

## レッドチコリのプロトプラストからの植物体再生

津川 秀仁\*・松中謙次郎

(青森県農業試験場・\*農業研究センター)

Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of Red Chicory (*Cichorium intybus* L.)

Hidehito TSUGAWA\* and Kenjiro MATSUNAKA

(Aomori Agricultural Experiment Station, \*National Agriculture Research Center)

### 1 はじめに

レッドチコリは、ヨーロッパ原産のキク科野菜で、アントシアニン色素を有した鮮やかな紫色の結球タイプチコリである。我が国に新野菜として導入され、広く栽培試験が行われている。品種特性、栽培特性などは十分に把握されていないが、青森県においても注目している野菜の一つである。レッドチコリのプロトプラスト培養については、我が国での報告例は少なく、レタスとの細胞融合に供試するために、プロトプラスト培養系の検討が必要であった。今回、レッドチコリのプロトプラスト培養系について確立できたので報告する。

### 2 試験方法及び調査方法

(1) レタス培養系におけるレッドチコリのコロニー形成、不定芽形成及び培養密度の検討

レッドチコリ品種 'MC-1', 'ルビン', 比較としてレタス品種 'カルマーMR', 'マイレタス', 'ユニバース' を供試した。供試材料は、1/2MSホルモンフリー培地で無菌的に発芽させた子葉を用いた。子葉を約2mmに細断し、0.75%マセロザイムR-10, 2.0%セルラーゼYC, 0.5Mマンニトールの酵素液で3時間振盪処理し、プロトプラストを単離した。各品種について子葉40枚のプロトプラスト収量を調査した。培養方法は、Nishio et al<sup>1)</sup>のレタスの培養法に準じて実施し、レタスとチコリ品種についてコロニー形成及び不定芽形成数を調査した。コロニー形成数は、肉眼で観察できる0.5mm以上の大きさのコロニー形成数を測定し、シャーレ当たり換算した。プロトプラストの初期培養培地には、1/2濃度のMS (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>のみ80mg/l), 1mg/l NAA, 0.3mg/l BA, 500mg/l カザミン酸, 5mM MES (コハク酸ナトリウム5mMを変更), 0.3Mショ糖, 0.3%ゲルライトを用いた。ゲルライトの封埋法は、2倍濃度の培地に2×10<sup>5</sup>個/mlのプロトプラストを懸濁させ、0.6%ゲルライトを含む0.3Mショ糖液と1:1で混合して、6cmプラスチックシャーレ中で固化させた(最終濃度10<sup>5</sup>個/ml)。25℃暗黒下で7~10日目に、ショ糖液を0.15Mにした同組成の培地4ml中に、ゲルライトを8等分してそのうちの2片を浮かべて、12時間日長で培養した。さらに、7~10日後、約0.5mm程度のコロニーをつまんで、ショ糖を3%にした同組成の0.3%ゲルライト

固形培地に移植し、7日間培養した。その後、1~2mmに生育したカルスを0.3mg/l BAを含む1/2MS培地で再分化を促した。

培養密度の検討には、レッドチコリ品種として 'ルビン' を用い、10<sup>5</sup>, 2×10<sup>4</sup>, 10<sup>4</sup>, 2×10<sup>3</sup>個/mlに調整し、上記の培地で培養し、コロニー数を測定した。

#### (2) 再分化培地の検討

供試品種は、前項の実験と同様な品種を用いた。再分化培地は、MSに0.2mg/l IAA, 0.3mg/l BAを添加した培地と0.1mg/l IAA, 0.1mg/l BAを含んだ培地を供試した。また、前項の実験ではコロニーからカルスを生育させたが、本実験では、0.5mm程度のコロニーを直接再分化培地に移植した。移植後30日目に再分化調査を行った。その後、発根を確認するために、MSホルモンフリー培地に再分化した個体を移植し、生存個体数、発根個体数、茎葉水浸株の発生率を調査した。

### 3 試験結果及び考察

(1) レタス培養系におけるレッドチコリのコロニー形成、不定芽形成及び培養密度の検討

表1 各品種のプロトプラスト収量

品 種	×10 <sup>6</sup> 個/ml
M C - 1	7.76
ル ビ ン	12.44
カルマーMR	4.44
マイレタス	2.64
ユニバース	2.04

表1に各品種のプロトプラスト収量を示した。レッドチコリ、レタスの品種間差は認められるものの、傾向としてレッドチコリの収量はレタスに対して2倍以上であった。

表2にコロニー形成数及び不定芽原基形成数を示した。コロニー形成はレッドチコリ、レタスともに多数形成された。特に、レッドチコリ 'MC-1' ではレタスの4~5倍の形成率であった。レタスではコロニー形成中に黄緑色不定芽原基が形成されたが、レッドチコリでは不定芽原基の形成は認められなかった。

表3には、レッドチコリ 'ルビン' の培養密度を代えた場合のコロニー形成数を示した。2×10<sup>3</sup>個/mlではコロニー形成は全く認められず、2×10<sup>4</sup>個/ml以上でコロニー

表2 各品種のコロニー形成数及び不定芽原基形成数

品 種	コロニー形成数 (個/シャーレ)	不定芽原基形成	
		不定芽原基数 (個/シャーレ)	コロニー当たり形成率
M C - 1	1,128	0	0
ル ビ ン	574	0	0
カルマー-MR	280	56	20.0
マイレタス	229	59	25.6
ユニバース	212	24	11.7

表3 培養密度によるコロニー形成数の差異 (ルビン)

培養密度 (個/ml)	シャーレ当たり コロニー形成数 (個)
10 <sup>5</sup>	764
2×10 <sup>4</sup>	60
10 <sup>4</sup>	4
2×10 <sup>3</sup>	0

表4 再分化培地 (MS+0.5mg/l BA) 上での不定芽形成数

品 種	不定芽原基形成置床		カルス置床	
	置床数 (個)	不定芽形成数 (個)	置床数 (個)	不定芽形成数 (個)
M C - 1	—	—	20	0
ル ビ ン	—	—	16	0
カルマー-MR	6	5	6	0
マイレタス	2	2	6	0
ユニバース	4	4	6	2

数は次第に増加し、10<sup>5</sup>個/mlが良好であった。

表4には不定芽原基とカルスに分けて再分化培地 (1/2 MS+0.3mg/l BA) に置床した場合の不定芽形成率を示した。レッドチコリはカルスのみの置床であるが、不定芽形成は全く認められなかった。レタスでは不定芽原基から効率的に不定芽が生育されたが、カルスからの不定芽形成は認められなかった。レッドチコリのカルスは緑色化し増殖を続けていた。そこで、MSホルモンフリー培地に移植し直したところ、54.2%と高率に不定芽が形成された (表5)。

表5 MSホルモンフリー培地上でのレッドチコリ (MC-1) の再分化

置床カルス数 (個)	再分化数 (個)	再分化率 (%)	発根率 (%)
48	28	54.2	43.8

(2) 再分化培地の検討

表6に各種再分化培地における再分化数を示した。レッ

表6 各再分化培地での再分化率

品 種	0.2mg/l IAA+ 0.3mg/l BA			0.1mg/l IAA+ 0.1mg/l BA		
	カルス置床数 (個)	再分化数 (個)	再分化率 (%)	カルス置床数 (個)	再分化数 (個)	再分化率 (%)
M C - 1	75	29	38.7	175	95	54.3
ル ビ ン	62	32	51.6	88	39	44.3
カルマー-MR	75	6	8.0	75	7	9.3
マイレタス	25	1	4.0	—	—	—
ユニバース	125	16	12.8	25	2	8.0

—: 試験せず  
基本培地: MS

ドチコリはレタスより再分化率が高く、カルス当たり38%以上であった。また、1個のカルスから多くの不定芽が形成された。コロニーを直接再分化培地に移植したが、レタスにおいてもカルスから高率に再分化が誘導された。

表7 プロトプラストからの再分化植物体の生育

品 種	置床数 (個)	生存率 (%)	発根率 (%)	健全葉 株率 (%)	水浸状 茎葉株 率(%)
M C - 1	16	56.3	55.6	33.3	66.7
ル ビ ン	12	100.0	75.0	58.3	41.7
マイレタス	12	91.7	66.7	72.7	27.3
ユニバース	8	100.0	12.5	100.0	0.0

培地の比較では、MS+0.2mg/l IAA+0.3mg/l BA及びMS+0.1mg/l IAA+0.1mg/l BA共に高い再分化率を示した。表7にMSホルモンフリー培地での植物体の生育を示した。レッドチコリの発根率は55%以上であったが、水浸状茎葉株が多く発生した。一方、レタスの発根率は低い傾向であったが、水浸状茎葉の発生は少なかった。

4 ま と め

レッドチコリのプロトプラスト初期培地は、レタスと同様に1/2MS (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 80mg/l)+1mg/l NAA+0.3mg/l BAで良好に分裂を行ったが、レタス用のカルス形成培地及び再分化培地はレッドチコリには不適當であった。そこで、コロニーを直接MS+0.2mg/l IAA+0.3mg/l BA或いはMS+0.1mg/l IAA+0.1mg/l BA培地に移植し、再分化を促したところ、効率的に植物体が再分化された。

引 用 文 献

- 1) Nishio, T.; Sato, T.; Mori, K. and Takaranagi, K. 1988. Simple and efficient protoplast culture procedure of lettuce, *Lactuca sativa* L. Japan. J. Breed. 38: 165-171.