

## キャベツのプロトプラストからの植物体再生

宮崎 正則・奥 正和・美谷 誠一・佐藤 宏・若狭 勝

### Plant Regeneration from Protoplast of Cabbage

Masanori Miyazaki, Masakazu Oku, Seiichi Miya, Hiroshi Sato and Masaru Wakasa

For the purpose of breeding of vegetables for processing uses by the cell fusion, the plant regeneration from protoplasts, an indispensable condition for the cell fusion, was attempted by using cabbage protoplasts.

In the protoplast culture, the use of viable protoplasts which can survive up to the end of culture was important. To obtaining these, it was necessary that the aseptic plants were treated by the enzyme solution containing a low level of cellulase and the protoplasts isolated were immediately purified.

Protoplasts of aseptic young cabbage were isolated by using an enzyme solution containing 0.2% Pectolyase Y23 and 0.3% Cellulase Onozuka RS in 0.5 Mol mannitol at pH 5.8. Protoplasts purified were cultured in the medium for cell division containing diluted MS medium and various concentrations of BA (6-benzylaminopurine), NAA (1-naphthaleneacetic acid) and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid).

After one month, cells divided and colonies were formed in the medium for containing 2,4-D and then the colonies were transferred to the medium for callus formation containing 1/2 MS minerals, MS vitamins, 1% sucrose, 0.8% agar, 1 mg/l BA and 0.5 mg/l 2,4-D. After another month, green calluses were formed and then grew up to 2 mm in diameter. These calluses were transferred to the medium for shoot formation containing MS medium, 1% sucrose, 0.8% agar and 1 mg/l BA.

Buds were formed on several calluses after two weeks and soon developed to shoots. Roots were formed from the shoots transplanted in the medium for roots formation containing MS medium, 1% sucrose and 0.8% agar and complete plantlets of cabbage were regenerated.

## 1 目 的

プロトプラストからの植物体再生は細胞融合を行うための重要な前提条件であり、これに関する報告は多い<sup>1)~11)</sup>。著者らも細胞融合により新しい加工原料作物を育成する目的で、基礎資料を得るため、プロトプラストの培養を実施している。今回はキャベツのプロトプラストからの植物体再生について報告する。

## 2 実 験 方 法

### 2-1 培養過程

培養過程は Fig. 1 のとおりである。その概要は、まず無菌苗を細断し、酵素処理してプロトプラストを単離、精製し、分裂培地に移して培養し、コロニーを形成させる。ついでカルス形成培地に移してカルスを形成させ、その後これらを茎葉分化培地に移して茎葉分化をはかる。さらに再生培地に移して発根させ、幼植物を得る。

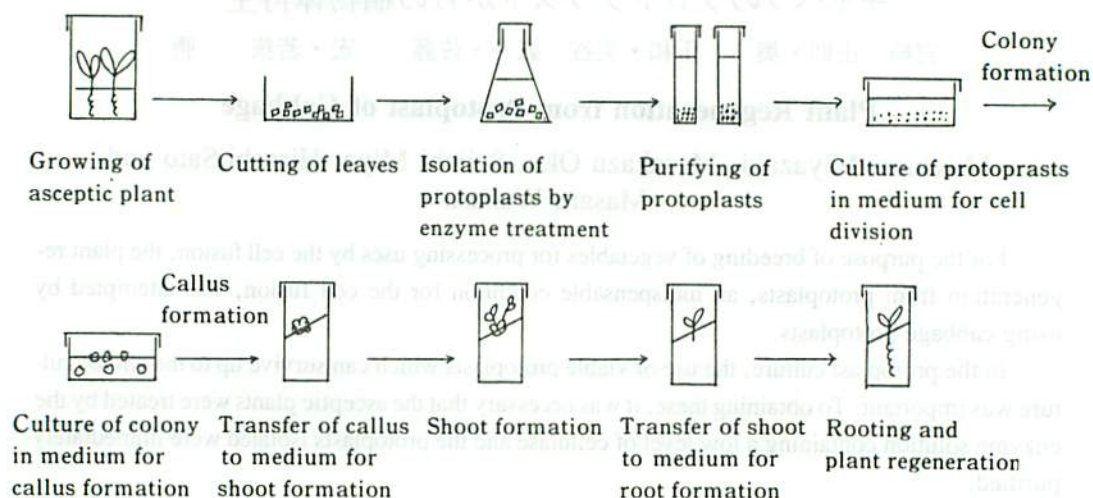


Fig. 1 Process of plant regeneration from protoplast

## 2-2 材料

キャベツ品種「未広」の種子を1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間殺菌し、滅菌水で充分水洗したのち、殺菌した寒天培地（ビタミン類と糖を除いたMS培地）のポットには種した。2週間後、幼植物をシャーレに出し、根部を切除し、地上部をナイフで細断して実験に供した。

## 2-3 プロトプラストの単離と精製

酵素液は、0.5Mマンニトール（浸透圧調整）、0.2%ペクトリアーゼY23（細胞解離）、0.3%セルラーゼオノズカRS（細胞壁溶解）、pH 5.8とし、0.45 $\mu$ のマイクロフィルターで濾過滅菌した。

200ml三角フラスコに酵素液100mlと細断した材料10gを入れ、フラスコをデシケーター中に置き、数分間減圧脱気した後常圧にもどし酵素液を組織内に浸透させたのち、25°Cに静置し、時々軽く手で振とうした。2時間後プロトプラストが充分量単離されたことを確認して、60 $\mu$ のナイロンメッシュで濾過し、残渣を除き、濾液中にプロトプラストを得た。

濾液を遠心管にとり、遠心分離（500~600 r.p.m, 3分）して酵素液とプロトプラストに分けた。上部の酵素液を除去し、下部のプロトプラストに0.5Mマンニトールを加えて洗浄し、遠心分離して、上部のマンニトールを除去することにより酵素液を洗い流した。この操作をさらに2回くり返し、酵素液を除去し、プロトプラストを精製した。

## 2-4 培地と培養操作

培地は基礎培地にMS培地を用いたが、その無機塩類とビタミン類はそれぞれ適度に希釈（1/4倍~標準濃度）して使用した。植物ホルモンはBA（ベンジルアデニン：細胞分裂促進）、NAA（ナフタレン酢酸：細胞肥大促進）、2,4-D（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸：細胞肥大促進）を種々の濃度に組合せて用いた。各生育段階における培地組成はTable 1~4に示した。

培養操作は、まず精製したプロトプラストを10<sup>5</sup>個/mlになるようにシャーレ中の分裂培地（3~4 ml）に加え、パラフィルムで密封し、20~25°Cに置いた。培養開始後10日間は暗所で培養した。培養中10日ごとに新しい分裂培地2 mlを加えた。

Table 1. Culture mediums for cell division of cabbage

Medium No.	Minerals	Vitamins	Mannitol	Sucrose	BA	NAA	2.4-D	Cell division
1	¼ MS	½ MS	0.5	1	1	1	0	+
2	¼ MS	½ MS	0.5	1	1	2.5	0	+
3	¼ MS	½ MS	0.5	1	1	5	0	+
4	¼ MS	½ MS	0.5	1	1	0	1	+ Colony
5	¼ MS	½ MS	0.5	1	1	0	2.5	+ Colony
6	½ MS	MS	0.5	1	1	1	0	+
7	½ MS	MS	0.5	1	1	2.5	0	+
8	½ MS	MS	0.5	1	1	5	0	+
9	½ MS	MS	0.5	1	1	0	1	+ Colony
10	½ MS	MS	0.5	1	1	0	2.5	+

+ : First division of cell

Table 2. Culture mediums for callus formation from cabbage protoplasts

Medium No. for cell division (Table 1)	Medium No. for callus formation	Minerals	Vitamins	Sucrose	Agar	BA	NAA	2.4-D	Callus formation
				%	%	mg/l	mg/l	mg/l	
1	→ 1	½ MS	MS	1	0.8	1	1	0	Callus browning
2	→ 2	½ MS	MS	1	0.8	1	1	0	Callus browning
3	→ 3	½ MS	MS	1	0.8	1	1	0	—
4	→ 4	½ MS	MS	1	0.8	1	0	0.5	Callus greening
5	→ 5	½ MS	MS	1	0.8	1	0	0.5	Callus greening
6	→ 6	MS	MS	1	0.8	1	1	0	—
7	→ 7	MS	MS	1	0.8	1	1	0	—
8	→ 8	MS	MS	1	0.8	1	1	0	—
9	→ 9	MS	MS	1	0.8	1	0	0.5	Callus browning
10	→ 10	MS	MS	1	0.8	1	0	0.5	—

— : No callus

\* Cells divided and colonies formed in each medium No. for cell division (Table 1) were transferred to medium No. for callus formation.

Table 3. Culture mediums for shoot formation from cabbage calluses

Medium No. for callus formation (Table 2)	Medium No. for shoot formation	Minerals	Vitamins	Sucrose	Agar	BA	Shoot formation
	*			%	%	mg/l	
4	→ 4	MS	MS	1	0.8	1	Shoot
5	→ 5	MS	MS	1	0.8	1	Shoot

\* Calluses formed in each medium No. for callus formation (Table 2) were transferred to medium No. for shoot formation.

Table 4. Culture mediums for root formation from cabbage shoots

Medium No. for shoot formation (Table 3)	Medium No. for root formation	Minerals	Vitamins	Sucrose	Agar	Root formation
	*			%	%	
4	→ 4	MS	MS	1	0.8	Root, Plant regeneration
5	→ 5	MS	MS	1	0.8	Root, Plant regeneration

\* Shoots formed in each medium No. for shoot formation (Table 3) were transplanted to medium No. for root formation.

培養開始1か月後、コロニーが形成されたことを確認して、シャーレの内容物を遠心分離し、上部の培養液を除去した。下部の沈着物（コロニー）をシャーレにとり、40°Cに保温した寒天を含むカルス形成培地を加えた。この培地で形成されたカルスが緑色で直径2mm以上の大きになると、茎葉分化培地に移植した。ここで分化した茎葉は1本ずつ再生培地に移植し、発根を促進させた。再生培地で根が十分に伸長した幼植物は順化培地に移植して育苗した。本実験における順化は、石英砂を入れたポットに幼植物を移植し、上からピーカをかぶせて乾燥を防ぎ、ハイポネックス溶液（1g/l）を施用する方法で行った。

### 3 結果

#### 3-1 プロトプラストの単離

予備実験で、プロトプラストは培養中も生存する健全なものでなければならないこと、その健全さを失わせる要因として、不適切な材料（特に葉令）、畑で生育した材料を供試する際の殺菌剤の使用およびプロトプラスト単離のための高濃度セルラーゼの使用がそれぞれ関与していることを認めた。そこで本実験では、無菌苗を供試することにより殺菌剤の使用をさけ、セルラーゼ濃度を0.3%と低濃度にして単離した。その結果、材料はは種後2週間の幼植物ではあったが、培養中も

生存する健全なプロトプラストが得られた (Fig. 2)。

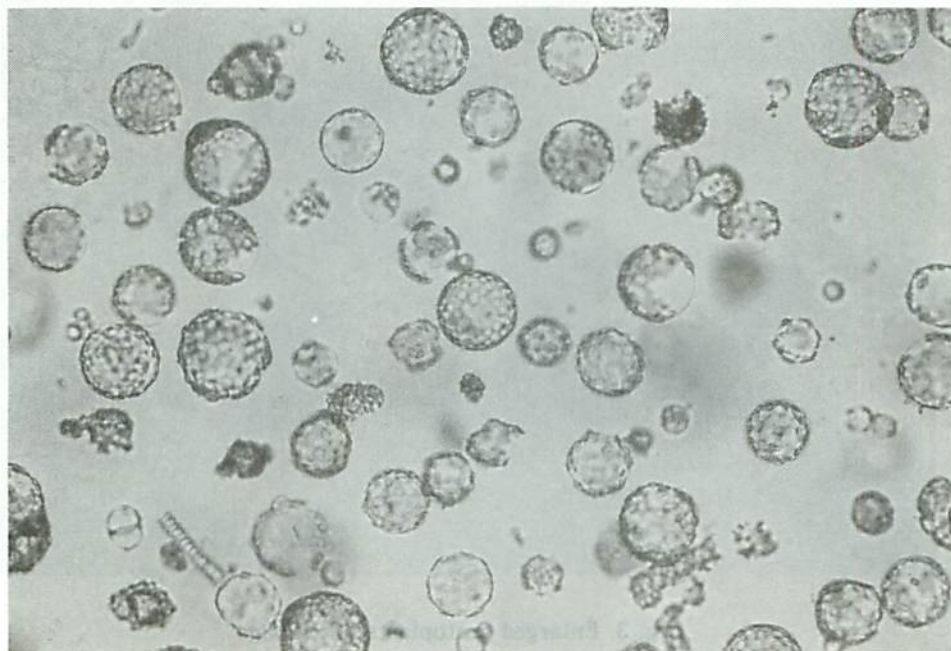


Fig. 2 Protoplasts of cabbage

### 3-2 培養

精製したプロトプラストを Table 1 の 10 種類の分裂培地で培養した。培養開始数日後から、いずれの培地でもプロトプラストは肥大、伸長し、分裂を開始した (Fig. 3, 4)。その後 2,4-D を含む培地のうち、No. 4、No. 5、No. 9 の培地でコロニーの形成が観察された (Fig. 5, 6)。

そこで培養開始 1 か月後に、Table 1 の 10 種の培地の内容物をそれぞれ Table 2 のカルス形成培地に移した。カルス形成培地は分裂培地とは若干異なり、寒天培地で、マンニトールを含まず、MS 培地の濃度は高く、NAA と 2,4-D 濃度は低い。なお Table 1 の培地 No. 1、No. 2、No. 3 は同じ組成のカルス形成培地に移した。同様に No. 4、No. 5 は 0.5mg/ℓ 2,4-D の培地、No. 6、No. 7、No. 8 は 1mg/ℓ NAA の培地、No. 9、No. 10 は 0.5mg/ℓ 2,4-D の培地に移した。その結果、カルス形成培地移行 1 か月後に、No. 4 と No. 5 の培地で緑色のカルスが多数形成され、肥大して 2mm 以上に成長した (Fig. 7, 8)。No. 1、No. 2 および No. 9 の培地でもカルスは形成されたが、白色のカルスで間もなく褐変した。

### 3-3 植物体再生

培地 No. 4 と No. 5 の緑色カルスを Table 3 の茎葉分化培地に移植した。この分化培地はカルス形成培地から NAA と 2,4-D を除去し、MS 培地の無機塩類の濃度を高めたものである。その結果、移植 2 週間後にはカルスはさらに肥大し、濃緑色となり、やがて茎葉が分化しはじめた (Fig. 9)。移植したカルスは 150 個で、そのうち 28 個のカルスから茎葉が分化した。また 1 個のカルスから多いもので 10 本以上の茎葉分化がみられた。しかし茎葉が大きく成長しても発根は認められなかった (Fig. 10)。

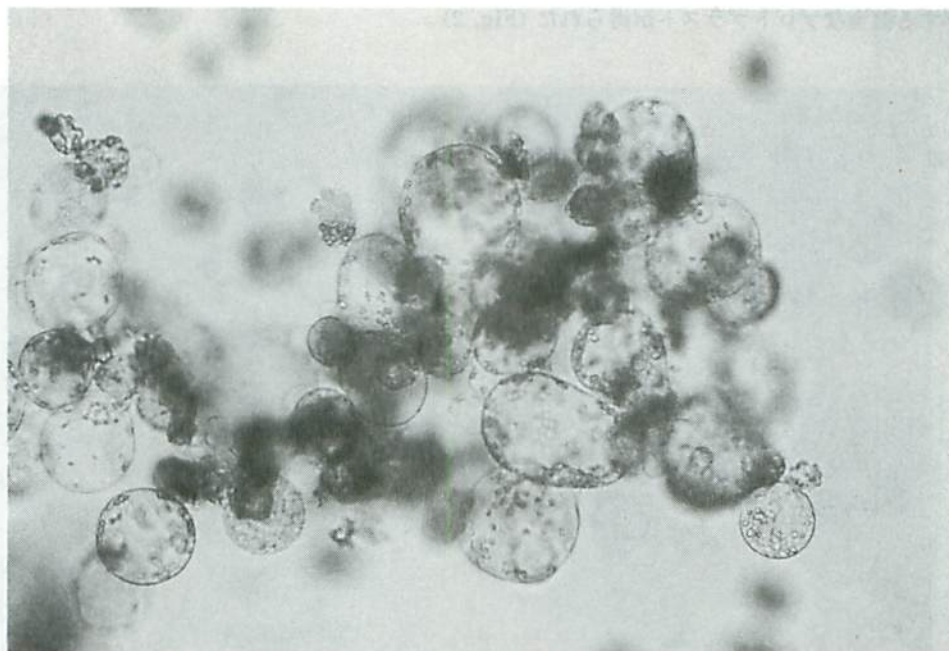


Fig. 3 Enlarged protoplasts of cabbage

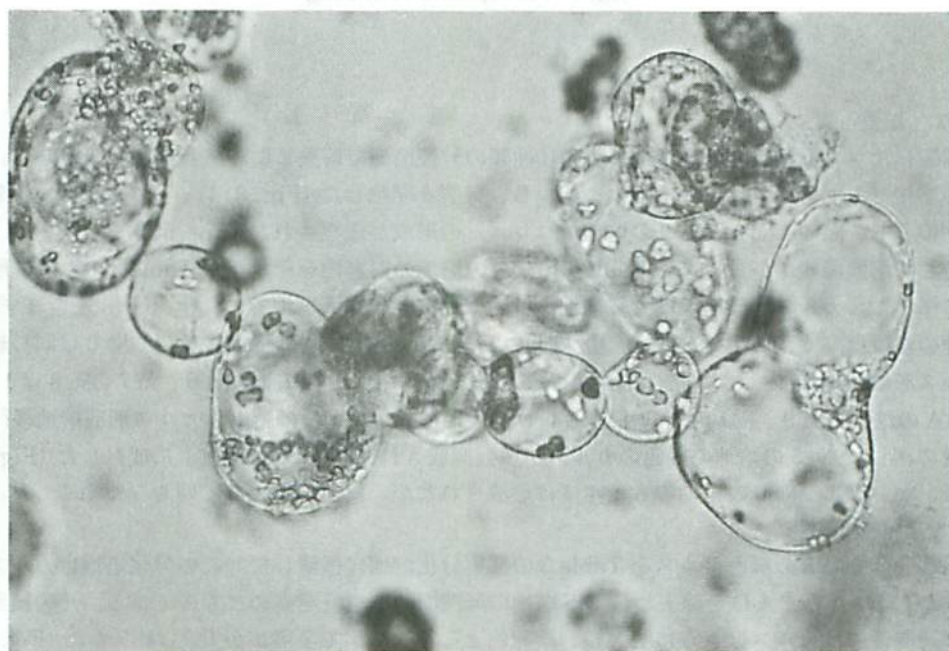


Fig. 4 First cell division of cabbage

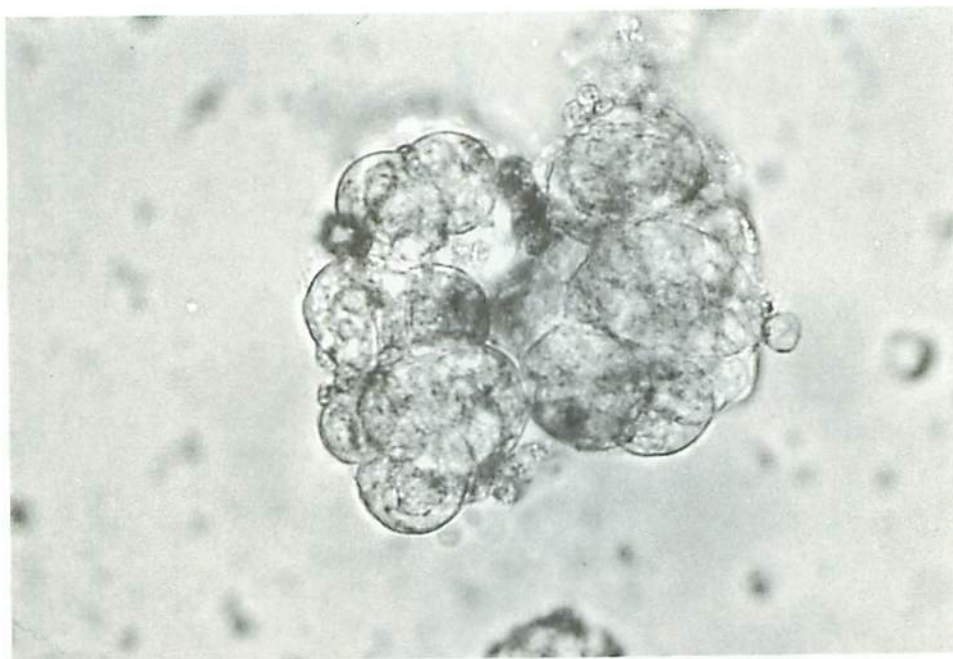


Fig. 5 A cell colony of more than 50 cells formed by cell division of cabbage

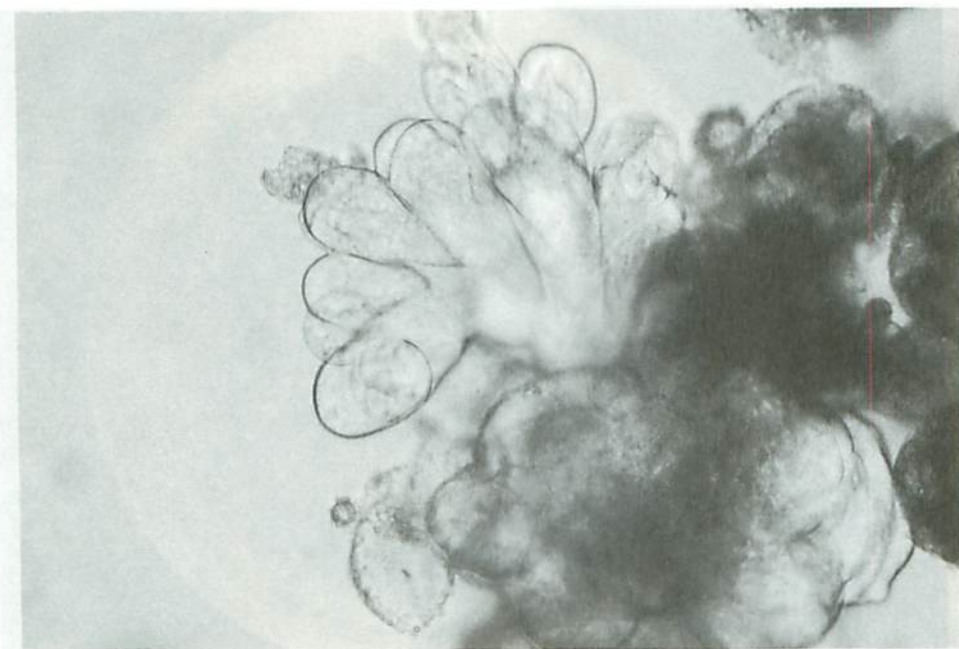


Fig. 6 A cell colony of more than 100 cells formed by cell division of cabbage

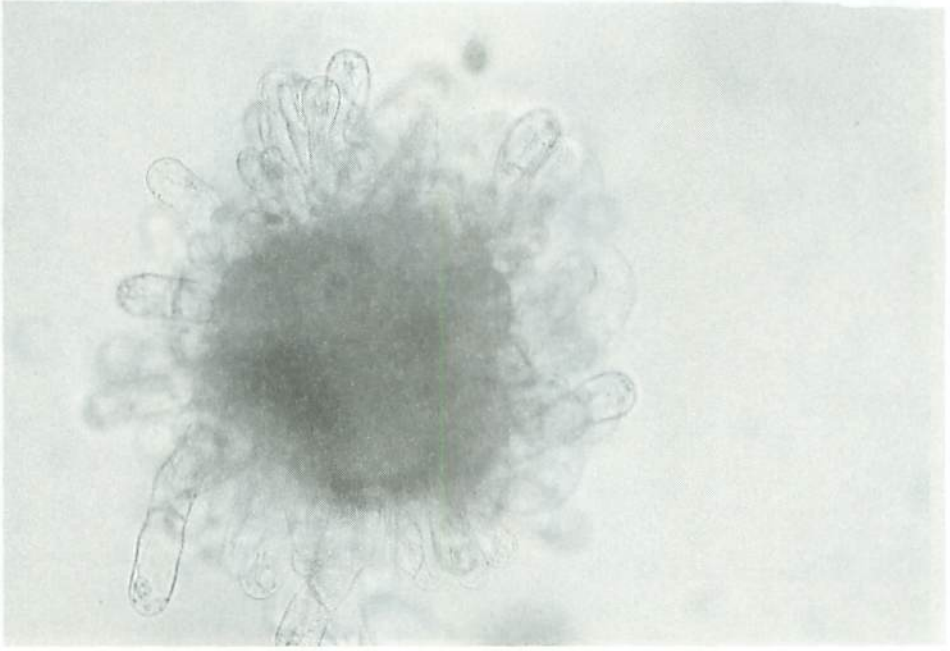


Fig. 7 .A callus formed formed from protoplasts of cabbage

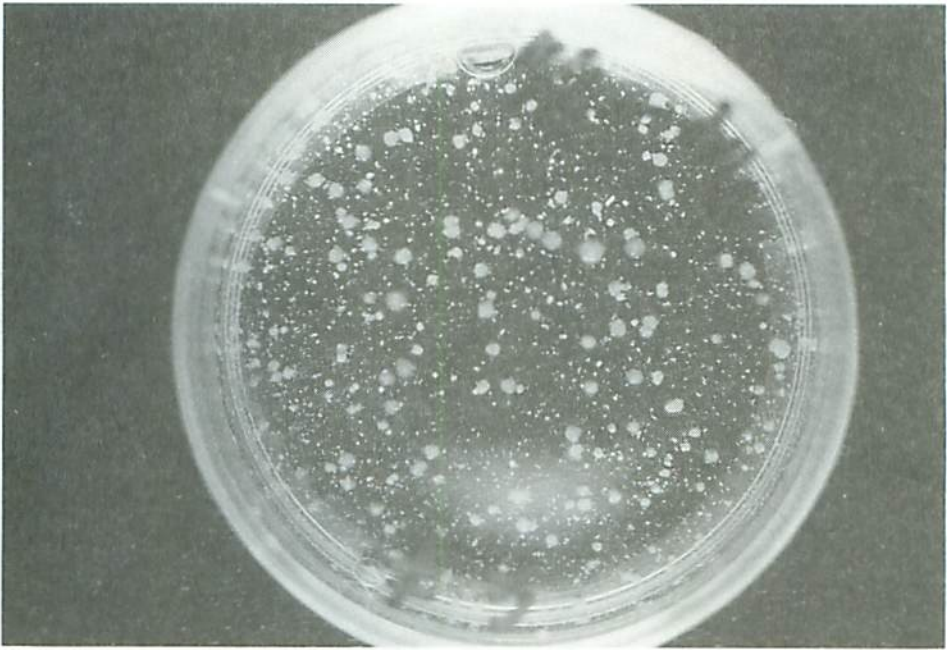


Fig. 8 Calluses formed on agar medium



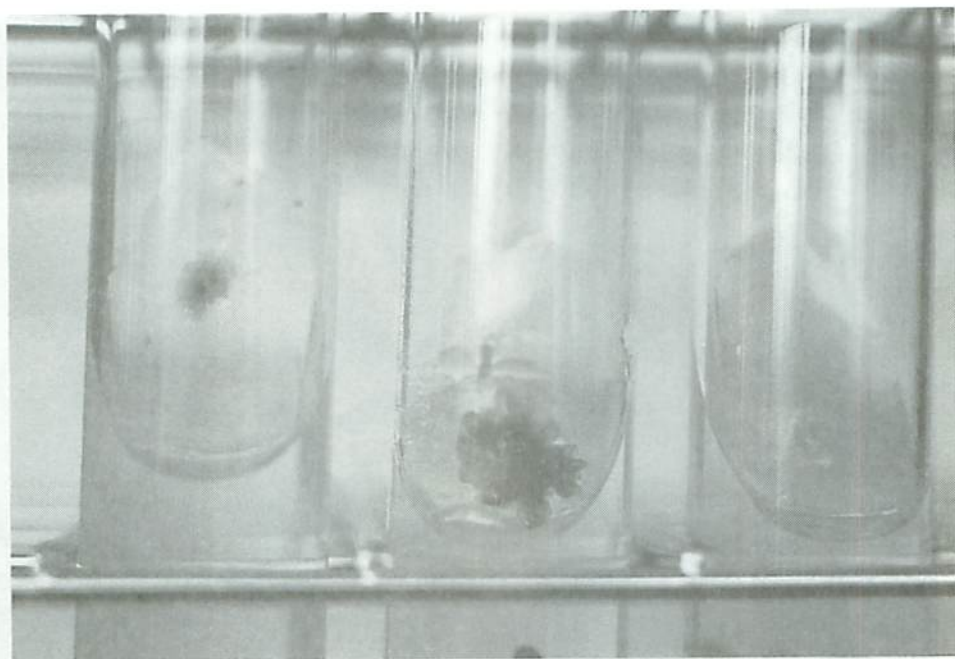


Fig. 9 Bud formation from callus of cabbage



Fig. 10 Shoots developed from buds of cabbage

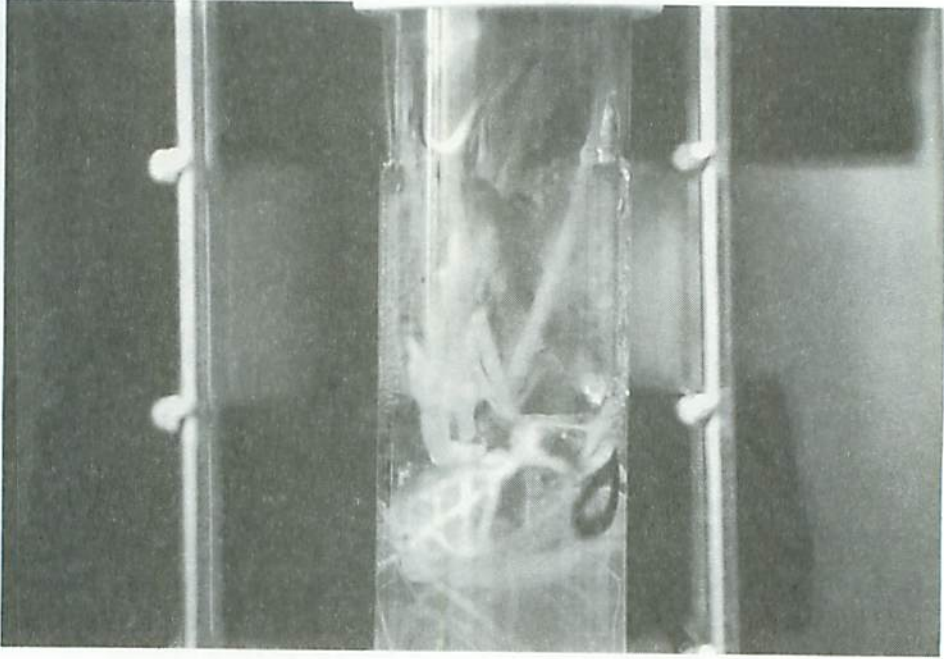


Fig. 11 Plantlet of cabbage regenerated from a protoplast



Fig. 12 A cclimatization of plantlets derived from protoplasts of cabbage



Fig. 13 Cabbage plants berived from protoplasts grown in air conditioning room

そこで茎葉を1本ずつ再生培地に移植した。その結果、移植した80本の茎葉のうち、9本の茎葉から発根し (Fig. 11)、幼植物になった。その後この9個の幼植物はすべて順調に生育し、結球するまでになった (Fig. 12, 13)。

以上の結果、キャベツのプロトプラストから植物体を再生させることができた。この再生の要因として、健全なプロトプラストを用いたこと、培養の各過程での培地条件が適切であったことが考えられた。今後は再生植物体が雑性を有しているかどうか、変異しているかどうかを検査するとともに、本実験で得られた技術や資料をもとにして、他の多くの作物についてもプロトプラストからの植物体再生を試みたいと考えている。

#### 4 要 約

- 1) キャベツのプロトプラストからの植物体再生を試みた。
- 2) 材料は無菌の幼苗を用いた。プロトプラスト単離のための酵素液組成は、0.2%ペクトリアーゼY23、0.3%セルラーゼオノズカRS、0.5Mマンニトール、pH 5.8であった。材料を細断し、酵素液に2時間浸漬して、プロトプラストを単離し、速やかに精製することにより健全なプロトプラストが得られた。
- 3) 培養の各過程における最適培地は次のとおりであった。

分裂培地	$\frac{1}{4}$ MS + 1 mg / $\ell$ BA + 1 ~ 2.5 mg / $\ell$ 2,4-D
カルス形成培地	$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg / $\ell$ BA + 0.5 mg / $\ell$ 2,4-D
茎葉分化培地	MS + 1 mg / $\ell$ BA
再生培地	MS

- 4) 培養の結果、キャベツのプロトプラストは分裂してコロニーを形成し、カルスを経て茎葉分化し、発根して幼植物に生長した。現在は結球するほどまでに生長している。

## 文 献

- 1) 大沢勝次・高柳謙治：野菜試報，A，12，9（1984）.
- 2) 大沢勝次・高柳謙治：野菜試報，A，12，29（1984）.
- 3) 坂田好輝・西尾 剛・小餅昭二：園芸学会昭和60年春季大会研究発表要旨，P214（1985）.
- 4) 山岸 博・西尾 剛・芦沢正和：園芸学会昭和60年秋季大会研究発表要旨，P166（1985）.
- 5) 矢部和則・西尾 剛・高柳謙治：育種学雑，36，131（1986）.
- 6) 山岸 博・芦沢正和・由比 進：園芸学会昭和61年春季大会研究発表要旨，P144（1986）.
- 7) 妹尾三郎・小管庸正：園芸学会昭和61年春季大会研究発表要旨，P146（1986）.
- 8) 浦上敦子・永井 信：園芸学会昭和61年秋季大会研究発表要旨，P210（1986）.
- 9) 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦：日本育種学会69回講演会要旨，P76（1986）.
- 10) 村田達郎・星野匡樹・宮司佑三：日本育種学会70回講演会要旨，P236（1986）.
- 11) 山岸 博・西尾 剛・吉川宏昭・高柳謙治：園芸学会昭和62年春季大会研究発表要旨，P324（1987）.