

異なる光条件下で育成したレタス子葉片からの不定芽分化, とくに細胞・組織学的研究

誌名	日本作物學會紀事
ISSN	00111848
著者名	榎本,末男 前田,英三
発行元	日本作物學會
巻/号	58巻3号
掲載ページ	p. 297-304
発行年月	1989年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



異なる光条件下で育成したレタス子葉片からの不定芽分化； とくに細胞・組織学的研究**

榎本末男・前田英三*

(農業生物資源研究所・*名古屋大学農学部)

昭和63年8月24日受理

要旨：プロトプラストの単離に使用するレタス子葉組織について、その育成光条件と葉組織の細胞学的特徴および不定芽形成との関係につき研究した。その結果、①蛍光灯と陽光ランプでは芽生えの生長が異なった。蛍光灯150 lx条件の子葉は未展開であったが、5,000 lx以上の区と陽光ランプ区ではよく展開し正常に生長した。②蛍光灯と陽光ランプで波長別エネルギー分布が異なっていた。③子葉組織の細胞学的観察では、150 lxの蛍光灯下で育成した子葉細胞で細胞質が多く、5,000 lx以上で細胞質が少なかった。陽光ランプ下で育成した子葉は、何れの区でも細胞質が多かった。④子葉の育成条件(照度)と芽生えのエイジは、不定芽形成頻度に大きく影響した。以上の結果から、プロトプラストを単離する材料組織の育成方法は、プロトプラストを単離培養の効率化に関係すると考えられた。

キーワード：茎葉分化、細胞、子葉、光、葉肉、レタス。

A Cyto-histological Study on Shoot Differentiation and Mesophyll Morphology of the Excised Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Cotyledons as Affected by Light Conditions during Seedling Growth: SUEO ENOMOTO and EIZO MAEDA* (*National Institute of Agrobiological Resources, Dep. Cell Biol. Tsukuba 305*; *Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan)

Abstract: Light quality and quantity of the environment, where lettuce seedlings were grown, affected the mesophyll tissue and the shoot formation in cotyledons excised and cultured *in vitro*. When cultured on MS medium for 5 days, the cotyledonary tissues of the seedlings were poorly developed under an illumination level of 150 lx with fluorescent light but well-developed both under 5,000 and 10,000 lx. The mesophyll cells of cotyledons were rich in cytoplasm when excised from the seedling grown under BOC lamp or 150 lx of fluorescent light but vacuolated under 5,000 and 10,000 lx. Frequency of adventitious buds on the cotyledons grown under high-level light intensity was less than low-level intensity. In addition, the adventitious bud formation decreased as the age of the cotyledons advanced. This trend was clear under the high light intensity.

Key words: Cell, Cotyledon, Lettuce, Light, Mesophyll, Shoot differentiation.

細胞操作の手法を用いて、近縁種の有用な遺伝子を作物へ導入するためには、プロトプラストの単離・培養とプロトプラストからの植物体再生に関する培養系を効率的に使用することが必要である。とくに、細胞融合法や遺伝子導入法^{6,7)}に応用するためには、培養条件の高度の安定化が求められる。

レタス (*Lactuca sativa* L.) の近縁種 (*Lactuca saligna* L.) は、チューリップモザイクウイルス (Turnip mosaic virus: TuMV), キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus: CMV), レタスベト病 (Downy mildew pathogen) 等に抵抗性が認められる^{11,12)} ことから、この植物の遺伝子をレタスに導入するために、レタスのプロトプラストの培養法が研究され、多くの報告が発表されている^{1,2,3,4,5,12)}。レタスの場合、プロトプラストを単離する材料組織は、研究者により子葉・普通葉・振とう培養カルスなどと異なっているが、培養条件にそれぞれ工夫を加え、いずれの材料からも植物体再生

に成功している。子葉起源のプロトプラストの場合には単離直後の顕微鏡観察により、プロトプラストの形の大小や葉緑体の多少など様々な形態的特徴が見られている。また、村山ら⁹⁾ は子葉育成時の光条件が、単離培養後のプロトプラストの分裂効率に影響すると述べている。

プロトプラスト培養を効率的に進めるためには、第一に生理的活性の高いプロトプラストを単離出来る材料を得る必要がある。このために、材料の育成条件と得られたプロトプラストの特性との関係を調べておくことは、培養効率を高める上で有意義であると考えられる。この研究では、レタス子葉の育成条件と子葉の組織学的構造との関係を観察し、培養細胞の特性と合わせて考察することが出来たので、その結果を報告する。

材料と方法

1. レタスの品種と芽生えの育成

レタスは品種カイザーを用いた。種子をガーゼに包み70%エタノールに数秒、つづいて1%次亜塩素

** 大要は、日本作物学会関東支部76回講演会(昭和62年12月)において発表。

酸ソーダ (有効塩素量) で 15 分間滅菌後, 滅菌蒸留水で 3 回洗った. その後種子を, 2% ショ糖を含むホルモンフリーの MS 培地⁹⁾ に播種した. 播種容器は光条件を均一にするため 90×20 mm のプラスチックシャーレ (Iwaki SH90-20) を用いた. 播種後, 25±1°C で 40 W 蛍光灯 (日立 FLR40SW1MG 白色) 下で光源との距離を調節して照度を変え, 24 時間照明下で育成した. 実験の一部では, 陽光ランプ (BOC ランプ ML BOC-400-FU 三菱) を使い, 同様に光量を調整し 24 時間照明下で 23±1°C 条件で育成した.

2. 照度の測定

照度 (lx) は光電照度計 (東芝光学機械株式会社製 SP1-5) で測定した. 蛍光灯および陽光ランプの光波長測定は, 波長別放射エネルギー測定装置 (飯尾電気株式会社製 SPR-1465 型) で行った.

3. 子葉の組織学的観察

無菌育成した芽生えの子葉 (播種後 5 日目) と一部培養した子葉を用いた. 超薄切片用には, 3% グルタルアルデヒドと 3% パラフォルムアルデヒドを含む燐酸緩衝液 pH 5.8 で 5.5 時間固定し, さらに 2% オスミック酸で 3 時間固定した. 固定後エタノールで脱水し, n-グリシジルエーテル (QY-1) で置換後エポンに包埋した. 試料は, SOVALL MT2B 型マイクロトームを用いて, 透過型電子顕微鏡 (TEM) 用には 0.01 μm (超薄切片), 光顕用には 0.5 μm (準超薄切片) の厚さの切片を作成した. TEM 用染色は酢酸ウラニルと酢酸鉛の二重染色を行い, 光顕用には脱エポンをしないまま, トルイジンブルー (2.5% 炭酸ナトリウム中に 1% トルイジンブルー溶解), パラゴン (Paragon Co.), ヨードヘ

マトキシリン等で染色し, バルサムで封入鏡検した. また, 光顕用のパラフィン切片は, FAA 液で 16 時間固定後アルコールで脱水し第三ブタノールで置換後パラフィンに包埋, ミクロトームで 7 μm の厚さの切片を作成し, トルイジンブルー, パラゴン等で染色して観察した.

4. レタス子葉からの器官分化能の観察

光条件を異にして育成した, 異なったエイジの芽生えから切り取ったレタスにおける不定芽形成能の観察は, つぎのように行った. 芽生えは 150 lx, 5,000 lx, 10,000 lx の蛍光灯下, 25±1°C 24 時間照明で育成した. 培養に供した子葉のエイジは播種後 3, 4, 5, 6, 8 および 10 日とした. 各エイジの子葉を葉柄部から切り離し, 向軸側を上にして培地に置床し培養した. 培地として 0.1 mg/l BA (6-Benzyladenin), と 0.1 mg/l NAA (Naphthalene-acetic acid) および 2% ショ糖, 0.2% ジェランガム (Kel-co, Division of Merck & Co. Inc.) を含む pH 5.8 の MS 培地を用いた. 培地を 90×20 mm のプラスチックシャーレに 25 ml 注ぎ固化した後, 子葉を置床し, パラフィルムで封じた. 培養条件は 25±1°C, 照度 2,000 lx の蛍光灯下で連続照明とした. 不定芽の観察は, 培養後 15 日と 35 日に行った.

実験結果

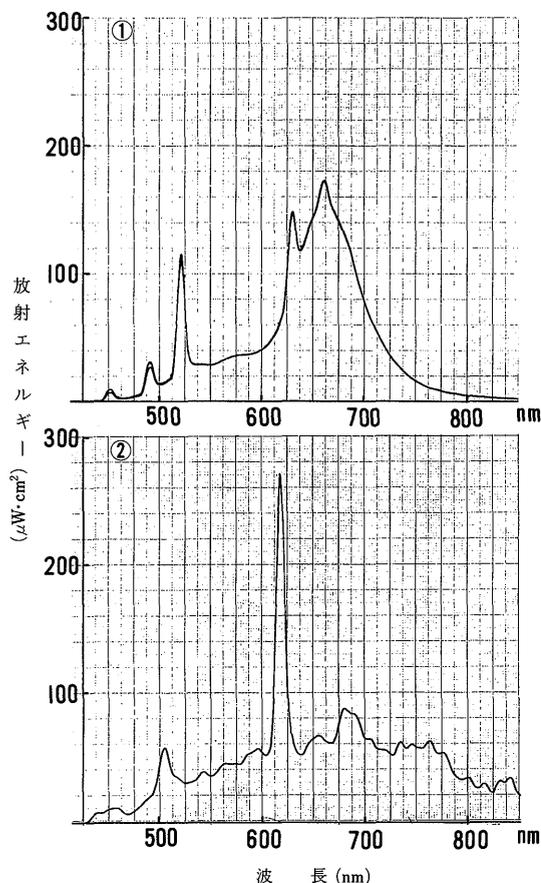
1. 光条件と芽生えの特徴

蛍光灯および陽光ランプ下で育成した芽生えは, いずれも光条件によって生長程度に違いが見られた. 調査は光条件別に, 根・下胚軸・子葉のそれぞれの長さを播種後 5 日目に測定した (第 1 表). 蛍

第 1 表 光条件の違いによる芽生え各器官の生長.

光 条 件		子 葉	下 胚 軸	根
蛍 光 灯	150 lx	9.2 mm	20.4 mm	11.8 mm
	5,000	9.6	2.0	10.4
	10,000	12.2	2.0	10.6
陽 光 ラ ン プ	1,000	9.6	4.8	7.6
	5,000	5.6	9.8	9.8
	10,000	5.4	1.8	8.4

調査方法: 播種後 5 日目, 光源: 蛍光灯・日立 FLA 40 W/MG 白色, 陽光ランプ・BOC ランプ MLBO 400-FU 三菱.



第1図 波長別放射エネルギー測定結果 ($\mu\text{W}\cdot\text{cm}^2$).
 ① 蛍光灯 5,000 lx の場合, ② 陽光ランプ 1,000 lx の場合.

光灯下で生長した芽生えの根長は長く、下胚軸の長さは 150 lx の場合約 20 mm であったが、5,000・10,000 lx ではいずれも 2 mm 程度で、両者間に約 10 倍の差が見られた。芽生えの子葉は、強い光条件でやや伸長し展開したが 150 lx 条件では未展開であった。陽光ランプ下で生長した芽生えは、光の強さによる根長の差が小さく、下胚軸は強光条件で伸びが少なかった。子葉長は、弱光条件ほど著しかった。

2. 蛍光灯および陽光ランプの光特性

異なった光源下で育成したレタスの芽生えは、上述のごとく播種後 5 日目の観察で生長程度の異なることが明らかになった。この原因を照度以外に、光源の放射する波長に着目し、これを測定した (第1図)。蛍光灯の場合は、520 nm および 620 から 700 nm 付近の波長部分に強いスペクトルが見られたが、その他の部分の波長別エネルギーの差異は少な

かった。陽光ランプでは、620 nm に特に強いスペクトルがあったが、その他の波長域では 500 nm から 800 nm まで平均した放射エネルギーが得られた。蛍光灯と陽光ランプの光エネルギーを照度 150・5,000・10,000 lx について比較したが、常に蛍光灯の値が低かった。

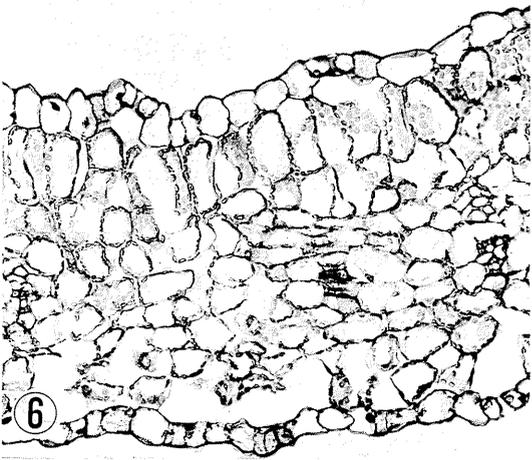
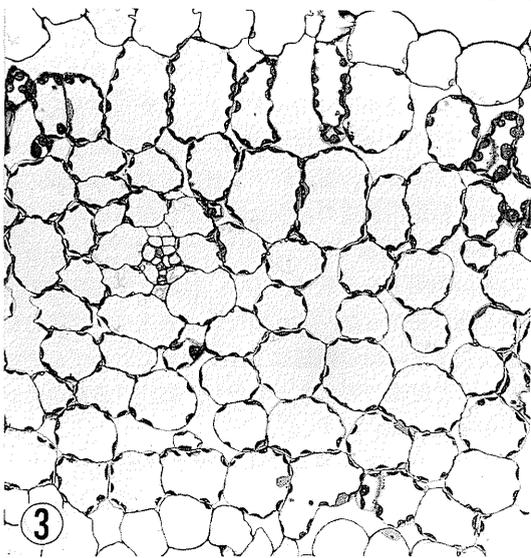
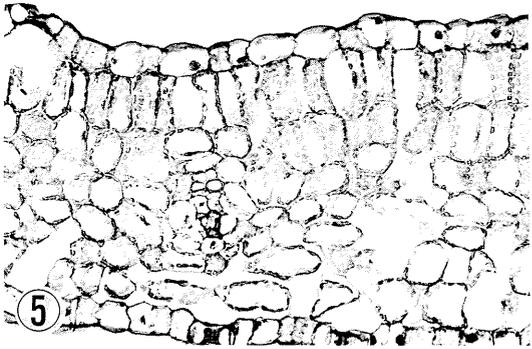
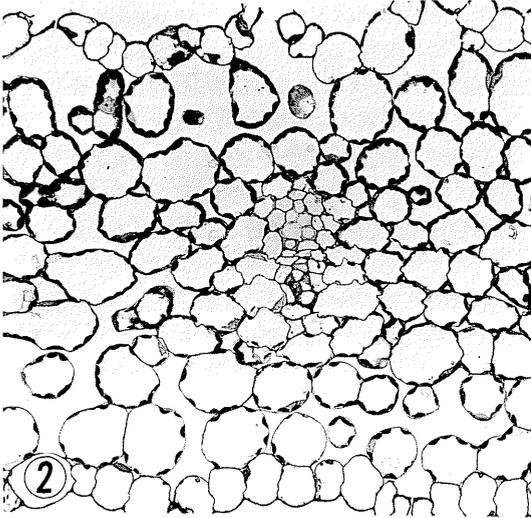
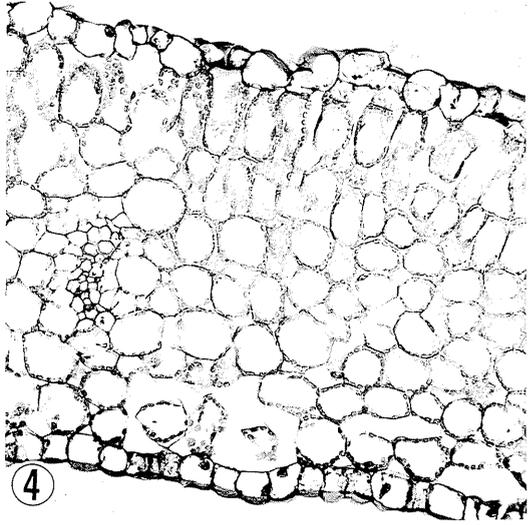
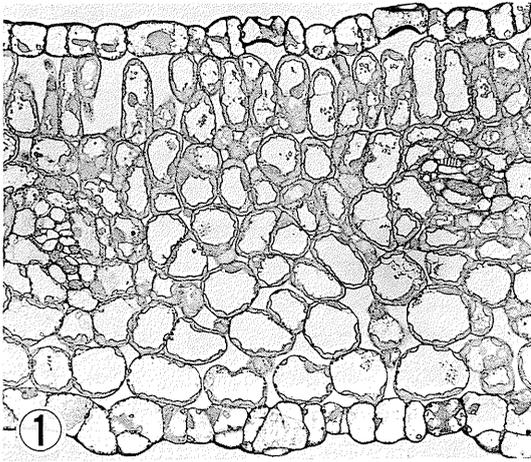
3. 子葉組織の細胞学的観察

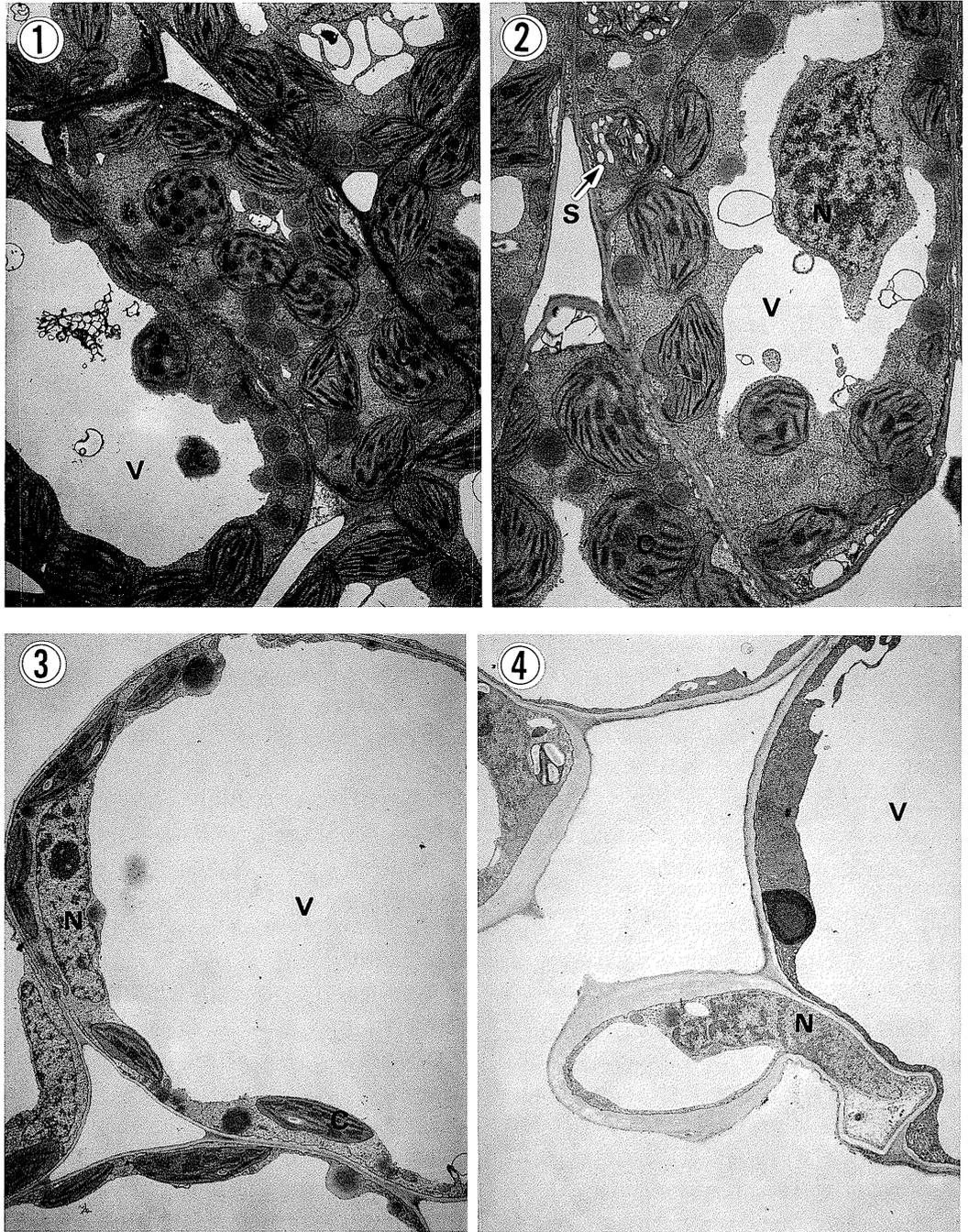
1) 蛍光灯下で育成した芽生えの子葉中央部から 1×1 mm の葉片をとり、グルタルアルデヒドとオスミック酸で二重固定し、超薄切片および準超薄切片を作成した。観察結果はつぎのようであった (第2図 1-3)。照度 150 lx で育成した子葉は細胞内の染色性がよく、柵状組織細胞では比較的強く染色された。海綿状組織細胞では染色性が比較的弱く、液胞化している部分が多かった。5,000 および 10,000 lx で育成した子葉はどの部分の細胞も染色性に乏しく、細胞が肥大し細胞内の大部分が液胞化していた。また、子葉の厚さは 150 lx に比べ厚くなっていた。ヨードヘマトキシリン染色では、150 lx 条件の場合に小球状の物質として澱粉粒が多く認められた。

超薄切片を TEM で観察したとき、150 lx の照度で育成した子葉では、細胞内に多くの細胞内小器官が見られた。葉緑体と核は円形または球状に近い形態であった (第3図 1-2)。一方、10,000 lx 条件の子葉は、細胞内に大きな液胞が存在し、葉緑体と細胞核が細胞壁に接するように存在し、いずれも楕円形をしていた。また、一部に細胞が変形し、葉緑体が見られない部分もあった (第3図 3-4)。

2) 蛍光灯および陽光ランプ照明下で育成したレタス子葉をグルタルアルデヒド、または FAA で固定し、パラフィン切片を作成し観察した結果はつぎのようであった。蛍光灯下で育成した子葉組織の細胞は、細胞内構造の多少に関して準超薄切片による観察結果と同様であったが 5,000 および 10,000 lx の強い照明下の子葉は、FAA 固定では細胞内の形状が崩れ易かった。これに対して陽光ランプ下で育成した子葉組織の細胞は FAA 固定においても崩壊が少なく組織の形状をよく保ち、細胞質の染色性がよかった (第2図 4-6)。

また、光条件を異にする環境で育成した子葉の FAA 固定時に現れた特徴は、固定直後における固定液の黄変に見られた。浸漬 30 分後の調査では、陽光ランプおよび蛍光灯 150 lx 下で育成した子葉の固定液の黄変が少ないのに対して、蛍光灯の





第3図 レタス子葉組織の TEM による観察。

①, ② 150 lx の照度の蛍光灯下で育成した子葉組織。①×30,000, ②×40,000。③, ④ 10,000 lx の照度の蛍光灯下で育成した子葉組織。×35,000。N—核, C—葉緑体, V—液胞, S—澱粉粒。

第2図 レタス子葉組織の顕微鏡観察 (播種5日目)。

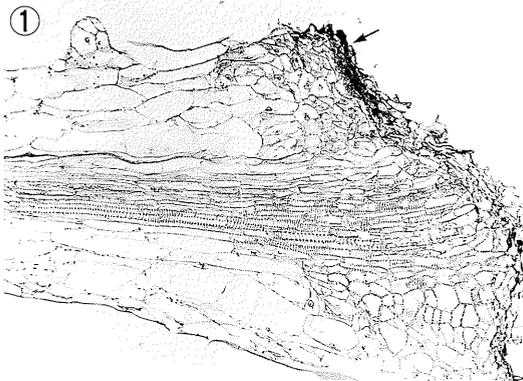
(前頁)

①—③ 蛍光灯下で育成した子葉組織をグルタルアルデヒド, オスミック酸固定。準超薄膜切片とし, パラゴン染色×125。① 150 lx, ② 5,000 lx, ③ 10,000 lx の照度で育成した子葉組織。
④—⑥ 陽光ランプ下で育成した子葉組織を FAA 固定。パラゴン染色×125。④ 1,000 lx, ⑤ 5,000 lx, ⑥ 10,000 lx の照度で育成した子葉組織。

第2表 切断子葉片からの不定芽の分化頻度と芽生えの育成条件。

播種後の日数	育成時の光条件			
	150 lx		5,000 lx	
	不定芽形成率	カルス形成程度	不定芽形成率	カルス形成程度
3	100%	++	100%	+
4	100	++	100	+
5	100	++	45	++
6	75	++	35	++
8	50	++	5	++
10	45	++	15	++

光源；蛍光灯・日立 FLR 40 W/MG 白色, Explant 数；子葉 20 枚, 調査方法；置床後 35 日目, カルス形成程度；+ 形成量少ない・++ 形成量やや多い



第4図 レタス子葉組織からの器官分化。

BA 0.1 mg/l, NAA 0.1 mg/l, ショ糖 2%, ジェランガム 0.2%を含む MS 培地で培養4日目。矢印は向軸側で見られたシュート形成の初期状態, 写真下側が培地接触面。

5,000 および 10,000 lx の子葉の固定液は濃い黄緑色を呈した。特に 10,000 lx の場合でより黄変度が著しかった。

4. 光条件を異にして育成した子葉からの器官分化

蛍光灯下で育成したレタス子葉からの不定芽形成能に対する、照度と芽生えのエイジの影響を調査した。培養15日後の不定芽形成はエイジの若い子葉ほど、その頻度が高い傾向を示した。照度 150 lx に比べ 5,000 lx 区は形成頻度が著しく低かった。また、いずれの区の子葉も基軸側に不定芽が形成され、カルス形成は著しくなかった。置床後 35 日後の調査結果を第2表に示した。照度 150 lx では、どのエイジの子葉からも不定芽の形成が認められた。播種後 3, 4, 5 日の若いエイジで、その形成頻度が高い傾向を示した。一方、5,000 lx では3日および4日の若いエイジの子葉からは、よく不定芽を形成したが5, 6, 8, 10 日とエイジが進んだ子葉で

は不定芽形成頻度が著しく低下した。しかし、この場合にはカルス形成が旺盛であった。第4図は 150 lx の蛍光灯下で育成した芽生えの子葉片から不定芽を誘導した材料を、パラフィン切片とし観察したものである。培養後4日目の子葉組織の切口近傍の細胞では細胞質に富む部分が比較的多く見られるが、切口から離れるにつれ細胞質内に染色質の少ないことがわかる。

考 察

本研究では、プロトプラスト培養系確立を目的として、プロトプラストを単離する組織片につき細胞学的観察を行い、不定芽およびカルス形成頻度につき検討した。強光条件下で育成したレタスの子葉から得られたプロトプラストは、培養中の分裂頻度が低くなること、および培地の褐変が早いなどに問題がある⁹⁾。このことは、プロトプラストを単離する組織片の性質に起因するものと考え、レタス芽生えの育成条件と子葉の組織構造との関係を研究した。無菌条件下で生育したレタスの芽生えは、150 lx の蛍光灯下で育成したとき下胚軸の伸長が著しいが子葉の展開は遅く、5日目でも殆ど展開していなかった。照度を 5,000 lx または 10,000 lx とした場合は下胚軸の伸長が少なく、子葉は展開し草型も正常に発育していた(第1表)。蛍光灯下で育成したこの時期の子葉をそれぞれ固定し、組織学的観察を行ったところ 150 lx の子葉は細胞質に富む細胞が多かったが 5,000 lx および 10,000 lx の子葉はいずれも細胞質内に染色質が少なく、葉肉が肥厚していた(第1図2-3)。このことは、子葉の展開が進むと子葉組織細胞の成分が失われるばかりでなく、細胞内に液胞が巨大化して来ることに基づくものと思われる。子葉は本来、第一次栄養生長(発芽)のため

の栄養貯蔵器官と考えられており、レタスの場合も細胞の液胞化は、子葉の生長に伴って子葉内貯蔵物質が利用された結果と考えられる。一方、陽光ランプの場合の生育は、照度が低いと子葉の伸長が大きく、照度が高いと子葉の伸長が少ないこと、および子葉組織細胞に細胞質が多く残っているなど、蛍光灯下で育成した場合と異なった対応を見せた。この結果はレタスの生育と細胞の生理的変化が単に明るさ (lx) だけでなく、スペクトル特性や波長別エネルギー分布に関係していることを示唆している。第1図に示したそれぞれの光源の波長別エネルギー測定値から、このことを推測しえる。今回行った蛍光灯と陽光ランプの場合、温度条件が異なり単純には比較できないので、詳細な検討は今後の課題として考えたい。

蛍光灯照度 150 lx で育成した子葉は、組織部位により細胞内の状況が異なる。柵状組織は細胞質に富むが、海綿状組織では背軸側表皮に近いほど細胞質が少なくなっている (第1図1)。またヨードヘマトキシリン染色により澱粉粒が見られる。さらに TEM の観察によれば細胞質の多い細胞は、葉緑体と核が球状に近い形態をしている (第3図1-2) のに対して、5,000 lx 条件の子葉では葉緑体も核も細胞壁に押しつけられるような形で存在していた (第3図1-2)。両者のこの違いは、一方が細胞質が多く残っているのに対して 5,000 lx 条件の細胞は液胞化している上に細胞壁が脆くなって細胞内容物が流失したと考えられる。このことは FAA 固定に際し固定液が黄変し易いことにも現れる。芽生えの生長に伴い子葉細胞の細胞内成分が消費され、組織が老化し、液胞に蓄積された成分が漏出し易くなった結果、このような現象が生じたものと思われる。プロトプラスト培養時に、強光条件下で育成した子葉起源のプロトプラストで褐変が早く分裂頻度が低い⁹⁾のも、このことと関連する現象と思われる。

子葉のエイジと器官分化能に関しては、若いエイジの子葉の方が不定芽分化能が高くエイジが古くなるほど分化能が低下する。この傾向は、蛍光灯 5,000 lx の子葉で顕著である。このような分化能の違いも、子葉の老化、即ち子葉内貯蔵物質の消費と関連していると考えられる。こうした傾向は Webb and Torres¹³⁾ の子葉からの器官分化の研究結果とも一致している。さらに、子葉からの器官分化に関する実験 (第4図) から、培養子葉片の組織内細胞

は切口から離れるにしたがって細胞質が少なく、培養によって細胞質の増加が見られないことから、不定芽分化域以外の子葉細胞は、細胞内貯蔵物質を消費するのみであると言える。

以上述べてきたことから、プロトプラストを単離する材料組織片の生理的状態は、光源、光量等の芽生え育成条件によって、芽生えの生育状況が異なるばかりでなく、子葉のエイジによって子葉細胞内の構造も変化することが明かとなった。このことは、子葉からの不定芽の分化能とも関係しているので、組織構造の異なった子葉からプロトプラストを単離培養した場合、その分裂と再生能に差異の生じることが推定される。このような観点から、プロトプラストを単離する組織片について、培養に適する組織が得られるような育成条件を厳密に検討する必要がある。

謝 辞：本研究の実施と取りまとめにあたり、有益な助言をいただいた農業生物資源研究所大山勝夫博士と、光エネルギー測定の便宜と研究に多くの助言をいただいた名古屋大学農学部大野 始博士、谷口武助教授に対し、深く感謝いたします。

引用文献

1. Berry, S.F., D.Y. Lu, D. Pental and E.C. Cocking 1982. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. Z. Pflanzenphysiol. 108: 31-38.
2. Brown, C., J.A. Lucas, and J.B. Power 1987. Plant regeneration from protoplasts of a wild Lettuce species (*Lactuca saligna* L.). Plant Cell Rep. 6: 180-182.
3. Engeler, D.E. and R.G. Grogan 1983. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. Plant Sci. Lett. 28: 223-229.
4. 松本悦男 1987. 細胞融合によるレタス栽培種 *Lactuca sativa* と野性種 *L. serriola* の体細胞雑種の育成. 育種 37(別号1): 134-135.
5. 松本悦男・大野清春 1984. レタスプロトプラストからの植物体再生に及ぼす諸要因の影響. 育種 35(別号2): 20-21.
6. Michael, E.F., L.P. Taylor and V. Walbot 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. Nature 319: 791-793.
7. Morikawa, H., Y. Yamada 1985. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. Plant Cell Physiol. 26: 229-236.
8. Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-

- 497.
9. 村山 徹・榎本末男・大山勝夫 1987. レタス子葉プロトプラスト培養の効率化. 植物組織培養学会第10回植物組織培養シンポジウム講要 212.
 10. Neter, D., D. Gubersso and J. Sacks 1976. *Lactuca saligna* L. a new source of resistance to Downy mildew (*Bremia lactuca* Reg.) Hort Science 11: 612—613.
 11. Provvidenti, R., R.W. Robinson and J.W. Shail 1980. A source of resistance to a strain of cucumber mosaic virus in *Lactuca saligna* L. Hort Science 15: 528—529.
 12. 鈴木裕二・榎本末男・大山勝夫 1986. レタス葉肉プロトプラストからの植物体再生. 植物組織培養 3: 83—85.
 13. Webb, D.T. and D. Torres 1984. Interaction of growth regulators, explants age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledon *in vitro*. Can. J. Bot. 62: 586—590.
-