

林木の細胞操作に関する研究

1992年度～1996年度（県単）

吉田 和広
平山 一木
竹内 英男

要 旨

特用林産物として期待されるタラノキ・コシアブラの優良品種作出のために、プロトプラストの分離、融合、培養を試みた。プロトプラスト分離源としての無菌植物体の作出についてはタラノキでは、初代培養でBAPと2,4-Dを含む濃度2分の1MS培地を用い、再分化培地にホルモン無添加の濃度2分の1MS培地を用いて可能となった。コシアブラについては、再分化に至っていない。プロトプラストの分離は、タラノキについてはマセロチームR10+セルラーゼオノゾカRSの組み合わせ、コシアブラについてはマセロチームR10+セルラーゼオノゾカR-10の組み合わせ酵素液で最も多く分離された。また、タラノキプロトプラストの電気的融合は可能であった。プロトプラストの培養、植物体の再分化については、今後の検討が必要である。

I. 目的

林家の短期収入源として期待される林木、特にタラノキ・コシアブラのプロトプラストの分離条件を究明するとともに、分離したプロトプラストを用いて優良個体を作成する事を目的とした。

II. 材料と方法

1. 無菌幼植物体の作出

プロトプラストの分離を行う上で、分離源の無菌化は重要な問題である。そこで、タラノキ・コシアブラを用い、無菌の幼植物体の作出およびカルスからの植物体再生条件について検討した。

本センター苗畑内のタラノキ4品種（蔵王1号、蔵王2号、駒みどり、改良駒みどり）と鳳来町自生の数個体および足助町内自生のコシアブラ数個体を用いた。

培地は、無機成分の濃度を2分の1にしたMS培地（以下1/2MSという）を基本培地とし、それに数種類の植物ホルモンを加えた培地を用いた。

萌芽枝の葉柄を培地上に置床し、その切り口からカルスを誘導し、そのカルスから植物体の再生を試みた。

2. プロトプラストの分離

(1) タラノキ

本センター苗畑内に植栽されている蔵王1号の萌芽枝の葉を用いた。

用いた酵素は、マセロチームR10、セルラーゼオノヅカRS、セルラーゼオノヅカR-10、ヘミセルラーゼでそれぞれ0.6Mマンニトール液に溶解し、凍結保存しておいた。実験の際には、凍結保存してある酵素液を室温で融解させ、それぞれ1%の濃度で組み合わせて用いた。酵素液の組み合わせについては表-1の通りで、ファルコン24穴シャーレに合計0.4mlとなるように分注した。

表-1 酵素液組合せ表

(I) マセロ 1%	(II) RS 1%	(III) R-10 1%	(IV) ヘミ 1%
(V) マセロ 1% RS 1%	(VI) マセロ 1% R-10 1%	(VII) マセロ 1% ヘミ 1%	(VIII) RS 1% R-10 1% ヘミ 1%
(IX) マセロ 1% RS 1% R-10 1%	(X) マセロ 1% RS 1% ヘミ 1%	(XI) マセロ 1% R-10 1% ヘミ 1%	(XII) マセロ 1% RS 1% R-10 1% ヘミ 1%

※凡例 記号：酵素名

マセロ : マセロチームR10
RS : セルラーゼオノヅカRS
R-10 : セルラーゼオノヅカR-10
ヘミ : ヘミセルラーゼ

葉片は、0.6Mマンニトール液を若干量入れたシャーレ上でメスとピンセットを用い、葉脈を切らないように2~3mm角に切断した。

細かく切った葉片の適当量をピンセットで酵素液の入った24穴シャーレに入れ、酵素液と葉片をよく混合した。シャーレにふたをして室温で静置し、倒立顕微鏡でプロトプラストの遊離状況、変

形、バースト等の反応を観察した。

(2) コシアブラ

足助町内に自生の個体の葉を用いた。

酵素は、セルラーゼオノヅカR-10あるいはセルラーゼオノヅカRSにマセロチームR10を組み合わせて用いた。組み合わせは表-2の通りで、

(1)と同様にファルコン24穴シャーレを用いた。

プロトプラストの分離操作は、(1)と同様に行った

表-2 酵素液組み合わせ表

(I) R-10 0.1% マセロ 0.1%	(II) R-10 0.1% マセロ 0.5%	(III) R-10 0.1% マセロ 1%
(IV) R-10 0.5% マセロ 0.1%	(V) R-10 0.5% マセロ 0.5%	(VI) R-10 0.5% マセロ 1%
(VII) R-10 1% マセロ 0.1%	(VIII) R-10 1% マセロ 0.5%	(IX) R-10 1% マセロ 1%
(X) RS 0.1% マセロ 0.1%	(XI) RS 0.1% マセロ 0.5%	(XII) RS 0.1% マセロ 1%
(XIII) RS 0.5% マセロ 0.1%	(XIV) RS 0.5% マセロ 0.5%	(XV) RS 0.5% マセロ 1%
(XVI) RS 1% マセロ 0.1%	(XVII) RS 1% マセロ 0.5%	(XVIII) RS 1% マセロ 1%

※凡例 記号：酵素名

R-10 : セルラーゼオノヅカR-10
RS : セルラーゼオノヅカRS
マセロ : マセロチームR10
酵素名の後の数字は濃度

3. プロトプラストの電氣的融合

タラノキ葉柄から誘導したカルス(継代培養後約1ヶ月)およびカルスからの再分化植物体の葉片を用いた。

シャーレに材料とCaCl₂・2H₂Oを2.5mM含む0.5Mマンニトール液（以下洗浄液という）を入れ、洗浄液に浸しながらメスを使って細かく刻んだ。

洗浄液を取り除いた後、酵素液（ペクトリアーゼY-23 0.1%+セルラーゼオノヅカRS 0.5%+0.5Mマンニトール液）を加えて室温で2時間振盪した。250 μ mのナイロンメッシュでプロトプラスト懸濁液を濾過し、プロトプラストを回収した。ナイロンメッシュに残ったプロトプラストを洗浄液で流した。

100G、2分間で遠心分離し、上澄みの酵素液を取り除いた。洗浄液を加えて懸濁し、同様に遠心分離を行い、上澄みを取り除いた。この操作を3回繰り返す、プロトプラストを洗浄した。

血球計算盤にプロトプラスト液を滴下し、顕微

鏡下で計数後、プロトプラストの密度が2~4 \times 10⁶個/mlになるように調整した。

密度調整したプロトプラスト液を融合用チャンバーに滴下し、本体とチャンバーを接続して細胞融合を行った。使用した細胞融合装置はIWAKIのEFS100型で手動により操作を行った。

4. 分離したプロトプラストの培養

3. の融合前までの操作により得られたプロトプラスト液を培養密度が5 \times 10⁴個/ml程度になるように調整し、培養を行った。

培地は市販のMS粉末培地を基本培地とし、濃度を変えて用いた。また、添加したホルモンはBAPと2,4-Dで濃度は0.1mg/ℓとした（表-3）。培養は直径6cmのプラスチックシャーレを用い、25 $^{\circ}$ C、暗黒下で行った。

表-3 プロトプラストの培養に用いた培地の基本培地及びホルモン条件

基本培地	ホルモン (mg/ℓ)	
	BAP	2,4-D
1/4MS培地	0.0	0.0
〃	0.0	0.1
〃	0.1	0.0
〃	0.1	0.1
1/8MS培地	0.0	0.0
〃	0.0	0.1
〃	0.1	0.0
〃	0.1	0.1

Ⅲ. 結果と考察

1. 無菌幼植物体の作出

タラノキについては、数個体においてカルスからの植物体の再生が可能であった（写真-1）。再生することができた個体の培養条件等は表-4の通りで、無菌の幼植物体の作出は可能になった。また、カルスからの培養系もある程度確立できたといえる。プロトプラストからの植物体の再生には、カルスからの器官の再分化は重要な因子であるので、カルスからの培養系が確立できた個体を

用いる必要がある。

コシアブラについては、カルスからの培養系が確立できていないので、今後検討する必要がある。

2. プロトプラストの分離

(1) タラノキ

各酵素処理によるプロトプラストの分離状況は表-5の通りである。4種類の酵素をそれぞれ単独で使用した場合（I~IV）、セルラーゼオノヅカR-10とヘミセルラーゼは全く変化が見られず、マセロチームR10とセルラーゼオノヅカRSでは、

表-4 無菌の幼植物体作出条件

	培養方法	使用部位	初代培地	再分化培地	その他
タラノキ 蔵王1号	カルス培養	新葉の葉柄	1 / 2 MS BAP 0.1~1.0mg / リソリン 2,4-D 0.5~1.0mg / リソリン	1 / 2 MS ホルモンフリー	
タラノキ 蔵王2号	カルス培養	新葉の葉柄	1 / 2 MS BAP 0.1~1.0mg / リソリン 2,4-D 0.5~1.0mg / リソリン	1 / 2 MS ホルモンフリー	
タラノキ 駒みどり	カルス培養	新葉の葉柄	1 / 2 MS BAP 0.1mg / リソリン 2,4-D 0.5~1.0mg / リソリン	1 / 2 MS ホルモンフリー	
タラノキ 自生	カルス培養	新葉の葉柄	1 / 2 MS BAP 0.1~1.0mg / リソリン 2,4-D 0.5~5.0mg / リソリン	1 / 2 MS ホルモンフリー	個体差 大きい

酵素処理3時間で若干細胞が遊離するものも見られたが、プロトプラストを分離するまでには至らず、どの酵素でも単独で用いた場合はあまり効果がなかった。

次に、マセロチームR10と他の3種類の酵素を組み合わせさせた場合(V~VII)、ヘミセルラーゼは全く変化が無く、セルラーゼオノヅカR-10では少しプロトプラストが分離されたがとても少なかった。それに対して、セルラーゼオノヅカRSとの組み合わせでは、処理2時間目ぐらいからプロ

トプラストが分離され始め、3時間後には多くのプロトプラストが分離された。

また、3種類以上の酵素を組み合わせさせて処理した場合(VIII~XII)、マセロチームR10とセルラーゼオノヅカRSを含むものではプロトプラストが分離されたが、それら2種類の酵素だけのものよりも効率的でなかった。

表-5 酵素処理によるプロトプラスト分離状況

酵素液組合せ	プロトプラスト分離状況	
	1時間後	3時間後
(I) マセロ	△	△
(II) RS	△	△
(III) R-10	×	×
(IV) ヘミ	×	×
(V) マセロ RS	○	◎
(VI) マセロ R-10	×	○
(VII) マセロ ヘミ	×	×
(VIII) RS R-10	×	×
(IX) マセロ RS R-10	×	○
(X) マセロ RS	○	○
(XI) マセロ R-10	×	×
(XII) マセロ RS R-10	△	○

それぞれの酵素はすべて1%の濃度で使用した

- ※ ◎：多くのプロトプラストが分離
- ：少しのプロトプラストが分離
- △：細胞が遊離
- ×：変化なし

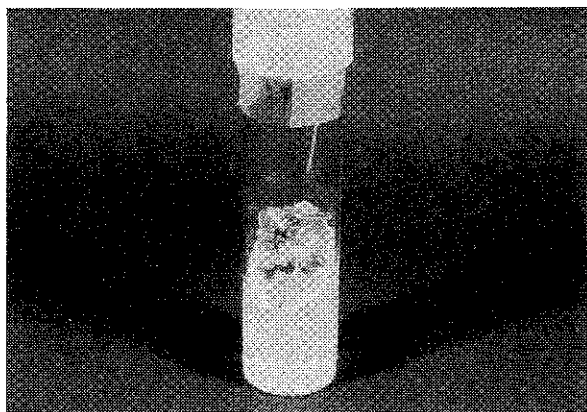


写真-1 カルスから再分化して得られたタラノキ幼植物体

以上のことより、今後は実際にカルスから再生した無菌状態のタラノキ葉片からの効率的なプロトプラスト分離技術を究明するため、マセロチームR10とセルラーゼオノヅカRSを中心に組み合わせた酵素で処理して、それらの濃度を検討していきたい。

(2) コシアブラ

各酵素処理によるプロトプラストの分離状況は表-6の通りである。明確な結果は得られなかったが、セルラーゼ(R-10、RSとも)の濃度が高く、マセロチームR10の濃度が低い組み合わせでプロトプラストがよく分離される傾向が見受けられた。

今後は、他の酵素を用いた組み合わせや処理時間等を検討し、安定したプロトプラスト分離系を開発する必要がある。

表-6 酵素処理によるプロトプラスト分離状況

酵素液組み合わせ	プロトプラスト分離状況
(I) R-10 0.1% マセロ 0.1%	×
(II) R-10 0.1% マセロ 0.5%	×
(III) R-10 0.1% マセロ 1%	△
(IV) R-10 0.5% マセロ 0.1%	◎
(V) R-10 0.5% マセロ 0.5%	△
(VI) R-10 0.5% マセロ 1%	×
(VII) R-10 1% マセロ 0.1%	○
(VIII) R-10 1% マセロ 0.5%	△
(IX) R-10 1% マセロ 1%	△
(X) RS 0.1% マセロ 0.1%	△
(XI) RS 0.1% マセロ 0.5%	△
(XII) RS 0.1% マセロ 1%	△
(XIII) RS 0.5% マセロ 0.1%	○
(XIV) RS 0.5% マセロ 0.5%	△
(XV) RS 0.5% マセロ 1%	△
(XVI) RS 1% マセロ 0.1%	○
(XVII) RS 1% マセロ 0.5%	○
(XVIII) RS 1% マセロ 1%	△

※ 酵素処理3時間後の状況

◎：多くのプロトプラストが分離

○：少しのプロトプラストが分離

△：細胞が遊離

×：変化なし

3. プロトプラストの電気的融合

酵素処理1時間後ぐらいからプロトプラストが分離され始め、2時間後には多くのプロトプラストが分離できた。プロトプラストの大きさは、葉由来のものが直径30~50 μ m、カルス由来のものが直径約30 μ mであった。

分離したプロトプラストは細胞融合装置で高周波電圧40Vをかけることにより、プロトプラストがならび始めた。パールチェーンができたところで、パルス電圧(150V、50 μ S)を印加する事により細胞融合が始まった。

以上のように、タラノキのプロトプラストを分離し、電気融合するおおよその条件は解明できた。今後は、分離したプロトプラストの健全性を検定するとともに、融合処理を行ったプロトプラストの培養条件について検討する必要がある。

4. 分離したプロトプラストの培養

8種類の培地でプロトプラストの培養を試みた。全ての培地でプロトプラストは細胞分裂する前に枯死してしまった。今後は、酵素液の組成、分離条件、培地の組成、分離条件などを検討していく必要がある。

