

## レタス‘岡山サラダ菜’の高効率培養系の確立

浅尾浩史・澤田和敏\*

Establishment of High Efficient Culture System in *Lactuca sativa* L.cv.

Okayama-saradana

Hiroshi ASAO and Kazutoshi SAWADA\*

Key words: lettuce, regeneration, cotyledon

## 緒言

植物に医療用タンパク質を生産させ、それらを食することによって病気の予防や治療をする研究が進められている<sup>2), 10)</sup>。有用タンパク質を生産する遺伝子組換え体を栽培する上で問題となるのは環境に対する配慮であるが、閉鎖系での栽培が可能な植物工場を利用すればそれらを解決できる。現行の植物工場でも最も栽培面積の大きいものはレタスであり、栽培されているレタス品種のほとんどはサラダ菜タイプである。しかし、サラダ菜タイプの代表品種である‘岡山サラダ菜’の組織からの再分化は、他品種と比較して困難で、培養における最適条件は確立されていない。レタス組織からの再分化については、これまでにいくつか報告されている。‘ワイヤーヘッド’の胚軸組織を2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸とカイネチンを組み合わせた培地<sup>5), 6), 7)</sup>で、播種後4日目の‘グランドラピッド’の子葉をインドール酢酸とカイネチンを組み合わせた培地<sup>9)</sup>で効率よい再分化系が確立されている。また、遺伝子導入には再分化効率が良い‘カイザー’<sup>1), 8)</sup>や‘シスコ’<sup>3)</sup>などの品種が用いられている。そこで、‘岡山サラダ菜’において、培養に用いる外植片の部位と生育ステージ、さらに最適培地条件を検討したので報告する。

## 材料および方法

サラダ菜タイプの‘岡山サラダ菜’と対照品種としてリーフレタスタイプの‘グリーンウェーブ’の2品種を供試材料とした。2品種の種子を有効塩素0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して5分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄後、1/2 Murashige and Skoog培地<sup>4)</sup>(シヨ糖3%, 寒天

0.8%, pH5.8)へ無菌播種した。

## 実験1 再分化に及ぼす外植片の生育ステージと切片部位の影響

播種後4, 6, 11, 13, 18, 21および28日目の子葉と、播種後11, 13, 18, 21および28日目の本葉から5mm角に切り取った切片を外植片として、6-ベンジルアミノプリン(BA)0.05mg/lと $\alpha$ -ナフチル酢酸(NAA)0.1mg/lを添加したMS培地(シヨ糖3%, 寒天0.8%, ポリビニルピロリドン0.5g/l, pH5.8)へ置床した。1試験区あたり1シャーレ20切片を4シャーレ、計80切片を置床し、培養1ヶ月後に不定芽の再分化を調査した。培養は25°C, 29.1  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>, 16時間日長で行った。

## 実験2 再分化に及ぼすBAとNAAの影響

次に、再分化における培地に添加する植物ホルモンの最適濃度を検討した。BA0.01, 0.05, 0.1mg/lとNAA0.01, 0.05, 0.1mg/lを組み合わせたMS培地に、実験1で再分化に最適なステージであると考えられた播種後6日目の子葉切片を置床した。他の条件は実験1と同様とした。

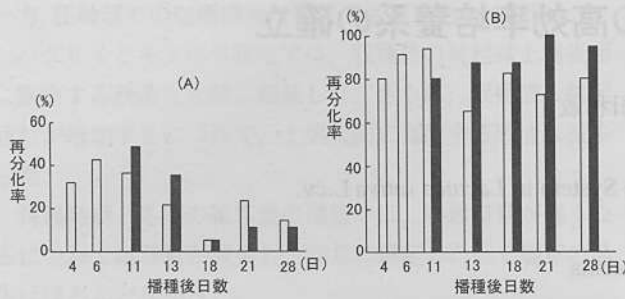
## 結果および考察

## 実験1 再分化に及ぼす外植片の生育ステージと切片部位の影響

‘グリーンウェーブ’は子葉、本葉にかかわらず、また生育ステージにかかわらず、再分化率は60%以上と高率で、特に播種後21日目の本葉切片からの再分化率は100%であった(第1図)。一方、‘岡山サラダ菜’では、子葉切片からの再分化は播種後6日目で、本葉切片では

\*出光興産

本研究は、経済産業省「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発」委託研究により実施した。



第1図 レタス組織からの再分化に及ぼす生育ステージ(播種後日数)と置床切片部位の影響

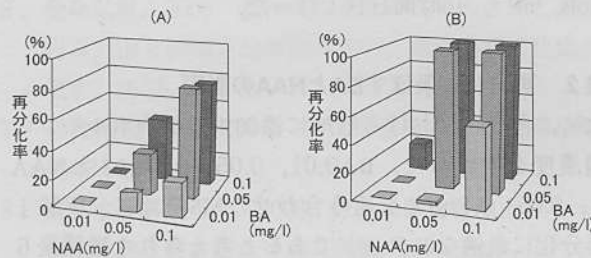
Fig.1. Effect of the growth stage and explant parts on regeneration from the tissue of lettuce

A:岡山サラダ菜, B:グリーンウェーブ  
□:子葉切片, ■:本葉切片

播種後11日目で、再分化率は最高となり40%を越えた。また、子葉・本葉とも生育ステージが進む程、再分化率が低下する傾向にあった。再分化後の生育を観察したところ、両品種とも播種後6日目の子葉切片から再分化した個体はガラス化せず、他の試験区と比較して最も良好に生育した。

実験2 再分化に及ぼすBAとNAAの影響

培地条件を検討したところ、'グリーンウェーブ'ではBA0.05および0.1 mg/lとNAA0.05および0.1mg/lを組み合わせた4つの培地で90%以上の高率で再分化した(第2図)。一方、'岡山サラダ菜'は、BA0.05および0.1mg/l



第2図 レタス組織からの再分化に及ぼすBAとNAAの影響

Fig2. Effect of BA and NAA on regeneration from the tissue of lettuce

A:岡山サラダ菜, B:グリーンウェーブ

とNAA0.1mg/lを添加した培地で再分化率が最も高く、良好な植物体が得られた。

以上の結果から、レタスの中でも再分化効率が低いとされてきた'岡山サラダ菜'において、置床する部位・生育ステージや培地を最適化することによって、70%以上の再分化率が得られる可能性のあることが判明した。しかし、再分化に適する生育ステージの期間は'グリーンウェーブ'と比較して明らかに短く、外植片の状態によって再分化効率は大きく変動すると思われる。

本報において、植物工場でもっとも多く栽培されている'岡山サラダ菜'で効率が高い培養系を確立したことにより、今後の植物ワクチンの実用化が期待できる。

引用文献

1. 榎本末男・伊藤博孝・村上 高・大島正弘・大橋祐子. 1993. 形質転換レタスにおけるタバコ感染特異的タンパク質遺伝子の誘導的発現. 生物研報. 8:11-23.
2. Gil, F., A. Brun, A. Wigdorovitz, R. Catala, J. L. Martinez-Torrecuadrada, I. Casal, J. Salimas, M. V. Borca and J. M. Escribano. 2001. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. FEBS Letters. 488: 13-17.
3. Kanamoto, H., A. Yamashita, H. Asao, S. Okumura, H. Takase, M. Hattori, A. Yokota and K. Tomizawa. 2006. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. Transgenic Research. 15: 205-217.
4. Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
5. 佐々木久視. 1975. そ菜類の発育・生長に関する生理形態的研究(第3報). 園芸雑. 44(2): 138-143.
6. ————. 1979. そ菜類の発育・生長に関する生理形態的研究(第4報). 園芸雑. 47(4): 479-484.
7. ————. 1979. そ菜類の発育・生長に関する生理形態的研究(第6報). 園芸雑. 48(1): 67-72.
8. Sun, H., M. Cui, B. Ma and H. Ezura. 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. FEBS Letters. 580: 620-626.
9. Webb, D. T. and L. D. Torres. 1984. Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*. Can. J. Bot. 62: 586-590.
10. Webster, D. E., M. L. Cooney, Z. Huang, D. R. Drew, I. A. Ramshaw, I. B. Dry, R. A. Strugnell, J. L. Martin and S. L. Wesselingh. 2002. Successful booting of a DNA measles immunization with an oral plant-derived measles virus vaccine. J. of Virology. 76: 7910-7912.