

## タバコとデュラムコムギプロトプラストの融合体からのカルス形成

今村 順\*

細胞融合や DNA による形質転換を使い、植物細胞に新しい遺伝的変異を導入する方法が、植物育種の立場から近年注目をあつめている。これらの新しい植物育種の方法の多くは、プロトプラストを実験材料として使っており、そのプロトプラストを培養すると、植物体に再生するという前提によって成り立っている。

プロトプラストから植物体が再生したという例は14属39種におよぶという<sup>1)</sup>。しかし、もっとも重要な植物である穀類のプロトプラストから植物体再生の成功例は3属4種からの報告があるのみである。多くの場合、プロトプラストから分裂を誘導することさえ困難な場合が多い。

コムギ属の植物は、もっとも重要な穀類の一つであり、多くの研究者がプロトプラストからの植物体再生を試みているが成功例はない。穀類のプロトプラストからの植物体再生にもっとも熱心な研究者の一人である Potrykus (スイス・バーゼル FMI) によると、小麦属の30を越える種・品種の異なる組織(花粉の四分子期を含む)から単離したプロトプラストを200を越える培地の組み合わせで培養した結果、プロトプラストが分裂をし、50細胞くらいまで達した例がもっとも成功した例であった(I. Potrykus, 私信)。

一方、双子葉植物ナス科のタバコは、プロトプラストから高頻度で容易に分裂を誘導できることで知られている。そこでタバコの持っている高い分裂能を細胞融合法を用いて小麦に移すことができないか、という発想に基づいて次の実験を行った。

プロトプラストの単離:デュラムコムギ (*Triticum durum*) の芽ばえ7日目の葉を用いた。滅菌後、葉をできるだけほそく、ななめに切り、酵素液 (2% Cellulase R-

10, 2% Pectinol) で 30°C, 3時間処理を行い、プロトプラストを単離した。さらに、0.6M サッカロース溶液を用い精製を行った。タバコは硝酸還元酵素欠損株である nia 115 の懸濁培養細胞を用いた。継代培養4日目の細胞を用い、酵素処理 (2% Cellulase R-10, 1% Maccerozyme, 0.5%, Driselase) は室温で3時間、振盪して行った。単離したプロトプラストは、0.6M サッカロース溶液にて精製を行った (詳しい方法は文献2))。

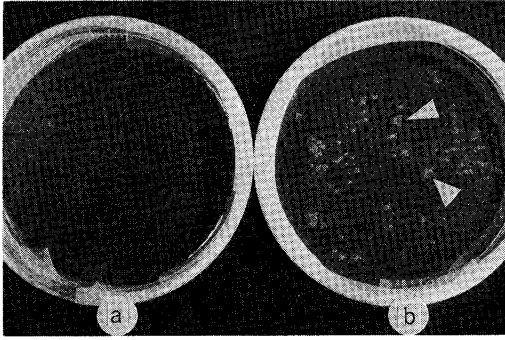
細胞融合:デュラムコムギとタバコのプロトプラストの融合処理時の数の比は、1:1から1:10の間で行った。細胞数は  $2 \sim 4 \times 10^5$  cells/ml となるよう調整した。PEG 6000を  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  14.7 g/l, Sorbitol 26.1 g/l MES 5g/l, pH 7.0 に溶かし 40% PEG 液を作り、最終濃度が10~13%になるようプロトプラスト懸濁液に加え、融合処理を行った。20分間の PEG 処理後、5分間隔で洗液 ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  23.5 g/l, MES 5 g/l, pH 5.6) を3回静かに加えた。洗液による PEG の希釈後、プロトプラストを AA-P medium<sup>3)</sup> で培養した。融合処理の対照区として、①デュラムコムギ、タバコのプロトプラストを単独で、あるいは両者のプロトプラストを混合して (PEG 処理なしで) 培養した②デュラムコムギ、あるいはタバコのプロトプラスト同志の融合を行った。

培養開始後10日目に各シャーレ (10 cm Corning Petri dish) に 5 ml の  $\text{KNO}_3$  を唯一の窒素源とする選択培地<sup>3)</sup> を加えさらに培養を続け、培養開始後3週間目に培養物を選択培地<sup>3)</sup> に plating した。

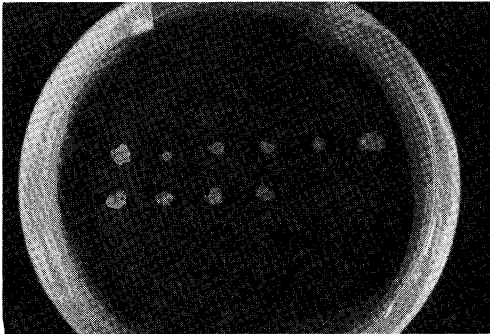
結果および考察:葉肉プロトプラスト (デュラムコムギ) と懸濁培養細胞からのプロトプラスト (タバコ) の融合体は、はっきりとした原形質流動と葉緑体をあわせ持つことで、顕微鏡下で容易に見分けることができる。融合体を連続して観察したところ、培養開始後8日目に融合体の分裂を観察することができた (タバコのプロトプラストは3日目から4日目で第1分裂を行う)。融合処理をした細胞を前述した選択培地に移してから3週間後、コロニーが形成された (第1図b)。しかし、対照区 (タバコとデュラムコムギの混合培養) で、コロニーの形成は観

\* Jun IMAMURA: Callus Formation from Tobacco (nia 115) + *Triticum durum* Fusion Hybrids  
Friedrich Miescher-Institut (Postfach 2543 CH-4002, Basel, Switzerland)

現在: 植物工学研究所 (〒227 横浜市緑区鴨志田町1000)  
Present address: Plantech Research Institute (1000 Kamoshida-cho, Midori-ku, Yokohama, Japan)



第1図 a. タバコ (nia 115) とデュラムコムギ (*T. durum*) のプロトプラストを混合して培養 (PEG 処理なし) 培養開始 52 日目。b. 上記の組み合わせのプロトプラストに PEG 処理をしたもの。いくつかのコロニー (矢印) が形成されている。



第2図 選択培地上で形成されたカルス。選択培地に移植して3ヵ月後の写真。

察されなかった (第1図 a)。他の対照区でもコロニーは形成されなかった。選択培地上に形成されたコロニーの増殖速度は、ゆっくりとしていた。さらに2ヵ月培養を続け、形成された小型のカルスを新しい選択培地に移した。形成されたカルス数は10個であった (第2図)。nia 115では revertant は観察されておらず (C.Harms, 私信), 対照区で1つもコロニーが形成されないことと考えると、選択培地上に形成されたコロニーは revertant である可能性は低いと考えられる。その後これらのカルスは増殖速度が低下し、培養開始後約5ヵ月で増殖が止まってしまった。増殖の止まったカルスの一部を数種のアミノ酸を含む AA 培地<sup>4)</sup>で培養したとこ

ろ、カルスは再度増殖を開始した。増殖したカルスを継代培養したところ、カルスの形態はもとの nia 115 に似て friable なカルスを形成した。これらのカルスの硝酸還元酵素活性を測定したが、活性は認められなかった。また、これらのカルスから DNA を抽出してデュラムコムギに特異的な DNA を probe として DNA-DNA hybridization を行ったが、デュラムコムギの DNA は発見できなかった。これらの事実から次のように推察することができる。

融合体が小型カルスに成育する段階では、デュラムコムギの硝酸還元酵素が融合細胞で働き  $\text{NO}_3^-$  を窒素源として利用することができた。しかし、培養がすすむにつれ、デュラムコムギの融合体からの染色体の削減がすすみ、最終的には硝酸還元酵素をコードする染色体を含む、ほとんどすべてのデュラムコムギの染色体が融合体細胞から削減されてしまった。

同様な実験がトウモロコシとタバコ (nia 115) を使って H.Lörz によって行われた。融合処理後、融合体の細胞分裂が観察され、選択培地で小型カルスが形成された。しかし、そのカルスの成育はそれ以上続かず枯死した (H.Lörz, 私信)。

ここにあげた実験の場合、融合体の分裂を維持することはできなかった。もし、融合体をカルスとして継代培養することができる場合、そのカルスからプロトプラストを単離し、再度デュラムコムギのプロトプラストと融合することで、融合体におけるデュラムコムギの割合を増すことができると考えている。数度このような「もどし交配的」細胞融合をくり返し、最終的には、ほとんどがデュラムコムギの核でおおかつ分裂能をもつ融合体の形成が可能となろう。

(1984年7月21日受理)

## 文 献

- 1) Ahuia, M.R. 1982. *Silvae Genetica*, **31** : 2, 3, 66-77.
- 2) Potrykus, I., J. Jia, G.B. Lazar, M. Saul, 1984. *Plant Cell Rep.*, **3** : 68-71.
- 3) Glimelius, K., T. Eriksson, R. Grafe, A. Müller, 1978. *Physiol. Plant.* **44** : 273-277.
- 4) Müller, A., R. Grafe, 1978. *Mol. gen. Genet.*, **161** : 67-76.