ハクサイ葉肉プロトプラストからの植物体再分化

山岸 博*・西尾 剛・高柳謙治

野菜・茶業試験場 514-23 三重県安芸郡安濃町大字草生

Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Chinese Cabbage

(*Brassica campestris* L.)

Hiroshi YAMAGISHI, Takeshi NISHIO and Kenji TAKAYANAGI

National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Ano, Mie 514-23

Summary

Mesophyll protoplasts were isolated from the plantlets of Chinese cabbage, c.v. 'Nozaki No. 2', cultured aseptically. Suitable media for protoplast culture, callus proliferation and shoot regeneration from calluses, especially the concentrations of growth regulators, were investigated.

1. Protoplasts were cultured in the liquid media of 1/2 MS salts containing various concentrations of auxins and cytokinins. For initial cell divisions, the most suitable combination of growth regulators was 5 mg/l NAA and 0.5~1 mg/l kinetin or 2.5~5 mg/l 2,4-D and 0.5~1 mg/l kinetin. The 2,4-D was more effective than NAA, while the lower level of 2,4-D (0.5 mg/l) showed the best effect on cell colony formation.

2. Cell colonies developed in liquid media were transferred to the 1/2 or 1/1 MS agar medium with various concentrations of 2,4-D and kinetin. For callus proliferation, the combination of 1 or 2 mg/l 2,4-D and 0.5 or 1 mg/l kinetin was the most suitable. When the growth regulator concentration was constant, 1/1 MS medium was more effective than 1/2 MS.

3. On the MS agar medium with 1 mg/l zeatin, 29% and 57% of calluses differentiated shoots and roots, respectively. These shoots rooted on MS agar medium.

From these results, it is suggested that an efficient system for plant regeneration from Chinese cabbage mesophyll protoplasts can be established by combining the suitable culture media for cell-division, colony formation, callus proliferation and shoot regeneration.

緒 言

組織・細胞培養技術の急速な進展に伴って、近年、交雑不可能な植物種間でも細胞融合によって体細胞雑種を得、それを育種素材として用いる試みが盛んに行われるようになった(11)。アブラナ科野菜においてもすでにいくつかの植物種間で細胞融合による体細胞雑種の作出が試みられている(2, 9, 10, 12)。

このような細胞融合による育種を効率的に進めるためには、対象とする作物においてプロトプラストからの植物体の再分化条件を明らかにしておく必要があるものと

考えられる。アブラナ科野菜においてはプロトプラストからの植物体再分化については、キャベツ類(*Brassica oleracea* L.)と西洋ナタネ(*B. napus* L.)を中心とした検討がなされており(1, 3, 4, 15)、ハクサイを含む*B. campestris*においては植物体再分化の研究が少なく、特に葉肉プロトプラストからの植物体再分化については報告がない。

このため、本報告ではハクサイの葉肉プロトプラストについて、その培養条件及び茎葉再分化条件、とりわけ培地中の植物ホルモンの効果について検討した。

材料及び方法

ハクサイ品種「野崎2号」を用いた。「野崎2号」の種子を次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度1%)で滅

1986年10月31日 受理

* 現在 京都産業大学国土利用開発研究所
603 京都市北区上賀茂本山

Fig. 1. Effects of phytohormones on cell division frequency of Chinese cabbage mesophyll protoplasts (a; NAA and kinetin, b; 2,4-D and kinetin). Protoplasts were cultured in the medium of 1/2 MS salts ($\text{NH}_4\text{NO}_3=200 \text{ mg/l}$, sucrose=1%, 0.5 M mannitol, pH=5.75) with the density of $1 \times 10^5/\text{ml}$. On the ninth day of culture, the frequency was counted under the microscope.

菌した後, Murashige and Skoog (5) の培地 (以下 MS 培地と略記する.) 上に播種して, 20°C , 2000 lx, 16時間照明下で約1か月間無菌的に育苗した。

得られた無菌植物の葉を1 mm 幅に細断し酵素処理を行った。酵素液にはベクトリアーゼ Y-23 を0.1%, セルラーゼ RS を0.5%, マンニトールを0.5 M として CPW 塩¹⁾を添加したものを用い, 28°C 下で70回/分の往復振とうを2時間前後行った。得られたプロトプラスト懸濁液を $50 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュでろ過した後, 1000 回転/分で2分間遠心分離して酵素液を取り除き, 更に CPW 塩を含む0.5 M マンニトール液中で2回洗浄 (1000回転/分で2分間遠心分離) して, プロトプラストを精製した。

得られたプロトプラストを1/2濃度の MS 培地 (ただし NH_4NO_3 は 200 mg/l , シュ糖1%, 0.5 M マンニトール添加, pH 5.75) に種々の濃度のオーキシンとサイトカイニンを組み合わせた液体培地で培養した。プロトプラストの密度は $1 \times 10^5/\text{ml}$ とし, 初期の1週間は暗黒下で, その後は 2000 lx, 16 時間照明下で培養した。

培養開始後10~14日間隔で3回, 培養液と等量の液体培地を添加してコロニーの形成を促した。形成されたコロニーを培養開始から約1か月後に, 液体培地と共に, 1/2 又は 1/1 濃度の MS 寒天培地 (ただし NH_4NO_3 は 200 mg/l , シュ糖1%, pH 5.75) に種々の濃度の植物

ホルモンを添加した培地上に流し込んでカルス化を促した。カルス化培地の量は直径 6 cm のシャーレに 10 ml とし, 各シャーレにコロニー懸濁液を 0.5 ml ずつ流し込んだ。

このカルス化培地上で直径 2 mm 程度に達したカルスを, 順次, 種々の濃度の植物ホルモンを含む MS 寒天培地 (シュ糖3%, pH 5.75) に移植して茎葉の再分化を促し, 得られた茎葉は更に植物ホルモンを含まない MS 培地に移植した。

これら一連の培養は, 20°C 温度条件下で行った。

プロトプラストの培養開始後9日目に, 倒立顕微鏡下で細胞分裂の頻度を調査し, また4週間目に同様にコロニー形成程度を調査した。プロトプラストからのカルス化の程度の調査は, 寒天培地に移植後約1か月目にカルスの数と大きさを調べて行い, 更に再分化の調査はカルスの移植後1か月目に行った。

結果及び考察

1. プロトプラストの分裂とコロニー形成

プロトプラストの培養開始から9日目における細胞分裂の頻度と植物ホルモンの濃度との関係を第1図にまたプロトプラストの分裂を第4図(A)に示した。

プロトプラストの分裂率は, NAA とカイネチンを組み合わせた場合には, NAA が 5 mg/l , カイネチンが $0.5 \sim 1 \text{ mg/l}$ の時に30% で最も高く, また2,4-D とカイネチンを組み合わせた場合には, 2,4-D が2.5又は 5 mg/l , カイネチンが 0.5 又は 1 mg/l の時に30% で最も高かった。NAA と2,4-D を比較すると, 全般に2,4-D の細胞分裂に及ぼす効果が高く, NAA より低濃度でも

1) KH_2PO_4 (27.2 mg/l), KNO_3 (101 mg/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1480 mg/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (240 mg/l), KI (0.16 mg/l), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.025 mg/l) を含む。

Fig. 2. Effects of phytohormones on cell colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts after four weeks culture (Culture medium was the same as Fig.1). Number of colonies is —=very small, ±=small, +=medium or ++=large, respectively.

高い分裂頻度が得られた。本報告で得られたハクサイのプロトプラストの分裂頻度は、キャベツ類やハクランのプロトプラストの分裂頻度と比較して(6), ほぼ同程度かやや低い値であった。

次にプロトプラスト由来のコロニーを第4図(B)に、培養4週間目におけるコロニー形成程度と植物ホルモンの濃度の関係を第2図にそれぞれ示した。

コロニーの形成程度は2,4-Dの濃度に影響され、2,4-Dが0.5 mg/lの時に最も高く、これより濃度が高くなるに従い次第に低下した。またカイネチンの濃度が0.5ないしは1 mg/lの時にコロニー形成程度が高かった。

このように、ハクサイの葉肉プロトプラストの培養においては、初期の細胞分裂には2.5~5 mg/lと比較的高いオーキシン濃度が適する一方で、その後のコロニーの形成には、0.5 mg/l前後の低いオーキシン濃度が適することが明らかにになった。これは、キャベツ、ハクラン等で得られた結果(6)と同様であるが、既往のアブラナ科植物におけるプロトプラスト培養の例では、オーキシンを0.7~1.2 mg/l、サイトカイニンを0.2~0.6 mg/lとしたものが多い(13)。これらは本報告で明らかとなったコロニー形成に好適なホルモン濃度に近いやや高い値となっている。このことと、プロトプラストの初期分裂には高濃度のオーキシンが適することを考え合わせると、ハクサイのプロトプラスト培養においては、初期培養に2.5~5 mg/lのオーキシンと0.5~1 mg/lのサイトカイニンを含む培地を用い、その後の培地添加の際にオーキシン濃度の低い培地を用いることによって高率にコロニーを得ることができるものと考えられる。

2. カルス形成と茎葉の再分化

液体培地中で形成されたコロニーを、培養開始後約1か月目に培養液と共にMS寒天培地上に流し込んでカルス化を図った。寒天培地上でのカルスの発達を第4図(C)にまた培地中の植物ホルモンの濃度とカルスの発達の関係を第3図に示した。

Fig. 3. Effects of phytohormones on callus formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. Agar medium of 1/2 MS salts was used except in No. 7. In medium No.7, usual MS salts were used.
 ▨ ; Calluses larger than 1 mm diameter
 □ ; Calluses smaller than 1 mm diameter

カルスの発達は、2,4-Dとカイネチンの濃度及びその比率によって変動し、2,4-Dを1又は2 mg/lとしカイネチンを0.5又は1 mg/lとした時にカルスの数が多く、かつその中における大きいカルスの割合も高かった。これに対して2,4-Dを0.5 mg/l、カイネチンを1 mg/lとした培地ではカルスの数、増殖とも低く、また2,4-Dを2 mg/l、カイネチンを0.5 mg/lとした培地ではカルスの増殖はやや早かったものの、全体のカルスの数が少なかった。

更に培地中の無機塩とビタミンの濃度を通常のMS培地の濃度とした場合には、1/2濃度の培地と比較して全体のカルス数はさほど変らないものの、増殖の早いカルスの割合が高くなっていた。

なお、本報告で得られたハクサイのカルス形成率は、当初培養に供したプロトプラストに対して約0.5%、分裂したプロトプラストに対して約1.5%に当たっていた。

カルス化培地上で2 mm前後に発達したカルスを再分化用培地に移植したところ、ゼアチンを1 mg/l添加したMS培地で、移植後2週間以内に茎葉の再分化が認められた。プロトプラスト由来のカルスからの茎葉分化を第4図(D)に、また移植後1か月目の根及び茎葉の分化程度と培地中の植物ホルモンの濃度の関係を第1表に示した。

再分化用培地のうちカイネチンを1 mg/lとした培地では、すべてのカルスから根毛が発生するものの根は発達せず、38%のカルスがグリーンスポットを有していたのに対して、カイネチンを2 mg/lとした培地ではグリーンスポットを有するカルスの割合が減少する一方で根の発達したカルスが増えていた。またカイネチン(1又は2 mg/l)と2,4-D(0.1 mg/l)を組み合わせた培地では、カイネチン単独の培地に比べて根の分化、グリーンスポットの割合がともに低かった。

Fig. 4. (A) Cell division of mesophyll protoplast of Chinese cabbage.
 (B) Cell colony of Chinese cabbage protoplast (after one month culture).
 (C) Callus development on MS agar medium at four weeks after transplanting.
 (D) Shoot and root regeneration from Chinese cabbage protoplast calluses.
 Two arrows show the shoot regeneration.

Table 1. Effects of phytohormones on shoot and root regeneration from protoplast callus of Chinese cabbage four weeks after transplanting^z.

Phytohormones (mg/l)			Medium No. for callus formation ^y	No. of calluses transferred	Calluses % with root hairs	Calluses % with roots	Calluses % with green spots	Calluses % with shoots
Kinetin	Zeatin	2, 4-D						
1			1	8	100	0	38	0
2			2, 3, 6	34	74	56	12	0
1		0.1	5, 7	16	75	0	13	0
2		0.1	5, 7	15	60	7	20	0
	1		4, 7	21	81	57	71	29
	2		4, 6, 7	28	93	21	54	7

^z MS agar medium (0.8% agar, pH=5.75) was used.

^y Phytohormone concentrations of each medium can be seen in Fig.3.

これらカイネチンを用いた培地では移植後1か月目では茎葉の再分化は認められなかったのに対して、サイトカイニンにゼアチンを用いた培地で茎葉の再分化が認められた。このうちゼアチンを1 mg/lとした培地では57%のカルスから発根し、また29%のカルスから茎葉が再分化したのに対して、ゼアチンを2 mg/lとした培地では根と茎葉の再分化率はそれぞれ21%、7%と1 mg/lの場合より低かった。

また、これらゼアチンを含む再分化培地上での茎葉の再分化率は、それ以前にカルス化に用いた培地の組成の

影響を受け、ゼアチンを1 mg/lとした再分化培地での再分化率はカルス化培地 No. 7 (2, 4-Dを1 mg/l, カイネチンを0.5 mg/l含むMS培地)に由来するカルスでは38%と高かったのに対して、培地 No. 4 (2, 4-D:1 mg/l, カイネチン:1 mg/l)に由来するカルスでは13%と低かった。またゼアチンが2 mg/lの培地上でも、カルス化培地 No. 6及びNo. 7由来のカルスでは10%の再分化率が認められたのに対して、カルス化培地 No. 4由来のカルスでは再分化が認められなかった。

ゼアチンを含む培地で茎葉を再分化したカルスはいずれ

れも同時に根を持っており、これらを植物ホルモンを含まないMS培地に移植することによって植物体が得られた。

従来、アブラナ科野菜の中ではハクサイを含む *B. campestris* は他の種に比べてプロトプラストからの茎葉再分化は極めて困難とされ、現在まで葉肉プロトプラストからは根の再分化に留まっている (8, 13, 14, 15)。また茎葉の再分化が困難なことを他種植物との細胞融合における体細胞雑種の効率的な選抜に利用しようとする試みもある (10, 12)。

しかしながらこれらの報告では、*B. oleracea* 又は *B. napus* の再分化に適する培地を *B. campestris* にあてはめている場合が多く、これらはサイトカイニンにカイネチン又はBAを多く用いている。その一方で、キャベツ類の茎葉再分化率はゼアチンよりもBAを用いた培地で高いことが認められている (7)。また著者ら (17) はカイネチンを用いた培地で、ハクサイにおいて低率ながら茎葉の再分化を認めているが、再分化までに本報告より長い期間を要した。

このようにキャベツ等で再分化に効果的なカイネチンやBAは効果が低く、ゼアチンが茎葉再分化に高い効果を持つことが、ハクサイが他のアブラナ科野菜と異なる点であると考えられる。

なお、本報告で得られたハクサイの茎葉再分化率 (29%) は、キャベツ類の再分化率 (50%以上 (7)) に比べて低いものの、フキで得られた再分化率 (32% (16)) よりやや低い程度のものであり、実用性は十分に高いものと考えられる。

以上のように、ハクサイの葉肉プロトプラストについて、初期の細胞分裂、コロニー形成、コロニーからのカルス誘導及びカルスからの茎葉再分化のそれぞれの過程について、適当な培地条件とりわけ植物ホルモンの種類と濃度が明らかとなった。しかし、すでにキャベツにおいても、カルス化培地のホルモン組成が茎葉の再分化率に大きく影響することが明らかになっており (7)、これら一連の過程における培地中の植物ホルモンは互いに独立には作用しないものと考えられる。

今後、これら培養過程での培地組成間の関係を含めて、更に適当な培地の組み合わせを検討することによって、より効率的なプロトプラストからの植物体再分化系を確立することができるものと考えられる。

摘 要

ハクサイ品種「野崎2号」の葉肉プロトプラストについて、培養条件及び茎葉の再分化条件とりわけ培地中の植物ホルモンの効果について検討した。

1) プロトプラストの初期分裂にはNAAを5 mg/l、又は2,4-Dを2.5~5 mg/lとし、カイネチンを0.5~1 mg/lとした1/2濃度のMS培地が適しており、2,4-Dの方がNAAより細胞分裂に効果的であった。

2) プロトプラストからのコロニー形成には2,4-Dを0.5 mg/l、カイネチンを0.5~1 mg/lとした培地が適し、プロトプラストの初期分裂とその後のコロニー形成では適するオーキシン濃度が異なることが示唆された。

3) コロニーからのカルス形成には2,4-Dを1~2 mg/lとし、2,4-Dとカイネチンの比を2:1とした培地が適していた。またカルス化培地に1/2 MS培地を用いるより通常のMS培地を用いる方が、カルスの増殖に効果的であった。

4) カルスからの茎葉再分化にはゼアチンが効果的であり、ゼアチンを1 mg/lとしたMS培地で移植後1か月以内に29%の茎葉再分化率が得られた。

以上より、ハクサイの葉肉プロトプラストの培養において、初期細胞分裂、コロニー形成、カルス化及び茎葉再分化のそれぞれについて適当な植物ホルモンの濃度が明らかとなった。

引用文献

1. BIDNEY, D. L., J. F. SHEPARD and E. KALEIKAU. 1983. Regeneration of plants from mesophyll protoplasts of *Brassica oleracea*. Protoplasma 117: 89—92.
2. GLEBA, Y. Y. and F. HOFFMANN. 1978. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*: No evidence for specific chromosome elimination. Molec. Gen. Genet. 165: 257—264.
3. KARTHA, K. K., M. R. MICHAYLUK, K. N. KAO, O. L. GAMBORG and F. CONSTABEL. 1974. Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (*Brassica napus* L. cv. Zephyr.) Plant Science Letters 3: 265—271.
4. LU, D. Y., D. PENTAL and E. C. COCKING. 1982. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 107: 59—63.
5. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473—497.
6. 西尾 剛・山岸 博・高柳謙治. 1986. アブラナ科野菜葉肉プロトプラストの初期培養条件に関する研究. 野菜試報 A14: 11—19.
7. NISHIO, T., H. YAMAGISHI and K. TAKAYANAGI. 1987. Shoot regeneration capacity destined at an early stage of protoplast culture in cabbage. Japan. J. Breed. 37: 22—28.

8. SCHENCK, H. R. and F. HOFFMANN. 1979. Callus and root regeneration from mesophyll protoplasts of basic *Brassica* species: *B. campestris*, *B. oleracea* and *B. nigra*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 82: 354—360.
9. SCHENCK, H. R. and G. RÖBBELEN. 1982. Somatic hybrids by fusion of protoplasts from *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 89: 278—288.
10. TAGUCHI, T. and T. KAMEYA. 1986. Production of somatic hybrid plants between cabbage and Chinese cabbage through protoplast fusion. *Japan. J. Breed.* 36: 185—189.
11. 高柳謙治. 1985. 野菜における細胞融合の研究段階. 農及園. 60: 165—171.
12. 寺田理枝・山下裕美子・西林双龍・島本 功. 1986. *B. oleracea* と *B. campestris* の体細胞雑種作出. 育雑. 36 (別冊1): 80—81.
13. 鳥山欽哉・亀谷寿昭. 1984. 十字花科植物のプロトプラスト培養と細胞融合—最近の文献紹介を中心に— 農及園. 59: 733—740.
14. ULRICH, T. H., J. B. CHOWDRURY and J. M. WIDHOLM. 1980. Callus and root formation from mesophyll protoplasts of *Brassica rapa*. *Plant Science Letters* 19: 347—354.
15. ZU, Z., M. R. DAVEY and E. C. COCKING. 1982. Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. *Plant Science Letters* 24: 117—121.
16. YABE, K., T. NISHIO and K. TAKAYANAGI. 1986. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Japanese butterbur (*Petasites japonicanus* Fr. Schmidt). *Japan. J. Breed.* 36: 131—137.
17. 山岸 博・芦澤正和・由比 進. 1986. ハクサイ葉肉プロトプラストからの茎葉再分化. 園学要旨, 昭61春: 144—145.