

## セリ科植物のプロトプラストの低密度培養における 条件培地および保護培養の効果

大原有美子・田代洋丞・水谷高幸\*・宮寄貞巳

佐賀大学農学部

(〒840 佐賀市本庄町一番地)

\* 現在 九州東海大学農学部

(〒869-14 熊本県阿蘇郡長陽村河陽)

(1994年7月29日受付)

(1994年11月5日受理)

ニンジン懸濁培養の継代3日後および7日後に細胞を除いた培養液より調整したプロトプラスト用条件培地を用い、 $10 \sim 10^5$  個/mlの培養密度でニンジンおよびセルリーのプロトプラストを培養し、分裂率を調査した。この条件培地は低密度区で両植物のプロトプラストの分裂率を顕著に高めた。ニンジンのプロトプラスト培養では、継代3日後の条件培地がより高い効果を示した。次に、ニンジンおよびセルリーのプロトプラスト(培養密度10個/ml)と保護細胞(ニンジンの懸濁培養細胞又はプロトプラスト)を円筒濾紙で隔離し、静置および振盪培養を行い、分裂率を調査した。保護細胞がある場合のみ両植物のプロトプラストの分裂がみられ、保護細胞としては懸濁培養細胞が、また、静置より振盪培養が分裂率を高める傾向にあった。以上の結果より、ニンジンの懸濁培養を利用した条件培地および保護培養はセリ科植物のプロトプラストの低密度培養に有効であることが明らかとなった。

### 1. 緒言

細胞融合により体細胞雑種を作出する場合、雑種細胞の選抜が必要である。そこで、融合処理後、融合細胞のみをマイクロペットで取り出し、培養することができれば、確実な選抜が可能となる。また、マイクロインジェクションやレーザービームによる細胞操作を行う場合、大量の細胞を扱うのは困難であることから、少数の細胞を低密度で効率よく分裂、増殖させる培養方法を確立する必要がある。

*Beta* 属、*Brassica* 属および *Diplotaxis* 属のプロトプラストの低密度培養に条件培地あるいは保護培養を応用し、プレーティング効率を向上させる効果があったことが報告されている<sup>1-3)</sup>。しかし、いずれの報告でもプロトプラストは $10^3$  個/ml以上の培養密度で培養されているので、上記のような雑種細胞のみの培養や細胞操作の場合には、さらに低密度培養が可能な方法を検討する必要がある。

本研究では、 $10^3$  個/ml以下の低密度のプロトプラストを高頻度に細胞分裂させる培養方法を確立するために、プロトプラストの培養が容易であるニンジン(*Daucus carota* L.)<sup>4-6)</sup> およびこれと近縁であるセルリー(*Apium graveolens* L.)のプロトプラストを用いて、ニンジンの懸濁培養物を利用した条件培地および保護培養の効果を検討した。

### 2. 材料および方法

#### 実験1. 条件培地の効果

ニンジン‘黒田五寸’の無菌播種した実生の胚軸を、ショ糖濃度を20 g/lに修正したMS培地<sup>7)</sup>に2,4-D(1 mg/l)を添加し、pH 5.8に調整した液体培地で培養し、得られた懸濁培養細胞を同培地で1週間毎に継代培養を行った。この懸濁培養細胞から単離したプロトプラストおよび無菌発芽させたセルリー‘トップセラー’の実生の本葉から単離したプロトプラストを材料として用いた。ニンジンは酵素液(1.0% セルラーゼ・オノズカRS、

0.2% ペクトリアーゼ Y-23, 0.6 M ソルビトール, pH 5.8) で 19 時間, セルリーは酵素液(1.0% セルラーゼ・オノヅカ RS, 0.25% マセロザイム R-10, 0.5% 硫酸カリウム, 5 mM モルホリノエタンスルホン酸, 0.6 M ソルビトール, pH 6.0) で 17 時間, 25°C, 静置処理を行った後, 148  $\mu\text{m}$  および 82  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過し, 0.6 M ソルビトールで 2 回洗浄してプロトプラストを単離した. これらのプロトプラストを密度が 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> および 10<sup>5</sup> 個/ml になるように培地で調整した. 培地としてニンジンの懸濁培養における継代 3 日後と 7 日後の条件培地および対照区として, ショ糖濃度を 20 g/l に修正した MS 培地に 2, 4-D(1 mg/l), カイネチン(1 mg/l) およびソルビトール(0.6 M) を添加し, pH を 5.8 に調整後, オートクレーブで滅菌を行った培地(MS-DKS 培地)の 3 種類を用いた. なお, 条件培地は, 懸濁培養液を 10  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過して細胞を除去後, カイネチン(1 mg/l) およびソルビトール(0.6 M) を加え, pH を 5.8 に調整し, 濾過滅菌を行った後使用した. 密度調整後のプロトプラストをマルチウエルプレート(24 ウエル)にウエル( $\phi$ 1.5 cm)あたり 250  $\mu\text{l}$  ずつ分注し, 25°C, 暗黒下で静置培養を行い, 1 週間毎にソルビトールを含まない同培地を 50  $\mu\text{l}$  ずつ加えた. それぞれの処理区に対して **Table 1** および **2** に示した反復をもうけ, 培養 30 日後に分裂率を調査した.

### 実験 2. 保護培養の効果

保護されるニンジンおよびセルリーのプロトプラストは, 実験 1 と同様の方法で単離し, MS-DKS 培地で密度を 10 個/ml に調整した. 保護細胞としてニンジンの懸濁培養細胞およびプロトプラストを用いた. すなわち, 実験 1 と同じニンジンの懸濁培養細胞を MS-DKS 培地に移植し, 1 週間毎に継代培養を行い, 継代 3 日後の培養細胞を保護細胞として使用した. また, 保護されるブ

ロトプラストと同時に単離したニンジンプロトプラストを MS-DKS 培地で密度を 10<sup>5</sup> 個/ml に調整して保護細胞として使用した. 保護される細胞と保護細胞を隔離するために, 円筒濾紙(ADVANTEC No. 84 2×9 cm)を切断して得た直径 2 cm, 高さ 1 cm の円筒を用い, ショ糖濃度を 20 g/l に修正した MS 培地に 0.3% ゲルライトを添加した固形培地で直径 6 cm のシャーレの中央に固定した. 円筒濾紙の内側に保護される細胞の懸濁液を 0.5 ml, 外側に保護細胞の懸濁液および対照区として MS-DKS 培地のみを 2.5 ml 入れ, 25°C, 暗黒下で静置培養および振盪培養(45 rpm)を行った. 1 処理区に 5 反復をもうけ, 培養 2 週間後に分裂率を調査した.

## 3. 結果

### 実験 1. 条件培地の効果

ニンジンの 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> および 10<sup>5</sup> 個/ml 区のプロトプラストの分裂率は対照区と条件培地間に大きな差はみられなかったが, 10 および 10<sup>2</sup> 個/ml 区では条件培地の分裂率が高かった(**Table 1**). また, 条件培地区間では, 10, 10<sup>2</sup> および 10<sup>3</sup> 個/ml 区で継代 3 日後の条件培地の方がより分裂率が高かった. なお, 10 細胞以上に分裂した細胞は, いずれの培養密度でも対照区より条件培地区で多く観察され, 条件培地区間では 10, 10<sup>2</sup> および 10<sup>3</sup> 個/ml 区で継代 3 日後の条件培地の方で多く観察された.

セルリーのプロトプラストでは, 10<sup>4</sup> および 10<sup>5</sup> 個/ml 区では対照区と条件培地間に大きな差はみられなかったが, 10, 10<sup>2</sup> および 10<sup>3</sup> 個/ml 区では条件培地の方が明らかに分裂率が高かった(**Table 2**). 条件培地区間では分裂率に差はみられなかった. また, 10 細胞以上に分裂した細胞は, いずれの培養密度でも対照区より条件培地区の方でやや多く観察されたが, 条件培地区間では差がなかった.

**Table 1.** Effect of conditioned medium on the plating efficiency of carrot protoplasts cultured at different densities.

Protoplast density (Protoplasts/ml)	Replication	Plating efficiency* <sup>1</sup>		
		MS-DKS medium* <sup>2</sup> (Control)	Conditioned medium* <sup>3</sup>	
			3-day-old	7-day-old
10	60	7.3 ± 2.1	41.3 ± 1.7	24.8 ± 4.2
10 <sup>2</sup>	32	16.0 ± 1.3	45.5 ± 3.2	37.5 ± 4.4
10 <sup>3</sup>	16	43.3 ± 0.9	52.4 ± 1.6	46.4 ± 1.1
10 <sup>4</sup>	8	51.0 ± 1.3	51.5 ± 1.4	51.4 ± 2.4
10 <sup>5</sup>	4	26.3 ± 2.0	32.1 ± 1.3	37.3 ± 1.0

\*<sup>1</sup> Percentage of the protoplasts that divided (Mean ± Standard error).

\*<sup>2</sup> MS medium with 20 g/l sucrose, 1 mg/l 2, 4-D, 1 mg/l kinetin and 0.6 M sorbitol.

\*<sup>3</sup> Conditioned media were prepared from 3- and 7-day-old carrot suspension cultures.

**Table 2.** Effect of conditioned medium on the plating efficiency of celery protoplasts cultured at different densities.

Protoplast density (Protoplasts/ml)	Replication	Plating efficiency* <sup>1</sup>		
		MS-DKS medium* <sup>2</sup> (Control)	Conditioned medium* <sup>3</sup>	
			3-day-old	7-day-old
10	60	1.9±1.3	12.1±1.3	11.5±1.0
10 <sup>2</sup>	32	2.1±0.8	12.4±2.2	13.0±1.1
10 <sup>3</sup>	16	10.6±1.6	18.1±1.1	17.8±1.0
10 <sup>4</sup>	8	23.8±1.2	31.3±2.0	28.0±1.8
10 <sup>5</sup>	4	24.4±2.7	19.1±1.1	21.6±0.7

\*<sup>1</sup> Percentage of the protoplasts that divided (Mean ± Standard error).

\*<sup>2</sup> MS medium with 20 g/l sucrose, 1 mg/l 2, 4-D, 1 mg/l kinetin and 0.6 M sorbitol.

\*<sup>3</sup> Conditioned media were prepared from 3- and 7-day-old carrot suspension cultures.

**Table 3.** Effect of nurse culture on the plating efficiency of carrot protoplasts cultured at the density of 10 protoplasts/ml.

Nurse cells	Plating efficiency* <sup>1</sup>	
	Static culture	Shake culture (45 rpm)
MS-DKS medium* <sup>2</sup> (Control)	0	0
Carrot suspension cells	9.2±2.6	13.3±7.3
Carrot protoplasts	6.7±5.4	10.7±4.6

\*<sup>1</sup> Percentage of the protoplasts that divided (Mean ± Standard error).

\*<sup>2</sup> MS medium with 20 g/l sucrose, 1 mg/l 2, 4-D, 1 mg/l kinetin and 0.6 M sorbitol.

**Table 4.** Effect of nurse culture on the plating efficiency of celery protoplasts cultured at the density of 10 protoplasts/ml.

Nurse cells	Plating efficiency* <sup>1</sup>	
	Static culture	Shake culture (45 rpm)
MS-DKS medium* <sup>2</sup> (Control)	0	0
Carrot suspension cells	9.1±2.4	13.8±2.0
Carrot protoplasts	5.7±1.7	9.1±2.2

\*<sup>1</sup> Percentage of the protoplasts that divided (Mean ± Standard error).

\*<sup>2</sup> MS medium with 20 g/l sucrose, 1 mg/l 2, 4-D, 1 mg/l kinetin and 0.6 M sorbitol.

## 実験 2. 保護培養の効果

保護培養をしたニンジンのプロトプラストの一部は分裂し、対照区のプロトプラストは全く分裂しなかった (Table 3)。保護細胞としては単離直後のニンジンプロトプラストより懸濁培養細胞を用いた方が、また、静置培養より振盪培養を行った方がプロトプラストの分裂は良い傾向にあった。

セルリーのプロトプラストについても、ニンジンプロトプラストと同様の結果が得られた (Table 4)。

なお、プロトプラストを隔離するためにナイロンメッシュ円筒とメンブランフィルターを張った隔離容器も検討した。その結果、円筒濾紙はナイロンメッシュ円筒に比べ厚みがあるためシャーレに固定し易く、倒れにくか

った。また、底部にメンブランフィルターを張った隔離容器と比較して、円筒濾紙は検鏡する際、光路をまったく遮らないように保護される細胞と保護細胞が光軸上で重なることがないため、プロトプラストの観察がより容易であった。

## 4. 考 察

ニンジンおよびセルリーのプロトプラストの低密度培養においてニンジン懸濁培養を利用した条件培地および保護培養は細胞分裂を促進する効果があることが明らかとなった。条件培地および保護培養を用いたプロトプラスト培養については、セリ科植物での報告はないが、他の植物では多くの報告がある<sup>1-3,8-13)</sup>。しかし、低密度培養にそれらを応用した研究は少ない<sup>1-3)</sup>。Pedersen

ら<sup>1)</sup>は *Beta vulgaris* の懸濁培養から得た条件培地が低密度 ( $4 \times 10^3$  個/ml) の *B. vulgaris* および *B. maritima* のプロトプラストに対して、Hall ら<sup>2)</sup>は保護細胞として用いた *Beta vulgaris* の懸濁培養細胞から単離したプロトプラストが低密度 ( $4 \times 10^3$  個/ml) の *B. maritima* のプロトプラストに対して、また、Simmonds ら<sup>3)</sup>は保護細胞として用いた *Brassica napus* の懸濁培養細胞から単離したプロトプラストが低密度 ( $5 \times 10^3$  個/ml) の *B. napus* および *Diplotaxis harra* のプロトプラストに対して、それぞれプレティング効率を向上させる効果があったことを報告している。これらの報告ではいずれも  $10^3$  個/ml 以上の培養密度で条件培地あるいは保護培養の効果が検討されているが、本研究では  $10^3$  個/ml 以下の培養密度について検討を行い、条件培地と保護培養がともにプロトプラストの分裂率を向上させる効果があることを明らかにした。特に、継代3日後の条件培地を用いることにより、 $10$  個/ml の低密度培養で、ニンジンのプロトプラストの約40% (対照区の約6倍)、セルリーのプロトプラストの12% (対照区の約6倍) に細胞分裂を起こさせることが可能であった。また、保護培養では、保護細胞にニンジン懸濁培養細胞を用い、円筒濾紙の内側と外側の培地交換を促進するために振盪することにより、 $10$  個/ml の低密度培養でニンジンおよびセルリーのプロトプラストの10%以上に分裂を起こさせることが可能であった。

条件培地と保護培養のどちらがプロトプラストの低密度培養に効果的であるかについては、本実験の分裂率の調査時期が異なるため直接比較することはできない。しかし、操作性を比較すると次のとおりである。条件培地は、懸濁培養液を濾過して細胞を除去後、ホルモンおよびソルビトールを加え、pHを調整し、濾過滅菌を行う必要があるが、これらの操作は煩雑ではない。また、培養の目的や細胞の数に応じて培養容器を選択することができる。しかし、培地の加除が容易でないため、一つの培養容器で長期間培養するのは困難である。一方、保護培養法は、円筒濾紙の滅菌、シャーレへの固定などに多少手間がかかるうえに、培養容器の大きさや形が制限さ

れるが、保護細胞や培地の加除が容易であり、長期間の培養が可能である。培養の目的、細胞の数あるいは培養期間によっては両者を組み合わせて利用することも考えられる。いずれにしても、これらの条件培地を用いた培養方法および保護培養法は、マイクロピペットで取り出したニンジンとセルリーの雑種細胞の培養、あるいはマイクロインジェクション等の細胞操作を行った細胞の培養方法として利用できると考えられる。

ニンジンの懸濁培養は非常に容易であるので、これを利用した条件培地および保護培養がセリ科以外の植物のプロトプラストの低密度培養にも効果があれば利用価値が高く、さらに広範な植物のプロトプラストを用いて検討する必要があると考えられる。さらに、これらの条件培地および保護培養においてプロトプラストの分裂を促進する物質の分析にも興味もたれる。

## 文 献

- 1) Pedersen, C., R. D. Hall, F. A. Krens, 1993. *Plant Sci.*, **95**: 89-97.
- 2) Hall, R. D., C. Pedersen, F. A. Krens, 1993. *Plant Cell Rep.*, **12**: 339-342.
- 3) Simmonds, D. H., N. E. Long, W. A. Keller, 1991. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **27**: 231-241.
- 4) Grambow, H. J., K. N. Kao, R. A. Miller, O. L. Gamborg, 1972. *Planta*, **103**: 348-355.
- 5) Kameya, T., H. Uchimiya, 1972. *Planta*, **103**: 356-360.
- 6) Nomura, K., K. Fukuei, T. Nitta, 1983. *Plant Sci. Lett.*, **29**: 1-7.
- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 8) Horn, M. E., B. V. Conger, C. T. Harms, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 371-374.
- 9) Kyojuka, J., Y. Hayashi, K. Shimamoto, 1987. *Mol. Gen. Genet.*, **206**: 408-413.
- 10) Gilmour, D. M., M. R. Davey, E. C. Cocking, 1987. *Plant Sci.*, **48**: 107-112.
- 11) Biswas, G. C. G., F. J. Zapata, 1993. *Journal of Plant Physiol.*, **141**: 470-475.
- 12) Li, Z., R. L. Jarret, R. N. Pittman, K. B. Dunbar, J. W. Demski, 1993. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **34**: 83-90.
- 13) Peeters, M. C., K. Willems, R. Swennen, 1994. *Plant Cell Rep.*, **13**: 208-211.

## Summary

### Effects of Conditioned Medium and Nurse Culture on Low Density Culture of Apiaceae Protoplasts

Yumiko OHARA, Yosuke TASHIRO, Takayuki MIZUTANI\* and Sadami MIYAZAKI

*Faculty of Agriculture, Saga University, Saga 840, Japan*

\* Present address: *Faculty of Agriculture, Kyusyu Tohukai University, Chouyou-mura, Aso-gun, Kumamoto 869-14, Japan*

The effects of conditioned medium and nurse culture on plating efficiency were studied in the low density culture of carrot (*Daucus carota* L.) and celery (*Apium graveolens* L.) protoplasts. Conditioned media, prepared from 3- and 7-day-old carrot suspension cultures obviously increased plating efficiencies at low densities ( $10^2$ ,  $10^3$  protoplasts/ml). In carrot protoplast culture, the 3-day-old conditioned medium was more effective than the 7-day-old one. When the protoplasts were separated by a filter ring and cultured with nurse cells (carrot suspension cells or carrot protoplasts), cell divisions of the protoplasts were observed at a low density ( $10^2$  protoplasts/ml). Plating efficiencies tended to be higher when the protoplasts were cultured with carrot suspension cells than with carrot protoplasts. Moreover, shake culture was preferable to static culture for protoplast division in both materials used.