

ワイルドライス(*Zizania palustris* L.)完熟胚からの カルス誘導におよぼす培地と種子令の影響

村山 廉生^{1,2}・三浦 秀穂¹

(受理：1996年5月21日)

Influences of medium and seed age on callus formation from
mature embryos of wild rice (*Zizania palustris* L.)

Yasuo MURAYAMA^{1,2} and Hideho MIURA¹

摘 要

北米高緯度の冷温帯に広く分布するワイルドライス(*Zizania palustris* L.)は、優れた耐冷性遺伝子や粒成分に関する遺伝子の供給源として期待される。このような有用遺伝子を細胞操作によって禾穀類の改良に役立てるための基礎資料を得る目的で、品種 Netum の完熟胚からのカルス誘導について、実験1では基本培地の種類、実験2では種子令と植物ホルモン濃度の影響を検討した。収穫後1~2ヶ月間5°Cで乾燥貯蔵した種子の完熟胚からのカルス形成はMS培地で最も高く(44.7%)、SH培地とB5培地では20~30%程度であった。MS培地を用いて、2,4-D濃度を3水準設けたとき、収穫後2ヶ月以内に置床した胚は、2,4-D1.0mg/lを添加した培地で2/3が、2.0mg/lの培地では約1/2がカルス化した。一方5ヶ月以上経た種子胚はカルス形成が低下し、種子令と2,4-D濃度の間に相互作用があった。

キーワード：遺伝子源、カルス誘導、胚培養、ワイルドライス

緒 言

ワイルドライス(*Zizania palustris* L.)は、イネ科イネ族マコモ属の1年生植物で、北アメリカ大陸五大湖周辺の湖沼地帯に広く野生している。アメリカンワイルドライスあるいはアメリカマコモとも呼ばれ(星川, 1984)、英名が wild rice であることから

しばしば野生イネ(*Oryza rufipogon*)と混同されることがある。東アジア原産でわが国にも分布する多年生のマコモ(*Zizania latifolia* Turcz.)とは同属異種である。また、同じ一年生で北米東海岸に分布する *Z. aquatica* とは形態的によく似た近縁種であり、研究論文ではワイルドライスにこの学名を用いる研究者も少なくない。

¹帯広畜産大学飼料作物科学講座 〒080北海道帯広市稲田町

²現 雪印種苗株式会社中央研究農場 〒069-14 北海道長沼町幌向1066

¹Department of Crop Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan 080

²Snow Brand Seed Co. Ltd., Hokkaido Research Station, Naganuma, Hokkaido, Japan 069-14

子実は古くからアメリカインディアンによって食料として利用されてきた。カナダではオンタリオ、マニトバ、サスカチュワンなどの諸州で、主として浅い湖水や河の自然集団から生産されるのに対し、アメリカ合衆国では今世紀後半から栽培化が始まった(Oelke et al., 1982)。1970年以降にミネソタ州を中心として商業栽培が発展し、カルフォニア州では水田利用の栽培が普及している(Hayes et al., 1989)。しかし、最大の栽培面積をもつミネソタ州でさえ1万 ha を大きく上回るまでには至っていない。野生集団から選抜育成された K2 や Netum などの現在の栽培品種は、完全な栽培型ではなく、脱粒性や種子休眠、出穂の同時性等の面で野生型の特徴を持つことが栽培の障害となっている。また雌雄異花植物でバイオマスに対する子実の割合は20%に満たないため(Wilson and Ruppel, 1984)、草型にも多くの改良が必要とみられる。わが国でも K2 や Netum が導入され、北海道や東北地方の水田で試作されたが、実用栽培には至っていない(Gemma et al., 1993)。

一方、近年細胞培養や遺伝子導入技術が発達したことを踏まえて、イネなど主要な禾穀類の改良に際し遺伝子供給源としてみたとき、ワイルドライスはいくつもの有用な形質をもっている。玄米に比べ、タンパク質が2倍程度と高く、逆に脂肪含量が低く、ビタミン B2 やリンなどの各種ミネラルに富んでいる(Terrell and Wiser, 1975; Oelke, 1976; Wang et al., 1978)。単位葉面積当たりの光合成活性はイネよりやや低いものの(渡部ら, 1986)、もともと北米高緯度の冷温帯に広く分布しているため、優れた耐冷性遺伝子の供給源として期待される(小山, 1984)。このようなワイルドライスの長所を禾穀類の改良に活用するためには、組織培養や細胞融合技術の確立が前提となる。そこで本研究では、まず完熟胚からのカルス形成についての基礎資料を得る目的で2つの実験を行った。実験1では、基本培地の種類、実験2では種子令と植物ホルモン濃度について検討した。

材料と方法

実験1. 基本培地試験

比較の対象とした基本培地は、MS 培地(Mura-shige and Skoog, 1962)、SH 培地(Schenk and

Hildebrandt, 1972) および B5 培地(Gamborg et al., 1976) の3種類である。植物ホルモンはオーキシシン類として2,4-D (2.0mg/ℓ)、カイネチン類として BAP (0.02mg/ℓ) を添加した。

水田で養成し、収穫した品種 Netum の乾燥種子を1~2ヶ月間5°Cの冷蔵庫で保存し、実験に用いた。籾殻を取り除いた種子を表面殺菌のため70%エタノールに10秒浸けた後、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で20分間攪拌した。クリーンベンチ内で完熟胚を摘出し、直径90mmのプラスチックジャーレに置床し、20°C暗黒条件でインキュベートした。その後1ヶ月間隔で継代培養し、3ヶ月目にカルス形成率、胚軸の伸長程度、致死率を記録した。

実験2. 種子令と植物ホルモン濃度試験

実験1と同様、水田で養成し収穫した Netum の乾燥種子を1~2ヶ月間および5ヶ月以上保存したものを2種類準備した。用いた培地はMS 培地で2,4-D を3水準の濃度、1.0, 2.0, 3.0mg/ℓ で添加した。BAP 濃度は0.02mg/ℓ で統一した。胚の摘出およびその他は実験1と同様である。

結 果

実験1.

基本培地を異にしたときの完熟胚からのカルス誘導の結果を Table 1 に示した。置床した胚数は培地間で様でなかったが、MS 培地で最も高いカルス形成(44.7%)が認められた。SH 培地と B5 培地では20~30%程度であった。逆に B5 培地では5割以上の胚が褐変、致死し、MS 培地では2割程度であった。その他には胚軸伸長が認められたものの、発芽状態のままカルス形成しなかった胚が含まれる。

ほとんどのカルスは1cm以上に伸長した胚軸とその基部、展開した葉から形成され、1cm未満の微弱な胚軸から形成したカルスはわずかであった。胚軸と葉から直接形成したカルスは、粗粒状のものが多く、硬く崩れにくい形状をしていた。それに対し、胚軸基部からのカルスは顆粒状で柔らかく、崩れやすかった。その後も継代培養を繰り返すと、顆粒状カルスに比べ粗粒状カルスでは、カルス全体あるいは一部が褐変し致死したものがより多く観察された。また顆粒状カルスは粗粒状カルスより増殖しやすい傾向にあった。

実験 2.

MS 培地を用いて、2,4-D 濃度を 3 水準設けたときの収穫後 2 ヶ月以内の新鮮な完熟胚と 5 ヶ月以上経た胚の培養結果を Table 2 に示した。収穫後 2 ヶ月以内に置床した胚は、2,4-D 濃度 1.0mg/ℓ の培地で 2/3 がカルスを形成し、2.0mg/ℓ の培地で約 1/2 がカルス化した。この 2,4-D 濃度 2.0mg/ℓ の結果は実験 1 での同処理での結果とほぼ一致した。

一方、収穫後 5 ヶ月以上経た種子から摘出した胚では、2,4-D 濃度 3.0mg/ℓ で 1/2 がカルスを形成したが、他の 2 つの 2,4-D 濃度では形成率が低く、4 割以上が褐変、致死した。そのため種子令と 2,4-D 濃度の間には相互作用が認められた。この相互作用は新鮮な胚では低濃度の 2,4-D でカルス形成が促進され、種子令の進んだ胚では高濃度の 2,4-D が適することを示唆している。しかし一部の処理で置床胚数が少ないため評価には注意を要する。

Table 1. Effects of medium on the callus formation from detached embryos of *Zizania palustris*

Medium ^a	Number of embryos cultured	Number of calli induced ^b	Number of brown or died embryos
MS	269	118(44.7)	53(19.7)
SH	183	43(23.5)	49(26.8)
B5	39	11(28.2)	23(59.0)

^a The three medium contain 2mg/ℓ 2,4-D and 0.02mg/ℓ BAP.

^b Figures in parenthesis denote the percentage to the number of embryos cultured.

Table 2. Effects of seed age and the 2,4-D concentration on the callus formation from detached embryos of *Zizania palustris*

Seed age	2,4-D concentration	Number of embryos cultured ^a	Number of calli induced ^b	Number of brown or died embryos
1-2 months	1.0mg/ℓ	39	26(66.7)	1(2.6)
	2.0	203	101(49.8)	26(12.8)
	3.0	108	33(30.6)	22(20.4)
More than 5 months	1.0	91	9(9.9)	50(54.9)
	2.0	66	23(34.8)	27(40.9)
	3.0	20	10(50.0)	8(40.0)

^a Embryos were incubated on the MS agar medium containing 0.02mg/l BAP.

^b Figures in parenthesis denote the percentage to the number of embryos cultured.

考 察

実験 1 の結果から SH 培地と B5 培地に比べ MS 培地、ワイルドライス完熟胚からのカルス誘導に勝ることが示された。さらに、実験 2 での 2,4-D 濃度 2.0mg/ℓ におけるカルス形成率 49.8% は、同条件の実験 1 の 44.7% とよく一致し、再現性の高い結果が得られた。Hirano and Kohno (1990) も 2,4-D を 2.0-4.0mg/ℓ 添加した MS 培地でカルス誘導が良いことを報告している。したがって本実験で比較した 3 種類の基本培地の中では、MS 培地がカルス誘導に適していると考えられる。また添加する植物ホルモンの種類とその濃度については、オーキシシンとして 2,4-D の代わりに NAA を用いたとき、カルス形成よりもシュートの伸長が促進されることから (Hirano and Kohno, 1990)、今後カイネチン類を含めて検討の余地がある。

ワイルドライス種子は収穫後直ちに冷水貯蔵しないと胚の生存力が低下し、発芽能力が消失するとされる (Elliott, 1980)。本実験では冷水貯蔵の煩雑さを除くために、乾燥貯蔵した種子を用いてカルス誘導を試みた。これはわれわれの先の実験で収穫後室温で乾燥貯蔵した種子でも数カ月は発芽能力をもつことが確認されたためである (Gemma et al., 1986)。実験 2 の結果から収穫後 1 ~ 2 ヶ月の種子胚では 50% 近いカルス形成が認められ、5 ヶ月以上経た種子の胚は確かに誘導能力が低下しているようであった。したがって、冷水貯蔵した種子でなくともカルス誘導は可能であるものの、乾燥貯蔵した種子を対象とする場合には出来るだけ新鮮なものを用いる必要がある。

カルスからの不定胚形成を経て再生植物体を得るために、実験 1 の MS 培地で誘導された 61 個のカルスを 2,4-D 濃度を 0.5mg/ℓ に減じた MS 培地に移植した。13 個のカルスで不定根が形成されたが、いずれも植物体にまで生長しなかった。Hirano and Kohno (1990) は再生個体を得たが、種子稔性がなかった。よって、育種手段として組織培養によるワイルドライス自体の改良は解決すべき課題がまだまだ多いと謂える。その一方で、Hirano and Kohno (1990) の報告および本実験でワイルドライスのカルス誘導が確認できたことから、将来カルスからプロトプラスト

を単離し、体細胞融合によって有用遺伝子を他の作物に導入できることへの可能性が高まった。

引用文献

- Elliott, W. A. (1980) Wild rice. pp721-731. In: Fehr, W. R., Hadley, H. H. (eds) Hybridization of crop plants. Am. Soc. Agron., Madison, Wisc.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Gemma, T., Miura, H., Furusato, K. (1986) Effects of soaking and scalification on germination of dry wild rice (*Zizania palustris* L.) seed. *Res. Bull. Obihiro Univ.* **15**: 65-68.
- Gemma, T., Miura, H., Hayashi, K. (1993) Effects of water depth and temperature on the seedling growth of wild rice, *Zizania palustris* L. *Jpn. J. Crop Sci.* **62**: 414-418.
- Hayes, P. M., Stucker, R. E., Wandrey, G. G. (1989) The domestication of American wildrice (*Zizania palustris*, Poaceae). *Econ. Bot.* **43**: 203-214.
- Hirano, M., Kohno, M. (1990) Callus formation from mature embryos and plant regeneration of American wild rice, *Zizania palustris* L. *Plant Tissue Culture Letters* **7**: 69-73.
- 星川清親(1984)アメリカマコモ. pp397-399. 新編食用作物. 養賢堂, 東京.
- 小山鐵夫(1984)資源植物学. pp145-147, 170-171. 講談社, 東京.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Oelke, E. A. (1976) Amino acid content in wild rice (*Zizania aquatica* L.) grain. *Agron. J.* **68**: 146-148.
- Oelke, E. A., Grava, J., Noetzel, D., Barron, D., Percich, J., Schertz, C., Strait, J., Stucker, R. (1982) Wild rice production in Minnesota. pp 1-38. Univ. of Minnesota, Agric. Ext. Service.
- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **50**: 119-204.
- Terrell, E. E., Wiser, W. J. (1975) Protein and lysine contents in grains of three species of wild rice (*Zizania*: Gramineae). *Bot. Gaz.* **136**: 312-316.
- Wang, H. L., Swain, E. W., Hesseltine, C. W., Gumbwann, M. R. (1978) Protein quality of wild rice. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 309-316.
- 渡部信義, 川尻達也, 宮田祐二(1986) *Zizania* 属植物の光合成活性. 岐阜大農研報 **51**: 43-49.
- Wilson, M. F., Ruppel, K. P. (1984) Resource allocation and floral sex ratios in *Zizania aquatica*. *Can. J. Bot.* **62**: 799-805.

Summary

Wild rice (*Zizania palustris* L.) is an annual and aquatic plant indigenous to lakes and slow-moving streams in the Great Lakes Resion, North America. In terms of an excellent amino acid composition in grains and a high adaptability to cold climates, wild rice has fascinated us as a gene source for improving productivity and tolerance to unfavorable environments of major cereals. Information about cell culture and molecular biology in this plant would contribute to utilize these advantageous characters.

The present paper describes the influences of medium and seed age on callus formation from mature embryos of the Netum variety. Compared to the SH and B5 mediums, the MS agar medium promoted callusing (Table 1). Embryos from fresh seeds, which were stored at 5°C in dry condition during 1-2 months after harvest, showed a high frequency of callus formation on the MS medium (Table 2).

Key words: gene resource, callus formation, embryo culture, Wild rice.