

カラシナ ‘さがみグリーン’ における 胚軸由来カルスからの植物体再生

野村 研・河田隆弘・北 宜裕

Whole Plant Regeneration from Hypocotyl-derived Calli of Leaf Mustard Variety (*Brassica juncea*) ‘Sagami-green’

Ken NOMURA, Takahiro KAWATA, and Nobuhiro KITA

摘 要

神奈川県育成のカラシナ ‘さがみグリーン’ の特性の改良を目的に、その組織培養法について検討した。無菌播種1週間後の幼植物の子葉及び胚軸を各種生長調節物質を含むMS培地に置床したところ、2,4-Dを $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ に調製した培地に胚軸を置床した場合に緑色のカルスが形成された。この胚軸由来カルスをNAA $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Tdz $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及び2iP $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を含むMS培地に移植した場合に最も高率で不定芽が形成された。これをさらにMSホルモンフリー培地に移植するとすべての個体で発根と茎葉の分化が確認された。再分化個体を順化することにより正常に生育する個体が得られた。

謝 辞

本研究を行うに当たり、横浜市立大学木原生物学研究所 笹隈哲夫教授には本報告書のご校閲をしていただいたことに感謝の意を表する。

キーワード：さがみグリーン，組織培養

Summary

Plant regeneration calli were induced from hypocotyl of leaf mustard cv.Sagami-green on MS medium containing $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D. Shoots were emerged from the calli on MS medium supplemented with $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of NAA, $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of Tdz and $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2iP, resulting in the whole plant regeneration. These shoots were regenerated upon transfer hormone-free MS medium.

Keyword: Sagami-green, regeneration

緒 言

カラシナ ‘さがみグリーン’ は当研究所において1996年に育成された品種で、本県伊勢原地域在来の‘大山菜’と‘晩生平茎大葉高菜’の交雑後代から選抜された(藤代ら 1999)。その特徴は、‘大山菜’の浅漬け特性を保ちながら、葉肉質が柔軟で、葉面に毛じがなく、葉色が濃く、食感が良いことである。一方、カラシナの特徴である漬け物にした際の辛味が少なく、冬期の耐寒性はやや弱い。春まきは抽だいするため栽培には不適であり、また夏まきでは病虫害が多発するなど作期が限定されている(藤代ら 1999)。これらの形質を改善することにより作期の拡大が可能となり、本県特有の地域特産物としてより普及が促進されるものと期待される。

このような特性の改善は交雑困難な組み合わせでの種属間交雑や細胞育種、遺伝子組換え等の先端技術の利用により効率的に行うことが可能と考えられるが、そのためには基本技術となる組織培養系の開発が欠かせない。アブラナ科野菜ではこれまでにハクサイ、コマツナ、カブ等において葉片、子葉、胚軸培養の事例が報告されている(松本 1990)。また、カラシナの培養系については複数報告されているが(George *et al* 1980, 北浦ら 1996)、その効率は品種間差が大きく、‘大山菜’は難培養性、‘晩生平茎大葉高菜’は培養可能であることから(北浦ら 1996)、『さがみグリーン’が培養効率の点でどのような特性を受け継いでいるかは不明である。

そこで、本研究で‘さがみグリーン’の培養系の開発に取り組んだ結果、高い効率で再生体を得る手法を確立したので報告する。

材料及び方法

1. 供試材料

当所で保存している平成10年産種子を用い、70%エタノール中で1分間、0.05%界面活性剤を含む1%次亜塩素酸ナトリウムで10分かしくはん後、滅菌水で洗浄することにより除菌した。この種子をMS培地に無菌播種し、発芽後1週間程度たった幼植物を供試した。得られた無菌幼植物の子葉及び胚軸部を1cm程度に切断後、各種の生長調節物質を含む培地に置床した。また、同様に0.5mg・L⁻¹の2,4-Dを含むMS培地(pH6.0)に10日間置床してカルス形成を誘導後、各種培地に移植した。

2. 培養方法

MS培地(pH6.0)を基本とし、ショ糖3%、固形材としてゲルライト0.2%を加えた。生長調節物質にはオーキシ

ン類として2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-Dichlorophenoxy acetic Acid, 以下2,4-Dと略記)、ナフタレン酢酸(Naphthyl Asetate, 以下NAAと略記)、3-インドール酢酸(3-Indoleacetic Acid, 以下IAAと略記)を、サイトカニン類として6-ベンジルアミノプリン(6-Benzylaminopurine, 以下BAと略記)、チジアズロン(Thidiazuron, 以下Tdzと略記)、イソペンテニルアデニン(N⁶-(2-Isopentenil)adenine, 以下2iPと略記)をそれぞれ0.1~8mg・L⁻¹の濃度で組み合わせて試験区を設計した。

3. 再分化及び植物体の順化育成

不定芽の形成された植物についてMSホルモンフリー培地に継代し、植物体を再分化させた。再分化した植物は、パーミキュライトに移植し、液肥を用いて培養室内で順化・育成した。

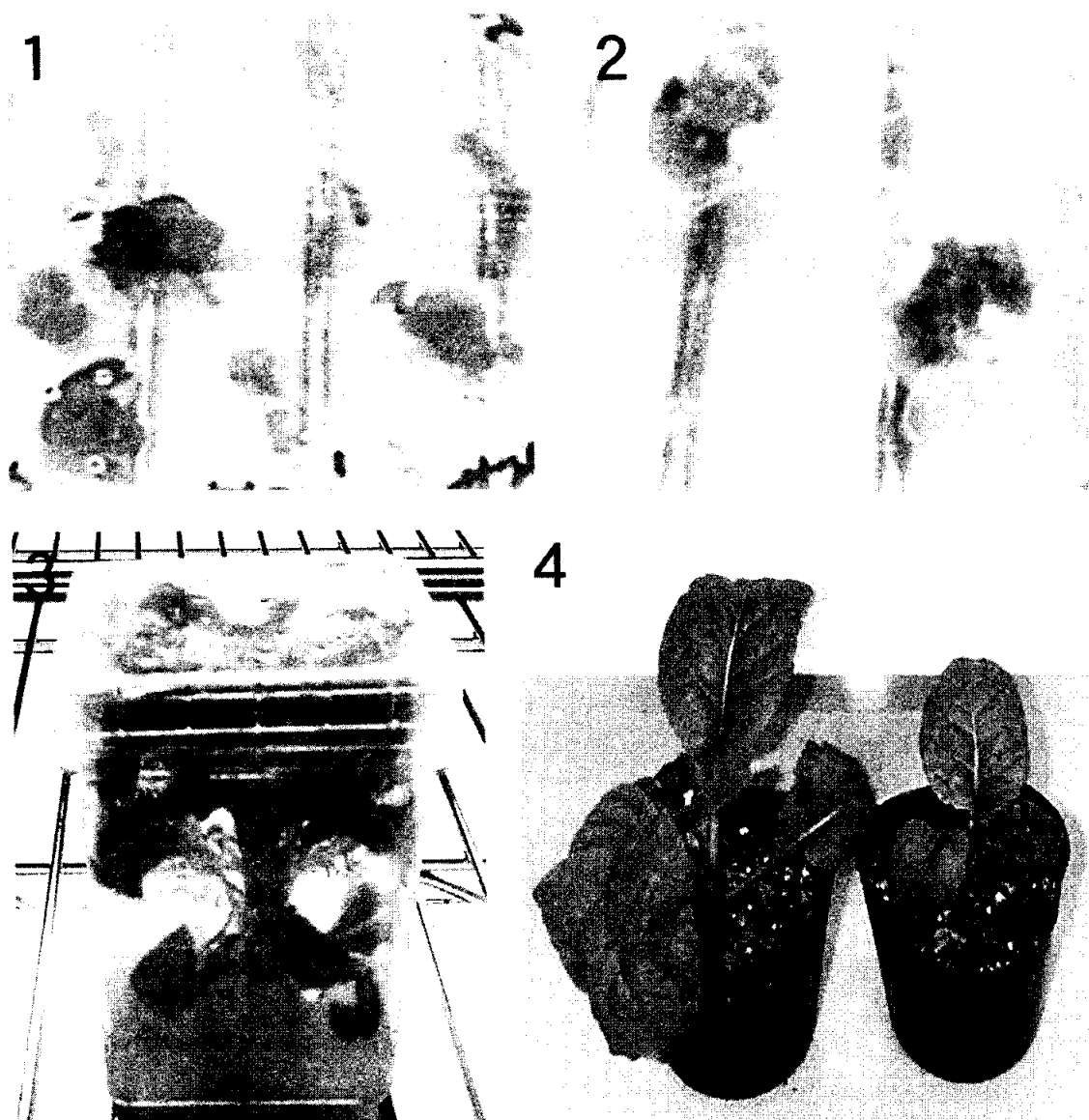
結 果

1. 子葉及び胚軸の生育に及ぼす生長調節物質の影響

無菌的に育成した幼植物における子葉及び胚軸の各種生長調節物質に対する反応について検討した(第1表)。カルスが形成されたのは2,4-Dの0.5及び2mg・L⁻¹、NAA及びTdzがそれぞれ0.5または1mg・L⁻¹の試験区であった。供試部位を比較すると、子葉では培地に接していない部分から褐変が進む傾向にあり、枯死する個体も認められた。また、カルスが認められるのも外植片の一部のみであった。一方胚軸部では黄白色またはやや緑色のカルスが全体的に形成され、その後、切断面のカルスが肥大化した。カルスの状態は2,4-D 0.5mg・L⁻¹の区で最も緑色が濃く、供試試料として適当であると判断された。不定芽の形成や発根はいずれの試験区においても認められなかった。

2. 胚軸由来カルスからの植物体再生

2,4-D添加培地での胚軸部のカルス形成率は100%であったことから、カルス形成後の植物体再生実験には胚軸由来カルスを供試した。2,4-D 0.5mg・L⁻¹を含むカルス形成培地で7~10日程度カルス形成させた胚軸部を、各種生長調節物質を含む培地に置床した(第2表)。供試植物の反応は生長調節物質の組み合わせにより著しく異なり、早い組み合わせでは1か月で不定芽の形成や発根が確認された(第1図 1,2)。不定芽形成率はNAA 0.5mg・L⁻¹、Tdz 1mg・L⁻¹及び2iP 2mg・L⁻¹を添加した培地が80%と最も高く、次いでIAA 0.1mg・L⁻¹にBAを1または2mg・L⁻¹添加した培地が60%となった。また、これ以外にも不定芽や発根が認められる区もあったが、その効率



第1図 カラシナ‘さがみグリーン’のカルス形成と再分化

1. カルス形成後、再分化培地に置床して誘導された不定芽
2. カルスからの発根
3. MSホルモンフリー培地に置床して再生した植物体
4. 順化後の植物体

はこれらの上記2つの培地に比べ劣っていた。ほかの区ではカルスの肥大が確認される場合もあるものの、不定芽形成や発根は認められなかった。不定芽が形成された個体をMSホルモンフリー培地に置床したところ、すべての個体が発根とともに葉身が増大し、1か月で成苗となった(第1図3)。これらの植物は、バーミキュライトを培地に用いてポリポットに移植し、1~2週間かけて順化した(第1図4)。順化後の植物については形態等の異常は認められなかった。以上の結果、さがみグリーン幼植物体の胚軸をカルス形成培地に置床後10日でカルス形成、不定芽形成に1か月、再分化と順化に1か月半の計約3か月でカルスからの植物体の再生が可能となった。

考 察

‘さがみグリーン’は神奈川県伊勢原地域の在来種である‘大山菜’を改良し、本県で育成されたカラシナ(*B. juncea*)である。カラシナを含むアブラナ科野菜の組織培養に関する研究は多数行われている(松本 1990)。Georgeら(1980)は、カラシナの発芽体から切除した子葉を各種生長調節物質を含むMS寒天培地に置床し、その効果を検討し、BA $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の添加によりシュート形成が促進されることを報告している。また、奥野ら(1994)は葉カラシナの側芽をBA $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2%ショ糖、0.6%寒天または0.2%ゲランガムを含むMS

第1表 子葉及び胚軸の生育に及ぼす生長調節物質の影響

培地 No	生長調節物質(mg·L ⁻¹)*						供試数	カルス形成数		不定芽形成数		発根数	
	2,4-D	NAA	IAA	BA	Tdz	2iP		子葉	胚軸	子葉	胚軸	子葉	胚軸
1	0.5						5	5	5	0	0	0	0
2	2						5	5	5	0	0	0	0
3		0.1		0.1			5	0	0	0	0	0	0
4		0.1		1			5	0	0	0	0	0	0
5		0.1		2			5	0	0	0	0	0	0
6		1		1			5	0	0	0	0	0	0
7		1		2			5	0	0	0	0	0	0
8		0.5			1	1	5	0	0	0	0	0	0
9		0.5			1	2	5	0	0	0	0	0	0
10		0.5			1	4	5	0	0	0	0	0	0
11		0.5				0.5	5	1	4	0	0	0	0
12		1				1	5	1	4	0	0	0	0
13		1				4	5	0	0	0	0	0	0
14		1				8	5	0	0	0	0	0	0
15			0.1	0.1			5	0	0	0	0	0	0
16			0.1	1			5	0	0	0	0	0	0
17			0.1	2			5	0	0	0	0	0	0
18			1	1			5	0	0	0	0	0	0
19			1	2			5	0	0	0	0	0	0
20			1	4			5	0	0	0	0	0	0

*2,4-D:2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, NAA:Naphthalene Acid, IAA:3-Indoleacetic Acid, BA:6-Benzylaminopurin, Tdz:Thidiazuron, 2iP:N-(2-Isopentenyl)adenine

培地に置床することで連続的に側芽を増殖する条件を明らかにした。Yongら(1999)は、遺伝子導入のために培養系の検討を行っており、BA 2mg·L⁻¹ 及びNAA 0.1mg·L⁻¹を含むMS寒天培地を基本培地にして再生植物体を得ている。北浦ら(1996)は、'大山菜'を含むカラシナ類数品種の培養条件について検討し、不定芽形成能力の品種間差とともにその遺伝的改良の可能性を指摘している。これらの報告で用いられている生長調節物質はBA及びNAAであるが、'さがみグリーン' 幼植物体の各切片または胚軸由来カルスを用いても、NAAとBAを添加した培地ではいずれの濃度の組み合わせでも再分化個体は得られなかった。このことは'さがみグリーン'が培養効率の点で難培養性の大山菜の形質を受け継いでいる可能性を示唆している。

本研究では胚軸由来カルスからの植物体再生条件を明らかにした。その特徴は、カルス形成後にオーキシン類とサイトカイニン類を複数組み合わせた培地で不定芽を誘導後、ホルモンフリーの培地で発根・茎葉分化させることである。生長調節物質の組み合わせで植物体の反応は全く異なっていた。また、カルスを経過しない植物では同様の培地に置床しても不定芽の形成等の反応は認め

られなかった。このことからカルス形成後に複数の生長調節物質を検討することでカラシナの培養効率の品種間差を克服できるものと考えられる。また、同様の手法がほかの培養困難なアブラナ科野菜・品種にも適用可能と思われる。本研究結果を用いて培養変異や遺伝子導入等、育種手法についての選択の幅が広がるとともに、効率的な品種育成につながるものと期待される。

カラシナは近年、その環境浄化機能が注目されている。土壌中への重金属の蓄積は大きな環境問題の一つとなっている。これを解決するための生物学的手法の一つとして植物の利用が試みられており、複数の植物についてスクリーニングした結果、カラシナは重金属を吸収する能力が高い植物であることが認められている(Salt et al. 1995)。また、Zhuら(1999)はその機能を遺伝的に改良する手法として遺伝子組換え技術を応用し、グルタチオン合成酵素を導入したカラシナを作成したところ、これらの組換え体はカドミウムの吸収力が增加することを報告している。また、カラシナを土壌中に混入するとカラシナの辛味成分であるアリルイソチオシアネートの殺菌作用によりホウレンソウ萎凋病が抑制されるなど、土壌病害に対する抑制効果も報告されている(竹原ら1996)。

第2表 胚軸由来カルの生育に及ぼす生長調節物質の影響

培地 No	生長調節物質(mg・L ⁻¹)*						供試数	個体数			
	2,4-D	NAA	IAA	BA	Tdz	2iP		不定芽形成	発根	茎葉分化発根	
1	0.5						10	0	0	0	
2	2						10	0	0	0	
3		0.1			0.1		10	0	0	0	
4		0.1			1		10	0	0	0	
5		0.1			2		10	0	0	0	
6		1			1		10	0	0	0	
7		1			2		10	0	0	0	
8		0.5				1	1	10	4	0	0
9		0.5				1	2	10	8	4	2
10		0.5				1	4	10	4	0	0
11		0.5					0.5	10	4	0	0
12		1					1	10	2	0	0
13		1					4	10	0	2	0
14		1					8	10	4	0	0
15				0.1	0.1			10	2	2	2
16				0.1	1			10	6	2	2
17				0.1	2			10	6	0	0
18				1	1			10	2	0	0
19				1	2			10	0	0	0
20				1	4			10	0	0	0

*2,4-D:2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, NAA:Naphthalene Acid, IAA:3-Indoleacetic Acid, BA:6-Benzylaminopurine, Tdz:Thidiazuron, 2iP:N-(2-Isopentenyl)adenine

‘さがみグリーン’ではこのような特性は未知であるが、本研究で得た技術を基礎とした先端的な育種技術によりこれらの機能を増強することも可能になると考えられる。

引用文献

- 藤代岳雄・林 英明・法月靖生. 1999. カラシナ新品種 ‘さがみグリーン’ の育成経過及び播種適期と栽植密度. 神奈川農総研報. 139: 1-6.
- George,L and P.S.Rao . 1980. In vitro regeneration of mastard plants(*Brassica juncea* var. RAI-5) on cotyledon explants from non-irradiated, irradiated and mutagen-treated seed. *Ann.Bot.* 46:107-112.
- 北浦健生・ケッサリーラズカルニカル・高柳りか・真子正史・三浦泰昌. 1996. 交雑育種によるカラシナの不定芽形成能力の改良. *育種学雑誌*. 第46巻(別2): 235.
- 松本悦夫. 1990. ハクサイ等アブラナ科野菜. 野菜の組織・細胞培養と増殖, 最新バイオテクノロジー. p100-121. 全書編集委員会編. 農業図書.
- 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造. 1994. 地域農業振興への組織培養の利用について 1. ハカラシナの実験室的手法による試験管内大量迅速育苗について. 筑波大農林研報7: 7-21.
- Salt,D.E., Price,R.C., Pickering,I.J. and I.Raskin . 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mutard. *Plant Physiol.* 109: 1427-1433.
- 竹原利明・萩原 廣・藤井義晴・平舘俊太郎・長井克将. 1996. カラシナから生じる揮発性物質のホウレンソウ萎ちょう病菌(*Fusarium oxysporum*)に対する生育抑制・殺菌効果. *日植病報*. 62(6): 609.
- Zhu,Y.L., Pilon-Smits,E.A.H., Jouanin,L and N.terry . 1999. Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119: 73-80.