イネ幼植物体の再分化培養過程と組織体内 電解質イオン濃度との関係

中園敦之*¹・沖井三孔*²

ナーサリーテクノロジー(株) 150 渋谷区神宮前 6-26-1

Relationship Between the Culture Process of Plantlet Regeneration and
the Intra-electrolytic Ion Content of Rice Tissues (*Oryza sativa* L.)

Atsuyuki NAKAZONO*¹ and Mitsuyoshi OKII*²

nursery tech, inc. Jingumae 6-26-1, Shibuya-ku, Tokyo, 150, Japan

Summary

Plantlets regeneration culture by the method of medium exchange (two-step, from the first F1 medium to the second F2 medium) liquid regeneration was conducted to clarify a relationship between internal electric conductivity (EC) and fresh weight (W) of the cultured rice tissues (calli, plantlets).

EC and W of the cultured rice tissues were measured in terms of mS/cm and mg, respectively. There was a good correlation between EC and W, and regression equation was as follows: $EC = 31.25 \times W^{-0.382}$ (mS/cm/mg) [95% confidence limit of regression index (0.382), 0.178]. Namely, the heavier the weight [mg (FW)] of inoculated calli, calli-parts of regenerated plantlets and regenerated plantlets were, the lower the density of internal electrolytes was.

Total content of internal electrolytes in the tissues (TEC) was represented by the following equation, $TEC = 31.25 \times W^{0.618}$. This equation was obtained by multiplying both members of the above-mentioned equation by W.

It was possible to optimize strength and volume of F2 medium as compared with F1 medium. This is, the above $W^{-0.382}$ of EC formula gave a close approximation F2 strength 0.65 to a experimental F2 strength 0.50 by substituting 3.14 [= (9.9/1)^{1/2}] for W, and the above $W^{0.618}$ of TEC gave a good approximation F2 volume 2.03 to a experimental volume 2.00 by substituting 3.14 for W.

In the same way, regression equation between internal H^+ or total internal H^+ (TH^+) and W was expressed as follows: $H^+ = 127.5 \times W^{-0.422}$ or $TH^+ = 127.5 \times W^{0.578}$.

The above-mentioned equations represented the experimental results well.

はじめに

一般に、動物や微生物の代謝量は、体重の増加に応じて増加するが、単位体重当たりの代謝率は、体重の増加と共に減少する傾向にある¹⁾。植物についてはこの関係が明確とはなっていない。

1995年12月25日受理

*¹ 現 日鉄シビルコンストラクション(株) 103 東京都中央区日本橋堀留町 1-3-21

*² 現 協和発酵工業(株)筑波研究所 305 茨城県つくば市御幸が丘 2

*) Nippon Steel Civil Construction Inc., Ltd., 1-3-21, Horidome. Cyuoh-ku, Tokyo, 103, Japan

**) Tsukuba Research Lab., Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 2 Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, Japan

この点を明らかにすべく、イネ・カルスからの幼植物体の液体再分化培養方法²⁾を用い、本再分化培養過程における組織体の生育を対象として、組織体生重量(W, 以下同じ)と組織体内の電解質イオン濃度(EC)との関係把握試験を行った。植物の代謝活性を示す指標として、動物の場合に準じた酸素呼吸速度(摂取率)をもとにしたエネルギー代謝率を取り上げる方が適切と思われるが、ここでは、より簡便な方法としてWとECの測定を行った。その根拠は、元種カルス・茎葉部およびこれに付着した未分化カルス部(カルス部)の何れにおいても、体内ECは培地から吸収された各種イオン成分および体内で生成・代謝された有機酸や遊離アミノ酸等に影響され、しかも何れの電解質も幼植物体の再分化に必要なものであると考えられたからである。即ち、体内ECは再分化培養ステージでの単純ではあるが包括的な体内代謝量(率)を反映しているものと考えた。

上述の関係把握試験の結果、イネ元種カルス・再分化幼植物体の茎葉部およびカルス部の全体に亘って、その個体生重量W[mg(FW)]と体内ECとの関係は、 $EC = 31.25 \times W^{-0.382}$ [mS/cm/mg(FW)]で、同じく体内電解質イオン総量(TEC, 以下同じ)との関係は、 $TEC = 31.25 \times W^{0.618}$ [mS/cm]で表された。これらの関係式は、係数は異なるものの、動物における関係式と同じ傾向を有することが判明した。以上から、イネ・カルスからの幼植物体の再分化(広くはイネ植物体)培養に関しては、体内ECが代謝率の指標となり得ること並びに植物の代謝も動物とほぼ同じ傾向を有することが判った。また、本実験結果を解析することにより、①再分化培養時の組織体重量の増加に応じた培地濃度の調整や培地量設定のための指針を得る方法が導かれた。これを大規模培養槽で実現するには、培養生育過程に於ける培養槽内組織体のより正確な生重量測定法の確立が望まれる。また、②上述のTECを示した式で用いられる重量指数0.618は、大凡の電解質イオンの細胞内への取り込み状況を表す指標となり得ることが示唆された。

供試材料および試験方法

1. 供試材料

元種カルスおよび再分化幼植物体は、前報^{3,4)}でアミノ酸含有率を求めたときの材料と同様に区分して準備した。但し、材料の乾燥は行わず、濾紙の上に材料を載せた後に、その上から別の濾紙を挟み込むように被せて、約5分間脱水処理した。

2. 培養組織体摩砕液のpHおよび電解質イオン濃度ECの測定

サイズ別に区分した幼植物体から、供試材料を選別し、メスを用いてガラス板の上で、茎葉部とカルス部に切断した。元種カルスは、カルス粒径に従って区分した。切断した材料を計数し、台秤の上に載せて、生重量を測定した。その後、これらを乳鉢(50mmφ)に入れて摩砕し、一定量の純水で洗い流し、100ml容のピーカーに受け入れて測定に供した。ここに、供試した試料生重量Wごとに、希釈と洗い出しに使用した純水量が異なるため、希釈・洗い出しの液量(測定液量、v)の測定値(pH/EC)およびWから原試料のpHとECを逆算した。即ち、式 $v \times EC = W \times X$ (X以外は測定値)から、原材料のX(=EC)を求めることが出来る。元種カルスの場合は、カルスの粒径に従って区分した以外は、上記と同様に摩砕し・測定液を調整し・逆算して、pHとECを求めた。

なお、電解質イオン濃度ECの測定は、堀場製作所製 twin cond 型電気電導度計を使用し、pH測定は、同社製 twin PH 型 pH メータを使用した。

試験結果および考察

1. 培養組織個体の重量と体内電解質イオン濃度との関係

組織体の個体重量 W [mg(FW)] と測定液量 v および測定された EC を、前述の逆算計算式に代入することにより、体内電解質イオン濃度 EC [mS/cm/mg(FW)] を求めることが出来る。個体生重量 W と体内 EC との関係を Fig. 1 に示した。Fig. 1 より、組織体が元種カルスカ・再分化幼植物体であるか・カルスカ部であるか、また、その生育ステージに拘わらず、体内 EC は、個体重量が小さくなるほど高くなり、重量が大きくなるほど低くなることが判明した。両者の関係は、次式(1)で表された。

$$EC = 31.25xW^{-0.382} \quad (1)$$

本式の回帰指数 0.382 の 95% 信頼限界は、 $t_{0.05}(18) \times \sqrt{\sigma^2/S_x} = 0.178$ であることが示された^{5,6)}。また、 EC [mS/cm/mg(FW)]、電解質電解イオン濃度； W [mg(FW)]、植物体生重量； σ^2 、残差不偏分散； S_x 、回帰内分散成分である。なお、統計処理計算は、STAT VIEW J4.02 の単回帰計算プログラムを使用した⁷⁾。

また、体内電解質イオン総量 TEC と個体生重量 W の関係は、(1)式に W を乗ずることによって得られ、(2)式で表される。

$$TEC = 31.25xW^{0.618} \quad (2)$$

本(2)式は、個体重量が大きくなると電解質イオン総量は増加するが、その増加率は生重量に比例する増分よりも少なくなることを示している。

Fig. 1 Relationship between internal electric conductivity [EC, mS/cm/mg(FW)] and fresh weight (w , mg), of the cultured rice tissue.

Tissue: The callus at the start of regeneration culture and the plantlet and the callus-part of regenerated tissue at the end of regeneration culture for 5 weeks.

2. 培養組織個体の重量と体内水素イオン濃度との関係

測定した PH 値から、そのときの被検体の水素イオンの個数が求められる。これらの測定値を、pH=7 においての水素イオンの個数を基準値 1 として、この基準値に対する倍率で表すことができる。このようにして、個体生重量 W と体内 H^+ [1/mg(FW)] との関係を図 2 に示した。ここに、基準値 1 とは、 $6 \times 10^{16} (H^+/l)$ である [pH=7 における水素イオン濃度は $10^{-7} (g/l)$ で、水素イオンは 1 価であるので、 $10^{-7} (mol/l)$ と等価となり、個数に換算すると $6 \times 10^{23} \times 10^{-7} = 6 \times 10^{16}$]。

Fig. 2 から、組織体が元種カルスか・再分化カルスであるか・カルス部であるか、またその生育ステージに拘わらず体内水素イオン濃度 [1/mg(FW)] は、個体重量が大きくなるにつれて低下し、個体重量が小さくなるほど高くなることが判明した。両者の関係は、前記(1)式と同様にして求められ、(3)式となった。

$$H^+ = 127.5xW^{-0.422} \quad (3)$$

本式の回帰指数 0.422 の 95% 信頼限界は $t_{0.05}(18) \times \sqrt{\sigma^2/S_x} = 0.093$ であった^{5,6)}。また、総水素イオン量 TH^+ と個体重量 W との関係は、(3)式に W を乗じ、(4)で表される。

$$TH^+ = 127.5xW^{0.578} \quad (4)$$

本式より、組織体重量が大きくなると、水素イオン総量が増加することが示された。

上記の(1)式・(2)式と(3)式・(4)式より、EC(TEC)と $H^+(TH^+)$ は、互いに密接な関係を有していることが判る。元種カルスの電解質イオン濃度と水素イオン濃度が高いのは、組織体の細胞質密度および組織体内 2,4-D 濃度が高く、潜在的な細胞分裂・増殖能力が高いことを示している。これまでの培養経過に関する現象的観察結果に依ると、再分化培養が開始されると、カルスの肥大増殖と分粒化が始まり、やがて茎葉が分化してくることが認められる。このことは、培

Fig. 2 Relationship between internal proton density [H^+ , 1/mg(FW)] and fresh weight (w , mg), of the cultured rice tissue.
Tissue: The callus at the start of regeneration culture and the plantlet- and the callus-part of regenerated tissue at the end of regeneration culture for 5 weeks.

養経過に伴い、カルス内および茎葉部内の電解質イオンと水素イオンが消費され、これらのイオン濃度が次第に低下することを示唆している。即ち、上記の(1)～(4)は、再分化培養経過の現象的観察結果を良く説明しているものと考えられる。

3. 培養組織個体のサイズ別の体内電解質イオン濃度

前報^{3,4)}において、組織個体のサイズ別のアミノ酸濃度を示した。これらと同様に、組織個体のサイズ [mm(ϕ), mm] ごとの組織体内電解質イオン濃度 [mS/cm/mg(FW)] を、Fig. 3 に示した。本図より、小さなサイズの元種カルス (0.25 mm, ϕ) の組織体内の電解質イオン濃度は、最も高く、カルス・再分化幼植物体および幼植物体に付着したカルス部のサイズが大きくなるにつれて低下していることが認められた。また、再分化して間もない芽長の短い幼植物体では、その体内電解質イオン濃度はカルス的と思われた。このことは、再分化幼植物体の分化程度を反映しているものと考えられる。これらの結果は、前報^{3,4)}の組織体内アミノ酸濃度とも類似している。

4. 電解質イオン濃度 EC(TEC) と水素イオン濃度 H^+ (TH^+) との関係

前記の(1) [または(2)] 式および(3) [または(4)] 式から、下記の(5)が導かれる。

$$EC/H^+ = 0.25xW^{0.04} \quad (5)$$

式(5)は、電解質イオン濃度 EC で表される電解質の電子の移動量は、水素イオン濃度 H^+ で表されるプロトンによる電子の移動量と、大凡の比例関係を保持しており、このような条件下で再分化が進行していることを示している。また、プロトンに依らない電子の移動量が、個体重量に比例してほぼ平均的に $W^{0.04}$ だけ存在していることを示唆しており、このことは、有機酸やアミノ酸等の酸化還元に対応しているものと考えられる。

5. 再分化培養時の培地濃度調整、培地量の設定方法

上記の(1)および(2)式並びにこれまでに得られた再分化培養試験結果も考慮して、再分化培養時の培地濃度の調整および培地量の設定方法に就いて、考察を加えることが出来る。

1) 交換培地(後期培地)の培地濃度について

ファーメンターを用い、前期培地 800 ml にカルス 800 mg(FW) を植え込み、3 週間培養し、後期培地 1600 ml で培地置換を行い、更に 2 週間培養した [培地組成は前報に記載³⁾]。本再分化培養における、培養開始時および終了時での培養液の $EC \cdot m \cdot pH \cdot H^+ \cdot$ カルス植え込み量と培養組織生重量(GW, g)およびこれらの組織体数(No.)並びに組織体 1 個当たりの生重量(UW, mg)並びに回帰式から求めた培地交換時における UW の推定値(EUW)を Table 1 に示した。

Table 1 に示したごとく、元種カルス 0.8 g(FW) [個数は 800 (1mg/個)] を前期再分化培地に植え込み、3 週間後に後期培地に置換し、更に 2 週間後期培地で培養したところ、309.9 g(FW) [個数は 31303 (9.9 mg/個)] となった。ここで、当初の生重量 1 mg が、前期 3 週間・後期 2 週間のそれぞれの培養において、1 週間当たり増殖倍率を同率にすると、その増殖率 x は $x^{3/5} = 9.9/1$ から、 $x = 3.96$ (Table 1 の EUW) となる。これを、前期の(1)式に適用すると $W^{-0.382} = 3.96^{-0.382} = 0.59$ となる。従って、当初の EC に比べ、培地交換時には約 0.6 倍に低下していると言える。このことから、後期培地の EC を前期培地の約 1/2 に低めることが適当と推定された。

2) 交換培地(後期培地)の培地量について

前述の通り、再分化培養 3 週間の平均増殖率を 3.96 とした。これを、(2)式に適用すると、

$W^{0.618} = 3.96^{0.618} = 2.34$ となり、後期培地の電解質イオン総量は当初の約2倍が適当と推計される。㈱ナーサリテクノロジーが開発した培地交換液体再分化方法では、多くの試行錯誤的な試験結果から、後期培地の成分濃度およびその液量を前記培地のそれらに比べ、それぞれ約1/2倍と約2倍量と定めている。培養試験結果から定めた適量値と回帰式から求めた適量値は、ほぼ等しいことが判明した。このことから、一般の植物組織培養において、組織体内EC(TEC)を根幹とする回帰式を適用することによって、培養経過の途中段階における培地の成分濃度およびその液量を定量的に最適値に近づけることが可能と言える。

6. 培地電解質イオン濃度(ECm)と体内電解質イオン濃度(EC)

培地から培養組織体への電解質イオンの取り込みに関して、培地中の電解質イオン総量(TEC)の減少分が培養物組織体の体内電解質イオン総量の増加分に対応しているか否かを、Table 1を基にして、検証してみる。再分化培養開始時での体内TECは、初期重量1.0mgであるから、前記の(2)式より、 $31.25(=31.25 \times 1.0^{0.618})$ mS/cmとなる。再分化培養終了時での組織体の平均生重量は9.9mgであるので、体内TECは $128.87(=31.25 \times 9.9^{0.618})$ mS/cmとなる。ここに、平均生重量とは、再分化終了時における未分化カルスと幼植物体等の全組織体生重量を全組織体数で除したものである。体内TECの差 $97.62(=128.87 - 31.25)$ は、組織体内のTEC増加分を示している。前期培地の培養開始時ECmとその液量は、それぞれ2.9 mS/cmと800 mlであるが、培養終了時にECmがxに減少し、その減少量が体内TECmの増加量に等しいとすると、 $97.62 = 2.9 \times 800 - 1600x$ が成り立つ。これから、 $x = 1.39$ mS/cmが求められ、この値は実測値ECmの測定値範囲(0.1~1.5)に含まれていた。ここに、ECmに範囲が存在するのは、培養開始時でのECmは初期値でほぼ一定(2.9)であるのに対し、培養終了時では実験ごとに異なるためである。

以上から、元種カルスから幼植物体が再分化し、これらが生育する過程における培地内の電解質イオンの摂取量と速度が明らかにされた。再分化幼植物体と未分化カルス部の体内電解質イオン濃度の和は、Fig. 3から、 $19.1 \sim 107.3(14.4 + 92.9)$ [mS/cm/mg(FW)]であり、Table 1

Fig. 3 Electric conductivity (EC) of the calli [C] (at the start of regeneration culture), the plantlets-parts [PP] and the calli-parts [CP] (at the end of regeneration culture for 5 weeks)

Table 1 Experimental measurements of medium electric conductivity (ECm), medium pH or H⁺ (pH or H⁺), fresh weight of tissues per vessel (GW), No. of tissue clusters per vessel (No.) and fresh weight of one cluster (UW) and estimated midterm UW (EUW, estimated UW at the time of medium exchange)

Stage of regeneration culture*)	ECm (mS/cm)	pH	H ⁺	GW (FW, g)	No.	UW (FW, mg)	EUW (FW, mg)
Start	2.9	5.8	16	0.80	800	1.00	
Exchange							3.96
End	0.1~1.5	5.7	20	309.9	31303	9.90	

*) : The 0.8 g (FW) of calli were inoculated to a vessel (Vol, 2500 ml) containing 800 ml of the first step medium F1. After incubation of 3 weeks, F1 was exchanged for the second step medium F2 (1600 ml). Hereafter, the second culture was further continued for 2 weeks, and then GW etc. were measured.

H⁺ : Calculated No. of protons per l (based upon 6×10^{16} H⁺/l at pH=7)

で示される培地初期濃度(2.9)の約7~37倍, 最終濃度(計算値1.39を適用)の約14~77倍に達しており, 培養物組織体が培地内電解質イオンを摂取・濃縮し, 代謝に役立てている状況が読み取れる。

7. 体内電解質イオン総量TECの重量指数0.618について

培養組織体内の電解質イオンは, 組織体の表面から摂取されており, その単位重量当たりの摂取率と見なされる体内電解質イオン濃度ECは, 培養物の表面積Sに比例するものと考えることが出来る。いま, 組織体の粒子半径をrとすると, 表面積Sはr²に比例し, その重量Wは, 密度一定とした時, 体積Vに比例し, 体積Vはr³に比例する。

以上を式で表すと, $S = \beta x r^2$, $W = \rho x V = \gamma x r^3$

従って, $EC = \alpha x S / V = \alpha' x r^2 / r^3 = \alpha' x r^{-1} = \delta x W^{-1/3}$ (6)

体内電解質イオン総量TECは, $TEC = EC x W = \delta x W^{2/3} = \delta x W^{0.667}$ (7)

となる。

式(7)は, 組織体表面の全面から電解質イオンを摂取出来るような活性状態のときに適用されるものと考えられる。試験で得られた(2)式の重量指数(以後, 重量指数と呼ぶ)は, 0.618であり, 0.667より0.049, 割合にして7.3%だけ小さい。また, 水素イオン総量TH⁺の重量指数は, 式(4)から, 0.578であり, 0.667より, 0.089, 割合にして13.3%だけ少ない。これは恰も, 組織体の表面の一部が機能せず不活性状態となっているためと思われる。換言すれば, カルス表面に凹部分が発生し, これに培養液が滞留し, カルスと共に随伴流動し, 電解質イオンの摂取がなされない不活性領域が存在するためではないかと考えられる(電解質イオン非摂取不活性領域の想定)。また, 電解質イオン総量TECの重量指数0.618は平均値であり, この95%信頼限界は, 0.44~0.796である。もしも, 再分化培養が理想的に推移し, 最適値に近い状態では, TEC重量指数は, 0.667に近づくものと予想される。ごく稀ではあるが, 0.667よりも大きくなることもありえる, この場合は, 組織体表面に新たな電解質イオン摂取活性領域が付加されることを意味するものと言える。

培養組織体表面からの電解質イオンの摂取について, 活性領域と不活性領域を想定したが, これらの領域を組織体の形状として捉えることは難しい。再分化培養では, 再分化の相が絶えず変化しており, 再分化過程のカルス形態とその電解質イオン代謝との関係を把握することが困難で

あるからである。

引用文献

- 1) 菊池俊英：人間の生物学，第3章ガリバーと小人の生理学，理工学社，p. 25～32(1976)
- 2) Kobayashi, H.・Okii, M. and Hirosawa, T.: Enhancement of plantlets regeneration by medium exchange in liquid regeneration culture of rice (*Oryza sativa* L.), Japan J. Breed., 42: 583～594(1992)
- 3) 中園敦之・沖井三孔：イネ再分化幼植物体の生育とアミノ酸との関係，日本植物工場学会誌，8(1): 35～42(1996)
- 4) 中園敦之・沖井三孔：イネの再分化培養過程に於けるハイドロキシプロリンの分析，日本植物工場学会誌 8(2): 84～88(1996)
- 5) 林 周二：ティ分布とその応用，「統計学講義，14」，丸善，p. 185～191(1966)
- 6) 林 周二：相関と回帰の推測，「統計学講義，17」，丸善，p. 229～237(1966)
- 7) 林 周二：相関と回帰，「統計学講義，4」，丸善，p. 29～49(1966)