アルミニウム耐性イネカルスの選抜とその再分化

誌名	日本土壌肥料學雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者名	大川原,良次 小島,邦彦 吉田,昌一
発行元	日本土壌肥料學會
巻/号	57巻6号
掲載ページ	p. 558-562
発行年月	1986年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

アルミニウム耐性イネカルスの選抜とその再分化*

大川原良次**・小島邦彦**・吉田昌一***

キーワード　アルミニウム耐性，イネカルス，ストレス選抜，再分化

1. 緒　言

酸性土壌における作物の生育障害の主要な原因は，水素イオン濃度の上昇にともなうアルミニウム（Al）イオンの濃度過剰にあるといわれている．たとえばイネにおけるブロンジングと呼ばれる生理病は，Al 過剰症の一つの具体例である[1]．このような酸性土壌は，わが国はもちろん，世界的にも広く分布している．したがって Al 耐性作物の作出は，酸性土壌における農業生産上極めて有意義な品種改良につながり，古くから多くの研究がなされてきた[2]．

最近，植物組織培養技法を導入して，塩類過剰や強酸性などの不良土壌を想定して，塩化ナトリウムや Al 耐性の作物を能率的に作出しようとする研究が盛んに行なわれている[3]．その方法の一つであるストレス選抜法は，Al や塩化ナトリウムの濃度過剰下に培養細胞を生育させ，生存株を選抜し，それを再分化して耐性植物個体を獲得しようとするものである．この技法は，従来の個体レベルでの選抜法に比して，時間的にも労力的にも簡便であるのみならず，脱分化にともなう細胞の変異を直接利用できるなどの利点がある．

これまで塩化ナトリウム耐性培養細胞の選抜例が数多く報告されているが[4]，多くの場合再生植物におけるその形質発現は極めて困難であるとされている．他方 Al 耐性細胞の選抜に関する研究は，トマト[5]やソルガム[6]など二，三を数えるにすぎない．最近，著者らの一人小島ら[7]は，Al 耐性のニンジン細胞から得た再生植物の Al 耐性について報告しているが，報告事例もまだ数少なく，耐性形質の安定性など，問題点も多く残されているのが現状である．

本報では，イネカルスを Al ストレス下に培養して Al 耐性株が得られたこと，さらにこのカルスからの再生植物に Al 耐性が認められたことなどについて報告する．

* 本報告の要旨は昭和60年7月，日本植物組織培養学会（神戸）で報告した．
** 東北大学農学部（980 仙台市堤通雨宮町 1-1）
*** 国際イネ研究所（P. O. Box 933, Manila, Philippines）
昭和60年11月8日受理
日本土壌肥料学雑誌 第57巻 第6号 p.558～562（1986）

2. 実験方法

1) カルスの誘導と培養

カルスの誘導，増殖には，Murashige and Skoog の培地[8]を基本として，これにカゼイン水解物(Sigma)を 0.2%，酵母抽出物（和光純薬）を 0.2%，2,4-ジクロルフェノキシ酢酸（2,4-D）を 2 ppm の濃度で加えた培地を用いた．この培地の pH を 5.8 に合わせた後，8 g/l の寒天（Bacto agar, Difco）を加え，120℃ で 15 分間オートクレーブ滅菌した．以下これを MS 培地と呼ぶ．

イネ（*Oryza sativa*, cv. Taichung 65）の種子の籾殻をはぎとり，これを 70% エタノールに数分間，続いて 0.1% 塩化第二水銀に 15 分間浸漬して種子表面を滅菌した．無菌水で数回洗浄した種子を MS 培地 20 ml を含む 50 ml の三角フラスコに置床し，26℃ 遮光下に，4 週間保温してカルスを誘導した．約 50 mg のカルスを 4 週間ごとに新しい MS 培地に移植して継代培養を行なった．

サスペンジョン培養にあたっては，上記カルス約 0.5 g を，R2 培養液[9] 50 ml 入りの 200 ml 三角フラスコに移植し，26℃ のもとで，120 rpm で回転振盪した．10 日ごとに比較的均一な細胞塊を新しい R2 培地に移して継代培養を行なった．

カルスの生育の測定にあたっては，培養後，濾紙でカルスの水分を除きその新鮮重を測定して次のように相対生育量を求めた．

$$\text{相対生育量} = \frac{\text{培養終了時のカルスの新鮮重} - \text{移植時のカルスの新鮮重}}{\text{移植時のカルスの新鮮重}}$$

培養細胞（サスペンジョン）は，呼吸濾過して細胞をミラクロース上に集めて新鮮重を測定した．

2) カルスからの植物体の再分化

イネカルスは次のような固型培地に移植して再分化を行なった．Murashige and Skoog の基本培地に 0.3% のカゼイン水解物，0.3% の酵母抽出物，7% のショ糖，2×10^{-6} M のナフタリン酢酸および 5×10^{-5}M のカイネチンを加えた．培地 pH を 5.8 に調整し，8 g/l の寒天を加えてオートクレーブ滅菌した．約 50 mg のカルスを 25×250 mm の試験管内の上記培地 20 ml に置床し，

26～27℃，3000 lux の人工照明下に保温した．約1カ月から2カ月後，再分化した幼植物体は，ガラス室内の1.8 l のプラスチック製ポットの土壌に移植し，ビニール袋をかぶせて約2週間馴化させた後，生育させ自殖により種子を得た．

3） 再生植物の Al 耐性の検定法[10]

再生植物から得た種子は，1～2日間水漬し，0.1%塩化第二水銀で数分間表面を滅菌し，水で湿らせた濾紙上に置き 30℃ で発芽させた．1～2日後，根が1～2 cm に達した種子を，Al 無添加ならびに Al 30 ppm を含む水耕液[11]で2週間次のように生育させ根長を測定した．300×225×10 mm の発砲スチロール製板に 75×15 mm の穴を 20 個あけて，その底にネットをはった．そのネット上に発芽した種子を並べて，5 l の水耕液に浮かべて水耕を行なった．水耕液は毎日 1N HCl で pH 4.0 に合わせ1週間で水耕液を更新した．この生育試験は，日中 29℃（9時から17時），夜間 21℃，相対湿度 70% 以上のガラス室で，自然光下で行なった．Al 耐性の度合は，Al 無添加の水耕液における根長に対する Al 30 ppm を含む水耕液における根長の比（相対根長値）で表わした．

4） 培養細胞の Al の定量法

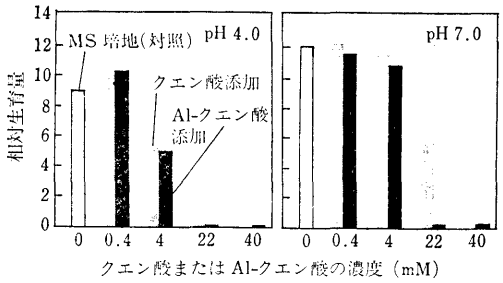
収穫した培養細胞は凍結乾燥後，一定量をとり硝酸と過塩素酸の混液（5:3, v/v）で湿式灰化し，原子吸光法で Al を測定した．

3. 結果および考察

1） ストレス選抜剤としての Al-クエン酸の適性について

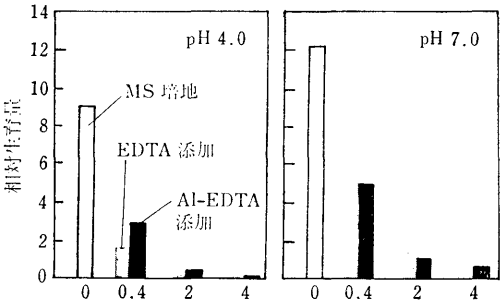
ストレス剤としての Al 給源に $AlCl_3$ や $Al_2(SO_4)_3$ を用いる場合，水酸化 Al の沈殿生成を防止するため培地 pH を4程度に下げたり，リン酸 Al の沈殿の生成を避けるためリン酸の濃度を下げたりするなど，培養細胞の生育にとって極めて不自然な処理を施さなければならない．また培地 pH を一定の値に設定しても，培養の経過とともに容易に変化してしまうし，また培地 pH を無菌的に一定に維持することは極めて困難である．このような点を考慮して，本報では耐性細胞の選抜剤として Al-クエン酸のキレート化合物を用いることにした．それに先立ち，クエン酸単独ならびに，Al 共存下のクエン酸のイネカルスの生育に及ぼす影響を調べた．その結果を第1図に示す．

最初の培地 pH を HCl と NaOH で 4.0 または 7.0 に調整しカルスを移植して4週間生育させた．pH 4.0 の場合は，クエン酸単独でも Al-クエン酸（$AlCl_3 \cdot 6H_2O$ とクエン酸を等モル添加）でも，全く同じように，4 mM では約 50%，22 mM ではほぼ 100% の生育阻害を示した．これに対して培地の pH を 7.0 に調整した場合は，両者ともに 4 mM ではほとんど生育は阻害されなかった．しかし 22 mM の濃度で，クエン酸では対照区の約 43% の生育阻害を示したのに対し，Al-クエン酸ではほぼ 100% の阻害を示した．つまり $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ とクエン酸を 22 mM 等量加えて培地 pH を中性近くに調整した場合，カルスの生育はほぼ完全に抑制されるが，見かけ上その 50% 以上は Al-クエン酸の Al 成分の作用によるものといえよう．



第1図　クエン酸ならびに Al-クエン酸によるカルスの生育阻害

クエン酸同様キレート剤としてよく用いられるものに EDTA がある．そこで EDTA による Al のキレート化がイネカルスの生育に及ぼす影響について調べてみた．その結果を第2図に示す．pH 4.0 においては，EDTA 単独でも Al-EDTA（$AlCl_3 \cdot 6H_2O$ と Na_2-EDTA を等モル添加）でも 0.4 mM という比較的低濃度で生育が著しく阻害された．pH 7.0 においても阻害の度合はやや軽減するが，pH 4.0 におけると同様 EDTA に比して Al-EDTA が際立って生育阻害を示す濃度域は見あたらなかった．したがって Al-EDTA を Al 給源として用いる限り，EDTA そのものの阻害作用が著しいので Al 成分のみの阻害作用を期待できず，Al-EDTA は Al 耐性



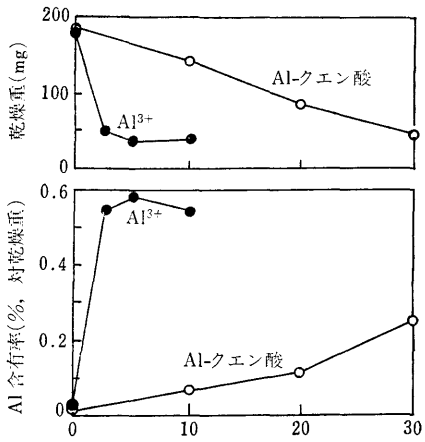
第2図　EDTA ならびに Al-EDTA によるカルスの生育阻害

細胞の選抜剤として適当ではないと判断した.

これまで Al 耐性培養細胞を選抜した例としてはトマト[5]とソルガム[6]の二つが知られているが，このいずれも選抜剤として Al-EDTA を用いている．したがってこれらの場合，Al に対してではなく EDTA に対して耐性の培養細胞を選抜した可能性があると思われる．最近 Conner and Meredith[12]は，培養細胞の生育に対する EDTA の著しい毒性に言及し，Al 耐性の選抜剤として Al-EDTA は適していないことを認めている.

第3図は Al-クエン酸添加培地において振盪培養した細胞の Al 含有率を，Al^{3+} 添加培地におけるそれと対比するために調べた結果である．なお Al-クエン酸添加培地では $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ とクエン酸を等モル加え，最初の pH は 7.0 に調整した．また $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 添加培地では，リン酸濃度を 0.1 mM，培地 pH を 4.0 に調整して，投与した Al の大部分が少なくとも培養開始時点では Al^{3+} として存在するよう留意した.

Al-クエン酸培地におけるイネ培養細胞の Al 含有率は，生育が完全に停止する 30 mM まで，その濃度の増加に応じて増加し続けた．しかし Al 濃度の増加にともなう生育阻害度，ならびに Al 含有率の増加の度合は Al^{3+} 培地に比して極めて緩慢であった．たとえば Al-クエン酸 20 mM では約 40% に生育阻害され，0.11% の Al 含有率であったのに対して，Al^{3+} は 2.5 mM という濃度でほぼ 100% の生育阻害がみられ Al 含有率も 0.54 % と著しく高い値を示した．これは Al-クエン酸が，Al(クエン酸)$^-$，あるいは(OH) Al (クエン酸)$^{2-}$[13]とい



第3図　Al^{3+} および Al-クエン酸両添加培地における細胞の生育と Al の吸収
約 53 mg（乾燥重）の培養細胞を移植して 6 日間培養した.

ったイオンとなっていることから，Al イオンが本来持っている細胞への吸着力を失うことによるものであり，同時にこのことが阻害度の低下の原因になっているものと考えられる.

2) Al-クエン酸耐性細胞の選抜とその再分化

第1図ならびに第3図の結果から，Al 耐性イネカルスの選抜は 10 または 20 mM の Al-クエン酸を含む MS 培地(pH 7.0)で行い，アニオン態の Al に対する耐性カルスを選抜することにした．始めに 20 mM の Al-クエン酸を含む MS 培地 (pH 7.0) 20 ml の入った 50 ml 三角フラスコ 100 個に約 50 mg のカルス 300 個を移植した．4 週間ごとに増殖したカルスから約 50 mg を釣り上げ，同じ組成の新しい培地に移植することを繰り返して耐性細胞を選抜した．ほとんどのカルスは褐変して死んだが，一部のカルスは黄色を呈して生存した．48 週間 (12 回同じ組成の培地で継代培養) 後，7 個の生存株を再分化培地に移したが，植物体は再分化しなかった．そこで新たに，同じ培地で 5 回 (20 週間) 継代培養することによって選抜したカルスを再分化培地に移して，24 個体の植物体を得ることができた.

さらに上記の場合とは別に，10 mM の Al-クエン酸を含む MS 培地 (pH 7.0) でカルスを継代培養することにより耐性カルスの選抜を試みた．約 50 mg のカルスを上記培地 20 ml を含む 50 ml 三角フラスコに移植して，4 週間ごとに生存カルスを同じ新しい培地で継代培養した．12 週間 (3 回) 継代培養後，生存したカルスを再分化培地に移植して，最終的に 10 個体の植物体を得た.

このようにして得られた選抜カルスの Al 耐性の度合を調べるため，約 50 mg のカルスを 10 mM または 20 mM の Al-クエン酸を含む MS 培地 (pH 7.0) に移植して 4 週間後の生育をみた．写真 1 にみられるように選抜カルスは 20 mM Al-クエン酸の存在下で (写真 A20)，Al-クエン酸無添加 (写真 0) あるいは 10 mM (写真 A

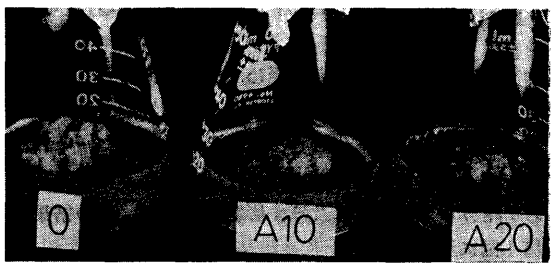


写真 1　選抜イネカルスの Al-クエン酸共存下での生育
左から培地は 0(0)，10 mM Al-クエン酸 (A10)，20 mM Al-クエン酸 (A20) を含む MS 培地 (pH 7.0)．約 50 mg の選抜カルスを移植して 4 週間培養したもの.

写真2　選抜，非選抜イネカルスのAl-クエン酸に対する耐性の比較
培地は20 mMのAl-クエン酸を含むMS培地(pH 7.0)．約50 mgの選抜（selected）または非選抜（control）のカルスを移植して4週間培養したもの．

10）におけるとほぼ同様に良好な生育を示した．これに対して選抜を加えなかったカルスは，写真2（左側；control）に示したように20 mM Al-クエン酸によって褐変化して，生育が完全に阻害された．

3）再生植物体のAl耐性

非選抜ならびに選抜両カルスからの再生された植物体は，土耕により栽培して最終的に自殖により種子を得た．この種子を発芽させて，幼植物の根長を測定することにより，そのAl耐性の程度を調べた．すなわち各再分化個体から得られた種子を発芽させ，それぞれ20個体をとり，10個体をAlを含まない水耕液（pH 4.0）で，10個体を30 ppm Alを含む水耕液（pH 4.0）で2週間生育させた．各個体の根長を測定し，その平均値から相対根長値を計算した．Al-クエン酸10または20 mMを含むMS培地で選抜された植物に関して上記のようにして求めた相対根長値を平均して第1表のようにまとめた（系統TA10, TA20）．なお対照として，選抜を加えないで1，2または4回継代培養（4週間ごとに約50 mgのカルスを新しい培地に移植）したカルス由来の植物から得られた種子についての相対根長値も第1表に示した（系統0-1，0-2，0-4）．

Al-クエン酸を含む培地でカルスを選抜することにより，再生植物におけるAl耐性は全体として非選抜の場合より増しており，その差異は有意であった．細胞レベルでストレスを加えて耐性株を選抜し，その再分化により耐性の植物を得るという試みは，ここでは一応の成功をおさめたといえよう．また選抜の有無にかかわらず，カルスの誘導・培養・再分化という過程を経ることにより，再生した植物個体相互の間で大きな変異幅が観察された．このことは脱分化したカルスが，Al耐性に関して有用な遺伝的な変異原となりうる可能性を示している．

本報では，耐性カルスの選抜にAl-クエン酸を用いた結果を報告したが，その他Alイオンの形態で培地に供給して選抜することも試みている．培地pHを4.0とし，Ca濃度を0.1 mM，リン酸を10 μMに下げて，Al^{3+}を含むMS培地をスポンジに含ませて，その上に置いた濾紙上で選抜を行なった．この方法では，今のところは，選抜されたカルスからの植物の再分化に成功するには至っていない．しかし既述のように，Al-クエン酸のストレス下で耐性のカルスが選抜され，そのカルス由来の再生植物から自殖により得られた種子は，$AlCl_3 \cdot 6H_2O$，すなわちAl^{3+}（pHは4.0）を用いた水耕法においてAl耐性を示すことがわかった．このことはカルスにおけるAl-クエン酸の選抜効果が，クエン酸成分ではなくAl成分によることを示唆している．

不良土壌を想定して，ミネラルストレスに対して耐性のカルスまたは培養細胞を選抜した報告は数多くある．とくに塩化ナトリウム耐性に関しては研究例が多いが，Al耐性に関しては極めて少ない．さらに細胞レベルで選抜された耐性形質が植物個体レベルで発現したのは，Al耐性のニンジン[7]と塩化ナトリウム耐性のタバコ[14]を数えるにすぎない．今後，このような形質発現の様々な作物種での実証，選抜カルスならびにその再生植物にお

第1表　非選抜ならびに選抜カルス由来の再生植物から得られた種子のAl耐性の検定

系統	継代培養した期間(週)[a]	選抜の有無	再分化した植物の数	相対根長値[b]	
				平均値	分布範囲[c]
0-1	4	非選抜	86	0.70^{-}	0.39～0.82
0-2	8	非選抜	19	0.70^{ns}	0.57～0.82
0-4	16	非選抜	25	0.70^{ns}	0.54～0.80
TA10	16(12)	10 mM Al-クエン酸	10	0.78**	0.65～0.93
TA20	32(20)	20 mM Al-クエン酸	24	0.79**	0.60～1.08

**，1%レベルで有意；^{ns}，有意差なし．0-1を基準としたLSDテストによる．
a) 4週間ごとに約50 mgのカルスを移植して継代培養した．TA10，TA20では（　）で示した数字が選抜を加えた期間（週）を示す．
b) 本文参照．
c) 最高と最低の相対根長値を示した．

ける Al 耐性機構の解明，さらに強酸性土壌での作物生産の向上を目指した Al 耐性形質の後代植物への遺伝の検討といった多くの課題が残されている．

4. 摘 要

1) Al 耐性カルスのストレス選抜にあたり，選抜剤としての Al-クエン酸のイネカルスまたは培養細胞の生育ならびに Al 吸収に及ぼす影響を，Al-EDTA または $AlCl_3$ のそれらと対比しながら検討を加えた．

2) Al-EDTA キレート化合物の EDTA 成分は，見かけ上 Al 成分と同等かそれ以上にカルスの生育にとって有害であった．したがって Al-EDTA は Al 耐性カルスの選抜剤として適していないと結論した．

3) イネ (*Oryza sativa*, cv. Taichung 65) 種子由来のカルスを Al-クエン酸 10 mM または 20 mM を含む pH 7.0 の MS 培地において数回継代培養を繰り返して，Al 耐性カルスを選抜した．

4) Al 耐性カルスから植物体を再分化，馴化育成し，自殖により種子を得た．Al を含む水耕液における根の伸長試験の結果から，選抜カルスと非選抜カルス由来の再生植物の間で，Al 耐性に関して有意な差が認められ，再生植物において Al 耐性の形質が発現しうる可能性が示された．

謝 辞 本研究の主要な部分は 1983 年から 1985 年にかけて国際イネ研究所 (IRRI) においてなされたものである．なお貴重なご助言をいただいた東北大学農学部教授大平幸次博士に深謝の意を表する．

文 献

1) 太田保夫：水稲の生理病 "Bronzing" に関する研究，農技研報D，**18**，31～104 (1968)
2) Foy, C. D.: The Plant Root and Its Environment, p. 601～642, University Press of Virginia, Charlottesville, N. C. (1974)
3) 小島邦彦・大平幸次：ミネラル耐性植物の作出と細胞工学，東北の農業と土壌肥料，日本土壌肥料学会・大会運営委員会，p.183～189 (1984)
4) 大野清春：試験管育種—植物組織培養による選抜，組織培養，**5**，325～334 (1979)
5) Meredith, C. P.: Selection and Characterization of Aluminum-resistant Variants from Tomato Cell Cultures. *Plant Sci. Lett.*, **12**, 25～34 (1978)
6) Smith, R.H., Bhaskaran, S. and Schertz, K.: Sorghum Plant Regeneration from Aluminum Selection Media. *Plant Cell Rep.*, **2**, 129～132 (1983)
7) Ojima, K. and Ohira, K.: Characterization and Regeneration of an Aluminum-tolerant Variant from Carrot Cell Cultures. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue & Cell Culture, Plant Tissue Culture 1982, p. 475～476 (1982)
8) Murashige, T. and Skoog, F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473～497 (1962)
9) Ohira, K., Ojima, K. and Fujiwara, A.: Studies on the Nutrition of Rice Cell Culture I. A Simple, Defined Medium for Rapid Growth in Suspension Culture. *Plant Cell Physiol.*, **14**, 1113～1121 (1973)
10) IRRI, Annual Report for 1981, 98～101 (1983)
11) Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. M. and Gomez, K. A.: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice, 3rd ed., p. 61～66, IRRI, Philippines (1976)
12) Conner, A. J. and Meredith, C. P.: Simulating the Mineral Environment of Aluminum Toxic Soils in Plant Cell Culture. *J. Exp. Bot.*, **36**, 870～880 (1985)
13) 加藤正義：アルミニウム－クエン酸キレートの結合比と安定度定数，工業化学雑誌，**69**，182～187 (1966)
14) Nabors, M. W., Gibbs, S. E., Bernstein, C. S. and Meis, M. E.: NaCl-tolerant Tobacco Plants from Cultured Cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 13～17 (1980)