

*Brassica campestris* のプロトプラスト培養: 植物材料の前処理効果

寺田 理 枝\*

植物の細胞育種を進めるためには、プロトプラストからの高頻度の植物体再生が必須である。これまでブラシカ属では *B. napus* のナタネ、*B. oleracea* のキャベツ・ブロッコリーで再生率の高い培養系が確立されている。しかし *B. campestris* では turnip のプロトプラスト培養で不定根を再生し<sup>1-4)</sup>、ハクサイでも同様に不定根を再生した<sup>5)</sup>にすぎない。その後、Glimelius が *B. campestris* var. *oleifera* (アブラナ) から幼植物を得た<sup>6)</sup>が、頻度は *B. oleracea*, *B. napus* に比べ、非常に低い。

再生植物体を得るためには、葉、葉柄、子葉、胚軸、根、等の組織からプロトプラストを単離し、コロニー、カルスを経て、葉原基または不定胚を誘導するための最適培養条件(特にホルモン条件)を探ることが常法である。近年、Shahin はトマトの多品種で、材料となる植物体の葉を、プロトプラスト単離前に、特定条件で処理(以後、前処理と呼ぶ)することにより、高頻度で植物体を再生することに成功した<sup>7)</sup>。そこで再生の難しい *B. campestris* に、この前処理の手法を適用することによって、プロトプラストからの植物体再生の頻度を上げることができないかと考えた。その結果、プロトプラストの分裂率を上げることができたので、報告する。また、その後の培養で若干の再生個体を得たので、その培養法と再生率向上の可能性について述べる。

材料・実験方法: 用いた植物は、*B. campestris* var. *rapa* cv. 東京コマツナ、オソメコマツナ、耐病ひかりカブである。材料となる植物を、①温室(12, 1, 2月)、②グロースチェンバー(16時間 10,000 lux 22°C, 8時間暗条件, 18°C)、③インキュベーター(明暗時間グロースチェンバーに同じ, 4,000 lux, 23°C)の3条件で育成した。成長した植物を2~3日間暗所においた後、葉または葉柄を滅菌して1~2mm幅に刻み、これを前処理液(NN 67培地<sup>8)</sup>に0.3~0.5M サッカロース, 0.5 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l BAPを含む)中に、暗所, 10°C, 16時間おいた後、酵素処理

(0.5% Cellulase Onozuka R-10, 0.05% Macerozyme R-10, 0.005% Pectolyase Y-23, 前処理液と同じ培地, 糖, ホルモンを含む)し、800回転, 8分遠心することにより、上層分画と沈澱分画に集まるプロトプラストを別々に回収した。培養は NN 67 培地に前処理液と同様の糖, ホルモンを加え、1 ml 当り  $10^5$  個の細胞密度で、アガロース、ビーズ法により行った。

結果・考察: (1)植物育成条件と前処理の効果—まず最初に温室育成植物の葉柄を材料とし、サッカロースまたはマニトールで浸透圧を0.3~0.5Mに調整した前処理液を用いてプロトプラスト単離を行ったが、どの条件でも前処理によってプロトプラストの分裂を引き起こす様な効果はみられなかった。特に0.3M浸透圧ではプロトプラストの破壊が著しい。次にプロトプラストが破損しない最低浸透圧の0.35M前処理液・培養液を用い、グロースチェンバー、インキュベーター育成植物を調べた。その結果、葉、葉柄ともに無処理区に比べ、前処理区では顕著な分裂率の向上が見られた(第1表)。(2)プロトプラストの収量・分裂率に対する前処理の効果—上記結果より前処理効果があると考えられるグロースチェンバー育成植物の葉を材料とし、前処理区、無処理区のプロトプラストを上層分画と沈澱分画に分け、それぞれの分裂率を調べた(第2表)。無処理区ではほとんど分裂が見られなかったが前処理区では10%の分裂が観察された。さらに両区で上層分画の分裂率は沈澱分画に比べ、全般に高かった。無処理区で、沈澱分画のプロトプラストが分裂しない場合でも、上層分画では分裂が見られた。上層分画に回収されるプロトプラストの収量は、前処理を行うことによって特に増加した。

以上のことから、ある程度良好な育成状態の植物では、前処理をすることにより、葉肉細胞に何らかの変化が生じるものと考えられる。その結果、プロトプラスト単離の際、酵素処理や遠心分離によるダメージの少ない細胞が上層分画に回収され、高い分裂率を示す。また、このプロトプラストはPEG・DMSOによる細胞融合の材料として最適で、薬剤による細胞破損が少なく、キャベツ胚軸プロトプラストとの融合で10%の高い融合率を得ている<sup>9)</sup>。(3)培養・再分化—Shahinの方法に従い培

\* Rie Terada: Protoplast Culture of *Brassica campestris*: Effects of Pretreatment of Plant Materials. 植物工学研究所(〒227 横浜市緑区鳴志田町1000) Plantech Research Institute (1000 Kamoshida, Midori-ku, Yokohama, 227).

第1表 グロースチェンバー・インキュベーター育成植物に対する前処理の効果

育成条件	葉齡 (日)	組織	分裂頻度 (5~7日目)	
			無処理	前処理
グロース チェンバー <sup>a</sup>	34	葉柄	-	+++
	37	葉柄	+	++
	30	葉肉	-	-
インキュ ベーター <sup>b</sup>	31	葉肉	-	+
	36	葉肉	-	+++
	44	葉肉	-	+

- : 分裂なし, + : 1~2%分裂, ++ : 5%分裂, +++ : 10%分裂

<sup>a</sup> 16 hr Light (10,000 lux) 22°C/8 hr Dark 18°C

<sup>b</sup> 16 hr Light (4,000 lux) 23°C/8 hr Dark 23°C

品種 : 東京コマツナ

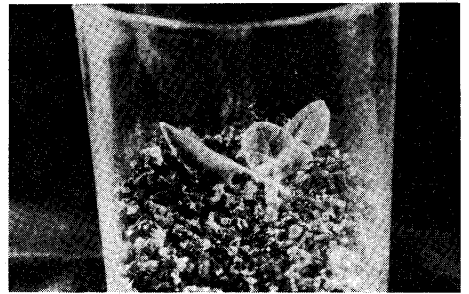
第2表 プロトプラストの収量・分裂率に対する前処理の効果

葉齡 (日)	プロトプラスト収量 ( $\times 10^5/g$ f.w.)				分裂率(%) 4日目			
	無処理		前処理		無処理		前処理	
	上層	沈澱	上層	沈澱	上層	沈澱	上層	沈澱
31	19	8	33	4	<1	0	13	<1
36	3	11	12	7	<1	0	15	18
44 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	50 <sup>b</sup>	<1

<sup>a</sup> - : 測定なし, <sup>b</sup> 6日目測定

品種 : 東京コマツナ. 組織はすべて葉肉を用いた.

養室内で無菌的に育成した播種後 20~30 日の植物の第 1・2 葉を前処理したところ, 10~30% の分裂率を示すプロトプラストが得られたので, 再生植物体を得る目的で, その培養を行った. 培養は Glimelius<sup>6)</sup>, Barsby<sup>12)</sup> の方法をもとに 3 ステップで行った. ステップ 1 はプロトプラストの分裂開始を目的とし, KM 8 p<sup>10)</sup> 培地に 0.4 M グルコースを含む液体培養で 1 mg/l 2, 4-D, NAA, BAP をそれぞれ, ① 0.1 mg/l, 0.05 mg/l, ② 0.1 mg/l, 0.1 mg/l, ③ 0.5 mg/l, 0.05 mg/l, ④ 0.5 mg/l, 0.1 mg/l の 4 条件で行った. ステップ 2 はミニコロニーの増殖を目的とし, MS 無機塩<sup>11)</sup> に NN ビタミン<sup>8)</sup>, 0.15 M サッカロースを加え, 0.05% のゲルライトを用いたソフトアガー培地 (0.05 mg/l 2, 4-D, 0.5 mg/l BAP, 1.0 mg/l ゼアチンを含む) で, 培養した. ステップ 3 はカルスからの不定芽形成を目的とし, ステップ 2 と同様の基本培地に 0.3% サッカロース, 1% アガロース (シグマ, タイプ I), 0.1 mg/l IAA, 2 mg/l の BAP とカイネチンを加えた.



第1図 東京コマツナプロトプラストから再生した幼植物

前処理後, 単離したプロトプラストは培養後 2~3 日で分裂を始め, 4 週間後にミニコロニーとなり, ステップ 2 に移した後 2 週間でカルスとなった. ステップ 3 において 6~8 週間後にステップ 1 条件④で分裂を誘導したカルスの中から葉原基を形成するものが現れた (第 1 図). 再生率は  $2.5 \times 10^5$  個プロトプラストから 2 個体と極めて低かった. しかし上記培養法では, 培養初期のホルモン条件が次のステップのコロニー, カルス状態を変化させる傾向があり, 各ステップのホルモン条件を検討することにより, 再生率をさらに向上させることができると考えられる.

(1986 年 10 月 29 日受理)

## 文 献

- 1) Schenk, H. R., F. Hoffmann, 1979. Z. Pflanzenzüchtg., **82**: 354-360.
- 2) Ulrich, T. H., J. B. Chowdhury, J. M. Widholm, 1980. Plant Sci. Lett., **19**: 347-354.
- 3) Xu, Z. H., M. R. Davey, E. C. Cocking, 1982. Plant Sci. Lett., **24**: 117-121.
- 4) Lu, D. Y., D. Pental, E. C. Cocking, 1982. Z. Pflanzenphysiol. Bd., **107**: 59-63.
- 5) Guo, B. J., O. Schieder, 1983. Z. Pflanzenphysiol. Bd., **110**, S: 375-377.
- 6) Glimelius, K., 1984. Physiol. Plant., **61**: 38-44.
- 7) Shahin, E. A., 1985. Theor. Appl. Genet., **69**: 235-240.
- 8) Nitch, C., J. P. Nitch, 1967. Planta, **72**: 355-370.
- 9) Terada, R., Y. Yamashita, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. Theor. Appl. Genet., **73**: 379-384.
- 10) Kao, K. N., M. K. Michayluk, 1975. Planta, **126**: 105-110.
- 11) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 12) Barsby, T. L., S. A. Yarrow, J. F. Shepard, 1986. Plant Cell Rep., **5**: 101-103.