バナナからのプロトコーム様体の誘導と L-ヒドロキシプロリンによる その成長阻害について

Kazumitsu MATSUMOTO・山口彦之・田野茂光・多々良 敦*

東京大学農学部放射線遺伝学教室*

アミノ酸アナログ突然変異体の作出を目的として、プロリンアナログ (L-ヒドロキシプロリン) によるバナナプロトコーム様体の成長阻害効果を調べた。

プロトコーム様体 (PLB) はバナナ (*Musa acuminata*, (AAA)) の茎頂培養から得られた。培養した茎頂から成長点およびそれに隣接する球茎組織を切り取り培地に移植した。PLB は薄層に切り取った球茎から誘導された。PLB の形成率は摘出方法によって異なり、角形に切り取った場合少数の PLB が形成されたにすぎなかった。プロリンアナログによる影響は、L-ヒドロキシプロリンを種々の濃度で加えた培地中で PLB を培養することによって調べられた。その結果、L-ヒドロキシプロリンの濃度が 4 mM 以上のとき PLB の成長は完全に阻害されることがわかった。

1987 年 4 月 30 日受付

緒 論

バナナは熱帯湿潤気候の地域で生育する植物で、乾燥に対して抵抗性を持たない。そこで栽培地域の拡大に伴い、少ない降雨量の地域でも栽培できる耐乾燥性品種の作出が望まれている。しかし、商業的に栽培されているバナナは、三倍体で種子を作らないかまたは作ってもその数は少なく、既存の交配法での育種を困難にしている。突然変異育種法を用いることによって、この問題は一部分回避できるが、そのためには、変異体の誘起と選抜のために多数の個体を扱う必要がある。

多数の個体から変異体を選抜する場合、培養細胞は最も適した植物材料といえよう。しかし、選抜細胞は、しばしば植物再分化能をなくすことが知られている¹⁾。そのため、*in vitro* での突然変異体作出においては、胚や胚様体を用いる研究者も多い¹⁻⁴⁾。しかも、バナナの組織培養においては、カルスや懸濁培養細胞からの植物再

分化の系さえ確立されていない現状⁵⁾で、選抜突然変異細胞からの植物の獲得は、バナナにおいてとくに難しいと言わねばならない。

この観点から、ランのプロトコーム様体 (PLB)^{6,7)} と形態的に同様な繁殖体をバナナで誘導し、多数の個体を一度に扱える実験系の確立を図った。また、水分欠乏や塩ストレスによって、多くの植物でプロリンの蓄積が観察されている^{8,9)} ことから、プロリン高含有個体選抜のための予備実験として、プロリンアナログ (L-ヒドロキシプロリン) の PLB に対する成長阻害効果も調べた。

材料および方法

1. 植物材料

バナナ栽培種 “Nanicão” (*Musa acuminata* (AAA)) の茎頂培養は下記の方法で行った。まずサッカー (吸枝, Sucker) の外皮を除きながら塊茎と茎頂を含む組織片 (10×10×15 mm) を取り出した。

次に、表面殺菌を行った後、解剖顕微鏡を用いて茎頂 (成長点とそれに隣接する 1, 2 枚の葉原基) を摘出した。移植片は、125°C 15 分の高圧殺菌処理で滅菌された、試験管中の培地 I (Table 1) に置床した。培養は 30°C、1500 lux の 12 時間照明で行った。茎頂から形成された不定芽は、6 から 7 週間ごとに分割 (それぞれ 1 から 2 個の芽を含む) して、培地 II (Table 1) に移植した。培養は 28°C、3000 lux の 14 時間照明で行った。この方法

Kazumitsu MATSUMOTO,* Hikoyuki YAMAGUCHI,* Shigemitsu TANO* and Atsushi TATARA*: Induction of Protocorm-Like Body and Its Growth Inhibition by L-Hydroxyproline in a Banana.

* Laboratory of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Table 1 Culture media used.

Component	Medium I	Medium II	Medium III
Salts	MS*	MS	MS
Vitamins	MS	MS	Morel**
Arginine	—	—	300 μ M
Indole-3-acetic acid	1 mg/l	—	—
6-Benzylamino-purine	0.5 mg/l	5 mg/l	—
Bromocresol purple	—	8 mg/l	—
Casein hydrolysate	—	—	500 mg/l
Sucrose	3%	3%	2%
Bacto Agar	0.6%	0.7%	0.7%
pH	5.7	5.8	5.8

* Murashige and Skoog (1962)¹¹⁾.** Morel (1964)¹²⁾. **Fig. 1** Schemes for cutting tissue.

(a) sliced-off cut; (b) cubic-form cut.

で3年以上マルチプルシュートとして継代培養したものから PLB を誘導した。

2. PLB の誘導

Fig. 1-a のようにマルチプルシュートから成長点とそれに隣接する塊茎を薄層として摘出し移植片とした。切断方法による PLB 形成の差異を見るため、対照として Fig. 1-b のように角型に切り取った移植片も用意した。すべての移植片は、培地 II (Table 1) に置床し、28°C, 3000 lux の 14 時間照明で培養、40 日後 PLB の形成を調べた。

3. プロリンアナログ処理

プロリンアナログとして、L-ヒドロキシプロリン (HYP) を用いた。HYP を含む培地の作成は以下のように行なった。高濃度の HYP を寒天を含まない培地 II に溶かし、濾過滅菌 (孔径 0.2 μ m) の後、前もって高圧滅菌後 40°C に維持しておいた培地 II に加え、種々の濃度の HYP 培地を作成した。HYP の濃度は Table 2 に示したように、0 から 8 mM の間で調製した。

Table 2 Effects of L-hydroxyproline (HYP) on banana protocorm-like body.

HYP concentration (mM)	Growth ratio*	Relative growth (%)
0	7.58 $\pm$ 2.31**	100
1	4.82 $\pm$ 1.36	63.6
2	2.19 $\pm$ 0.85	28.9
4	1.19 $\pm$ 0.12	15.7
8	1.05 $\pm$ 0.12	13.9

* Growth ratio = final fresh weight/initial fresh weight.

** Standard deviation.

それぞれの培地上に約 200 mg の PLB 小塊を置床し、30°C 500 lux 連続光で培養した。1 カ月後生体重を測定し、HYP による成長阻害を調べた。

結果および考察

1. PLB の誘導

茎頂を薄層に切り取り培地 II に移植したとき、それぞれの移植片より 20 から 50 個の PLB が誘導された (Fig. 2-a)。しかし、茎頂を角型に切り取り培地に置床すると、1 から 5 個の PLB しか観察されなかった。また、PLB は成長点に隣接した組織からのみ誘導された。誘導された PLB の数は、これら 2 つの切断方法 (Fig. 1) によって異なることから、成長点下部組織の表出面積の違いが PLB 形成数を左右しているものと考えられた。このことから茎頂部を摘出するときは、成長点下部組織の現われる面積が最大になるように切断すべきである。しかしながら、そのためには多くの労力を要することから、大量増殖のための実験系としては、Fig. 1-a のような薄層切断法が適当であると思われる。

PLB の継代培養は培地 II のほか、培地 III のように成長調節物質を含まない培地においても行うことができた。しかし、その成長速度は培地 II の場合より低く、また、3 から 4 回継代を繰り返すうち、カルス状になる傾向がみられた。この培地 III は、カルス化を防ぎ成長速度を速めるため改良される必要があるものの、成長調節物質を含まないという点で意義深いと思われる。培地に添加された成長調節物質が、継代培養中に起きる好ましくない突然変異の原因の一つであることは、多くの研究者によって指摘されているからである。

2. プロリンアナログ処理

結果を Table 2 および Fig. 3 に示した。HYP を 1 mM の濃度で培地に添加すると、PLB の成長は HYP 無添

Fig. 2 Protocorm like bodies induced from a shoot apex (a) and the plant regenerated from them (b).

Fig. 3 Inhibition of protocorm like bodies by hydroxyproline in a banana (*Musa acuminata* (AAA)).

加培地に比して64%にまで抑制された。そして、HYPの濃度が4 mM以上の時、PLBはほとんど増殖を示さなかった (Table 2)。このときPLBは褐変するか、または完全に死滅した (Fig. 3)。

Kueh & Bright¹⁾ は大麦の胚におけるHYPの成長阻害効果を調べ、著者らとほぼ同様の結果を得ている。つまり、大麦では0.5から1 mMのHYPで阻害効果が現われ、8から16 mMで、ほぼ完全に成長を止めた。一方、Hasegawa & Inoue¹⁰⁾ は水稻幼植物での検討の結果、0.05 mM HYPで効果が現われ、0.5 mM HYPでほぼ完全な成長阻害を観察している。材料が異なるので一概にいえませんが、大麦が比較的乾燥に強い植物、水稻が乾燥に弱い植物、そしてバナナがその中間に位置することから、種属間での乾燥耐性とHYP耐性との正の連関が示唆される。また大麦においては、プロリンを培地に添加

することによってHYPの害を軽減できることから、HYPの成長阻害効果は、プロリンの生合成阻害作用として働いているものと考えられる。これらのことから、HYP耐性個体は、耐塩性や耐乾燥性作物作出としての実用的な意義の他に、プロリンの生化学的研究素材としても重要であり、より多くの植物種での感受性等のデータの蓄積が望まれる。

著者らは現在、上記の結果をもとに、PLBを γ 線照射後4 mM HYPを含む培地で継代培養することでHYP耐性突然変異体の作出を図っている。

文 献

- 1) KUEH, J. S. H., and S. W. J. BRIGHT. 1981. Proline accumulation in a barley mutant resistant to trans-4-hydroxy-L-proline. *Planta* **153**: 166-171.
- 2) KOCHBA, J., G. BEN-HAYYIM, P. SPIEGEL-ROY, H. NEUMANN, and S. SAAD. 1982. Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *C. sinensis* and *C. aurantium*. *Z. Pflanzenphysiol.* **106**: 111-118.
- 3) MATSUMOTO, K., and H. YAMAGUCHI. 1983. Induction of adventitious buds and globular embryoids on seedling of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*). *Jpn. J. Breed.* **33** (2): 123-129.
- 4) MATSUMOTO, K., and H. YAMAGUCHI. 1984. Increased variation of NaCl-tolerance in adventitious embryoids of trifoliate orange using an *in vitro* technique. *Brazil. J. Genetics* **7** (1): 73-81.
- 5) CRONAUER, S. S., and A. D. KRIKORIAN. 1986. 8. Banana (*Musa* spp.). In: "Biotechnology in Agriculture and Forestry 1, Trees 1" (Ed. by BAJAJ, Y. P. S.) 233-252, Springer-Verlag, Berlin

Heidelberg.

- 6) MOREL, G. M. 1964. Tissue culture—A new means of clonal propagation of Orchids. Am. Orchid Soc. Bull. **33**: 473–478.
- 7) SAGAWA, Y., T. SHOJI, and T. SHOJI. 1966. Clonal propagation of Cymbidiums through shoot meristem culture. Am. Orchid Soc. Bull. **35**: 118–122.
- 8) STEWART, C. R. 1978. Role of carbohydrates in proline accumulation in wilted barley leaves. Plant Physiol. **61**: 775–778.
- 9) WATAD, A-EA., L. REINHOLD, and H.R. LERNER. 1983. Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. Plant Physiol. **73**: 624–629.
- 10) HASEGAWA, H., and M. INOUE. 1983. Induction and selection of hydroxy-L-proline resistant mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Jpn. J. Breed. **33** (3): 275–282.
- 11) MURASHIGE, T., and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**: 473–497.
- 12) MOREL, G. M. 1964. La culture in vitro du meristeme apical. Rev. Cytol. Biol. Veg. **27**: 307–314.

Summary

In order to induce and select amino acid analogue resistant mutants, a protocorm-like body (PLB) was induced by a shoot apex culture in a banana (*Musa acuminata*, (AAA)). And the growth inhibition of the PLBs by proline analogue (L-hydroxyproline) was studied.

The meristem including adjacent corm tissue was removed from the cultured shoot apex and was transplanted to a fresh medium. PLBs were induced on the sliced corm. They were proliferated by separating into smaller pieces and subculturing on the same medium.

L-hydroxyproline(HYP) containing media were prepared by adding HYP into the culture medium, after filter-sterilization. The growth inhibition of PLBs by HYP was analyzed by culturing PLBs on the HYP-medium. It was observed that concentrations of HYP up to 4 mM completely inhibited the PLB's growth, i.e. prevented any increase of the fresh weight of the PLBs.

The results described here are being used for the selection of banana tolerant to the amino acid analogue.

(Received April 30, 1987)