

レタス葉肉プロトプラストからの植物体再生

鈴木裕志*・榎本末男**・大山勝夫**

* 十勝農業協同組合連合会農産化学研究所
(〒 080-24 北海道帯広市西24条北1)** 農林水産省農業生物資源研究所細胞育種部
(〒 305 茨城県筑波郡谷田部町観音台2-1-2)

(1986年3月27日受付)

(1986年5月13日受理)

近年, 多くの高等植物から活性のあるプロトプラストが単離され, その培養が試みられている. 現在までのところプロトプラストから植物体が再生した事例は数十種におよぶが, 経済的に重要な作物ではいまだ安定したプロトプラスト再生系が得られていない.

今後, 遺伝子組換えによる形質転換や細胞融合による育種素材の作出にあたり, プロトプラスト再生系は極めて重要と考えられる.

レタスについては, Engler ら (1982)¹⁾ および Berry ら (1982)²⁾ によって, それぞれプロトプラストからの植物体再生について報告がある. そこで, 著者らはわが国で現在広く栽培されているレタス (品種カイザー) を用い, 試験管内で育成した芽生えの子葉からプロトプラストの単離と培養を試み, 培地中の硝酸アンモニウム濃度や数回にわたる新鮮培地の追加などを検討することにより, 植物体を再生することが可能であったので報告する.

レタス (品種カイザー) の種子を70%エタノールに数秒浸漬し, 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素0.1%) に10分間浸漬して滅菌処理を行った. 滅菌水で3回水洗したのち, これらの種子を MS 寒天培地に播種し, 3,000lux, 16時間照明下で芽生えを育成した.

プロトプラストの単離には, 播種後3~4日目の芽生えから子葉約60枚を用いた. これらの子葉をメスで1~2mm幅に細断し, 0.5Mのマンニトール液に0.5%のセルラーゼオノズカ RS, 0.02%のペクトリアーゼ Y23 を加え, pHを5.8に調整した酵素液に浸し, 25°C, 暗所, 静置状態のもとで16~18時間処理した. 処理後, 酵素液をミラクロスで濾過し, 100×g 2分間の遠心分離により生じた沈澱を, 0.5Mのマンニトール液で3回洗浄し

プロトプラストを得た. このような条件のもとでプロトプラストの収量は子葉 100mg 生重当り 7×10^5 個前後であった. 得られたプロトプラストは MS 培地に懸濁し直径 6 cm のプラスチックシャーレに 2.5ml の培養液を入れパラフィルムで密封後, 25°C, 暗黒下で培養した.

その結果, 培養開始後2~3日目には細胞壁の再生が蛍光染色により確認され, この時期には細胞分裂を始め, 培養後10日目には10細胞程度の集団にまで成長したが, その後培地の褐変化が進み同時に小コロニーも褐変して発育を停止した.

そこで培地条件等について検討を進めた. まずプロトプラスト培養初期の段階でプロトプラストが相互に凝集し, その後の発育に好ましくない影響を与えることが考えられたため, 培地にアガロース (SIGMA type II) の添加を試みたところ, 0.1%の濃度で凝集防止に効果が認められた. また, 細胞分裂ならびにコロニー形成に対するプロトプラストの適正密度は, 1ml 当り 2×10^4 個であった. (Table 1).

つぎに培地組成のなかで硝酸アンモニウム濃度につい

Table 1. Effect of protoplast density on cell division and colony formation.

Protoplast density (cells/ml)	Cell division ^a	Colony formation ^a
4×10^4	+++	+++
3×10^4	+++	++
2×10^4	+++	+++
1×10^4	+	+

^a Visual estimation; +=poor; ++=good; +++=very good.

Table 2. Effect of NH_4NO_3 on cell division and colony formation from lettuce protoplasts.

NH_4NO_3 (mg/l)	Cell division ^a	Colony formation ^a
1,640	++	+
200	+++	++
80	+++	+++
0	++	++

^a The same as in Table 1.

Table 4. Effect of NAA and BA on shoot and root formation from protoplast-derived calli.

Exp. No.	No. of calli	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Shoot	Root
1	16	0.05	0.5	1	—
2	16	0.5	0.5	2	1
3	16	0.5	1.0	8	1
4	16	—	0.1	—	—
5	16	—	—	—	2

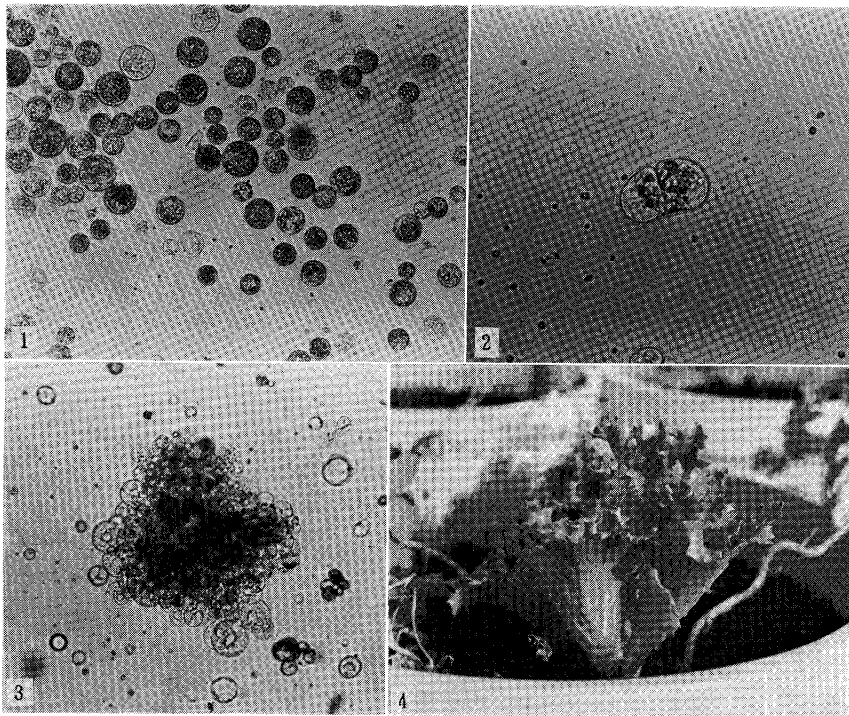
Table 3. Effect of time of addition and mannitol concentration in fresh medium on colony formation.

Exp. No.	Medium A	Medium B	Medium C	Colony formation ^b
1	7 days ^a	12 days	17 days	+++
2	7 days	14 days	21 days	+
3	7, 12 days	17, 22 days	27, 32 days	+
4	7, 12, 17 days	—	—	+

The media containing modified MS salts, 1% sucrose, NAA, BA and 6% (Med. A), 3% (Med. B) or 0% (Med. C) mannitol.

^a After the start of protoplasts culture.

^b The same as in Table 1.

**Fig. 1.** Freshly isolated protoplasts.**Fig. 2.** First division of a protoplast.**Fig. 3.** Protoplast-derived colony.**Fig. 4.** Whole plant obtained from a protoplast.

て検討したところ、MS 標準濃度よりも下げ、培地 1 l 当り 80~200 mg とすることによりコロニー形成が認められた (Table 2).

しかし、このような条件下でもコロニー形成のあと褐変が進みカルス塊の形成にまではいたらなかった。この原因として、細胞分裂が進行しコロニー形成の過程で細胞の増殖を阻害する物質が培地中に浸出し、それが悪影響をもたらしていると考えられた。そこで培養期間中に新鮮培地を追加する方法を試みた。培養液の追加は、マンニトールの濃度を順次下げながら3回に分けて行った。その結果、追加の間隔としては培養後7日目、12日目および17日目に行った場合での効果が大きかった (Table 3)。このように順次新鮮培地を追加すると、コロニーは2回目の追加以降急速に肥大し、培養3週間後には0.3~1.0 mm 大のコロニーに発達した。

そこでコロニーからカルスの誘導条件を検討したところ、液体培地から硝酸アンモニウム濃度を下げた修正MS培地に0.1 mg/l の NAA、0.5 mg/l の BA、炭素源としてショ糖を1%、寒天を0.7%およびマンニトールを3%加えた培地にコロニーを移植することでカルス形

成が認められた。

このようにして得られたカルスを、NAA と BA を組み合わせた修正 MS 培地に移したところ、0.5 mg/l の NAA、1.0 mg/l の BA を加えた培地で、置床したカルスの半数から不定芽が誘導された (Table 3, 4)。

また、これらの不定芽は NAA および BA をそれぞれ 0.1 mg/l 含む MS 培地上で茎葉を伸長させたのち、MS 組成を10分の1にしたホルモンフリーの発根培地に移植することにより、完全な植物体を得ることが可能であった。この植物体を馴化後鉢上げしたところ、正常に開花し種子を得ることができた。なお、プロトプラストから植物体を得られるまでの所要日数をみると、コロニー形成まで14~17日、カルス形成までは30日前後、さらに植物体までは90日程度を要した (Fig. 1~4)。

文 献

- 1) Engler, D.E., R.G. Grogan, 1982. *Plant Sci. Lett.*, 28 : 223-229.
- 2) Berry, S.F., D.Y. Lu, D. Pental, C. Cocking, 1982. *Z. Pflanzen Physiol.*, 108 : 31-38.

Summary

Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of *Lactuca sativa* L.

Hiroshi SUZUKI,* Suco ENOMOTO** and Katsuo OHYAMA**

* *Agricultural Research Institute, Tokachi Federation of Agricultural Cooperatives, Obihiro, Hokkaido, Japan 080-24*

** *Department of Cell Biology, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki, Japan 305*

Leaf mesophyll protoplasts of *Lactuca sativa* were enzymatically isolated and cultured in a modified MS medium. After two or three days, cell division started. The sequential addition of fresh medium during the culture period was essential for sustained cell division and colony formation. Shoot buds were developed from protoplast-derived calli on a regeneration medium containing 0.5 mg/l NAA and 1.0 mg/l BA and intact plants were developed from these buds.