

山形青菜のプロトプラストからの植物体再分化

仲野 英秋・清野 栄美・佐藤 昌宏

(山形県農業試験場)

Prant Regeneration from Protoplasts of *Brassica juncea* Czern. et Coss. var. *integlifolia* Kitamura

Hideaki NAKANO, Emi SEINO and Yoshihiro SATO

(Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

山形青菜はタカナの一種で、漬物用野菜として県内で古くから栽培されているが、長日条件で抽台するため作期が限られている。そこで、細胞融合やソマクローナル変異による品種改良を図るため、プロトプラストの培養条件について検討したので報告する。

2 試験方法

プロトプラストは、無菌播種5日後の子葉及び1カ月後の本葉を約2mm幅に細刻して酵素液に浸漬し、25℃、暗黒下で50rpm 1時間処理後、1時間静置して単離した。酵素液は、0.1%ペクトリナーゼY-23、0.5%セルラーゼオノズカRS、0.5MマンニトールをCPW塩 (pH5.8) で調整したものを用いた。

本試験を行うにあたり、初代培養の基本培地について検討を行ったが、李ら¹⁾の報告にあるNitsch培地の場合、カルス形成は良好であったが再分化率は低く、またダイコンで再分化例のあるPelletierら²⁾のB培地においては初期分裂が認められなかった。そこで、西尾ら³⁾の報告を参考に、アブラナ科のプロトプラスト培養で広範囲に成功例のある修正MS培地を基本培地として培養を行った。

(1) 初代培地とコロニー形成

1) 初代培地の無機塩組成と細胞密度、追加培地法
初代培地 (MS培地+ビタミン1/2MS+1%ショ糖+0.5Mマンニトール+BA1.0mg/ℓ+NAA0.5mg/ℓ) における無機塩組成とプロトプラスト分裂状況との関係について調査した。また、培養約2週間後に追加培地を行い、細胞密度や追加培地法がコロニー形成に及ぼす影響について調査した。培養温度は、25℃とし、培養開始10日目までは暗黒下、その後は散光下に静置した。

2) 初代培地のホルモン組成

初代培地 (無機塩1/2修正MS培地 (NH₄NO₃200mg/ℓ)+1%ショ糖+0.5Mマンニトール) におけるホルモン組成 (BA, NAA, 2, 4-D) がプロトプラストの分裂・コロニー形成に及ぼす影響について調査した。

(2) プロトプラストからの植物体再分化条件

カルス誘導のホルモン条件と再分化との関係を検討するため、培養約4週間後のコロニーをBA, 2, 4-Dを組合せて添加したカルス形成培地 (無機塩1/2修正MS培地 (NH₄NO₃200mg/ℓ)+1%ショ糖+0.8寒天) にプレティングしてカルスを誘導し、得られた径1~2mmのカルスを再分化培地 (MS培地+BA1mg/ℓ+GA₃0.035mg/ℓ+3%ショ糖+0.8寒天) に移植して再分化率を調査した。

また、カルス形成培地のホルモン組成をBA0.5mg/ℓ+2, 4-D0.5mg/ℓに固定し、初代培地のホルモン組成 (BA+NAA) 及び再分化培地のホルモン組成 (BA+NAA, BA+GA₃) と再分化との関係についても検討した。再分化培養は、25℃、16時間日長条件下で行った。

3 試験結果及び考察

(1) 初代培地とコロニー形成

1) 初代培地の無機塩組成と細胞密度、追加培地法
プロトプラストの分裂は、無機塩の濃度を1/2倍にし、NH₄NO₃を200mg/ℓに修正した区で認められたが、無機塩1/1修正MS (NH₄NO₃400mg/ℓ) 培地では分裂が認められず、無機塩1/4修正MS (NH₄NO₃100mg/ℓ) 培地では分裂率が低かった (表1)。このことから、初代培地としては無機塩1/2修正MS (NH₄NO₃200mg/ℓ) 培地が適するものと判断されたので、次項試験の初代培地及びカルス形成培地の基本培地に使用した。

表1 初代培地の無機塩組成とプロトプラストの分裂

無機塩組成*	分裂程度**
A	-
B	+~±
C	+~±

*; A: 1/1MS (NH₄NO₃400mg/ℓ)

B: 1/2MS (NH₄NO₃200mg/ℓ)

C: 1/4MS (NH₄NO₃100mg/ℓ)

** : 培養5日目調査 - : 無 + : 少

細胞密度: 5.0×10⁴/ml

ホルモン組成: BA1.0mg/ℓ+NAA0.5mg/ℓ

子葉プロトプラストの培養結果

コロニー形成率は、細胞密度を2.5×10⁴/mlとし、初代培地からオーキシンのみを除いた培地を追加した区で良好であったが、細胞密度の高い区では、コロニーの褐変が観察され、コロニー形成率が低かった (表2)。

表2 初代培養の細胞密度・追加培地法とコロニー形成

細胞密度 (×10 ⁴ /ml)	追加培地 *	コロニー形成 **	コロニー褐変
2.5	a	+	±
"	b	++	±~+
5.0	a	+	+
"	b	+	+

*; a: 同一ホルモン組成 b: NAA除去

** : 培養16日目調査 - : 無 + : 少~中 ++ : 多

初代培地:

1/2MS (NH₄NO₃200mg/ℓ)+BA1.0mg/ℓ+

NAA0.5mg/ℓ

子葉プロトプラストの培養結果

プロトプラストを分裂させた後、コロニーの生育を早めたり褐変を防止するためには、培地のオーキシンの濃度を下げる必要のあるものが多く²⁾、山形青菜についても同様の傾向が認められた。

2) 初代培地のホルモン組成

初代培地のホルモン組成とコロニー形成との関係について検討した結果、子葉由来プロトプラストでは、BA0.1~1.0mg/ℓ+NAA1.0~2.0mg/ℓの組合せで細胞分裂率、コロニー形成率が高く、本葉由来プロトプラストでは、BA0.5~1.0mg/ℓ+NAA0.5mg/ℓの組合せで良好であった。BAと2, 4-Dの組合せは、コロニー形成率が低く、不適と判断される。

表3 初代培地のホルモン組成とプロトプラストの分裂、コロニー形成

ホルモン (mg/ℓ)			分裂(6日後)*		コロニー形成**	
BA	NAA	2,4-D	子葉	本葉	子葉	本葉
0.1	0.5	0	+	+	+	+
"	1.0	0	+++	±	++	~+
"	2.0	0	++	-	+++	-
0.5	0.5	0	++	+	+	+++
"	1.0	0	++	+	++	~+
"	2.0	0	++	-	+++	-
1.0	0.5	0	+	+	+	++
"	1.0	0	++	+	++	~+
"	2.0	0	++	-	+++	-
0.5	0	0.1	++	+	~+	+
"	0	0.5	+++	++	~+	~+
"	0	1.0	+++	+	~+	-
"	0	2.0	+++	+	~+	-

*; プロトプラスト分裂率 - : 0% ± : <1% + : 1~5%
++ : 5~20% +++ : 20~50%

** : 培養14日目調査 - : 無 + : 少 ++ : 中 +++ : 多

初代培地 : 1/2MS (NH₄NO₃200mg/ℓ),

細胞密度 : 2.5×10⁴/ml

(2) プロトプラストからの植物体再分化条件

カルス形成培地のBAと2, 4-D濃度と再分化との関係を検討した結果、茎葉の再分化は2, 4-D0.5mg/ℓ+BA0.5mg/ℓで誘導したカルスを再分化培地に移植した場合にのみ認められ、それ以外のホルモン濃度で誘導したカルスからの再分化は困難であった(表4)。このことから、カルスの誘導条件が再分化に密接に関与しているものと推察される。

表4 カルス形成培地のホルモン組成とカルス形成、植物体再分化

初代培地*	ホルモン組成 (mg/ℓ)		カルス** 形成	再分化 カルス数**
	BA	2,4-D		
a	0.5	0.1	+~++	0
"	2.0	0.1	+~++	0
"	0.5	0.5	+	2
"	2.0	0.5	+	0
b	0.5	0.1	++	0
"	2.0	0.1	++	0
"	0.5	0.5	+~++	2
"	2.0	0.5	+~++	0

* : 初代培地 : 1/2MS (NH₄NO₃200mg/ℓ)

a : BA0.1mg/ℓ+NAA1.0mg/ℓ

b : BA0.5mg/ℓ+NAA1.0mg/ℓ

** : カルス培養14日後調査

- : 1mm未満 + : 1~2mm ++ : 2mm以上

*** : 再分化培地 :

MS+BA1.0mg/ℓ+GA₃0.035mg/ℓ5mg/ℓ

+3%suc.+0.8%agar

移植カルス : 20個/区

本葉プロトプラストの培養結果

初代培地及び再分化培地のホルモン組成が再分化に及ぼす影響について検討した結果、初代培地のホルモン組成をBA0.5mg/ℓ+NAA1.0mg/ℓとし、BA0.5mg/ℓ+GA₃0.035mg/ℓを添加した再分化培地に移植した場合に、最も多くの茎葉の再分化が認められた(表5)。

再分化した茎葉はホルモンフリーのMS培地への移植により発根し、馴化個体を得ることができた。

表5 再分化培地のホルモン組成と植物体再分化

初代培地	ホルモン組成 (mg/ℓ)			再分化茎 葉数*
	BA	NAA	GA ₃	
a	0.1	0.01	0	0/15
"	0.5	0.01	0	0/15
"	1.0	0.01	0	0/15
"	0.1	0	0.035	3/15
"	0.5	0	0.035	1/15
"	1.0	0	0.035	0/15
b	0.1	0.01	0	0/15
"	0.5	0.01	0	4/15
"	1.0	0.01	0	2/15
"	0.1	0	0.035	2/15
"	0.5	0	0.035	7/15
"	1.0	0	0.035	4/15

* : 再分化培養1.5ヵ月目調査

再分化カルス数/移植カルス数

カルス形成培地 :

1/2MS (NH₄NO₃200mg/ℓ)+BA0.5mg/ℓ

+2,4-D0.5mg/ℓ+1%suc.+0.8%agar

本葉プロトプラストの培養結果

なお、本試験の培養系において細分化植物を得ることができたが、さらに効率的な再分化系を確立するために、初代培地においてChatterjeeら(1983)のB5改変培地等についても検討する必要があるものと思われる。

4 ま と め

山形青菜のプロトプラスト培養について検討した。初代培地としては、無機塩組成1/2修正MS (NH₄NO₃200mg/ℓ)の基本培地にBA0.5mg/ℓ+NAA1.0mg/ℓを添加した培地が適していた。コロニー形成は、細胞密度を2.5×10⁴/mlとし、細胞分裂後はNAAを除いた新鮮培地を追加することによって促進された。植物体の再分化は、BA0.5mg/ℓ+2, 4-D0.5mg/ℓを添加した培地でカルスを誘導し、得られたカルスをBA0.5mg/ℓ+GA₃0.035mg/ℓ添加の再分化培地へ移植した場合に最も多かった。

引 用 文 献

- 1) Li, W.; Chen, Z.; Song, Y. 1986. Studies on plant regeneration from protoplasts of Brassica juncea. Acta Genetica Sinica. 13(3) : 184-187
- 2) 西尾 剛, 坂田 好輝, 山岸 博, 田部井 豊, 佐藤 隆徳, 高柳 謙治. 1989. 各種野菜におけるプロトプラスト培養技術の開発と改良. 野菜・茶試研報 A. 3 : 67-96
- 3) Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrit, R.; Remy, R.; Roudille; Renard, M. 1983. Intergeneric Cytoplasmic Hybridization in Cruciferae by Protoplast Fusion. Mol Gen Genet. 191 : 244-250