

琉球大学学術リポジトリ

[報文]カラシナのカルス由来プロトプラストからの不定芽再分化

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徳元, 正和, TOKUMOTO, Masakazu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016560

カラシナのカルス由来プロトプラストからの不定芽再分化

徳元正和

(沖縄県農業試験場)

Shoot Regeneration from Protoplasts Derived from Callus of Brassica Juncea

Masakazu TOKUMOTO

Okinawa Prefectural Agricultural Experiment Station,
4-222 Sakiyama-cho, Naha, Okinawa 903

諸言

プロトプラストを用いた細胞融合や遺伝子導入など、細胞レベルで作物育種を行う場合、プロトプラスト培養法は育種の技術として欠かせないものになりつつある。これまで多くの作物種でプロトプラストからの植物体再分化報告があるが¹⁾、特に野菜分野での成功例が多い。なかでもアブラナ科のキャベツやブロッコリー、ウリ科のキュウリやメロン等ではプロトプラストからの植物体再分化が安定的な技術になっており、体細胞雑種による新品種の作出や遺伝子の導入等、育種への利用が試みられている^{2) 3) 4)}。

中国を原産とするアブラナ科のカラシナは、沖縄地方における特産野菜として定着しているが、国内での育種例はあまりなく、また、プロトプラスト培養についての報告は見あたらない。

本研究は地域特産野菜に対する細胞育種技術の応用が目的であり、本報ではカラシナの子葉から誘導したカルスを用いてプロトプラストを分離培養し、カルス形成を経て不定芽形成が確認されたので報告する。

実験方法

1) カルスの誘導と増殖

カラシナ (*Brassica juncea* Czern. et Coss.) の種子を、70%エタノールに30秒間、1%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬滅菌後、滅菌水で3回洗浄した。これをMurashige・Skoogの固形培地(MS培地)に播種し、27℃、16時間照明で1週間培養後、展開した子葉をBA(ベンジルアデニン)、カイネチンとNAA(ナフチル酢酸)、2.4-D組合せのMS固体培地に移植しカルス誘導を行った。

誘導カルスは概らの方法に準じて⁵⁾ステレスメッシュを用いて碎き、MS液体培地(2.4-D 1 mg/ℓ)で回転振とう培養して増殖した。培地は1週間毎に新鮮培地と交換した。

2) プロトプラストの分離

増殖したカルスは洗浄液(0.5Mマンニトール液)中で細断後、切片をマセロザイム0.1%、セルラーゼオノズカR-10、RSの各0.5%、デキストラン硫酸カリウム0.5%、マンニトール0.5 M、pH 5.7の酵素液にいれ、27℃、50rpmで3時間回転振とうした。プロトプラストを含む酵素液は80μmのナイロンメッシュのフィルターで濾過し、500rpmで5分間遠心後に上澄液を捨て、沈殿したプロトプラストを洗浄液に懸濁した。同条件でさらに2回遠心・洗浄を繰り返し酵素液を除いた。

3) プロトプラストの初期培養条件の検討

調整したプロトプラストは浸透圧濃度に対す

*沖縄県那覇市首里崎山町4-222

る安定性, 初期分裂におけるホルモンの影響, 基本培地濃度及び窒素塩濃度の影響について調べた。

浸透圧濃度に対するプロトプラストの安定性については, プロトプラストを各濃度のマンニトール液で約 1×10^6 個になるように調整し, 6 cm シャーレに 3 ml ずつ添加し培養した。各時間における健全な形のプロトプラスト数は, 倒立顕微鏡で計測した。

プロトプラスト分裂に及ぼすホルモンの影響については, BA と NAA の各濃度組み合わせの MS 培地を用いて調べた。

プロトプラスト分裂に及ぼす培地組成の影響については, NH_4NO_3 を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に換地した修正 MS 培地を用い, あらかじめ窒素源を除いた同培地に KNO_3 もしくは $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加して, 濃度別の影響を調べた。細胞分裂は培養 5 日後に倒立顕微鏡にて測定した。なお, 上記培養培地は 1% のシヨ糖を含み, pH 5.7 に調整した液体培地で, 培養は 27°C の暗黒条件下でおこなった。

4) コロニー形成と不定芽誘導

修正 MS 培地 1/2 濃度, マンニトール 0.45 M, シヨ糖 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mg/l, KNO_3 475 mg/l を基本培地とし, ホルモンは BA 1 mg/l と NAA 0.5 mg/l の組合せ, もしくは 2,4-D 1 mg/l に活性炭 (0.035%), カザミノ酸 (0.025%) 及び Conditioning 培地 (あらかじめ基本培地でカラシナ葉を培養した培養ろ液) を 50% 添加した培地でプロトプラストの初代培養を行った。培養は 27°C, 暗黒条件下で行い約 3 週間でコロニーが形成された。コロニーの形成された培地は 2 週間毎に培地交換を行い, コロニーの生育を促した。培養後 5~7 週間を経過し 2~3 mm 大に生育したカルスを固形培地に移植し不定芽の誘導を行った。不定芽誘導は 27°C, 約 2,000 lx, 16 時間照明下で行った。

実験結果および考察

プロトプラストの材料は通常葉肉を用いて行うことが多い。しかし, カラシナ葉肉由来のプロトプラストは物理的的刺激に弱く, 精製時における収量減と生存率の低下, さらに細胞分裂の遅延と異常な分裂が観察された (Fig. 1)。そこで, 大槻らの方法⁵⁾にしたがい, カルスを材料に用いてプロトプラストの単離と培養を試みた。

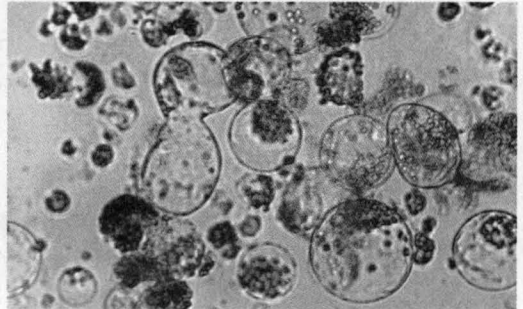


Fig 1 The first cell division of leaf mesophyll protoplast

子葉からのカルス誘導を Table 1 に示した。オーキシンの 2,4-D, NAA そしてサイトカイニンの BA, カイネチンを含むいずれの培地においてもカルスは誘導された。サイトカイニンは単独でも増殖効果は高かったが, サイト

Table 1 Cullus induction and plant regeneration from leaf of *B. juncea* on MS medium containing auxin and cytokinin

Auxin (mg/l)	Cytokinin (mg/l)							
	BA				Kinetin			
	0	0.5	1	5	0.5	1	5	
2,4-D	0	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0.5	++	++	++	++	++	+	+
	1.0	++	++	+	+	++	++	++
	2.0	++	++	+	++	++	+	+
NAA	0.5	++(R)	++(S/R)	++(S/R)	+++ (R)	++(R)	++(R)	++(R)
	1.0	++(R)	+++ (S/R)	+++ (S/R)	+++ (R)	+(R)	+(R)	+(R)
	2.0	++(R)	++(R)	+++ (R)	+++ (S/R)	+(R)	+(R)	+(R)

Degree of callusing: - :not visible, + :poor, ++ :good, +++ :very good S : Shoot formation R : Root formation

カイニンを含む培地のカルスはやや緑色をおび、形状もオーキシン単独のカルスとは異なり、かつ酵素処理によるプロトプラスト分離および収量が低かった。しかし、2,4-D単独培地でのカルス増殖はサイトカイニンを含む培地に劣るものの、酵素処理によるプロトプラスト収量は多かった。従って、以後の実験におけるカルス誘導および増殖は2,4-D1mg/ℓを含むMS培地で行った。NAAを含む培地ではカルス形成後発根がみられ、さらにNAA0.5-1mg/ℓとBA0.5-1mg/ℓの組合わせ範囲においてはシュート形成が認められた。いわゆる、脱分化したカルスからの、植物体再分化が確認された (Fig. 2)。

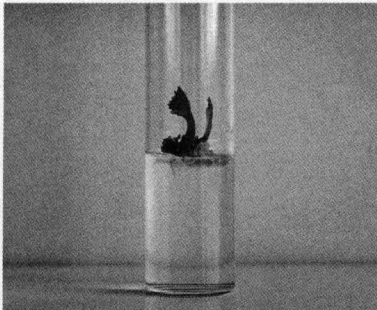


Fig 2 Shoot formation from cullus on MS medium containing BA and NAA

プロトプラストのマニトール濃度に対する安定性をTable 2に示した。浸透圧剤は通常マ

Table 2 Effect of Mannitol concentration on protoplast stability in *B. juncea*

Concentration (M)	Time				
	1	15	20	30	48 (hr)
0.400	+++	++	++	+	±
0.425	+++	++	++	+	±
0.450	+++	++	++	++	±
0.475	++++	+++	+++	++	+
0.500	++++	+++	+++	+++	++
0.525	+++	++	++	+	±
0.550	+++	++	++	+	±
0.575	++	+	+	±	±
0.600	++	+	+	±	-

Degree of survival protoplast: -, 0%; ±: <3%; +: 3-10%; ++: 10-30%; +++: 30-50%; ++++: >50%

ンニトールなどの糖アルコールやぶどう糖などの糖を用いるが、植物の種類や組織の由来により浸透圧剤や濃度に対する安定性に差異がある。代謝的に不活性と考えられ最も利用されているマンニトールは、0.3~0.7Mの濃度範囲で利用されるが、カラシナプロトプラストにおいては0.475~0.5Mの濃度で最も安定であった。

Table 3 Effect of NAA and BA on protoplast division in *B. juncea*

BA(mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)			
	0.2	0.5	1.0	2.0
0	8.3	13.5	15.9	12.7(%)
0.2	17.7	11.4	16.8	10.7
0.5	17.8	22.7	22.5	8.4
1.0	21.9	29.4	20.9	6.9

プロトプラスト分裂におよぼすホルモンの影響をTable 3に示した。植物細胞の分裂は、サイトカイニンあるいはオーキシン単独では効果の低い事があり、両者の相乗効果で分裂が促進されると考えられている。しかし、2つのホルモンがどのような働きをしているのか、まだはっきりした結論は得られてない⁶⁾。カラシナプロトプラストにおける分裂率は、BA0.5~1mg/ℓとNAA0.5~1mg/ℓの組合わせ範囲で比較的高い分裂率が得られ、BA1mg/ℓとNAA0.5mg/ℓの組合わせで最も分裂率が高かった。

窒素源を除いたMS培地濃度及び同培地に添加する硝酸塩濃度、アンモニウム塩濃度がプロトプラストの初期分裂に及ぼす影響をTable 4, 5に示した。植物には窒素源としてNH₄⁺を好む植物やNO₃⁻を好むものがある。また、培地中のNの形態がNH₄⁺かNO₃⁻かということは単に細胞の増殖のみでなく、不定胚形成にも関係している⁷⁾。MS培地濃度及びKNO₃濃度がカラシナのプロトプラスト分裂に及ぼす影響を見ると (Table 4), MS培地が1/1~1/2

Table 4 Effect of varied concentration of KNO_3 and MS* minerals on protoplast division in *B. juncea*

Dilution of MS*	KNO_3 (mg/ℓ)					
	0	237	475	950	1,900	3,800
1/1	5.9	23.2	36.2	16.9	10.2	0
1/2	5.1	22.5	26.4	16.1	9.8	0
1/4	7.3	8.5	8.3	11.4	9.6	0
1/8	0	0	0	0	0	0

*MS minerals were excepted for a nitrogen source

Table 5 Effect of varied concentration of $(NH_4)_2SO_4$ and MS* minerals on protoplast division in *B. juncea*

Dilution of MS*	$(NH_4)_2SO_4$ (mg/ℓ)					
	0	200	400	800	1,600	3,200
1/1	5.4	18.7	19.8	16.5	16.2	7.2
1/2	6.4	34.7	31.3	17.6	17.0	6.2
1/4	8.2	18.8	25.4	10.2	5.1	0
1/8	0	0	0	0	0	0

*MS minerals were same Table 4

Table 6 Effect of the growth regulation on colony formation and plant regeneration in *B. juncea*

Growth regulators(mg/ℓ) Additives	1 nd cultivation			2 nd cultivation			
	BA	NAA	2,4-D	cell division	colony formation*	shoot formation	root formation
Control	1	0.5		33.9(%)	++	0(%)	100(%)
			1	18.8	-	0	0
Activated Chacoal(0.035%)	1	0.5		0	-	0	0
			1	0	-	0	0
Cazamino Acid(0.025%)	1	0.5		39.3	++	0	100
			1	14.4	-	0	0
Conditioned Medium (50%)	1	0.5		54.5	+++	12	94
			1	17.5	-	0	0

*Degree of colony formation ; - : 0, + : 10~50, ++ : 50~100, +++ : >100/plate.

濃度, KNO_3 が237~950mg/ℓの範囲で比較的良好な細胞分裂が見られた。最も分裂率が高かったのはMS培地1/1濃度で KNO_3 が475mg/ℓであった。 KNO_3 の高濃度は初期分裂に阻害的に働いた。また, $(NH_4)_2SO_4$ 濃度の影響を見ると (Table 5), MS培地1/1~1/2濃度及び $(NH_4)_2SO_4$ の200~800mg/ℓの範囲で良好な分裂が見られ, MS 1/2濃度及び $(NH_4)_2SO_4$ 200mg/ℓで最も分裂率が高かった。 KNO_3 同様, 高濃度の $(NH_4)_2SO_4$ は阻害的に働くことが示された。いずれの場合も, MS培地1/8の低濃度では分裂は認められなかった。

上記の結果で得られた最適条件の培地を基本に, プロトプラスト分裂, コロニー形成, シュート形成, 発根に及ぼす種々の添加物の影響をTable 6に示した。初期培養において活性炭添加培地を除く各培地で細胞分裂 (Fig. 3)が見られたが, 2,4-D添加の培地では分裂率が低く, コロニー形成まで至らなかった。最も細胞分裂およびコロニー形成 (Fig. 4)が良好だったのはConditioning培地で, 同培地で形成されたコロニーを継代培地に移植するとカルスを経てシュートが形成された (Fig. 5)。同培地におけるシュート形成率は12%, 発根率が94%であった。また, 対照及びカザミノ酸添加の培地においても, コロニーおよびカルス形成を経て出根が見られたが, シュート形成は見られなかった。

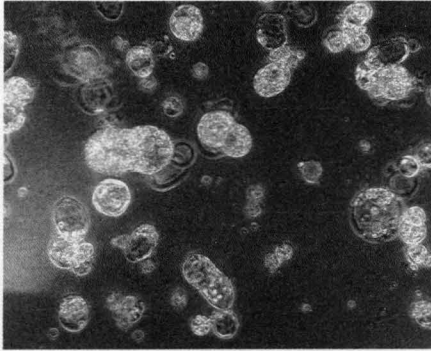


Fig 3 The first cell division of callus protoplast

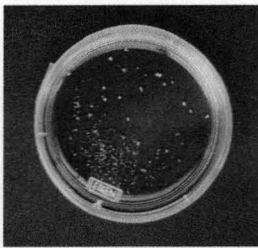


Fig 4 A cell colony that had formed 3 weeks after protoplast isolation

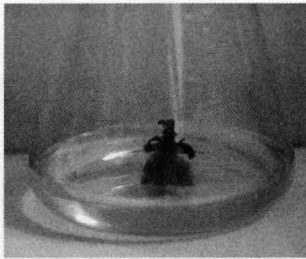


Fig 5 Shoot regeneration from protoplast

植物のプロトプラスト培養において、新しい培地での分裂・増殖は困難だが、すでに培養に使用した培地 (Conditioning培地) を新培地に加えて培養すると増殖が促進されることがある。これは、成長旺盛な細胞やカルス等から細胞分裂を促進する物質が培地中に分泌されると考えられているが⁸⁾、Bellincampiらはニンジンの培養細胞から分子量約 700 の Conditioning Factor と呼ばれる細胞増殖因子を分離し⁹⁾、また、Birnbergらは対数増殖期にあるトウモロコシ懸濁細胞培養培地から分子量約 1,200 の細胞増殖因子を確認している¹⁰⁾。これらの因子の構

造は植物ホルモンとは化学的に類似せず、オリゴ糖類と推定されているが、構造は解明されていない。カラシナ葉培養培地を用いた場合もプロトプラスト分裂及びコロニー形成を促進したことから、葉培養培地中には、植物ホルモンとは異なる、細胞増殖に関与する因子が分泌されている可能性が示された。

要 約

カラシナカルスから単離したプロトプラストを用いて、初期分裂に及ぼす基本培地濃度、窒素塩濃度の影響、ホルモン濃度の影響、さらに不定芽再分化に対する各種添加物の効果について検討した。

カラシナプロトプラストは浸透圧調節剤のマニトール 0.475~0.5M の範囲で安定であった。

プロトプラストの初期分裂に対して、BA 1 mg/l と NAA 0.5 mg/l のホルモン組合せで効果が高く、分裂率は 29.4% であった。また、修正 MS 培地 (NH_4NO_3 を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に置換) の窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ は 200 mg/l、 KNO_3 は 475 mg/l の濃度でもっとも高い分裂率が得られ、それぞれ 34.7%、36.2% であった。修正 MS 培地中の無機塩濃度 (窒素源は除く) は 1/2 濃度が効果的であった。

得られた最適条件の培地に、活性炭 (0.035%)、カザミノ酸 (0.025%)、コンデショニング培地 (50%) を添加して、プロトプラスト培養をすると、活性炭以外はコロニーを経てカルスが形成された。特にコンデショニング培地ではコロニーおよびカルス形成効果が高く、得られたカルスを再分化培地に移植すると、コンデショニング培地で不定芽形成 (形成率 12%) が見られた。しかし、他の培地では不定芽は形成されず不定根のみ形成された。

文 献

- 1) 中島卓介 (1994) 1993年度 細胞育種技術の進捗状況, BRAINテクノニュース, 42, p 22

- 2) 赤松豊和, 他 (1988) 育雑, 38 (別1), 14.
- 3) 田口拓郎, 他 (1993) 植物組織培養, 10, 138.
- 4) 吉岡啓子, 他 (1992) 育雑, 42, 277.
- 5) 大槻義昭, 他 (1988) 育雑, 38 (別1), 78.
- 6) 倉石すすむ (1990) 植物ホルモン [第2版], P 89.
- 7) S. Narayanaswamy, (1977) "Plant Cell, Tissue, and Organ Culture", ed. by J. Reinert, Y. P. S. Bajaj, p. 178, Springer-Verlag, Berlin.
- 8) 山川 隆, 児玉 徹 (1990) 植物細胞工学, 2, 569.
- 9) Bellincampi, D and Morpurgo, G (1987) Plant Science 51, 83-91
- 10) Birnberg, P.R. et al (1988) J. Plant Physiol. 132, 316-321