得られたカルスをグルタミン添加R2液体培地で振とう培養することにより, 低頻度ではあるが作出することができた。しかし, グルタミンを添加しない培地では培養細胞が作出できなかった。結果として400粒の完熟胚のうち135粒でカルスが形成され, その中から4系統の培養細胞を作出することができた。得られた4系統の培養細胞から増殖能と再生能の高い1系統を選んでプロトプラスト培養を行った。単離されたプロトプラストは培養3~4日目から分裂を開始し, コロニーを形成した。植物体再生には, 6%ショ糖, 1%アガロースを含むホルモンフリーのN6培地にグリシンと粉末酵母エキスを添加した培地が有効であった。850個のプロトプラスト由来コロニーから, 158植物体が再生し, その内, 100個体が稔実した。再生植物当代について形態的な培養変異を調査したところ, 変異が認められた。

1. 緒 言

コシヒカリは, 良食味, 高品質, 広域適応性, 早生, 穂発芽耐性などの優れた性質を合わせ持っている品種であり, 日本においてその市場評価が非常に高い。滋賀県においても, 本品種は広く栽培されており, 1996年度の作付面積は水稻全体の約30%を占めている。しかし, 本品種には耐倒伏性が「弱」という栽培上の問題点がある。これまで, コシヒカリを用いた品種改良が多く試みられ, いくつかの品種が育成されているが,

この品種の優れた遺伝資源を利用する育種は, 現在においてもなお有効であると言われている¹⁾。

1980年代後半に入り, イネのプロトプラストからの植物体再生が報告され^{2, 5, 7, 11, 12, 22, 24)} 得られたプロトプラスト由来植物に培養変異が見られることが明らかとなってきた^{3, 9, 10, 18, 19)}。OGURAら¹⁹⁾ はこれらプロトプラスト由来植物の農業形質を調査し, プロトプラスト培養による変異が育種に利用できる可能性が高いと指摘し, 実際, 現在までにこれらの変異を利用したいくつかの品種が育成されている¹⁰⁾。

*現 滋賀県農林水産部農産普及課

一方、イネの培養効率には品種間差が存在し、コシヒカリは培養の困難な品種であると言われており^{8, 10)}、これまで、コシヒカリのプロトプラストから少数の植物体を再生させた報告はあるが、数多くの再生植物体を作成させた報告はほとんどない。KYOZUKAら¹¹⁾は、コシヒカリにおいてプライマリーカルス由来プロトプラストから数本の植物体を再生させた。しかし、問題点として、プライマリーカルスでは、多数のプロトプラストを単離することが難しく、それから得られたプロトプラストの活性も、培養細胞由来のプロトプラストと比べて、低くなる点を挙げている。このため、プロトプラストからの再生植物体を育種に利用するためには、多数のプロトプラストが得られる培養細胞を用いたプロトプラスト培養系を確立する必要があると考えられる。

我々は、コシヒカリのプロトプラスト培養による変異を利用した突然変異育種を行うことを最終目的とし、本報ではコシヒカリの培養細胞の作出と培養細胞由来プロトプラストから多数の再生植物体を得る培養法を検討した。

2. 材料および方法

2. 1 カルス誘導

材料は滋賀県農業試験場保存の原々種コシヒカリを用いた。計400粒の完熟胚を1%次亜塩素酸ナトリウムで30分間緩やかに攪拌した後、滅菌水で3回洗浄し、カルス形成培地に置床した。培地は、N6基本培地⁹⁾ 1 literに2,4ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) 2 mg, ショ糖30gおよびゲルライト 3 gを添加し、pHを5.8に調整した培地を用いた。培養は、25℃、暗黒下で50~60日行った。シャーレは、上下の段差のないタイプ(直径90mm, 高さ20mm, 西部株式会社)を用い、無シールでシャーレを5枚程度重ね、縦にテープでとめた。

2. 2 培養細胞の作出

完熟胚置床60日後、形成されたカルスを20mlの培養細胞用培地入りシャーレに粒別に移し、暗黒下、60rpmで巡回培養を行った。培養細胞用培地は硫酸鉄(II) 5.6mg, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 7.5mgを含むR2基本培地²⁰⁾ 1 literにMS培地¹⁰⁾のビタミン, グルタミン0.42g, 2,4-D 1mgおよびショ糖30gを添加し、pHを5.8に調整した培地を用いた。カルスは、1週間毎に同じ培

地に植え継いだ。4~6週間後、カルスの植物体再生能を調査するため、一部を再生培地A(表2)に移植した。

2. 3 プロトプラストの単離と培養

作出した培養細胞2ml(圧縮細胞量)と酵素液20mlを100mlの三角フラスコに入れ、30℃で1時間緩やかに振とう処理した後、2時間静置しプロトプラストを単離した。酵素液は、ペクトリアーゼY-23(SEISHIN社) 0.05%, セルラーゼRS(ヤクルト社) 2%, 塩化カルシウム0.01%, デキストラン硫酸カリウム0.1%を含む0.5molマンニトール液を用い、pHは5.6に調整した。単離したプロトプラストは20 μ のナイロンメッシュでろ過し、細胞残渣を除去した後、1000rpm, 5分で遠心分離した。得られたプロトプラストを1 liter当たり塩化カルシウム166mgを含む0.5molマンニトール液で3回洗浄した後、プロトプラスト用培地にプロトプラスト密度 2×10^6 個/mlになるように懸濁した。プロトプラスト用培地は、培養細胞用培地の無機塩類, MS培地のビタミン, 0.4molショ糖を含む液1 literに、2,4-D 2mgを添加し、pHを5.8に調整した培地を用いた。

プロトプラスト培養は、アガロースビーズ法²¹⁾とナース培養法¹¹⁾を併用し、25℃、暗黒下、30rpmで巡回培養とした。プロトプラストはKYOZUKAら¹¹⁾の方法に従って最終密度が 1×10^6 個/mlになるようにアガロース入りプロトプラスト用培地と混合しアガロースブロックを作成した。プロトプラスト入りアガロースブロック(1ml)とプロトプラスト用培地5mlおよびナース細胞100mgを1シャーレ(直径60mm, 高さ15mm)に入れ培養した。培養10日後、ナース細胞を完全に取り除き、プロトプラスト用培地に植え継いだ。コロニー形成率は培養開始14日後に、全プロトプラスト当たりの分裂しているプロトプラスト数を顕微鏡下で調査し、算出した。

2. 4 植物体再生

ナース細胞を除いた約2週間後、プロトプラスト入りアガロースプレートをプロトプラスト用培地と再生前培養用培地を等量混合した培地に植え継いだ。再生前培養培地は、硫酸鉄(II) 5.6mg, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.5mg, 硫酸銅(II) 0.025mg, モリブデン酸ナトリウム0.25mg, 塩化コバルト0.025mgを含むN6基本培地にMS培地のビタミン, プロリン1g, カザミノ酸(ビタミンアッセイグレード, Difco社) 300mg, 2,

4-D 1 mg, ショ糖60gを加え, pHを5.8に調整した。混合培地に植え継いでさらに約2週間後, プロトプラスト入りアガロースブロックを前培養培地に植え継いだ。

プロトプラスト由来コロニーの直径が約1mmに達した時, 表2に示した7種類の再生培地の入ったシャーレ(直径90mm, 高さ20mm)にシャーレ当たり10コロニーずつを移植し, 25℃, 400lux, 16時間日長で培養した。再生培地は, N6培地を基本培地とし, 糖濃度, ホルモン(ナフトレン酢酸(NAA), ベンジルアミノプリン(BAP))濃度, アガロース濃度および添加物(プロリンとカザミノ酸, グリシンと粉末酵母エキス)等について検討した培地の計7種類を用いた(表2)。

2. 5 プロトプラスト由来植物体の培養変異

得られたプロトプラスト由来植物体を温室でポット栽培し, 形態的な変異を遠観で調査した。倍数性は穂の形態と成熟期の稔性で判断した。

3. 結果

3. 1 カルス形成と培養細胞の作出

供試したほとんどの完熟胚からカルスは誘導され, 培養30日目にはカルス形成が認められたが, ほとんどのカルスに褐変が観察された。しかし, さらに20~30日培養を続けたところ, その中から褐変カルスに隣接して黄色のフライアブルなカルスを増殖する完熟胚が認められた(写真1)。この黄色のカルスは, 完熟胚400粒のうち135粒で観察され, 完熟胚あたりの黄色のカルスの形成率は34%に達した(表1)。

さらに, R2培地にグルタミンを加えた培養細胞作出用培地に得られた135の黄色のカルスを移植したところ, 131のカルスは移植後に褐変枯死し, 培養細胞が作出できなかったが, 残りの4カルスからは培養細胞を作出することができた。一方, グルタミンを添加しない培地では, カルスはすべて褐変し, 培養細胞は作出できなかった(データ略)。培養細胞が作出で

表1. コシヒカリにおける培養細胞の作出率

供試数	カルス形成数 ¹⁾	培養細胞作出数 ²⁾
400	135	4

1)培地置床60日目のフライアブルカルス形成数

2)培養細胞用培地はグルタミン添加 R2培地を用いた。



写真1. フライアブルなカルスの形成(培養60日目)

きた4カルスは増殖能の高いカルスであった。これら4系統の培養細胞について植物体再生能の有無を調査した結果, 程度の差が認められたが, いずれの培養細胞も植物体再生能を有していた。その中の2系統は特に高い植物体再生能を有していた。

3. 2 プロトプラストの単離と培養

作出された培養細胞4系統のうち, 増殖能, 植物体再生能ともに最も高かった1系統(M2系統, 写真2a)を選出し, これをプロトプラストの単離の材料とした。

M2系統は増殖能が高く, 1週間で約2.9倍(圧縮細胞量)に増殖した。M2系統を酵素処理した結果, 活性の高いプロトプラストが得られた(写真2b)。プロトプラストの収量は, 培養細胞1ml(圧縮細胞量)当たり平均 1×10^7 個と高かった。単離されたプロトプラストは, 培養3~4日後から分裂を開始した(写真2c)。コロニー形成率は, 40~60%と高率であった(写真2d)。

3. 3 植物体再生

表2で示した7種類の再生培地について, プロトプラスト由来コロニーの植物体再生状況を調査した。直径1mm程度になったプロトプラスト由来コロニーを7種類の再生培地に移植したところ, 3~8週間後, すべての培地で植物体の再生が認められ(写真2e), 計850個のプロトプラスト由来コロニーから最終的に158植物体が再生した(表3)。

7種類の再生培地のうち, 植物体再生率はA培地にグリシンと粉末酵母エキスを添加したD培地が最も高く, 33.6%に達した。次いでA培地が高く, 17.3%, 続いてE培地8.2%, G培地7.3%, C培地5.5%, B培地3.6%, F培地2.7%であった(表2)。A培地とD培地の結果の比較から, 植物体再生率向上にグリシンと粉末酵母エキスの添加が効果的であった。NAA(0.01mg/l)とBAP(0.1mg/l)を添加したB培地ホルモンは, 無添加のA培地と比較して, 植物体再生

表2. 培養組成がコシヒカリのプロトプラスト由来コロニーからの植物体再生に及ぼす影響

培地	糖の濃度 (g/l)		ホルモンの濃度 (mg/l)		アガロース (g/l)	添加物	植物体再生率 ^{D)}	再生植物体数
	ショ糖	ソルビトール	NAA	BAP				
A	60	-	-	-	10	-	19/110 (17.3%)	26
B	60	-	0.01	0.1	10	-	4/11 (3.6%)	4
C	60	-	0.01	0.1	10	1g/l プロリン 0.3g/l カザミノ酸 20mg/l グリシン	6/110 (5.5%)	8
D	60	-	-	-	10	1g/l 粉末酵母-	37/110 (33.6%)	53
E	40	-	0.01	0.1	10	-	9/110 (8.2%)	12
F	20	30	-	-	7	-	3/110 (2.7%)	4
G	60	-	-	-	7	-	8/110 (7.3%)	11

^{D)} 植物体を再生しているコロニー数/全置床コロニー数. 再生培地置床約8週間後に調査した。

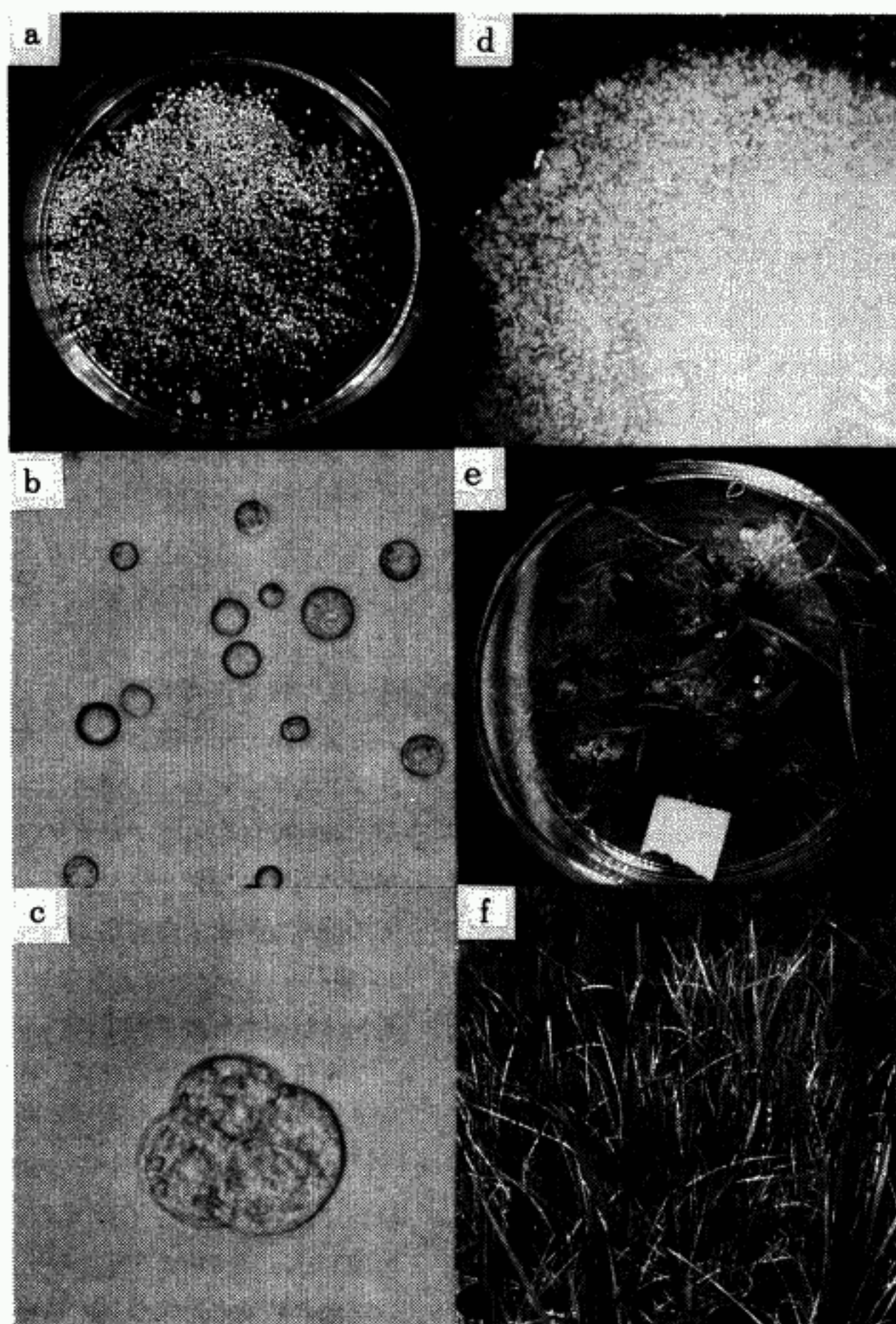


写真2 コシヒカリのプロトプラストからの植物体再生

- a. コシヒカリの培養細胞M2系統 b. プロトプラスト c. 分裂を始めたプロトプラスト
 d. プロトプラスト由来コロニー入りアガロースプレート e. 植物体再生 f. 再生植物体の生育状況

表3. コシヒカリのプロトプラスト由来コロニーからの植物体再生数

供試 コロニー数	再生 植物体数	生育した 植物体数	稔実 植物体数
850 ¹⁾	158	151	100

¹⁾ 再生培地は、A,B,C,D,E,F,G,の7種類を用いた。

率が13.8%も低下し、本培養系では、ホルモン無添加の方が適している事が明らかとなった。また、アガロース濃度が7g/literのG培地は、10g/literのA培地と比較して植物体再生率が半減した。B培地とC培地の結果から、プロリンとカザミノ酸の添加効果は明らかではなかった。

3. 4 プロトプラスト由来植物体の培養変異

得られたプロトプラスト由来植物体158個体を温室内のポットに移植したところ、151個体が生育し、100個体が稔実したが不稔変異が51個体で認められた。穂の形態と稔性等の達観調査の結果、151個体のうち、10個体が半数体、8個体が4倍体と考えられた。

4. 考 察

コシヒカリは、培養中にカルスの褐変枯死が起こる培養の困難な品種であると言われている^{8,10)}。小田ら¹⁰⁾は、イネ24品種について培養細胞の作出を試みた結果、コシヒカリではカルスの褐変が起こり培養細胞は作出できなかったと報告している。我々も、コシヒカリについて検討したところ、カルス形成培地培養30日目ではほとんどのカルスにおいて同様に褐変が観察された。しかし、さらに20~30日培養を続けることにより黄色のフライアブルなカルスを獲得することができた。この原因は明らかではないが、原因として、カルスの吸収や培地の乾燥によって培地成分が変化した、カルスのDNA変異が誘発された、培養中にカルスの生理的な変化が起こった、の3点が考えられる。また、培養細胞用培地では低頻度ではあるが、グルタミンを添加した培地でカルスの褐変が見られない細胞が得られ、培養細胞を作出することができた。グルタミンは、他品種のイネの薬由来培養細胞において細胞塊を小さくする機能があると報告されている²⁰⁾。得られたコシヒカリの培養細胞に細胞塊が小さい傾向が観察されたが、今回の培養細胞作出段階におけるグルタミンの役割に

については今後さらに調査を行う必要がある。

コシヒカリのM2細胞から、プロトプラストを単離したところ、活性の高い多数のプロトプラストを得ることができた。コロニー形成率も高く、多数の植物体も再生できたことから、コシヒカリにおいても、培養細胞の作出さえできればプロトプラスト培養が行えることが明らかとなった。

また、再生培地の検討を行った結果、コシヒカリの本培養系においてはN6培地へのグリシンと粉末酵母エキスの添加によって植物体再生率が2倍に向上する効果が認められた。しかし、この効果は日本晴では認められなかった(データ略)。近年、コシヒカリの培養において、培地の窒素源の濃度や種類が培養効率に影響を及ぼすことが報告されている^{15,17,23)}。本培養系の培養細胞用培地のグルタミンの添加効果および再生培地へのグリシン、粉末酵母エキスの添加効果は、それらの結果と同じ傾向を示す結果となった。

今回、我々は、コシヒカリのプロトプラスト培養変異の育種的利用を目的として、培養細胞由来プロトプラストから再生植物体を効率的に作出できるプロトプラスト培養系を検討した。今回考案した培養系では、コシヒカリの完熟胚からのフライアブルなカルス形成率は34%であったが、形成されたカルスからの培養細胞作出率は3%(4系統)と低かった。増殖能、植物体再生能ともに高い1系統を選出し、プロトプラストの単離を行ったところ、プロトプラストの収量性は高く、コロニー形成率も40~60%と高率であった。さらに、それらプロトプラスト由来コロニーから植物体の再生を試みたところ、全コロニー数の19%に相当する158個体もの多くの植物体を得られ、それら植物体には培養変異が認められた。しかし、今回のプロトプラスト培養系は、培養細胞作出率が低いという問題点があり、育種に利用していくためには、今後さらに培養細胞作出率が高い培養系を検討する必要がある。

引用文献

- 1)阿部欣司:コシヒカリ育成系譜上の水稻品種の薬培養におけるカルス形成能. 育種42, 403-413, 1992.
- 2) ABDULLAH, R., E. C. COCKING and J. A. THOMPSON: Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. Bio/Tecnol 4, 1087-1090,

- 1986.
- 3) ABDULLAH, R., J. A. TOMPSON, G. S. KHUSH, R. P. KAUSHIK and E. C. COCKING :
Protoclonal variation in the seed progeny of plants regenerated from rice protoplasts. *Plant Sci.* 65, 97-101, 1989.
- 4) CHU, C. C., C. C. WANG, C. S. SUN, C. HSU, K. C. YIN, C. Y. CHU and F. Y. BI : Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18, 659-688, 1975.
- 5) COULIBALY, M. Y. and Y. DEMARLY :
Regeneration of plantlets from protoplasts of rice, *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 96, 79-81, 1986.
- 6) 大源正明・阿部聖一 : コシヒカリの種子カルス形成・懸濁培養と植物体再生. *植物組織培養*, 10 (2), 176-179, 1993.
- 7) FUJIMURA, T., M. SAKURAI, H. AKAGI, T. NEGISHI and A. HIROSE : Regeneration of rice plants from protoplasts. *Plant Tissue Culture Lett.* 2, 74-75, 1985.
- 8) 岩井正志・吉田晋弥・渡辺和彦 : 水稻やく培養の脱分化及び再分化培地におけるアンモニア態窒素の影響. *近畿中国農研*. 80, 14-17, 1990.
- 9) KANDA, M, S. KIKUCHI, F. TAKAIWA and K. OONO : Regeneration of variants plants from rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts derived from long term cultures. *Japan. J. Genet.* 63, 127-136, 1988.
- 10) KAWATA M., S. HARADA, B. ANTONIO and K. OONO : Protoclonal variation of plant regeneration in rice. *Plant Cell, and Organ Culture* 28, 1-10, 1992.
- 11) KYOZUKA, J., Y. HAYASHI and K. SHIMAMOTO : High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* 206, 408-413, 1987.
- 12) LI, Z. and N. MURAI : Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Rep.* 9, 216-220, 1990.
- 13) 丸山清明 : バイオテクノロジーによる稲品種の開発の現状と将来. *続図説米の品種*. 83-88. 日本穀物検定協会, 東京, 1995.
- 14) MURASHIGE, T. and F. SKOOG : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497, 1962.
- 15) 日本作物学会北陸支部・北陸育種談話会編 : コシヒカリの遺伝育種的特徴と改良展望. *コシヒカリ*. 2-10. 農山漁村文化協会, 東京, 1995.
- 16) 小田文明・金治龍・吉田泰二・大槻義昭 : イネ液体細胞培養系の早期安定化・大量および効率的再分化. *育種*39 (別2), 58-59, 1989.
- 17) OGAWA, T., H. FUKUOKA, and Y. OHKAWA : Effects of reduced nitrogen source and sucrose concentration on varietal differences in rice cell. *Breeding Science* 46, 103-105, 1996.
- 18) OGURA, H., J. KYOZUKA, Y. HAYASHI, T. KODA and K. SHIMAMOTO : Field performance and cytology of protoplast derived rice (*Oryza sativa*), high yield and low degree of variation of four japonica cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 74, 670-676, 1987.
- 19) OGURA, H., J. KYOZUKA, Y. HAYASHI and K. SHIMAMOTO : Yielding ability and phenotypic traits in the selfed progeny of protoplast-derived rice plants. *Japan. J. Breed.* 39, 47-56, 1989.
- 20) OHARA, K., K. OJIMA and A. FUJIWARA : Studies on the nutrition of rice cell culture 1. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14, 1113-1121, 1973.
- 21) SHILLITO, R. D., J. PASZKOWSKI and I. POTRYKUS : Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.* 2, 244-247, 1983.
- 22) TORIYAMA, K. and K. HINATA : Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41, 179-183, 1985.

- 23) 津川秀仁・大槻義昭：イネにおける細胞培養系の
汎用化 1. コシヒカリの懸濁培養および再分化
育種43 (別2), 121, 1993
- 24) YAMADA, Y., Z. Q. YANG and D. T. TANG : Plant regeneration from protoplast-
derived callus of rice (*Oryza sativa* L.).
Plant Cell Rep. 4, 85-88, 1986.
- 25) 山之内宏明・鳥山欽哉・日向康吉：イネ懸濁培養
におけるAA培地構成アミノ酸の役割について。
育種 37 (別2), 84-85, 1987.

Summary

To improve Japonica rice (*Oryza sativa* L.) Koshihikari variety, by taking advantage of somaclonal variation, we attempted to obtain protoplast-derived Koshihikari plants using a suspension culture system. The suspension cultures of Koshihikari were established from friable calli induced on N6 medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose and 3 g/l gelrite incubated for 60 days. Although the initiated calli of Koshihikari turned brown within 30 days of incubation, after another 20-30 days incubation without subculture under the same condition yellow localized friable calli were formed adjacent to the brown calli. The addition of glutamine to the R2 suspension medium was effective obtaining its suspension culture. Among 400 seeds plated on the medium, 4 cell lines were obtained. However, the efficiency of establishing cell lines was low. One cell line showing faster growth and higher plant regeneration was selected among the 4 cell lines and was used for protoplast culture. The addition of glycine and yeast extract to the regeneration medium was effective on the regeneration of Koshihikari. From 850 protoplast-derived colonies, 158 regeneration plants were obtained, 100 of which produced seeds. In the regeneration plants morphological variations were observed.