

秋田伝統野菜と山菜のカルス誘導と関連遺伝子についての研究

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 野崎 ののこ

1年 畠山 雄多

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

准教授 水野 幸一

【目的】

秋田には伝統野菜・山菜がある。しかし、収穫の季節が限られていることから、広く流通させることが難しい側面がある。そこで本研究では、植物の培養工学的側面からのアプローチとして秋田の伝統野菜や山菜からカルス誘導を試み、さらに再分化に至る過程を調べることで、それらを時期にかかわらず効率的に作れるようにするきっかけとなるデータが得られるのではないかと考えた。

【研究計画】

秋田の伝統野菜(じゅんさい・山内にんじん)や山菜(コシアブラ)のカルス誘導をめざす。まず、植物ホルモンのオーキシン・サイトカイニンの種類と濃度の条件を検討し、効率的にカルスを作製できる条件を見つけ出す。つぎに誘導したカルスからの再分化を試みる。

【試料や試薬など】

1. 実験に用いた伝統野菜・山菜

コシアブラ、じゅんさい、山内にんじん

2. 試薬・培地

〈植物ホルモン〉ナフチル酢酸(NAA)、ベンジルアデニン(BA)、
2-イソペンテニルアデニン(2iP)

〈滅菌関係〉エタノール、1% NaOCl溶液、有機洗剤

〈培地〉アガロース、ゲランガム、ショ糖、0.1 N NaOH水溶液、1 M HCl水溶液、MS培地無機塩類、ビタミン

MS培地の組成は表1に示した。また、植物ホルモンと培地の構成は、対象の伝統野菜・山菜に毎に調整した。

◎ MS培地の調製法(植物ホルモン有・無)

植物ホルモン有無・培地の希釈などの条件をもとに、それぞれコシアブラ I 培地、コーヒー II 培地、じゅんさい III 培地およびにんじん IV 培地と名付け、調製した。コシアブラ I 培地の場合、ショ糖、MS培地混合塩類(和光純薬工業)をイオン交換水に溶解し、0.1 N NaOH水溶液・1 M HCl水溶液により、pH 5.7にあわせた。各濃度(表

表 1 MS 培地の組成

成分	含有量(mg/L)	成分	含有量(mg/L)
NH ₄	1650	KI	0.83
K	1900	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	CuSO ₄ ·H ₂ O	0.025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170	myo-イノシトール	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	ニコチン酸	0.5
Na ₂ -EDTA	37.8	塩酸ピロキシシン	0.5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	塩酸チアミン	0.1
ZnSO ₄ ·H ₂ O	8.6	グリシン	2
H ₃ BO ₃	6.2	ショ糖	20000

表 2 培地中の NAA と BA の濃度比

	0.5uM NAA	5uM NAA	50uM NAA
0.5uM BA	条件1 1/10BA 1/10NAA	条件2 1/10BA	条件3 1/10BA ×10NAA
5uM BA	条件4 1/10NAA	条件5	条件6 1/10BA ×10NAA
50uM BA	条件7 ×10BA 1/10NAA	条件8 ×10BA	条件9 ×10BA ×10NAA

2)に調整したNAAおよびBAを添加し、120°C15分オートクレーブを行った。なおホルモンフリーを条件10とした。コーヒーII培地の作製法もほぼ同じであるが、ホルモンは20 μM 2iPとし、その他異なる点を表3にまとめた。じゅんさいIII培地はMS培地を50倍希釈・100倍希釈し、植物ホルモン組成を、コシアブラI培地またはコーヒーII培地と同様とした。にんじんIV培地はカルス誘導までは1 mg/L 2,4-D入り、カルスから分化誘導のためにホルモンフリーの二種類作製した。日長条件は基本的に16時間明期、8時間暗期とした。

表3 培地組成の比較

	コシアブラ I 培地	コーヒー II 培地
MS培地用混合塩類	1 袋/L (4.460 g)	1/4 袋/500 ml (1.115 g)
ショ糖		15 g/500 ml
寒天	アガロース	ゲランガム
植物ホルモン	NAA(1-ナフタレン酢酸)BA(ベンジルアデニン)各種	2iP(2-イソペンテニルアデニン)

【各試料毎の方法・結果・考察】

〈コシアブラ〉

【方法】

1回目

表面を水洗いしてから、洗剤に30秒間浸した。葉を約1~3 cm²に切り、再び洗剤に30秒、流水で30秒、70%エタノールで30秒、滅菌水で7回すすぎ滅菌した。ホルモン条件1~10のコシアブラI培地に葉切片をそれぞれ5つずつに植えた。

2回目

27日後、1回目の試料をコーヒーII培地に植え替えた。

【結果】

1回目

12日後、条件3の培地でカルスの発生が確認できた。

2回目

元は条件9のコシアブラI培地で培養していた試料をコーヒーII培地に移し替えてから47日後、カルスの発生が確認できた。その後、約1ヵ月間カルスの状態を維持することができた(写真1)。



写真1 コシアブラのカルスの様子

【考察】

1回目はカルス化する前にコンタミネーションした葉が多かった。これは、次亜塩素酸ナトリウムの滅菌操作をしなかったことによる滅菌不足であると考えられる。またサイトカイニン(BA)の濃度が高くなるにつれ枯れやすい傾向があった。通常、オーキシン濃度が高すぎると成長が抑制されるが、この場合は内生サイトカイニンの蓄積量が増加し、何らかの影響を与えたためであると考えられる。コシアブラにおけるこの作用機構について興味をもった。

1回目は条件3のコシアブラI培地(NAA 50 μM・BA 0.5 μM)と2回目は条件9のコシアブラI培地(NAA 50 μM・BA 50 μM)からコーヒーII培地に移植した試料でカルス化がみられた。条件5がカルスを作る一般的なホルモン濃度と考えた場合、NAA濃度はより高く、コシアブラの葉をカルス誘導するには、NAAの濃度が50 μMで適正であると考えられた。

2回目は新たに試料採取することが困難であったため、1回目の試料の中で生き残ったものを移植し、異なるホルモン条件を試した。コーヒーⅡ培地はコーヒーの葉切片からのカルス誘導に用いられる培地であり、コシアブラのような木本植物には有用であると考えられる。

〈じゅんさい〉

【方法】

1回目

じゅんさいの葉の裏のぬめりをブラシで落とし、洗剤に30秒、水洗いを3回、70%エタノールに30秒、水洗いを3回した。葉脈が断面になるように切り1%次亜塩素酸ナトリウムで5分間滅菌し、滅菌水で3回すすいだ。条件1~10のコシアブラⅠ培地とコーヒーⅡ培地にそれぞれ葉切片を3つずつに植えた。

2回目

1回目に1%次亜塩素酸ナトリウムで5分間滅菌したところ、色素が抜けてしまった葉が多かったため、滅菌時間を1分30秒間に変え、滅菌水で5回すすいだ。条件1~10のコシアブラⅠ培地にそれぞれ葉切片を3つずつに植えた。

3回目

2回目と同様に操作した。

4回目

1%次亜塩素酸ナトリウムでの滅菌時間を1分間に変えた。1~3回目の実験で条件10も枯れてしまったことから、培地がじゅんさいと合わないことが考えられたため、1/50または1/100 MSコーヒー培地Ⅱと、1/100 MSコシアブラⅠ培地の条件1~10に植えた。

【結果】

1回目

8日後、葉のほとんどが黒色に変色してしまった。

2回目

5日後、葉の一部が茶色に変色し、11日後、葉の全体が茶色に変色していた。

3回目

5日後、条件1と3はただらに緑の部分が残っていたが他の条件の培地では枯れていた。7日後、条件1と3でもすべて茶色に変色した。

4回目

1/50、1/100 MSコーヒーⅡ培地は6日後、どちらも葉の大部分が茶色に変色していた。11日後、カビが発生し枯死した。1/100 MSコシアブラⅠ培地の条件1、4、7は2日後、茶色に変色しており、条件2、8、9、10は葉の一部の色が薄くなっていた。7日後、条件1、7は白いカビが発生していた。条件2、3、5、6、8、9は葉から粘性のある液体が出ていた。条件10は葉の一部が黄色や茶色に変色していた。9日後、条件8、9、10は茶色に変色していた。23日後、条件2はただらに緑色の部分が残っていた。条件3、5、6は大部分が黒色や茶色に変色していた。37日後、わずかに緑色の部分が残っていた条件2、3、5を1/100 MSコーヒーⅡ培地に移したがコンタミネーションしてしまった。

【考察】

いずれの条件の培地でも、じゅんさいの葉切片からカルス化はみられず、枯死またはコンタミネーションを起こした。このことから今回の培養条件はじゅんさいの葉には合わなかったと考えられる。一方、条件2、3、5、6、8、9で生じた液体は、乾燥から守るためにじゅんさいから分泌されたものだと考えられた。今回の実験では葉を用いたが、これまでの研究で用いられていたゼリー状の可食部と比較すると生存期間は延びた。今後は茎や根の部分を用いてカルス化に挑戦したいと考えた。

〈山内ニンジン〉

根【方法】

木部を取り除いた根の上部を約1 cm²に切り、洗剤で30秒、水洗いを3回、70%エタノールに30秒、水洗いを3回した。1%次亜塩素酸ナトリウムで3分間滅菌し、滅菌水で5回すすいだ。暗条件でニンジンIV培地に植え付けた。

【結果】

5日後、一部で白いカビが生えた。9日後、多くの試料が白く変色またはカビが生えていた。

葉【方法】

葉を約1 cm²に切り、洗剤で30秒、水洗いを3回、70%エタノールに30秒、滅菌水で3回すすいだ。暗条件でニンジン培地に植え付けた。

【結果】

25日後、一部の葉が不定胚を形成していた。

【考察】

山内ニンジンの根が白く変色又はコンタミネーションによってすべて死滅してしまった原因として、根を切った後に高濃度の次亜塩素酸ナトリウムでの滅菌をした操作に問題があると考えられる。一方で葉が不定胚を形成した要因として、培地に含まれていた2,4-Dが適正濃度値であったためと考えられる。



写真 1 山内ニンジン葉の不定胚

【総合考察】

コシアブラの実験を行った際は、はじめての実験で操作に慣れない点が多々あったことから、滅菌が上手に行えず多くの試料をコンタミネーションさせてしまった。しかし、一部からカルス化がみられたことでNAAの濃度が重要であると分かった。また今回材料に未熟葉を用いたが、これは以前の研究で成熟葉からのカルス化は困難であることが知られていたため、その知見が生かされた。以上より、今後より効率的にカルスを誘導できる条件を見いだせると期待している。じゅんさいは、誘導方法を試料の部位や使用するホルモンも含め再度検討し、カルス誘導に挑戦したい。山内ニンジンの葉からカルスではなく不定胚の形成に成功した。形成できた不定胚は継続して再分化まで至らせたい。

【参考文献】

形質転換プロトコール【植物編】 田部井豊 化学同人
化学・生物学実験Ⅱ実験マニュアル 秋田県立大学生物資源科学部