

ホウレンソウ葉肉プロトプラストの初期培養条件の改良

藤田 智・杉山信太郎・遠藤元庸¹・稲田委久子¹

¹岩手大学農学部

Improvement of Plating Efficiency on the Mesophyll Protoplast Culture of Spinach, *Spinacia oleracea* L.

Satoshi FUJITA, Shintaro SUGIYAMA, Motonobu ENDO¹ and Ikuko INADA¹

¹Faculty of Agriculture, Iwate University

Summary

In order to improve the plating efficiency on spinach mesophyll protoplast culture, various conditions were examined with four cvs. of spinach, four cvs. of chard and one cv. of tablebeet.

1. Mesophyll protoplasts of these test plants were isolated from the *in vitro*-grown young seedlings by treatment of the enzyme solution containing 2% Cellulase Onozuka RS, 0.5% Cellulase Onozuka R-10, 0.5% Macerozyme R-10, 0.02% Pectolyase Y-23, CPW salts, 0.1% MES and 0.5 M sorbitol (pH 5.8) for 4-11 hours.
2. The cell division and colony formation of spinach cv. 'SHINNIPPON' occurred only in a modified MS medium (No. 3) containing 1 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA in five combinations of growth regulators.
3. The cell division and colony formation of protoplasts only occurred in all spinach cvs., but not in chard and tablebeet in No. 3 medium.
4. The frequency of cell division and colony formation in spinach cv. 'F₁ SHINRYOKU' increased to DMSO concentration. Plating efficiency of the medium containing 1.0% DMSO (14.7%) was much higher than that of the medium without DMSO (3.2%).
5. We now plan to induce plant regeneration from the thus obtained callus.

緒言

近年、植物組織培養技術の進歩にともない、分類学的に遠縁の植物間交配では雑種植物が得られない種間、属間あるいは科間でも、プロトプラスト融合により種々の体細胞雑種が作出され、従来不可能とされていた異種間の遺伝子の交換が可能であることが示されている (Melchersら, 1978; Ohgawaraら, 1985). 著者らは、ホウレンソウ育種の一重要課題である耐暑性の改良を、細胞工学的手法を利用し解決することを目指しているが (Sugiyama and Fujita, 1992; Fujitaら, 1994; 藤田ら, 1995; 藤田, 1995; 杉山・藤田, 1996; 杉山ら, 1997a および 1997b), そのためにはホウレンソウのプロトプラストから植物体再生に至る一連の培養系の確立が前提となる。ホウレンソウのプロトプラストからの植物体再生に関する報告は、現在までのところ、

Goto and Miyazaki (1992), Gotoら (1996) および 駒井ら (1996) の葉肉プロトプラストを用いた3例のみであり、培養の効率化、とくに植物体再分化率を向上させる必要がある。また、他のアカザ科植物の研究例には、テンサイについて2例 (Krensら, 1990; Hallら, 1993)があるのみで、しかも植物体再生率はかなり低い。

本研究では、ホウレンソウの葉肉プロトプラスト培養における初期培養条件の改良を目的に、品種間差異、初代培地の諸要因がプロトプラストの単離と初期分裂、コロニー形成などに及ぼす影響について検討を行い、若干の知見が得られたので報告する。

材料および方法

1. 無菌植物の育成

供試材料として、ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*

L.) 4品種 ('F₁深緑', '新日本', '次郎丸' および '豊葉') とフダンソウ (*Beta vulgaris* L.) 4品種 ('黒種', '赤根', '西洋' および '日本') ならびにテーブルビート (*Beta vulgaris* L.) 1品種 ('デトロイトダークレッド') を用いた. ホウレンソウ, フダンソウおよびテーブルビート種子は, 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Tween 20添加) で15分間, 75%エタノール (Tween 20添加) で2分間の二重殺菌した後, 滅菌水で3回水洗し, 播種培地に置床した. 播種培地は, Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1962) のビタミンをB5ビタミン (Gamborgら, 1968) に変更し, スクロース30g/l, ゲルライト3g/l を添加し, pHを5.8に調整したものを用いた. 発芽は, 25°C, 5,000lux, 16時間日長の培養条件下で行った.

2. プロトプラストの単離・精製

ホウレンソウは, 置床後7~10日目の子葉および本葉, フダンソウおよびテーブルビートは継代後30日目の若い本葉各々1gを, 1~2mm幅に細断した後, ろ過滅菌した酵素液10ml (2%セルラーゼオノヅカRS, 0.5%セルラーゼオノヅカR-10, 0.5%マセロザイムR-10, 0.02%ペクトリアーゼY-23, 0.1%MES, 0.5Mソルビトール, CPW塩, pH5.8) に移し, 25°Cのグロースチャンバー内 (暗黒下) で, 4時間 (ホウレンソウ) ないし11時間 (フダンソウおよびテーブルビート) 酵素液処理し, その後45rpmで30分間振盪しプロトプラストを単離した. 単離したプロトプラストは, 孔径50 μmのナイロンメッシュでろ過した後, 800rpmで4分間遠心分離し酵素液を除いた. 次いで, 洗浄液1 (CPW塩, 0.5Mソルビトール, pH5.8) で2回遠心分離 (800rpm, 4分間) し, さらに洗浄液2 (CPW塩, 0.6Mスクロース, pH5.8) で精製 (1,000rpm, 10分間) 後, プロトプラスト培地で1回洗浄 (800rpm, 4分間) した. この後, 血球計算盤でプロトプラストの収量を計数した. プロトプラストの活性調査は, FDA法 (Wildholm, 1972) により行った.

3. プロトプラスト培養

単離・精製したプロトプラストは, MS無機塩およびB5ビタミンを基本に, NAA, 2,4-DおよびBAを組み合わせ, スクロース20g/l, 0.5Mソルビトールを添加し, pH5.8に調整後, フィルター滅菌した液体培地を用い, 培養密度を 5×10^4 個/mlに調整して培養に供試した. プロトプラストの培養は径6cmのプラスチックシャーレを用い, 培地を3mlずつ注し, 各実験区, 3反復で行った. 初期培養条件の検討として, 植物生長調節物質の組み合わせ, 品

間の差異, 培養密度およびDMSO添加の有無が初期分裂 (培養後7日目) およびコロニー形成率 (培養後14日目) に及ぼす影響について調査した. プロトプラストは, 25°C暗黒下で3週間, それ以降は3,000luxの照明下で培養した. 新鮮培地の補給は7日ごとに1プラスチックシャーレあたり2mlずつ行い, 培養開始21日目からは浸透圧を次第に下げ, 1か月目にソルビトールを0にした0.3%ゲルライト固形培地に移植した.

結果および考察

1. プロトプラストの単離と精製

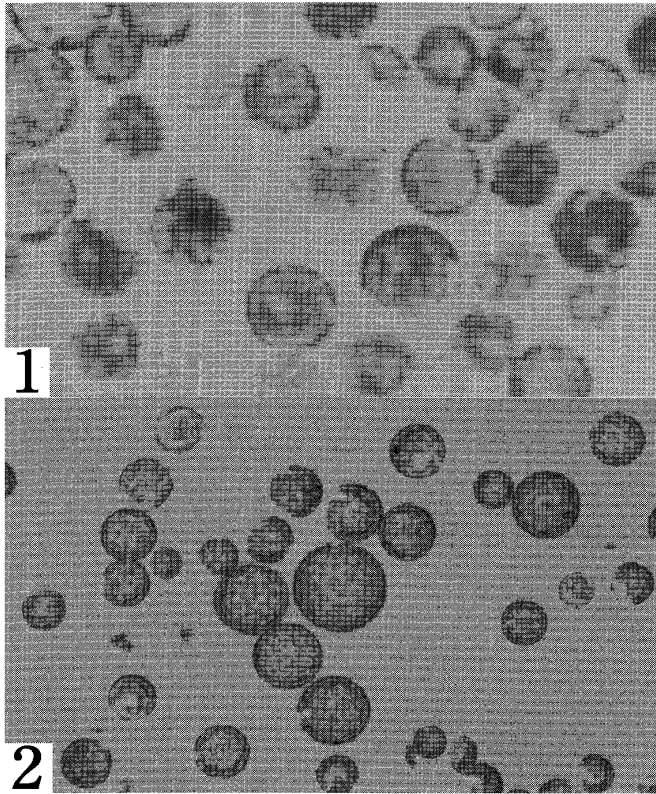
本研究で用いた単離・精製法により, ホウレンソウ, フダンソウおよびテーブルビートのいずれの品種からも比較的活性の高い均一な葉肉プロトプラストが安定して得られた (第1表および第1図). 新鮮重1g当たりのプロトプラスト収量には品種間差異がみられ, ホウレンソウ品種が $1.0 \sim 2.1 \times 10^6$ 個, フダンソウおよびテーブルビート品種が $0.6 \sim 1.8 \times 10^6$ 個であった. また, 単離直後のプロトプラストの活性をFDA法で観察した結果, '新日本'の活性率が95.5%と非常に高く, また, 他の品種も80~94%と良好なプロトプラストが得られた (データ未発表). ホウレンソウ葉肉プロトプラストの単離法として, Goto and Miyazaki (1992) およびGotoら (1996) は, 葉を細断せずに0.5Mのマン

第1表 ホウレンソウ, フダンソウおよび
テーブルビートのプロトプラスト
収量の品種間差異

| 供試材料 (品種名) | プロトプラスト収量 ^z (個/g・fw) |
|----------------------|------------------------------------|
| ホウレンソウ | |
| F ₁ 深緑 | $2.07 (\pm 0.61) \times 10^6$ |
| 新日本 | $1.47 (\pm 0.52) \times 10^6$ |
| 次郎丸 | $1.03 (\pm 0.48) \times 10^6$ |
| 豊葉 | $1.76 (\pm 1.04) \times 10^6$ |
| フダンソウ | |
| 黒種 | $0.60 (\pm 0.13) \times 10^6$ |
| 赤根 | $1.81 (\pm 0.63) \times 10^6$ |
| 西洋 | $0.78 (\pm 0.43) \times 10^6$ |
| 日本 | $1.65 (\pm 0.73) \times 10^6$ |
| テーブルビート ^y | $0.80 (\pm 0.33) \times 10^6$ |

^z (± S.D.)

^y 品種 'デトロイトダークレッド'



第1図 単離直後のプロトプラスト

1. ホウレンソウ・‘F₁深緑’ (×200)
2. フダンソウ・‘西洋’ (×200)

ニトール溶液中で前処理(原形質分離)し、減圧下で酵素液を浸透させる方法で良好な結果を得ている。この方法は、単離中のプロトプラストへの障害が少なく、収量も多いとされているが、プロトプラストの均一性に欠ける。したがって、実験の目的により、本研究の方法と Goto and Miyazaki (1992) および Goto ら (1996) の方法を使い分ける必要がある。

2. ホウレンソウプロトプラストの初期分裂に及ぼす植物生長調節物質の影響

第2表 ホウレンソウプロトプラストの初期分裂に及ぼす植物生長調節物質の影響(品種‘新日本’)

| 培地 | 植物生長調節物質 (mg / l) | | | 初期分裂程度 ^z |
|-------|-------------------|-----|-------|---------------------|
| | BA | NAA | 2,4-D | |
| No. 1 | 1 | 1 | 0 | - |
| 2 | 1 | 2 | 0 | - |
| 3 | 1 | 1 | 1 | + |
| 4 | 1 | 0 | 1 | - |
| 5 | 1 | 0 | 2 | - |

^z - : 分裂せず + : 分裂
初期分裂の調査: 培養後, 7日目

第3表 ホウレンソウとフダンソウプロトプラストの初期分裂ならびにコロニー形成の品種間差異^z

| 供試材料 (品種名) | 初期分裂程度 ^y (培養後7日目) | コロニー形成程度 ^y (培養後14日目) |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| ホウレンソウ | | |
| F ₁ 深緑 | +++ | ++ |
| 新日本 | ++ | + |
| 次郎丸 | ++ | + |
| 豊葉 | + | + |
| フダンソウ | | |
| 黒種 | - | - |
| 赤根 | - | - |
| 西洋 | - | - |
| 日本 | - | - |
| テーブルビート | - | - |

^z 供試培地: 第2表 No. 3

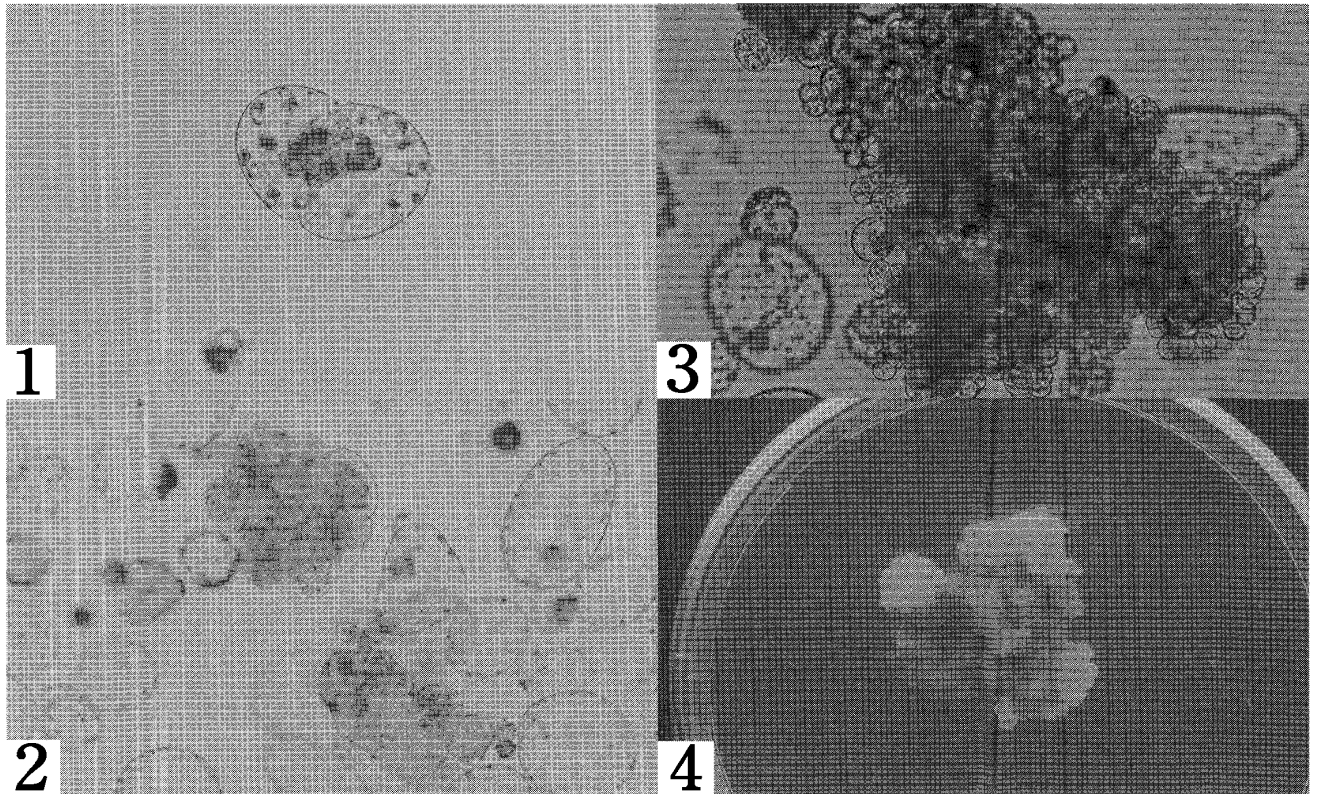
^y - : 0% + : 0~1%
++ : 1~2% +++ : 2%[<]

^x 品種: ‘デトロイトダークレッド’

‘新日本’を用い5種類の培地で培養を試みた結果、初期分裂はNAA, 2,4-DおよびBAを各々1mg/l添加したNo.3培地でのみ観察された(第2表)。Goto and Miyazaki (1992)は‘次郎丸’の葉肉プロトプラスト培養で、初期分裂がBAと2,4-Dを組み合わせて添加した培地でのみ見られたことを報告しているが、本研究でも同様な傾向が示された。

3. ホウレンソウとフダンソウの初期分裂ならびにコロニー形成の品種間差異

‘新日本’でプロトプラストの初期分裂が見られたNo.3培地を用い、ホウレンソウ4品種とフダンソウ4品種ならびにテーブルビート1品種の初期分裂とコロニー形成について検討した(第3表)。ホウレンソウプロトプラストの初期分裂は、いずれの品種も培養後6日目頃から観察されたが(第2図)、その分裂程度には品種間差異が見られ、‘F₁深緑’が最も高く、次いで‘新日本’、‘次郎丸’が同程度、‘豊葉’の順となった。また、コロニー形成は10~12日目に観察され、20日目頃にはマイクロカルスとなり、1か月目に固形培地に移し、カルスを生長させた(第2図)。しかし、フダンソウおよびテーブルビートのプロトプラストはこのNo.3培地では、分裂が全く観察されなかった(第3表)。松本(1992)は、レタスの栽培種と野生種のプロトプラスト融合の際に、栽培種のみが分裂できる培地を用い、栽培



第2図 ホウレンソウプロトプラストからのカルス形成（‘F₁深緑’）

1. 第1分裂（培養後6日目，×200）
2. コロニー形成（培養後12日目，×200）
3. マイクロカルス形成（培養後21日目，×200）
4. カルス形成（培養後100日目）

種にIOA処理を施した後，野生種のプロトプラストと融合することにより，雑種植物のみを育成することに成功している．このことから，本研究の結果はホウレンソウとフダンソウのプロトプラスト融合の際に，No.3培地を用いホウレンソウプロトプラストを予めIOA処理した後，フダンソウプロトプラストと融合を行えば，融合細胞の選抜が可能となることが示唆される．本研究でも，プロトプラスト融合の検討を進める必要がある．

4. ホウレンソウプロトプラストの初期培養条件の検討

供試したホウレンソウ品種中で初期分裂率が最も高かった‘F₁深緑’を用い，初期培養条件の検討を行った．培養密度については， $1 \sim 5 \times 10^4$ 個/mlの範囲では， 5×10^4 個/ml区で，初期分裂率とコロニー形成率がいずれも最高であった（第4表）．また，DMSO添加の影響については，培養密度を 5×10^4 個/mlに調整して検討した結果，初期分裂とコロニー形成率いずれにも明らかにその効果が認められた（第5表）．すなわち，1% DMSO添加区の分裂率は14.7%で，コントロール区（3.2%）の約5倍，コロニー形成率は8.9%でコントロール区（1.4%）の約6

第4表 ホウレンソウプロトプラストの初期分裂とコロニー形成に及ぼす培養密度の影響^z（品種：‘F₁深緑’）

| 培養密度(個/ml) | 分裂率(%) ^y | コロニー形成率(%) ^y |
|-----------------|---------------------|-------------------------|
| 1×10^4 | 2.2 | 1.0 |
| 2×10^4 | 1.7 | 0.9 |
| 5×10^4 | 3.2 | 1.4 |

^z 供試培地：第2表 No.3

^y 分裂率およびコロニー形成率の調査：各々培養後，7日目および14日目

第5表 ホウレンソウプロトプラストの初期分裂とコロニー形成に及ぼすDMSO添加の影響（品種：‘F₁深緑’）^z

| DMSO濃度(%) | 分裂率(%) | コロニー形成率(%) |
|-----------|--------|------------|
| 0 | 3.2 | 1.4 |
| 0.5 | 5.6 | 3.0 |
| 1.0 | 14.7 | 8.9 |

^z 供試培地および各調査は第4表の注に準じる．

倍となった。Hahne and Hoffmann (1984) は、DMSOが細胞代謝系に関与し、とくに何らかの原因で細胞壁の再生が抑制されて分裂が起きないプロトプラストにおいて、細胞膜表面の再生を誘発することを報告している。また、佐野ら (1988) は、フジマメおよびダイズ、Endoら (1997) は、キクのプロトプラスト培養において、本研究と同様にプロトプラスト用培養培地へのDMSOの添加がプロトプラストの生存、分裂の向上に著しい効果を示したと報告している。ハウレンソウプロトプラスト培養においても、DMSOがプレーティング効率の改良に効果的であることが示された。

得られたハウレンソウの葉肉プロトプラスト由来カルスの培養を継続して行った結果、130日目に器官形成(発根)の誘導には成功したが、その後植物体の再生には至っていない。したがって、本実験に比べてさらに、安定したプロトプラスト培養系確立のため、懸濁細胞およびカルスからのプロトプラストの単離・精製と培養法の検討、ならびに、カルスからの効率的な植物体再生条件の確立などが課題となり、現在、これらの検討と同時に、ハウレンソウとフダンソウのプロトプラスト融合実験を開始している。これらの成果が得られれば、耐暑性ハウレンソウ育成もより現実に近づくであろう。

摘 要

ハウレンソウ葉肉プロトプラストの初期培養の効率化を図る目的で、ハウレンソウ4品種、フダンソウ4品種およびテーブルビート1品種を供試し、培養条件の検討を行った。

- 1.無菌で育成したハウレンソウ、フダンソウおよびテーブルビートの子葉および本葉を2%セルラーゼオノヅカRS、0.5%セルラーゼオノヅカR-10、0.5%マセロザイムR-10、0.02%ペクトリアーゼY-23、CPW塩、0.1%MESおよび0.5Mソルビトールを含む酵素液で4~11時間処理することによって、供試材料のいずれからも活性の高いプロトプラストが安定して得られた。
- 2.ハウレンソウ‘新日本’のプロトプラストを用い、初期分裂に及ぼす植物生長調節物質の影響を検討した結果、NAA、2,4-DおよびBAを各々1mg/lずつ添加したNo.3培地でのみ分裂が観察された。
- 3.No.3培地を用いプロトプラストを培養した結果、ハウレンソウ4品種はいずれも分裂し、コロニーを形成したが、フダンソウ4品種およびテーブルビートでは分裂が全く観察されなかった。
- 4.培養密度 5×10^5 個/mlでハウレンソウ‘F₁深緑’

のプロトプラストを培養した結果、1%DMSO添加区の分裂率およびコロニー形成率は無添加区に比較し明らかに高い値を示した。

- 5.現在得られたカルスからの植物体再分化条件について検討している。

引用文献

- Endo, M., N. Fujii, S. Fujita and I. Inada. 1997. Improvement of plating efficiency on the mesophyll protoplast culture of chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* (Ram.) Kitam. *Plant Biotechnology* 14 (1):81-83.
- Fujita, S., S. Sugiyama, M. Endo and I. Inada. 1994. Evaluation of chard as the material for breeding of heat-tolerant spinach by cultivation test. XXIVth Internat. Hort. Cong. Abstr.: 0-51-1.
- 藤田 智・杉山信太郎・遠藤元庸・稲田委久子・福原弘芳. 1995. ハウレンソウにおける単為生殖の一事例 園芸学会東北支部平成7年度大会研究発表要旨: 55-56.
- 藤田 智. 1995. ハウレンソウにおける細胞工学的研究の現状と展望 秋田 稔先生退任記念論集: 279-295. 惠泉女学園短期大学.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exper. Cell Res.* 50: 151-168.
- Goto T. and M. Miyazaki. 1992. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Spinacia oleracea* L. *Plant Tissue Culture Letters.* 9: 15-21.
- Goto T., M. Miyazaki and M. Oku. 1996. An improved procedure for protoplast culture and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65 (2): 349-354.
- Hahne and Hoffmann. 1984. Dimethyl sulfoxide can initiate cell division of arrested callus protoplast by promoting cortical microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5449-5453.
- Hall R. D., C. Pedersen and F. A. Krens. 1993. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *Plant Cell Reports.* 12: 339-342.
- 駒井史訓・増田 清・原田 隆・奥瀬一郎. 1996.

- ホウレンソウ子葉プロトプラストからの不定胚形成. 園学雑 65 (別1):184-185.
- Krens, F. A., D. Jamar, G. J. A. Rouwendal and R.D.Hall. 1990. Transfer of cytoplasm from new *Beta* CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. *Theor. Appl. Genet.* : 390-396.
- 松本悦夫. 1992. 細胞融合ーレタス. p.148-151. 増補・図解組織培養入門. 誠文堂新光社.
- Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43: 203-218.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Utimiya and S. Ishii. 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliana*. *Theor. Appl. Genet.* 71: 1-4.
- 佐野 浩・大野清春・鈴木芳夫. 1988. フジマメとダイズの培養細胞由来のプロトプラスト培養および細胞融合について. 園学雑 57 (3): 399-407.
- Sugiyama, S. and S. Fujita. 1992. Breeding spinach adaptable to high temperature. An international symposium 'Adaptation of vegetables and other food crops to temperature and water stress' (Taiwan), Abstr.: 30
- 杉山信太郎・藤田 智. 1996. ホウレンソウ品種の耐暑性実験. 恵泉女学園短大園芸生活学科 研紀 28: 13-20.
- 杉山信太郎・藤田 智・遠藤元庸. 1997a. ホウレンソウ品種の耐暑性とその育種的利用 育雑 47 (別1): 286.
- 杉山信太郎・遠藤元庸・藤田 智. 1997b. 耐暑性ホウレンソウの育成に関する研究. 平成6年度・7年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書. 課題番号06660041.
- Wildholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47: 189-194.