

ナスの胚軸からの耐塩性カルスの選抜

村上賢治・松原幸子

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received June 15, 1992

Selection of Salt-tolerant Callus from Eggplant Hypocotyl

Kenji MURAKAMI and Sachiko MATSUBARA

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

Hypocotyl segments of eggplant were cultured on media supplied with various concentrations of NaCl. The fresh weight of callus on 0.2% NaCl medium dropped to half of that found on a NaCl-free medium. Callus was not initiated on media containing more than 1.0% NaCl. Callus on 0.8% NaCl was chosen for further selection. After subculturing on a 0.8% NaCl medium for 2 years, tolerant callus grew vigorously and was named C-0.8. C-0.8 callus then sequentially transferred to media containing increasing levels of NaCl (0.8, 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6% NaCl). Surviving callus was named C-1.6. Control callus was obtained by culturing on a NaCl-free medium for 2 years (C-0).

The color of C-0.8 and C-1.6 was green, whereas that of C-0 was white. C-0.8 was more friable than C-0, whereas C-1.6 was more compact than C-0. The dry matter content of C-1.6 was higher than that of C-0.8 and C-0.

On the 0.8% NaCl medium, the growth of C-0 was strongly inhibited, but that of C-0.8 and C-1.6 was only slightly inhibited.

The stability of the salt tolerance was examined by transferring calli to a NaCl-free media for 60 days. Treated C-0.8 retained the trait of salt tolerance, but C-1.6 callus lost its salt tolerance.

Adventitious shoots regenerated from C-0.8 after their transfer to a NaCl-free medium containing 1.0 mg/liter BA.

Thus the salt tolerant callus of eggplant was obtained by its subculture on a medium containing 0.8% NaCl.

緒 言

高塩類土壌の積極的な利用と、耕地の塩害の問題の解決は、世界の食糧問題を考える上で非常に重要である。この問題を解決する方法のひとつとして、耐塩性作物の育成がある。耐塩性作物の育成を目的とした細胞選抜に関する研究は、1970年代半ばより多くの研究者によって行われてきた。これは、細胞培養により耐塩性の変異細胞を選抜し、そこから耐塩性植物を再生させようとするものである。Nabors らは、タバコの培養細胞を NaCl 濃度を段階的に上げた培地で選抜を繰り返し、0.88% NaCl を含む培地で増殖する細胞を作出し、そこから耐塩性植物を再生させることに成功した¹⁾。その後、イネでも細胞選抜による耐塩性植物の育成が報告された²⁾。しかし、耐塩性細胞から再生した植物に耐塩性がなかった例もあり³⁾、耐塩性細胞から実際に耐塩性植物が得られた報告は少ない。この理由として、植物の耐塩性

が培養細胞レベルの反応だけではとらえられないことと、耐塩性の培養細胞は遺伝的に変異したものではなく単に順化したものである可能性がある、といったことが挙げられる。以上のような問題は、未だ十分に解決されていない。

主要な果菜であるナス (*Solanum melongena* L.) は、耐塩性の弱い植物であることが知られている。本実験では、細胞選抜による耐塩性植物育成の可能性を調べることを目的とし、NaCl 添加培地でカルス選抜を行い、高塩濃度に対する細胞の順化の問題について検討し、さらに植物体の再生を試みた。

材料及び方法

ナスの栽培品種“早生真黒”を供試した。本実験を通じて用いた基本培地は、Murashige and Skoog (1962) の無機塩³⁾に、100mg/liter *myo*-イノシトール、2 mg/liter グリシン、0.5mg/liter 塩酸ピリドキシリン、0.1mg/liter 塩酸サイアミン、30 g/liter ショ糖および支持体として 2 g/liter ジェランガムを添加し、pH を 5.8 に調整したものである。培養物は、25°C、1500 lx の定温器内に置いた。

1. 胚軸切片からのカルスの形成と増殖に及ぼす培地の添加 NaCl 濃度の影響

種子を有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 10 分間浸漬して滅菌し、基本培地上に無菌的には種した。は種 10~15 日後 (発芽 5~6 日後) の実生の胚軸を 2~3 mm の長さに切り分け、1 mg/liter 1-naphthaleneacetic acid (NAA) および 0.1mg/liter *N*-(phenylmethyl) -1 *H*-purin-6-amine (BA) を添加した基本培地 (カルス増殖培地) に、次に示す各濃度の NaCl を添加した培地に植え付けた。培地の NaCl 濃度は、0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2% の 7 段階とした。植え付け 30 日後に、カルスの生体重を測定した。

2. NaCl 添加培地でのカルス選抜および選抜カルスの耐塩性

1) NaCl 添加培地でのカルス選抜

実験 1 と同様に、無菌には種して得られた実生の胚軸の切片を、NaCl 無添加または 0.8% NaCl を添加したカルス増殖培地に植え付けた。NaCl 無添加培地で形成したカルスは、1 ヶ月ごとに同組成の培地に継代培養して維持した (これを C-0 とする)。0.8% NaCl 添加培地で形成したカルスは、胚軸を植え付けてから 4 ヶ月後に同組成の培地に継代し、その後は 2 ヶ月ごとに同組成の培地に継代培養して約 2 年間維持した (これを C-0.8 とする)。

さらに、0.8% NaCl 添加培地で形成したカルスを 1.0% NaCl 添加培地に移植し、2~3 ヶ月間培養して増殖するカルスを選抜した。同様に、1.2%, 1.4%, 1.6% と培地の NaCl 濃度を段階的に上げて増殖するカルスを選抜し、1.6% の NaCl 添加培地でも増殖するカルスを作成し、2 ヶ月ごとに継代培養して約 1 年間維持した (これを C-1.6 とする)。

このようにして得られた C-0, C-0.8, C-1.6 の組織の生体重を測定した後、80°C で 24 時間乾燥し、乾物重を測定して生体重当りの乾物重の割合 (乾物率) を算出した。

2) 選抜したカルスの耐塩性

C-0, C-0.8, C-1.6 をそれぞれ約 5 mm 角 (約 0.05 g) に切り分け、0, 0.8, 1.6% NaCl と、1 mg/liter NAA と 0.1mg/liter BA を添加した基本培地に植え付け、30 日後に生体重を測定した。

3. 選抜カルスの耐塩性の安定性

次に、NaCl 添加培地で選抜したカルスの耐塩性が、NaCl 無添加培地で培養すると失われるかどうか調べるための実験を行った。この実験には、実験 2 で得られた C-0.8 および C-1.6 を供試した。これらのカルスをそれぞれ約 5 mm 角に切り分け、1 mg/liter NAA と 0.1mg/liter BA を添加した NaCl 無添加の基本培地に植え付けた。植え付け 30 日後に同組成の新しい培

地に移植してさらに30日間培養し、合計60日間 NaCl 無添加培地で培養した。これらのカルスを約5mm角に切り分け、C-0.8由来のものは0.8%、C-1.6由来のものは1.6% NaCl 添加培地に移植した。対照区として、C-0.8を0.8% NaCl 添加培地、C-1.6を1.6% NaCl 添加培地に植え付けた。30日間培養後、生体重を測定した。

4. 選抜カルスからの不定芽形成

この実験には、実験2で得られたC-0.8およびC-1.6を供試した。カルスからの不定芽形成のための培地として、基本培地に1mg/liter BAを添加したものをを用いた(再生培地)。2種のカルスをそれぞれ約5mm角に切り分け、NaCl 添加または無添加の培地に移植した。NaCl 添加培地に移植する場合のNaCl濃度は、C-0.8は0.8%、C-1.6は1.6%とした。移植30日後に、不定芽の原基とみられる緑色の組織の形成状況を調査した。

結 果

1. 胚軸切片からのカルスの形成と増殖に及ぼす培地の添加 NaCl 濃度の影響

0.2% NaCl添加培地において、カルス生体重はNaCl無添加培地の約50%となった(Fig. 1)。NaCl濃度が1.0%以上ではカルスは全く形成せず、胚軸からカルスが形成し増殖する限界のNaCl濃度は0.8%であった。

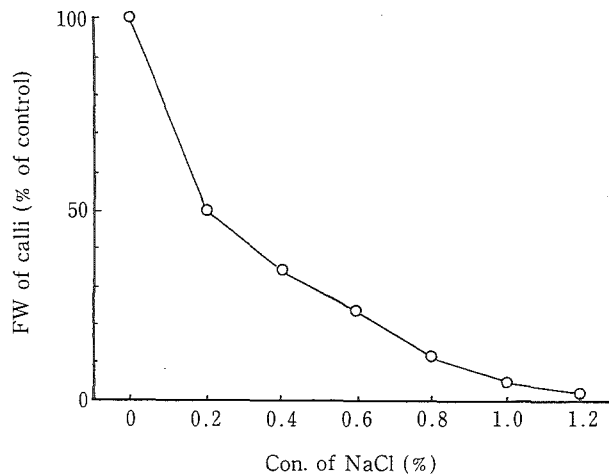


Fig. 1 Effect of NaCl on fresh weight of calli from hypocotyl of eggplant.

Table 1 Percentage of dry matter in calli cultured on the media containing 0, 0.8 and 1.6% NaCl (Named as C-0, C-0.8 and C-1.6, respectively)

Callus ^{a)}	% of dry matter ^{b)}
C-0	6.52b
C-0.8	6.91b
C-1.6	12.08a

a) C-0 : Callus subcultured on medium without NaCl for 2 years.

C-0.8 : Callus subcultured on medium containing 0.8% NaCl for 2 years.

C-1.6 : Callus formed on medium containing 0.8% NaCl was sequentially transferred to media containing 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6% NaCl at 2-3 month intervals and finally subcultured on a medium containing 1.6% NaCl for 1 year.

b) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

2. NaCl 添加培地でのカルス選抜および選抜カルスの耐塩性

1) NaCl 添加培地でのカルス選抜

0.8% NaCl 添加培地での初代培養では、胚軸からのカルスの増殖は遅かったが、継代を繰り返すにつれて次第に増殖が速くなった。1.2%までの NaCl 濃度では、容易に増殖するカルスが得られた。それより高い濃度では、カルスの増殖がきわめて遅く、褐変し枯死するものもみられ、増殖するカルスを得るのに長期間を要した。カルスの組織の状態は、そのカルスが順応している培地の NaCl 濃度によりそれぞれ異なった。C-0 は白色でややかたく、C-0.8 は緑色でやや軟らかく、C-1.6 は緑色でかたかった。乾物率（生体重に対する乾物重の割合）は、C-0 と C-0.8 では有意差がなかったが、C-1.6 は高かった（Table 1）。

2) 選抜したカルスの耐塩性

結果を Table 2 に示した。C-0 は、0.8% NaCl 添加培地に移植すると増殖が著しく抑制され、1.6% NaCl 添加培地に移植すると褐変して枯死した。C-0.8 と C-1.6 は、0.8% NaCl 添加培地ではよく増殖し、1.6% NaCl 添加培地に移植しても褐変せず、少し増殖した。NaCl 添加培地での生体重は、C-0.8の方が C-1.6より高かった。

実験 3. 選抜カルスの耐塩性の安定性

C-0.8 および C-1.6 を NaCl 無添加培地に移植して培養すると、カルスの色は緑色から白色に徐々に変化した。

C-0.8 を NaCl 無添加培地で60日間培養したものは、0.8% NaCl 添加培地に移植してもよく増殖し、元の C-0.8 との間に生体重に有意差はみられなかった（Table 3）。一方、C-1.6 を NaCl 無添加培地で60日間培養したものは、1.6% NaCl 添加培地に移植すると褐変し、ほとんど増殖しなかった（Table 4）。

実験 4. 選抜カルスからの不定芽形成

NaCl を添加した再生培地に移植した C-0.8 および C-1.6 はすぐに褐変し、不定芽の原基は全く形成されなかった。NaCl 無添加の再生培地に移植した C-0.8 は、移植1ヵ月後までには不定芽の原基が形成され、その後不定芽が伸長した。しかし、苗条が正常に伸長・発根せず、約6ヵ月経過した現在の所、植物体にまでは生長していない。

Table 2 Fresh weight of C-0, C-0.8 and C-1.6 calli after transferring to a medium containing 0, 0.8 and 1.6% NaCl for 30 days

Callus ^{a)}	NaCl in re-subcultured medium (%)	FW of callus (g) ^{b)}
C-0	0	0.76b
	0.8	0.14d
	1.6	0.07d
C-0.8	0	0.86b
	0.8	0.66b
	1.6	0.19d
C-1.6	0	1.08a
	0.8	0.41c
	1.6	0.13d

a) See Table 1.

b) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 3 Comparison of fresh weight between calli treated on NaCl-free medium and non-treated after 2 years culture on 0.8% NaCl medium and then resubcultured on medium containing 0.8% NaCl

Treatment	FW of callus (g) ^{a)}
Transplanted to NaCl-free medium for 60 days	0.48a
Non-treated	0.58a

a) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 4 Comparison of the fresh weight of calli treated on a NaCl-free medium and non-treated calli after 1 year culture on 1.6% NaCl medium and then resubcultured on medium containing 1.6% NaCl

Treatment	FW of callus (g) ^{a)}
Transplanted to NaCl-free medium for 60 days	0.08b
Non-treated	0.15a

a) Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

考 察

細胞選抜による耐塩性植物の育成が難しいとされる大きな理由として、培養細胞の高塩条件に対する順応の問題がある。選抜細胞から植物を再生したとしても、その細胞は遺伝的に変化したわけではなく生理的に順応したものであるため、再生植物に耐塩性がみられないといった例は、これまでいくつか報告されている。Hasegawaらは、タバコを用いた実験で、1% NaClを含む培地で選抜した細胞の耐塩性はNaClストレス下では安定していたが、NaClを含まない培地に移植し細胞数が5倍になるまで増殖させると、耐塩性は失われたと報告し、1% NaClを含む培地で選抜した細胞のもつ耐塩性は単なる生理的順応であると述べている¹⁾。本実験において、1.2%までのNaCl濃度では、よく増殖するカルスが比較的容易に得られたことから、得られた耐塩性カルスは単に生理的に順応したものである可能性が高い。しかし、本実験で得られた耐塩性カルスは、NaCl無添加培地に移して一定期間培養しても耐塩性がほとんど失われなかったことから、長期間にわたる培養の間に細胞に耐塩性が強まるようななんらかの突然変異が生じた可能性がある。Hasegawaらは、1% NaClではいくら長期間培養しても高塩条件に生理的に順応した細胞しか得られないが、2.5%まで段階的にNaCl濃度を上げて選抜を続けると、そこから再生した植物にも耐塩性がみられたことを報告している²⁾。一方、Naborsらは、0.88%という比較的低い濃度のNaCl添加培地でタバコの培養細胞を選抜し、そこから遺伝的に耐塩性を持つと考えられる植物を再生させている³⁾。このように、選抜に用いるNaClの濃度が、選抜された細胞から再生した植物の耐塩性とどのように関わっているかについては、研究者により見解が異なり結論が得られていない。したがって、本実験で得られた耐塩性カルスからも耐塩性植物が得られる可能性はあり、再生させて調査する必要がある。

摘 要

ナスの胚軸の切片を種々の濃度のNaClを添加した培地に植え付けて培養した。0.2% NaCl

添加培地において、カルスの生体重は、NaCl 無添加培地の2分の1になった(Fig. 1)。1.0%以上のNaCl濃度では、カルスは全く形成されなかった。そこで、0.8% NaCl 添加培地で形成したカルスを、その後のカルス選抜に用いた。0.8% NaCl 添加培地で2年間継代培養すると、活発に増殖するカルスが得られた(これをC-0.8とする)。さらに、0.8% NaCl 添加培地で形成したカルスを、1.0, 1.2, 1.4, 1.6とNaCl濃度を上げた培地に順次継代し、1.6% NaCl 添加培地でも生存するカルスを作出した(これをC-1.6とする)。対照とするカルスには、NaClを含まない培地で2年間継代培養したものを用いた(これをC-0とする)。カルスの色は、C-0は白色であったが、C-0.8およびC-1.6は緑色であった。カルスのかたさは、C-0.8はC-0よりやわらかく、C-1.6はC-0よりかたかった。カルスの乾物率は、C-0とC-0.8は差がなかったが、C-1.6は高かった(Table 1)。

0.8% NaCl 添加培地では、C-0の増殖は著しく抑制されたが、C-0.8およびC-1.6の増殖はわずかに抑制されたのみであった(Table 2)。

カルスの耐塩性の安定性を調べるため、C-0.8およびC-1.6を60日間NaCl無添加培地に移植し培養した後、0.8%および1.6% NaCl 添加培地にそれぞれ戻した。60日間NaCl無添加培地で培養後も、C-0.8は耐塩性を示したが(Table 3)、C-1.6の耐塩性は失われた(Table 4)。

不定芽は、C-0.8を1.0mg/liter BAを添加したNaCl無添加培地に移植すると再生した。

本実験の結果、ナスのカルスを0.8% NaCl 添加培地で継代培養することにより、耐塩性カルスが得られることが分かった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学生の喜多泰三氏にお手伝いいただいた。心から感謝申し上げる。

なお本研究は、平成元年度から3年度までの3年間、岡山大学特定研究(生物生産のための細胞選抜と細胞育種)を分担して行ったものである。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Hasegawa, P. M., R. A. Bressan and A. K. Handa : Growth characteristics of NaCl-selected and non-selected cells of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol.* **21**, 1347—1355 (1980)
- 2) Hasegawa, P. M., R. A. Bressan and A. K. Handa : Cellular mechanisms of salinity tolerance. *HortScience* **21**, 1317—1324 (1986)
- 3) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **914**, 473—497 (1962)
- 4) Nabors, M. W., G. E. Gibbs, C. S. Bernstein and M. E. Meis : NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 13—17 (1980)
- 5) Smith, M. K., J. A. McComb : Selection for NaCl tolerance in cell cultures of *Medicago sativa* and recovery of plants from a NaCl-tolerant cell line. *Plant Cell Reports* **2**, 126—128 (1983)
- 6) Yano, S., M. Ogawa and Y. Yamada : Plant formation from selected rice cells resistant to salt. In : Fujiwara, A. (ed) *Plant tissue culture 1982*. Maruzen. Tokyo. 495—496 (1982)