

カリフラワー葉肉細胞由来プロトプラストからの 植物体再生

後藤 隆子・宮崎 正則・奥 正和
佐藤 宏・若狭 勝・美谷 誠一

Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast of Cauliflower. (*Brassica Oleracea L.*)

Takako GOTO, Masanori MIYAZAKI, Masakazu OKU,
Hiroshi SATO, Masaru WAKASA and Seiichi MIYA

Mesophyll protoplasts of cauliflower, cv "Snow crown", were prepared in the enzyme solution containing 0.1% Pectolyase Y-23, 0.3% Cellulase Onozuka RS, CPW salts and 0.5M mannitol at room temperature for 3hr. with shaking at a rate of 60 str./min. Purified protoplasts were cultured in the liquid media of 1/2MS salts (200 mg/l NH_4NO_3) containing 1 mg/l BA (6-benzylamino purine) and various concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and NAA (α -naphthylacetic acid). For initial cell division there was no difference among the initial cultured media, but for colony formation NAA was more effective than 2,4-D.

After about one month culturing, cell colonies were transferred onto the agar medium containing 1/2MS salts, 1 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 1% sucrose and 0.8% agar for callus formation.

Colonies cultured in the initial media containing 2.5-5.0 mg/l NAA formed large green calluses. Calluses of 2 mm diameter were transferred onto the agar medium containing MS salts, 1 mg/l zeatin, 1% sucrose and 0.8% agar to induce shoot.

Shoot formation was induced only from the calluses on the initial cultured media containing 0.5-2.5 mg/l NAA.

Whole plants were obtained from shoot transplanted on the agar medium containing MS salts and 0.8% agar.

近年、植物の組織・細胞培養技術は急速な進歩を遂げた。特にプロトプラスト融合は、これまで交雑不可能な組合せの雑種植物を育成できる画期的な手法である。しかし、この手法を用いて効率よく育種を行うためには対象とする植物においてプロトプラストからの植物体再生条件を明らかにする必要がある。プロトプラストからの植物体再生に関しては種々の報告がみられ¹⁻⁶⁾、著者らの研究室でもキャベツについて検討したが⁶⁾、本研究では、カリフラワーのプロトプラストより植物体を再生させることができたのでそれらについて報告する。

実験方法

1. 材料

カリフラワー品種 'スノークラウン' の種子を70%エタノールで15秒間表面消毒後、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1%、0.1% Tween 20を含む)で30分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。Murashige and Skoog⁷⁾ 培地(以下MS培地と略記する)の無機塩に0.8%寒天を加えた培地に、殺菌した種子を播種し、25°C、2000lux、16時間照明下で約1カ月間無菌的に育苗したもの

を試験に用いた。

2. プロトプラストの単離と精製

根部を切除した2-3cm葉の無菌苗をシャーレにとり、約1mm幅に細断した。酵素液はペクトリアーゼY-23を0.1%、セルラーゼオノズカRSを0.3%、マンニトールを0.5Mとし、CPW塩⁸⁾を加え、pH 5.8とした。供試材料の切片1gに対し10mlの酵素液を加え、室温で60回/分の往復振とうを約3時間行った。プロトプラストが充分量単離されたことを確認した後、プロトプラスト懸濁液を60μのナイロンメッシュ(2重)で濾過した。濾液を遠心管にとり、800回/分で3分間遠心分離を行ってプロトプラストを沈澱させ、酵素液をとり除いた。さらに、CPW塩を含む0.5Mマンニトール液を沈澱物に加え、遠心分離し(800回/分、3分間)、上澄みを取り除く操作を3回行って、プロトプラストを精製した(photo.1)。

3. プロトプラストの培養

培地は無機塩が1/2濃度のMS培地(ただし、200mg/ℓ NH₄NO₃、1%しょ糖、0.5Mマンニトール添加、pH 5.8)に種々の濃度のオーキシシン及びサイトカイニンを組み合わせて使用した(Tab. 1)。精製して得られたプロトプラストに培地を1×10⁵個/mlの密度になるように加え、直径6cmのシャーレに4mlずつ分注し、パラフィルムで密封した。培養開始後1週間は25°C暗黒下で、その後は2000lux、16時間照明下で培養し、10日毎に新鮮な培地を2mlずつ加えコロニー形成を促した。

培養開始1カ月後、コロニーを含む懸濁培養液を遠心分離し、上澄みを取り除き、沈澱物(コロニー)を、無機塩が1/2濃度のMS(ただし、200mg/ℓ NH₄NO₃、1%しょ糖、0.8%寒天、pH 5.8)と1mg/ℓ BA、2mg/ℓ NAAを含む培地に包埋し、カルス形成を促した。

この培地で直径2mm程度に生長したカルスを順次MS培地(1%しょ糖、0.8%寒天、pH 5.8)に1mg/ℓ ゼアチンを加えた培地に移植し、茎葉の分化を促した。分化した茎葉は、1本ずつに分割して植物ホルモンを含まないMS寒天培地(1%しょ糖、pH 5.8)に移植し、発根を促進した。根が充分生育した個体は、石英砂を入れたポットに移植し、順化を行った。

Table 1. Effect of phytohormones on protoplast division and colony formation

Initial culture medium (1)			Protoplast division (Cultured for 10 days)	Colony formation (Cultured for 20 days) (2)
BA	2,4-D	NAA		
mg/ℓ	mg/ℓ	mg/ℓ		
1	0.5		4-5 Cell division	+
1	2.5		4-5 Cell division	+
1	5.0		4-5 Cell division	+
1		0.5	4-5 Cell division	+
1		2.5	4-5 Cell division	+++
1		5.0	4-5 Cell division	+++

(1) Initial culture medium containing 1/2 MS salts (200mg/ℓ NH₄NO₃, 0.5 M mannitol, pH 5.8) and various concentration of phytohormones

(2) +: small colony, ++: medium colony, +++: large colony

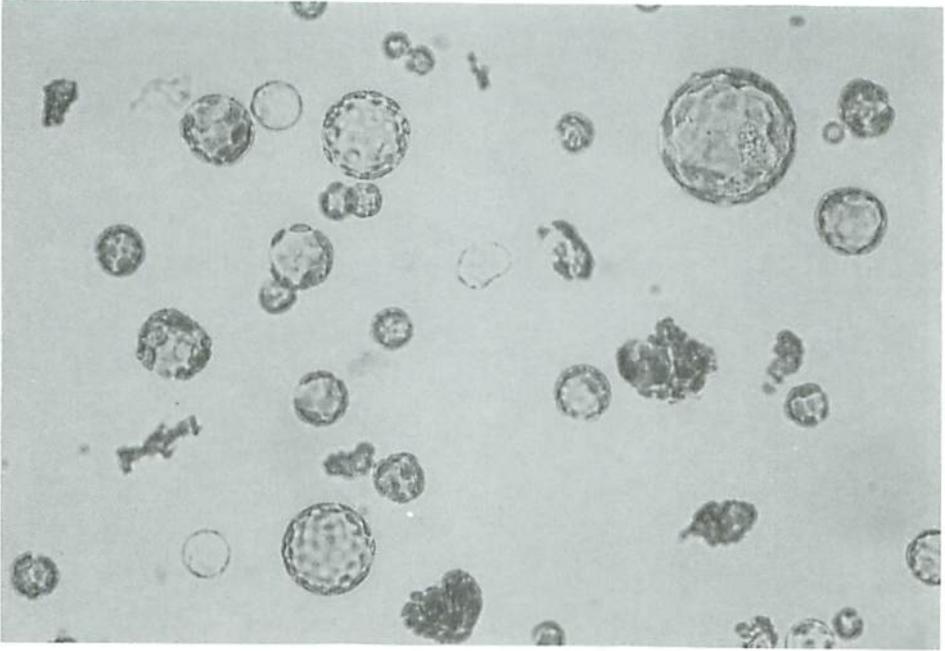


Photo. 1. Mesophyll protoplast of cauliflower. ($\times 400$)

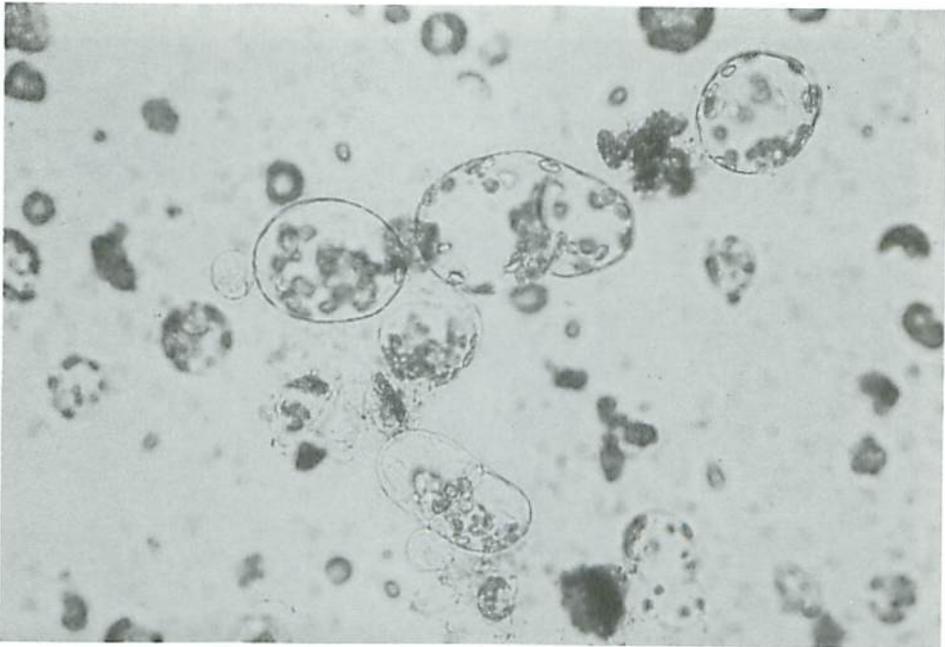


Photo. 2. Enlarged protoplast of cauliflower. ($\times 400$)

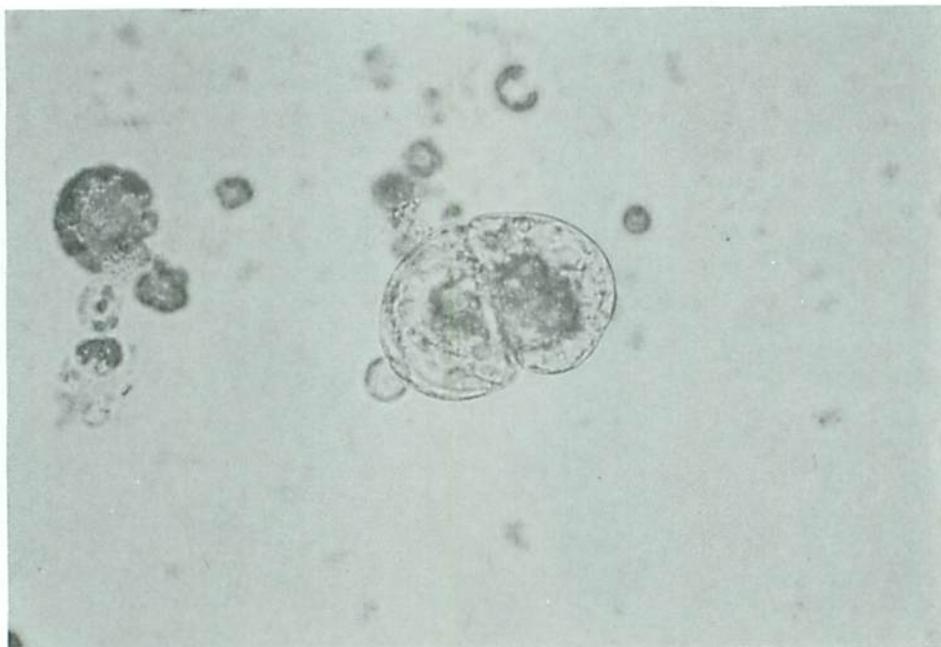


Photo. 3. First cell division. ($\times 400$)

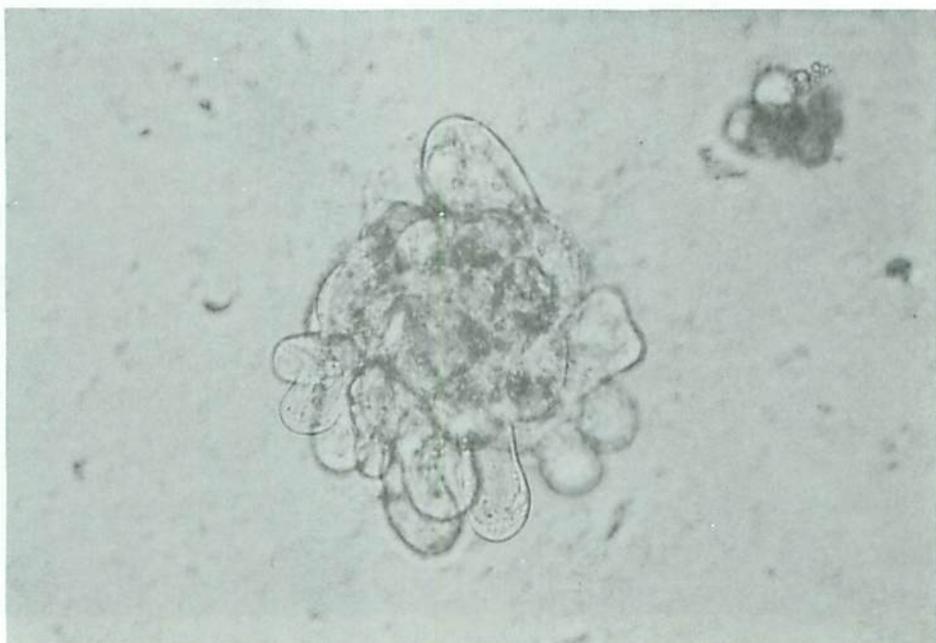


Photo. 4. Cell cluster. ($\times 200$)

結果及び考察

1. プロトプラストの分裂とコロニー形成

精製したプロトプラストを Tab. 1 に示す 6 種類の培地で培養したところ、いずれの培地においても培養開始 2 日後より肥大し始め、培養開始 10 日後には、4 - 5 分裂に至り、植物ホルモンの種類や濃度による影響は認められなかった。(Photo. 2, 3)。

しかし、コロニーの形成は 2.5 - 5.0mg / ℓ N A A で最もよく、0.5mg / ℓ N A A では数は少ない

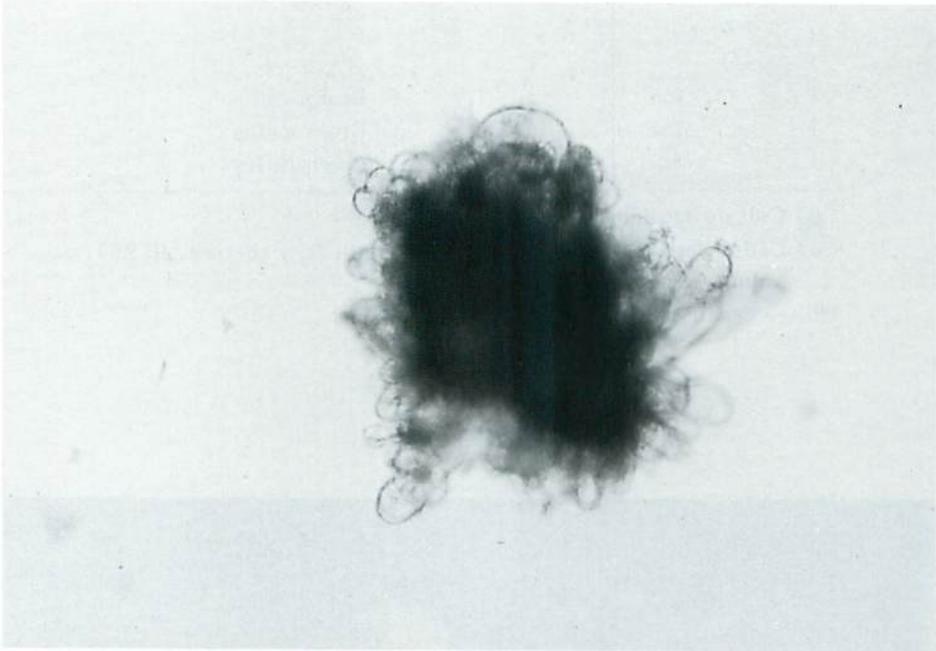


Photo. 5. Cell colony. (×100)

が大きなコロニーが形成された (Photo. 4, 5)。2, 4 - D の効果はいずれの濃度でもコロニー形成が認められるものの N A A よりははるかに劣っていた。

このことは同じ *B. oleracea* であるキャベツでは 2, 4 - D を添加した方がコロニー形成が良好であるという報告⁶⁾ と異なるため、同じ属でも種によってかなり最適培養条件に差があると考えられた。

2. カルス形成

各液体培地で形成されたプロトプラスト由来のコロニーをカルス形成培地に移植したところ、初期培地が 2.5 - 5.0mg / ℓ N A A で、移植 1 カ月後に緑色カルスが形成されたが、2, 4 - D を添加した初期培地ではいずれの濃度でもコロニーは形成せずカルスにはいたらなかった (Tab. 2)。

3. 植物体再生

カルス形成培地上で直径が 2 mm 程度に発達したカルスを 1 mg / ℓ ゼアチンを含む M S 寒天培地に

Table 2. Effect of phytohormones on callus formation

Initial culture medium (1)			Callus formation (2)
BA	2, 4-D	NAA	
mg/l	mg/l	mg/l	
1	0.5		— (3)
1	2.5		—
1	5.0		—
1		0.5	+ Brown callus
1		2.5	+ Green callus
1		5.0	+ Green callus

(1) Culture medium was same as Table 1.

(2) Callus formation medium was $\frac{1}{2}$ MS agar (1 % sucrose, pH 5.8) with 1 mg/l BA and 2 mg/l NAA.

(3) + : callus formation

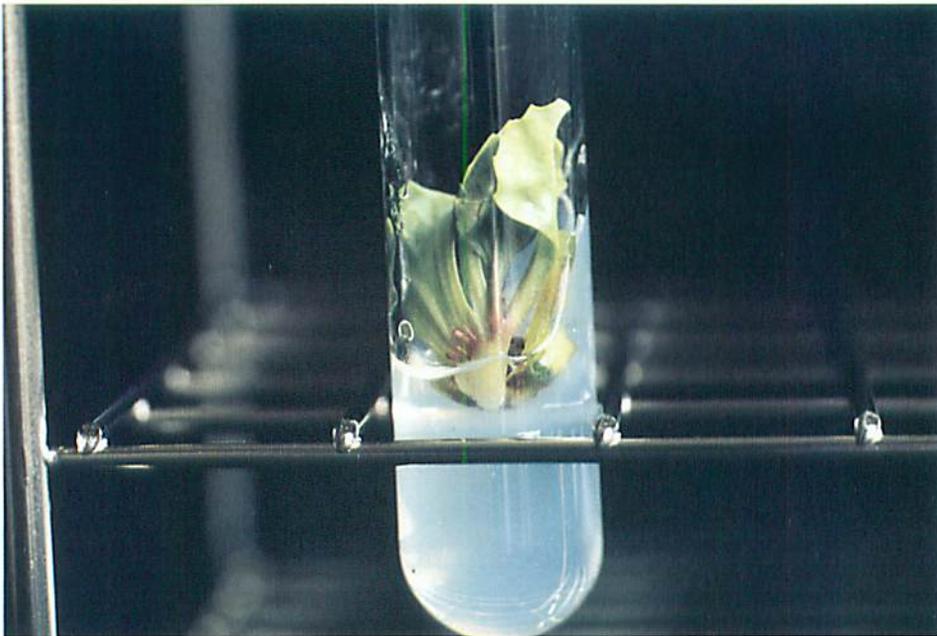


Photo. 6. Shoot regeneration from cauliflower protoplast callus.

Table 3. Effect of phytohormones on shoot and root regeneration

Initial culture medium (1)		Number of calluses transferred (2)	Number of shoots regenerated	Number of shoots transplanted	Number of roots regeneration (3)
BA	NAA				
mg/ℓ	mg/ℓ				
1	0.5	2	1	1	0
1	2.5	47	2	30	19
1	5.0	46	0		

(1) Culture medium was same as Table 1.

(2) Shoot regeneration medium was MS agar (1 %sucrose, pH5.8) with 1 mg/ℓ zeatin.

(3) Root regeneration medium was MS agar (1 %sucrose, pH5.8).



Photo. 7. Root regeneration from protoplast-derived shoot.

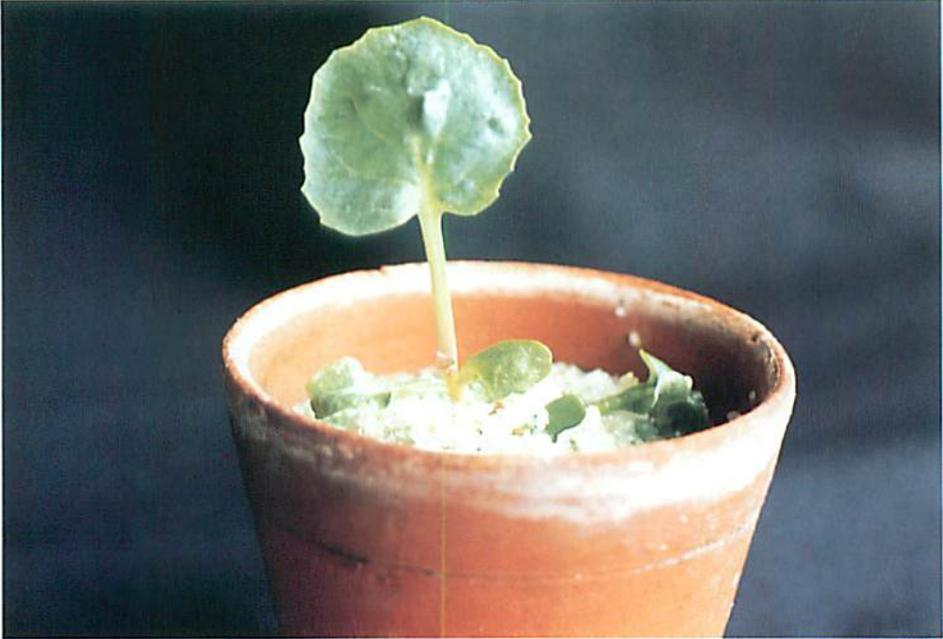


Photo. 8. Acclimatization of regenerated plant.



Photo. 9. Regenerated plants derived from mesophyll protoplast of cauliflower.

順次移植した。そのうち、初期培地が $2.5\text{mg}/\ell$ NAA で47個中2個のカルスに茎葉の分化が観察された (Photo. 6)。他のカルスは移植後ほとんど発達せず褐変した。

得られた茎葉を1本ずつにわけ、植物ホルモンを含まないMS寒天培地に移したところ、移植した30個体のうち19個体に根の分化がみられ、植物体に生育した (Tab. 3, Photo. 7)。そのうち14個体が順化に成功し (Photo. 8)、形質の変異を調査しているが、現在までのところプロトプラスト由来の植物体に形質の変異はみられない (Photo. 9)。

要 約

細胞融合法を用いて農産加工原料作物の育種を行うため、カリフラワーのプロトプラストを培養し、植物体の再生を試みた。

播種後約1カ月の無菌苗を材料とし、プロトプラストの単離には、0.1%ペクトリアーゼY-23、0.3%セルラーゼオノズカRS、0.5Mマンニトール、CPW塩添加でpH5.8に調整した酵素液を用い、3時間処理を行って、正常なプロトプラストを得ることができた。培養開始後2-3日でプロトプラストの分裂がみられた。

プロトプラストの分裂に初期培地中の植物ホルモンの種類や濃度はほとんど影響を及ぼさないが、その後のコロニー形成やカルス形成などに大きな影響を与えるため初期培地は無機塩が1/2濃度のMS (ただし、 $200\text{mg}/\ell$ NH_4NO_3 、1%しょ糖、0.5Mマンニトール添加、pH5.8) に $1\text{mg}/\ell$ BA、 $2.5\text{mg}/\ell$ NAAを加えたものが適していた。

培養開始1カ月後に、形成されたコロニーを無機塩が1/2濃度のMS (ただし、 $200\text{mg}/\ell$ NH_4NO_3 、 $1\text{mg}/\ell$ BA、 $2\text{mg}/\ell$ NAA、1%しょ糖、pH5.8) 寒天培地に包埋したところ良好なカルスが形成され、これをMS (1%しょ糖、 $1\text{mg}/\ell$ ゼアチン、pH5.8) 寒天培地に移植すると茎葉の分化が認められた。再分化した茎葉をMS寒天培地に移植し発根を促したところ、根が分化し正常な植物体を得ることができた。

文 献

- 1) 大沢勝次・高柳謙治：野菜試報，A，12，29．(1984)．
- 2) Yabe, K., T. Nishio and K. Takayanagi : *Japan J. Breed.*, **36**, 131 - 137. (1986) .
- 3) Murata, T., K. Hoshino and Y. Miyaji. : *Japan J. Breed.*, **37**, 291 - 298. (1987) .
- 4) Nishio, T., T. Sato, K. Mori and K. Takayanagi : *Japan J. Breed.*, **33**, 165 - 171 (1988) .
- 5) Nishio, T., T. Sato and K. Takayanagi : *Japan J. Breed.*, **37**, 389 - 396. (1987) .
- 6) 宮崎正則・奥 正和・美谷誠一・佐藤 宏・若狭 勝：本誌，17，19 - 30. (1987) .
- 7) Murashige, T. and F. Skoog : *Physiol. Plant.*, **15**, 473 - 497. (1962) .
- 8) Freason, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking : *Dev. Biol.*, **33**, 130 - 137. (1973) .