

第3章 リンドウ属植物のプロトプラスト培養系の確立

### 第3章 リンドウ属植物のプロトプラスト培養系の確立

プロトプラスト培養系は、植物の再生能力を高める重要な技術であり、その確立は、植物の遺伝的変異の創出や、組織培養の効率化に大きく貢献する。本論文では、リンドウ属植物のプロトプラスト培養系の確立に成功した。まず、植物の組織を消毒し、プロトプラストを抽出する。次に、抽出したプロトプラストを培養液に懸濁し、培養する。培養液の成分は、植物の成長に必要な栄養素を含み、pHも適切に調整されている。培養期間中は、温度と湿度を厳密に管理し、プロトプラストの生存率を高める。最終的に、プロトプラストが再生し、新しい植物体として成長する。この培養系は、リンドウ属植物の繁殖と遺伝的変異の創出に有効な手段となる。

### 第3章 リンドウ属植物のプロトプラスト培養系の確立

#### 1. 緒言

プロトプラストとは、細胞壁を持たない原形質のみの細胞、いわゆる“裸の細胞”である。そのため、高分子物質や細胞内小器官の取り込みあるいは細胞融合を行うことができ、細胞育種の面で利用価値が高い。プロトプラストの酵素を用いた単離は、Cooking (1960) が *Lycopersicon esculentum* で木材腐敗菌から抽出したセルラーゼを用いて調整したのが始まりである。その後、Takebe et al. (1968) が市販の酵素を用いて二段階法により、効率的にプロトプラストを単離し、現在は、一段階法により簡便に、数多くの植物でプロトプラストの単離が行われている。プロトプラストからの植物体再生は、Nagata et al. (1970) が *Nicotiana tabacum* で報告して以来、現在まで、多くの植物で報告されている (Griesbach 1988, Bajaj 1995)。また、花卉類では、カーネーション (Nakano and Mii 1993)、キク (大塚ら 1985, 深井ら 1989)、ヒマワリ (Burruset et al. 1991) などプロトプラストからの植物体再生が行われている。

リンドウ科植物のプロトプラスト培養に関しては、表3-1に示すとおり、Zhou et al. (1985) および高畑 (1987) が、リンドウ (*G. scabra*) の葉肉プロトプラスト単離とカルス形成を報告し、その後、Takahata and Jomori (1989) が植物体再生に成功した。さらに Nakano et al. (1995) は、*G. triflora* を用いて、プロトプラストからの植物体再生を報告している。また Meng et al. (1996) は、薬用の *G. crassicaulis* のカルスからプロトプラストの単離を行い、再生植物体を得ている。一方、リンドウ科の中でリンドウ属以外では、ユーストマ属 (*Eustoma*) のトルコギキョウ (*E. grandiflorum*) で、葉肉プロトプラストからの植物体再生が報告されている (Kunitake et al.

表3-1 リンドウ科植物のプロトプラスト培養に関する報告一覧

種名	使用部位	結果	文献
<i>Gentiana scabra</i>	葉肉細胞	カルス形成	Zhou et al.(1985)
<i>G. scabra</i>	葉肉細胞	カルス・根形成	高畑(1987)
<i>G. scabra</i>	葉肉細胞	植物体再生	Takahata and Jomori(1989)
//	//	//	田中・小代(1992)
<i>G. triflora</i>	葉肉細胞	植物体再生	Nakano et al.(1995)
<i>G. crassicaulis</i>	カルス	植物体再生	Meng et al.(1996)
<i>Eustoma grandiflorum</i>	葉肉細胞	植物体再生	Kunitake et al.(1995)
//	//	//	村山ら(1996)

1995, 村山ら 1996) . しかし, リンドウ科植物を用いたプロトプラストからの植物体再生については, 限られた種のみで報告されており, 効率的で安定な再分化系はまだできていない.

そこで, 本実験では, はじめにリンドウ科植物からのプロトプラスト単離の条件について検討した. その後, プロトプラストからの植物体再生について, 培地の硝酸アンモニウム濃度, 植物成長調節物質の影響および褐変防止物質の培地への添加による褐変防止の効果などについて検討を行った.

## 2. 材料および方法

### (1) 材料

プロトプラストの収量および活性調査は, リンドウ属3種6系統, トルコギキョウおよびエキザカム各1品種を材料とし(表3-2), 用いた材料のうち, *G. scabra* T0系, *G. triflora* Y系, トルコギキョウおよびエキザカムは無菌植物を用い, *G. scabra* 東和町在来および紅千鳥, *G. triflora* ‘いわて乙女’, *G. acaulis* × *G. dinarica* ‘アルペンブルー’ は自生または鉢植え植物を用い, これらの比較的上位の若い葉片を採取した.

また, プロトプラスト培養には *G. scabra* T0系および *G. triflora* Y系の生長点培養由来の無菌植物を用いた.

### (2) プロトプラストの単離および精製

プロトプラストの単離には, 浸透圧調整物質としてマンニトール9%, pH安定化剤として2-N-morpholino ethane sulfonic acid (MES) 5mM を添加し, C.P.W.塩に単離用酵素を溶かした酵素液 (pH 5.8) を用いた (表3-3). 酵素としては, セルラーゼオノズカR-10およびRS, マセロザムR-10 (以上 (株)

表3-2 リンドウ科植物のプロトプラストの単離に用いた材料

種名	系統名・品種名	入手先	プロトプラスト培養に使用した植物体
<i>G. scabra</i>	T0系	岩手県園芸試験場 <sup>1)</sup>	無菌植物
<i>G. scabra</i>	東和町在来	岩手県園芸試験場	野外(自生)
<i>G. scabra</i>	紅千鳥	(株)日本花き直販	野外(鉢植え)
<i>G. triflora</i>	Y系	岩手県園芸試験場	無菌植物
<i>G. triflora</i>	いわて乙女	岩手県園芸試験場	野外(鉢植え)
<i>G. acaulis</i>			
× <i>G. dinarica</i>	アルペンブルー	タキイ種苗	野外(鉢植え)
<i>E. grandiflorum</i>	霧の峰	(株)サカタのタネ	無菌植物
<i>E. affine</i>	ドワーフミゼットブルー	(株)サカタのタネ	無菌植物

1) 現岩手県農業研究センター

表3-3 プロトプラスト単離および洗浄に  
用いたC.P.W.塩<sup>1)</sup>

C.P.W. :	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	27.2 mg/l
	$\text{KNO}_3$	101.0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1480
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246
	KI	0.16
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	MES <sup>2)</sup>	5mM
pH	5.7	
C.P.W.9M :	C.P.W. + 9% Mannitol	
pH	5.7	
C.P.W.21S :	C.P.W. + 21% Sucrose	
pH	5.7	

<sup>1)</sup> Frearson et al. (1973)

<sup>2)</sup> 2(N-morpholino) ethane sulfonic acid

ヤクルト薬品工業), ベクトリアーゼY-23 (株) 盛進製薬) を2および3種類の組み合わせで使用した。これらの酵素液は, 濾紙 (ADVANTEC, NO. 6) で濾過後, クリーンベンチ内で0.20 $\mu$ m のメンブランフィルター (株) ミリポア) で濾過滅菌した。プロトプラストの単離は, 以下の方法で行った。はじめに, 滅菌した10 $\times$ 60mmのガラスシャーレ内に葉片およびC.P.W.9Mを4ml入れ, メスで葉片を細断あるいは切れ目処理をした。細断後, C.P.W.9Mを除き, 酵素液を4ml添加し, シャーレの周囲をパラフィルムで巻き, さらに, アルミホイルで包み遮光した。その後, 25 $^{\circ}$ Cの培養室および人工気象器内で静置し, 4時間, 5時間および16時間酵素処理を行った (図3-1)。酵素処理後, 往復振とう器 (30rpm) で30~60分間処理し, さらにC.P.W.9Mを約4ml添加し酵素反応を弱めた。このプロトプラスト懸濁液をステンレスメッシュ (82 $\mu$ m) で濾過した後, 800rpm 4分間遠心して酵素液を除いた。次に, C.P.W.9Mで2回洗浄 (800rpmで4分間遠心分離) した。その後, C.P.W.21Sでプロトプラストを分離 (900rpm 5~7分間遠心分離) し, C.P.W.9Mで1回洗浄 (800rpmで4分間遠心分離) し, プロトプラストを単離した (図3-2)。

### (3) プロトプラスト収量調査およびFDA 染色による活性調査

収量の測定は, 新鮮重1gの葉片を用いて単離したプロトプラストを10mlのC.P.W.9Mに懸濁し, Fucksの血球計算盤を用いて行った。

プロトプラストの活性調査は, Fluorescein diacetate (FDA) 染色法により以下の方法で行った。C.P.W.9M溶液にFDA を入れ1%FDA染色液を作成し, 10mlのC.P.W.9Mに懸濁したプロトプラスト浮遊液に1%FDA染色液を1ml入れ, 混合した。5分間静置し染色後, 3,000rpm で3分間遠心し, 上清液を捨て, これにC.P.W.9M溶液10ml添加後, 3,000rpm 3分間遠心し, 上清液を捨て, 洗浄

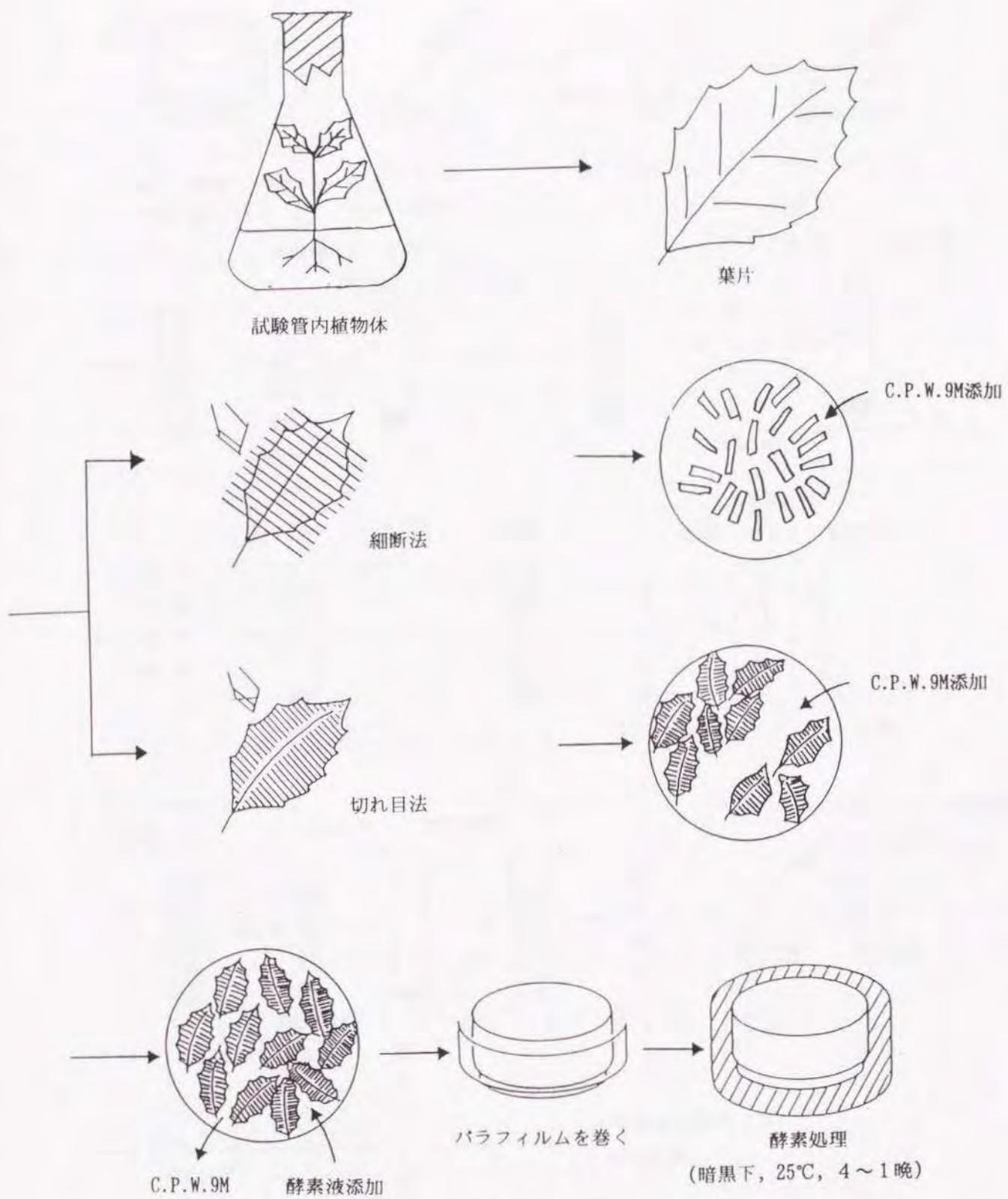


図3-1 葉片の酵素処理方法

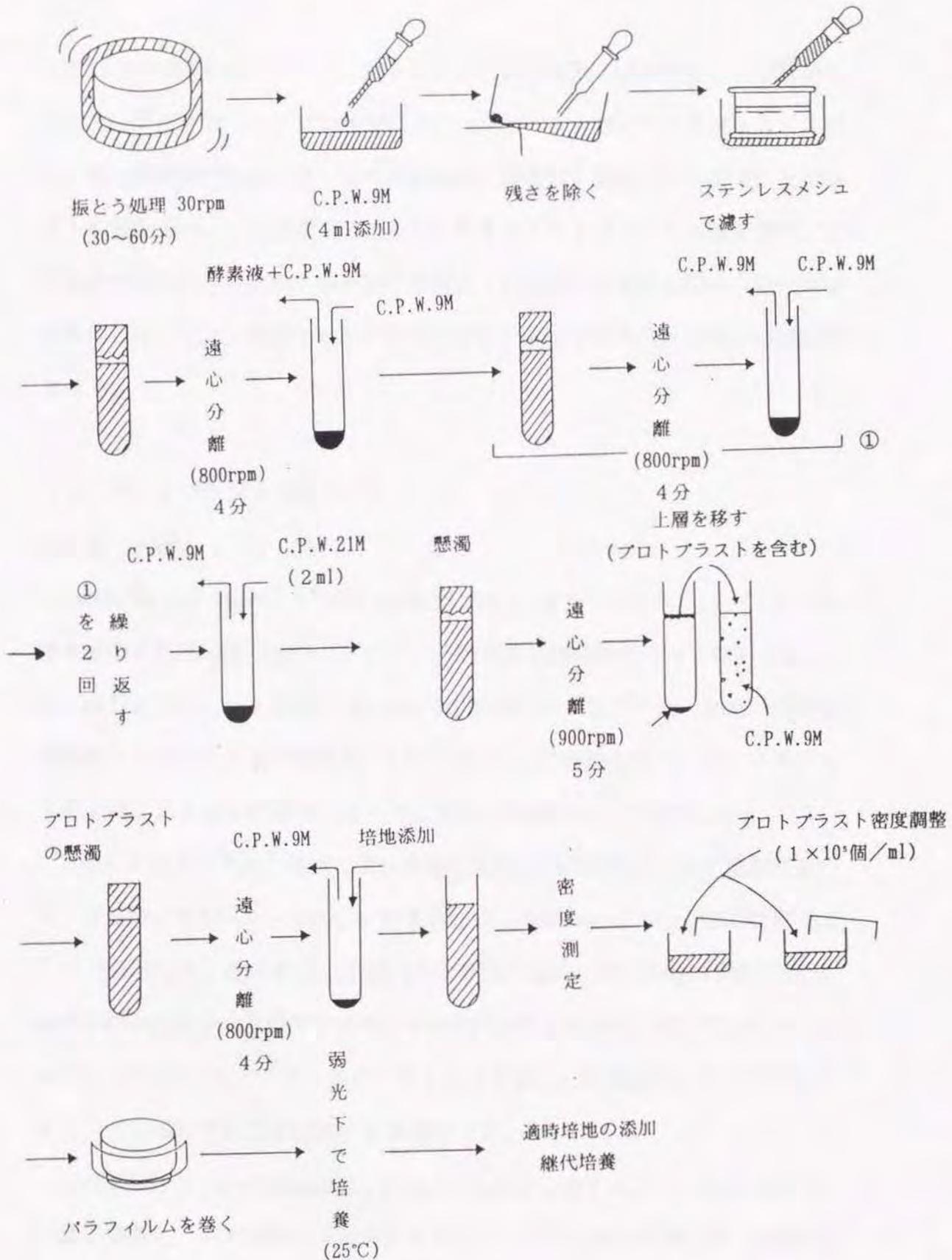


図3-2 プロトプラスト単離・精製，培養方法

を行った。沈殿したプロトプラストに、C.P.W. 9M溶液 1 ml 添加し、よく懸濁した。このプロトプラスト懸濁液をパスツールピペットでスライドガラスにのせて、蛍光顕微鏡で観察した。活性の調査は、顕微鏡 1 視野当たりのプロトプラストの数を調べ、その後蛍光下で蛍光を発するプロトプラストの数を調べ、活性割合を算出した。これを各植物の系統および品種で 5 視野を調べ、その平均を算出した。なお、調査したプロトプラストの数は 5 視野当たり 668~916 個であった。

#### (4) プロトプラスト培養

##### 1) *G. scabra*

Takahata and Jomori (1989) の報告に従い、9%マンニトール、1%ショ糖を添加したMS培地 (pH 5.8) を用い、植物成長調節物質としてNAA 2 mg/l, BA 1 mg/l および 2,4-D 2 mg/l, BA 1 mg/l の組み合わせを用いた。また、MS培地の硝酸アンモニウム濃度を標準、1/2, 1/4 にした培地を用い、プロトプラストの分裂におよぼす硝酸アンモニウム濃度の影響について検討した。

次に、プロトプラスト培養における褐変化防止剤の影響について検討するため、9%マンニトール、1%ショ糖を含むB5 (Gamborg et al. 1968) 培地 (pH 5.8) を基本とし、2,4-D 1~2 mg/l および BA 1 mg/l と NAA 2 mg/l および BA 1 mg/l の組み合わせの3種類の培地にそれぞれルチン0.01%、ポリビニールピロリドン (PVP) 1%、アスコルビン酸1%を添加し、培養20日目までのプロトプラストの褐変化状況および分裂を調査した。

プロトプラストの培養密度は、Fucksの血球計算盤を用いて、約  $1 \times 10^5$  個/ml に調整し、10×60mmのプラスチックシャーレに 2 ml で培養した。培養は、25°C 暗黒下で約 1 カ月行い、その後16時間日長、照度3,000 lux に変更して行っ

た。なお、培養約10日ごとにマンニトールの濃度をそれぞれ4%、1%および無添加に下げた培地を1mlずつ添加した。

## 2) *G. triflora*

プロトプラスト培養は、9%マンニトール、1%ショ糖を含む1/4MS（硝酸アンモニウム濃度を1/4にしたMS）培地、pH 5.8を用いた。植物成長調節物質として、NAA を0.1mg/lおよび2.0mg/l、BA 0.1, 1.0, 5.0mg/lあるいはTDZ 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/lを添加した。なお、カルス形成後は、プロトプラスト培養と同組成のMS固形培地（ジェランガム 0.2%、ショ糖3%）、pH 5.8に継代した。プロトプラストの培養密度および培養条件は、*G. scabra*と同様に行った。

## 3. 結果

### (1) プロトプラストの単離

リンドウ、エキザカムおよびトルコギキョウの葉肉プロトプラストの単離に及ぼす酵素処理方法を調査した結果は、表3-4に示すとおりであり、系統間で大きな差がみられた。*G. scabra*では、T0系が $3.86\sim 7.05\times 10^5$ 個と最も多くのプロトプラストを単離することができた（図3-3A）。一方、東和町在来は3種類の酵素組成のうち1種類のみでプロトプラストが得られたが、その収量は $0.20\times 10^5$ 個と最も低く、紅千鳥も $0.76\times 10^5$ 個と低かった。*G. triflora*の2系統では、いずれの酵素処理方法でも $2.24\sim 8.05\times 10^5$ 個のプロトプラストを単離することができ、特にY系の収量が多かった。また、アルペンブルー（*G. acaulis* × *G. dinarica*）、トルコギキョウ（*E. grandiflorum*）およびエキザカム（*E. affine*）も $1.71\sim 2.41\times 10^5$ 個のプロトプラストを得た（図3-

表3-4 リンドウ科植物の葉肉プロトプラストの単離における酵素処理方法の影響

種名	系統・品種名	酵素組成 <sup>1)</sup>	酵素処理		収量( $\times 10^5$ 個/gfw)
			方法	時間(h)	
<i>G. scabra</i>	T0系	1 <sup>2)</sup>	細断	16	3.86 $\pm$ 0.47
<i>G. scabra</i>	T0系	2 <sup>3)</sup>	切れ目	5	7.05 $\pm$ 0.14
<i>G. scabra</i>	東和町在来	1	細断	16	単離不可
<i>G. scabra</i>	東和町在来	2	細断	5	単離不可
<i>G. scabra</i>	東和町在来	3 <sup>4)</sup>	切れ目	5	0.20 <sup>5)</sup>
<i>G. scabra</i>	紅千鳥	1	細断	16	単離不可
<i>G. scabra</i>	紅千鳥	2	細断	4	0.76 $\pm$ 0.24
<i>G. triflora</i>	いわて乙女	1	細断	16	4.85 $\pm$ 0.02
<i>G. triflora</i>	いわて乙女	2	切れ目	4	2.24 $\pm$ 0.50
<i>G. triflora</i>	Y系	1	細断	16	8.05 $\pm$ 1.07
<i>G. triflora</i>	Y系	2	細断	4	6.88 $\pm$ 0.67
<i>G. acaulis</i>	アルペンブルー	1	細断	16	2.41 <sup>5)</sup>
<i>G. acaulis</i>	アルペンブルー	1	切れ目	16	単離不可
<i>G. acaulis</i>	アルペンブルー	2	細断	4	1.71 $\pm$ 0.01
<i>E. grandiflorum</i>	霧の峰	1	細断	16	1.9 $\pm$ 0.34
<i>E. affine</i>	トワ-フミセツブルー	1	切れ目	16	1.77 $\pm$ 0.49
<i>E. affine</i>	トワ-フミセツブルー	2	細断	4	1.97 $\pm$ 0.04

<sup>1)</sup> Mannitol 9%, C.P.W.S.S. 10ml/100ml(v/v), MES 5mM添加, pH 5.7

<sup>2)</sup> セルラーゼオノズカR-10 2.0%, マセロザイムR-10 0.2%

<sup>3)</sup> セルラーゼオノズカRS 2.0%, マセロザイムR-10 1.0%

<sup>4)</sup> セルラーゼオノズカRS 2.0%, マセロザイムR-10 0.5%,  
ベクトリアーゼY23 0.05%

<sup>5)</sup> 1回のみ実施

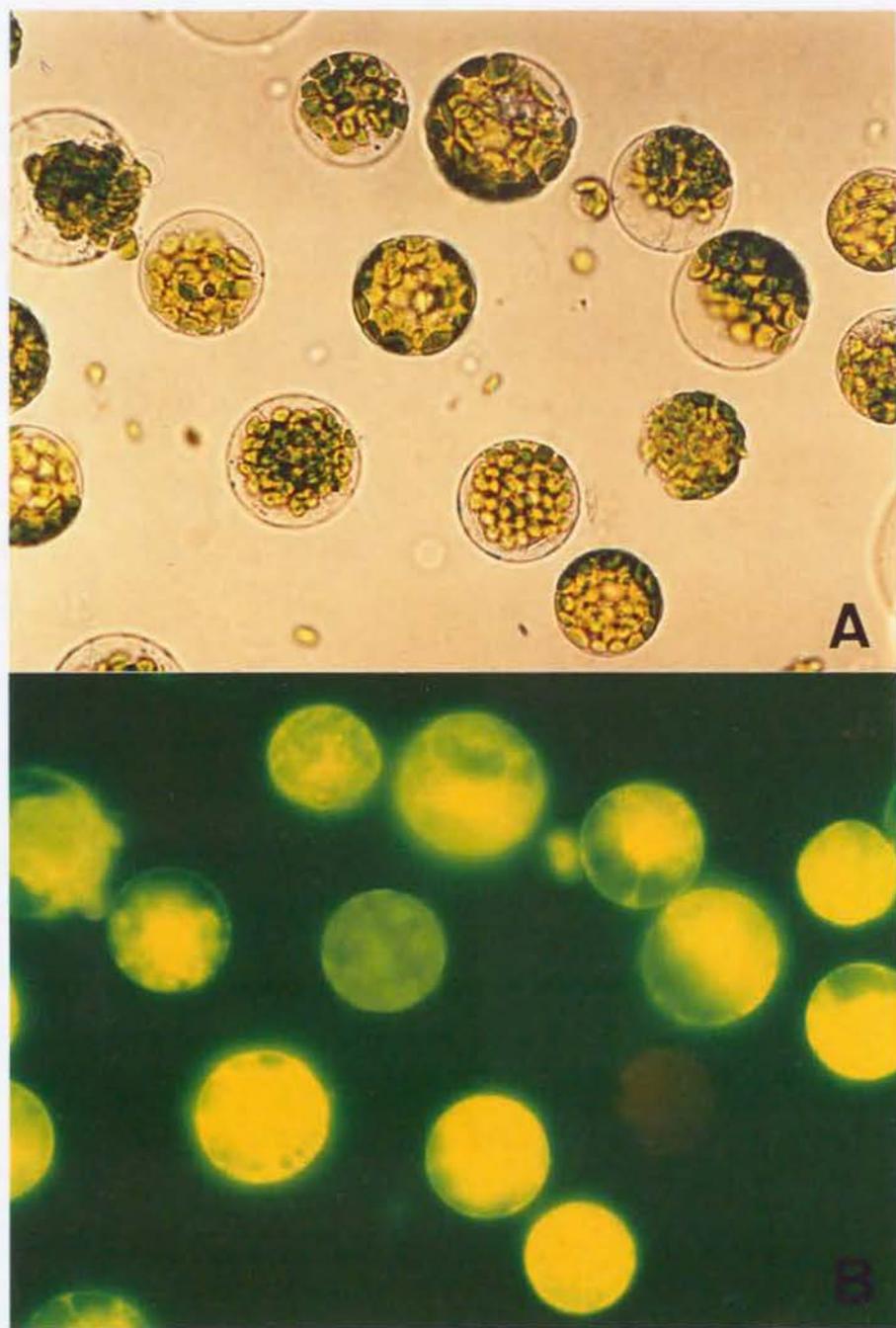


図3-3 *G. scabra* T0系葉片から単離した葉肉プロトプラスト

A : 単離直後の葉肉プロトプラスト (×150)

B : FDA 染色した葉肉プロトプラスト (×150)

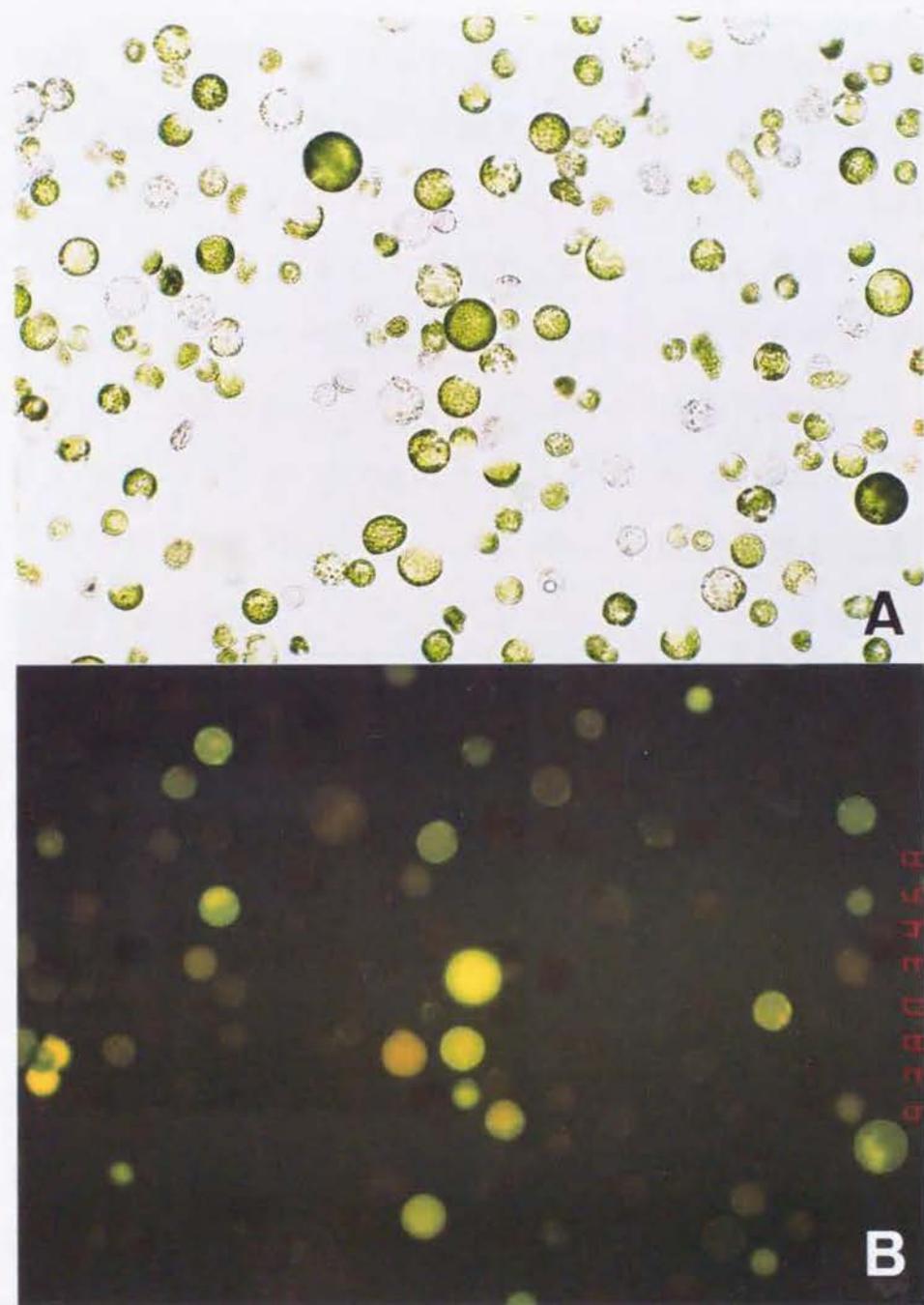


図3-4 エキザカム葉片から単離した葉肉プロトプラスト

A : 単離直後の葉肉プロトプラスト (×100)

B : FDA 染色した葉肉プロトプラスト (×100)

4 A) . 酵素組成の種類によってもプロトプラストの収量に差異がみられた. *G. scabra* T0系ではセルラーゼオノズカR-10 2.0%およびマセロザイムR-10 0.2%の酵素組成に比べ, セルラーゼRS 2.0%およびマセロザイムR-10 1.0%の組成で, 比較的多数のプロトプラストが得られた. また, *G. scabra* 紅千鳥では, セルラーゼRS 2.0%およびマセロザイムR-10 1.0%の酵素で, 東和町在来は, さらにペクトリアーゼY23 0.05%を添加することによりプロトプラストを単離することができた. 一方, *G. triflora*の用いた2系統では, セルラーゼオノズカR-10 2.0%およびマセロザイムR-10 0.2%の酵素のほうが多くのプロトプラストが単離された. なお, エキザカムでは, 酵素組成の種類による差異は認められなかった.

プロトプラストの活性率については, リンドウ属3種において*G. scabra* 東和町在来の54.5%から*G. triflora* いわて乙女の86.0%まで変異した(表3-5, 図3-3B). 一般に, *G. scabra* T0系を除けば*G. triflora* が活性率が高かった. 一方, エキザカムは23.3%とリンドウ属に比べ低く, 調査した植物の中で最も低い値を示した(図3-4B).

## (2) プロトプラスト培養

### 1) *G. scabra* T0系

植物成長調節物質およびMS培地中の硝酸アンモニウム濃度がプロトプラストの分裂におよぼす影響について検討した(表3-6). MS培地中の硝酸アンモニウム濃度が標準濃度の場合は, 用いた植物成長調節物質の組み合わせにかかわらず, プロトプラストの分裂は観察されず, プロトプラストの褐変化がみられた. 一方, 硝酸アンモニウム濃度を1/2および1/4濃度にした場合は, 低い割合であるがプロトプラストの分裂が観察された. 特に硝酸アンモニウム濃度

表3-5 リンドウ科植物の葉肉プロトプラストの活性率

種名	系統・品種名	プロトプラスト活性率 (%)	使用酵素 <sup>1)</sup>
<i>G. scabra</i>	T0系	83.6 ± 2.5	2
<i>G. scabra</i>	東和町在来	54.5 ± 16.6	3
<i>G. scabra</i>	紅千鳥	62.7 ± 11.4	2
<i>G. triflora</i>	いわて乙女	86.0 ± 1.4	1
<i>G. triflora</i>	Y系	82.3 ± 6.9	1
<i>G. acaulis</i>			
× <i>G. dinarica</i>	アルペンブルー	75.0 ± 1.7	1
<i>E. affine</i>	ドワーフミゼットブルー	23.3 ± 2.2	2

<sup>1)</sup> 1 : セルラーゼオノズカR-10 2.0%, マセロザイムR-10 0.2%

2 : セルラーゼオノズカRS 2.0%, マセロザイムR-10 1.0%

3 : セルラーゼオノズカRS 2.0%, マセロザイムR-10 0.5%,  
ペクトリアーゼY23 0.05%

表3-6 *G. scabra* T0系の葉肉プロトプラストからの細胞分裂に及ぼす硝酸アンモニウム濃度と植物成長調節物質の影響<sup>1)</sup>

植物成長調節物質(mg/l)				硝酸アンモニウム濃度		
				標準 <sup>2)</sup>	1/2	1/4
NAA	2.0	BA	1.0	0	1.0±0.7	8.3±1.5
2,4-D	2.0	BA	1.0	0	24.0±11.6	3.6±2.9

<sup>1)</sup>プロトプラスト分裂数：1シャーレ当たりのプロトプラスト分裂数

<sup>2)</sup>1650mg/l

を1/2にした2,4-D 2.0mg/l, BA 1.0mg/lの添加区では,他の区に比べ最も多くの分裂が観察された。しかし,その後コロニー形成したのは,硝酸アンモニウム濃度が1/4で,NAA 2.0mg/l,BA 1.0mg/lの添加区のみであり,他の培地では,分裂が継続してみられなかった。このコロニー形成した条件で培養したプロトプラストは,培養3日目ころに分裂し,培養12日目ころには,コロニーを形成し,培養30日後には,肉眼で観察できるほどのカルスに成長した(図3-5B~D)。これらカルスは,プロトプラスト培養と同じ植物成長調節物質の組み合わせ(NAA 2.0mg/lおよびBA 1.0mg/l)のMS寒天培地(寒天0.8%,シヨ糖3%)に移植したところ,移植後60日ころにはカルスの一部から根が形成された(図3-5E)。しかし,いずれのカルスからもシュートの誘導は,観察されず,継代培養を行うごとにカルスが褐変化し,その後枯死した。

プロトプラスト培養における褐変化防止剤の効果を調査した結果,培養6日目ころには,2,4-D 1.0mg/lとBA 1.0mg/lの無添加区およびPVP添加区でプロトプラストの褐変を観察し,培養12日目ころには,ルチン添加区(2,4-D 1.0mg/lとBA 1.0mg/lおよび2,4-D 2.0mg/lとBA 1.0mg/l),無添加区(2,4-D 2.0mg/lとBA 1.0mg/lおよびNAA 2.0mg/lとBA 1.0mg/l)でプロトプラストの褐変を観察した(表3-7)。さらに培養15日目ころには,PVP添加区(2,4-D 2.0mg/lとBA 1.0mg/l),それに続き培養17日目ころにはルチン添加区(NAA 2.0mg/lとBA 1.0mg/l)でそれぞれプロトプラストの褐変が観察された。しかし,アスコルビン酸添加区(2,4-D 2.0mg/lとBA 1.0mg/l)では,培養20日目までにプロトプラストの褐変化はみられなかった。なお,プロトプラストの分裂は,ルチン添加区(2,4-D 2.0mg/lとBA 1.0mg/l)のみで培養6日目ころにみられたが,コロニーまでは成長しなかった。

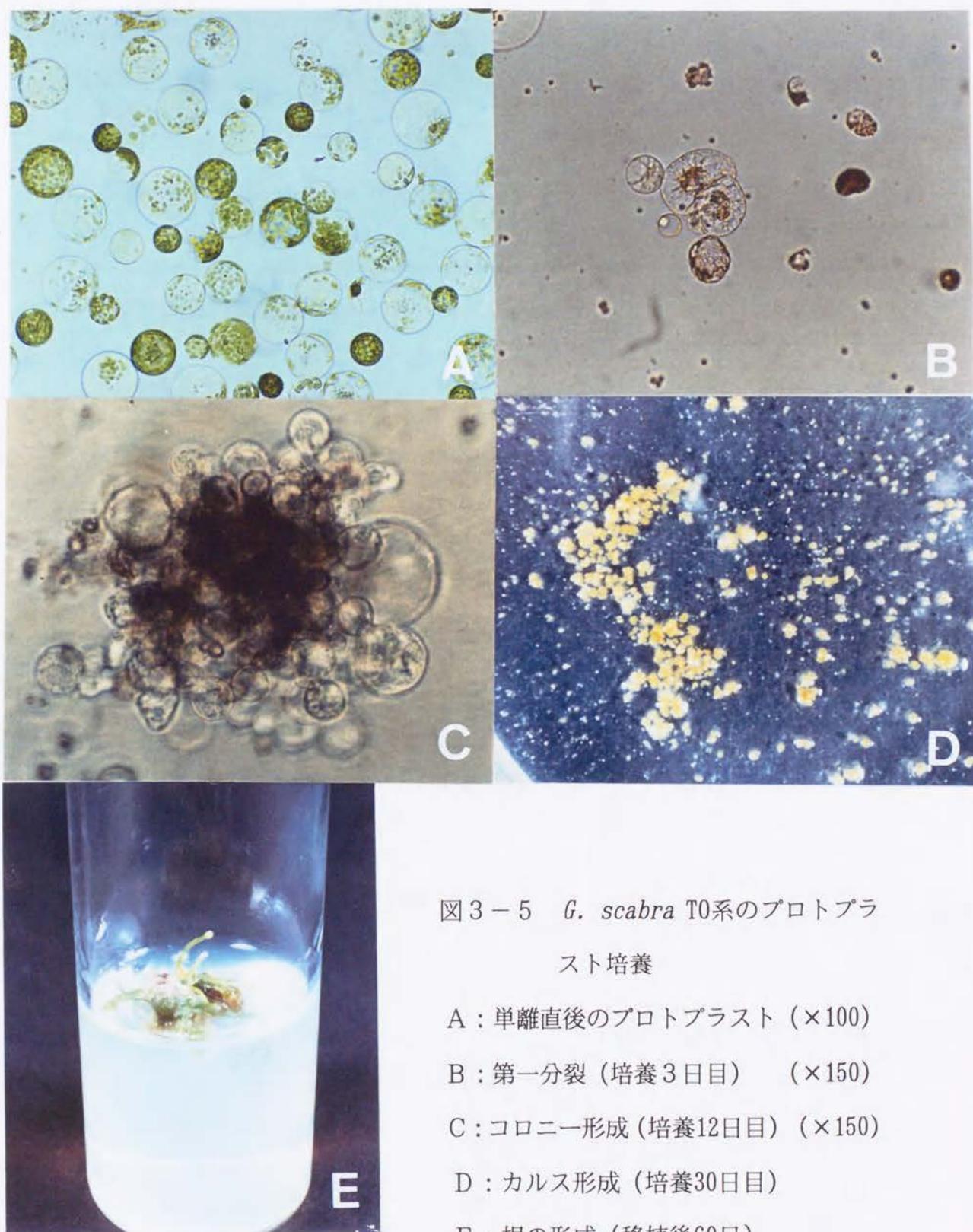


図3-5 *G. scabra* T0系のプロトプラ  
スト培養

- A : 単離直後のプロトプラスト (×100)
- B : 第一分裂 (培養3日目) (×150)
- C : コロニー形成 (培養12日目) (×150)
- D : カルス形成 (培養30日目)
- E : 根の形成 (移植後60日)

表3-7 *G. scabra* T0系の葉肉プロトプラスト培養に及ぼす褐変化防止剤の効果<sup>1)</sup>

植物成長調節物質 (mg/l)			褐変化防止剤		培養状況		
2,4-D	NAA	BA	種類	(%)	分裂	コロニー	褐変
1.0		1.0	無添加		なし	なし	6日 <sup>2)</sup>
1.0		1.0	ルチン	0.01	なし	なし	12日
1.0		1.0	PVP <sup>2)</sup>	1	なし	なし	6日
2.0		1.0	無添加		なし	なし	12日
2.0		1.0	ルチン	0.01	6日	なし	12日
2.0		1.0	PVP	1	なし	なし	15日
	2.0	1.0	無添加		なし	なし	12日
	2.0	1.0	ルチン	0.01	なし	なし	17日
	2.0	1.0	アスコルビン酸	1	なし	なし	なし

<sup>1)</sup> PVP: ポリビニルピロリドン

<sup>2)</sup> 褐変が観察された培養後日数

調査日: 培養20日

## 2) *G. triflora* Y系

*G. triflora*のプロトプラストは、セルラーゼオノズカR-10 (2.0%) とマセロザイムR-10 (0.2%) を組み合わせた酵素組成で16時間処理し、単離した (図3-6 A)。プロトプラストは、NAA 0.1~2.0mg/lおよびBA0.1~5.0mg/l またはTDZ 0.05~5.0mg/lの合計10区の試験区で培養を行い、植物成長調節物質の影響について比較した (表3-8)。コロニー形成は、NAA 2.0mg/lとTDZ 0.05mg/l添加区 (4区)、NAA 0.1mg/lとTDZ 0.1mg/l添加区 (9区)、NAA 0.1mg/lとTDZ 0.5mg/l添加区 (10区) の合計3種類の区でみられ、特に、9区および10区でコロニー形成が良好で、1シャーレ当たりの平均169~226個のコロニーがみられた。これら二つの区について、さらにコロニーの大きさについて調査した (表3-9)。両区における1mm以下のコロニーは、それぞれ平均165, 225個、1mm以上のコロニーも平均1, 4.3個観察された。調査した二つの区のうち9区が、10区に比べ1mm以下のコロニー数は多かったが、1mm以上のコロニー数は10区が若干多かった。

コロニーを形成した試験区では、培養14日目ごろに第一分裂が確認され (図3-6 B)、培養40日目ごろにコロニーが形成された (図3-6 C)。その後、培養110日目ごろには、肉眼で観察できる大きさの0.5~1.0mm程度のコロニーに成長した。さらに、培養190日目ごろには、5.0~8.0mm程度の大きさのカルスに成長した (図3-6 D)。これらのカルスは、プロトプラスト培養と同組成のMS固形培地 (ジェランガム 0.2%、シヨ糖 3%) に継代した。さらに、約30日ごとにカルスを継代したところ、培養270日目ごろに根が形成された (図3-6 E) が、いずれの試験区でもシュートの誘導はみられず、カルスは継代をすごるとに褐変化して枯死した。

表3-8 *G. triflora* Y系の葉肉プロトプラスト培養におけるコロニー形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質(mg/l)			コロニー形成数 <sup>1)</sup>
	NAA	BA	TDZ	
1	2.0	0.1		0
2	2.0	1.0		0
3	2.0	5.0		0
4	2.0		0.05	7.16 ± 7.63
5	2.0		0.1	0
6	2.0		0.5	0
7	2.0		1.0	0
8	2.0		5.0	0
9	0.1		0.1	226 ± 43.1
10	0.1		0.5	169 ± 29.1

<sup>1)</sup> 1mm以上のコロニーも含む (6シャーレ当たり平均)

調査日: 培養107日目

表3-9 *G. triflora* Y系の葉肉プロトプラスト培養における  
コロニーの大きさに及ぼす植物成長調節物質の影響

シャーレNO.	9区 <sup>1)</sup>		10区 <sup>2)</sup>	
	1mm未満	1mm以上	1mm未満	1mm以上
1	306	1	203	0
2	346	0	225	8
3	159	3	137	7
4	202	0	190	3
5	256	0	188	5
6	83	2	47	3
平均	225±43.5 <sup>3)</sup>	1±0.56	165±28.9	4.3±1.31

<sup>1)</sup> 培地 : MS+NAA 0.1mg/l+TDZ 0.1mg/l

<sup>2)</sup> 培地 : MS+NAA 0.1mg/l+TDZ 0.5mg/l

<sup>3)</sup> 平均±標準偏差

調査日 : 培養後110日目

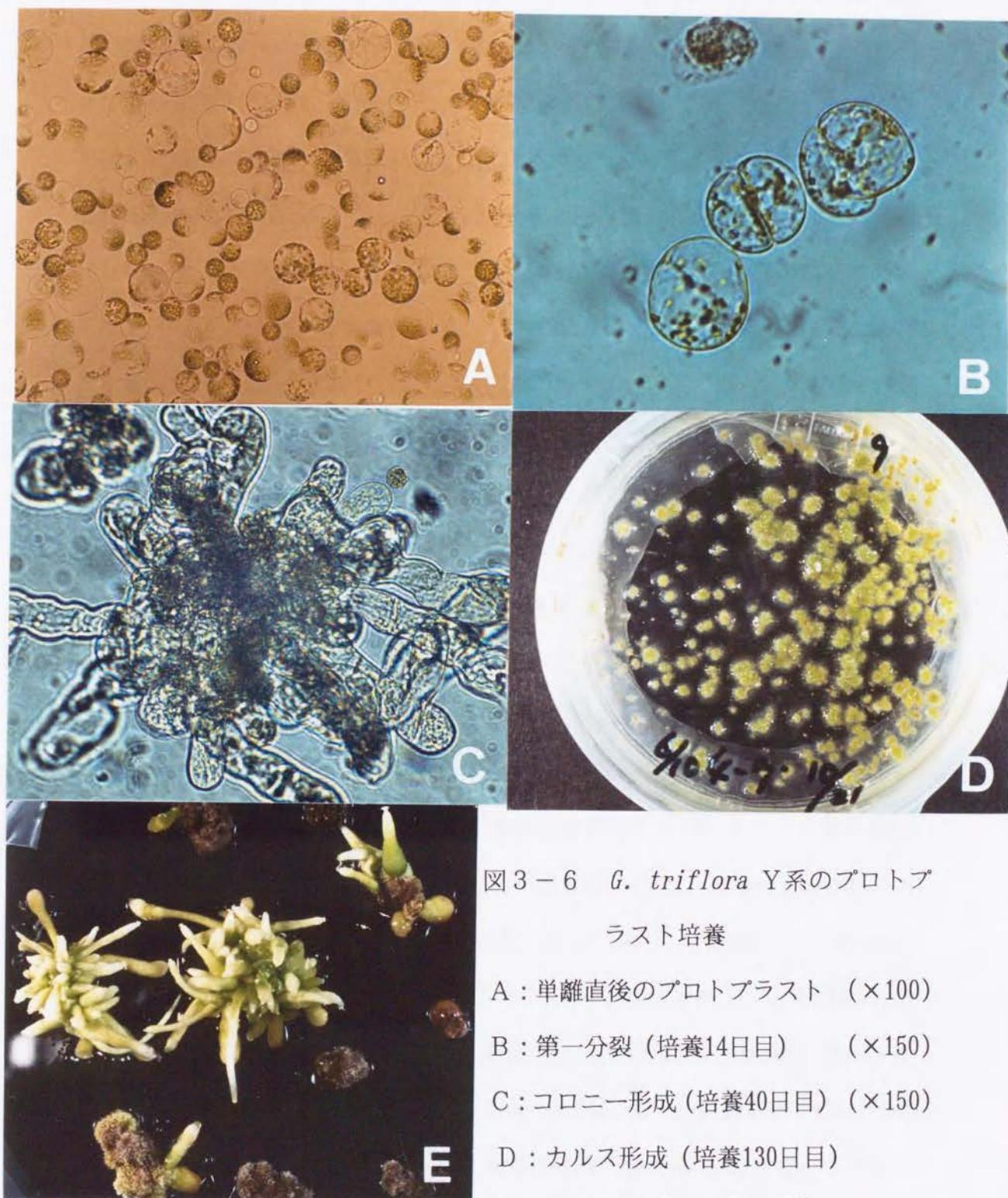


図3-6 *G. triflora* Y系のプロトプラスト培養

A : 単離直後のプロトプラスト (×100)

B : 第一分裂 (培養14日目) (×150)

C : コロニー形成 (培養40日目) (×150)

D : カルス形成 (培養130日目)

E : 根の形成 (培養270日目)

#### 4. 考察

葉片からのプロトプラストの収量を上げるためには、酵素処理に使用する酵素の種類および濃度が検討されている。本実験では、3種類の酵素を用いて、リンドウ科植物からのプロトプラストの単離条件を検討した。*G. scabra* T0系では、セルラーゼオノズカR-10 (2.0%) とマセロザイムR-10 (0.2%) の酵素の組み合わせで多くのプロトプラストが得られることが報告されている。

(Takahata and Jomori 1989)。本実験の結果、この酵素の組み合わせでは、プロトプラストが単離できなかつた。しかし、*G. scabra* の東和町在来および紅千鳥、*G. acaulis* アルペンブルーのセルラーゼオノズカRS (2.0%) やペクチナーゼY23などの高活性の酵素を使用することでプロトプラストを得ることができた。プロトプラストの単離が困難だったこれら3系統はすべて自生または鉢植えの植物体から採取した葉片を用いており、プロトプラストの単離が容易だった他の系統は、無菌植物体からのものであった。前者のプロトプラストの単離が困難だった理由の一つとして、種や系統の相違すなわち遺伝的差異の他に野外の植物体を用いたことによる供試材料の生理的条件が大きく影響したものと考えられた。

次に、単離したプロトプラストの活性率を調査した結果、リンドウ属植物6系統では、54.5~86%であった。Nakano et al. (1995) は、*G. triflora* の‘イーハトヴォ’、‘いわて’、‘マシェリ’ および *G. triflora* × *G. scabra* のWSP-3のすべての系統で90%以上のプロトプラスト活性があることを報告しており、本実験の結果は、同報告と比べて低かつた。特に、*G. scabra* 東和町在来と紅千鳥では、プロトプラスト活性が50~60%と低く、また、*G. acaulis* × *G. dinarica* ‘アルペンブルー’ も75%と比較的低い率であった。この原因として、前述したようにこれらの植物に関しては、単離に用いた葉片が野外の

ものであったことが一つの理由と推察された。また、エキザカムは、プロトプラスト活性率が23.3%と低く、葉片から活性のあるプロトプラストを得るためには、酵素処理方法などの検討が必要と考えられた。最近、高橋（2000）は、エキザカムの葉肉組織からのプロトプラストのFDA 活性は6%以下であったのに対し、体細胞胚形成能カルスおよび懸濁培養細胞のそれは90%以上であり、プロトプラスト培養にはこれらの組織から単離したプロトプラストを使うことが重要であると述べている。エキザカムは葉片からの再分化は比較的容易であるが、プロトプラスト化すると活性が低下する要因については不明である。

プロトプラスト培養では、*G. scabra*を用い、培地組成、特に培地に添加する硝酸アンモニウムの濃度について、3種類の濃度で検討した。その結果、プロトプラストの分裂は硝酸アンモニウム濃度を1/2と1/4区でみられたが、コロニー形成は、1/4濃度（NAA 2.0mg/lとBA 1.0mg/l）区のみで観察された。この結果は、Takahata and Jomori（1989）の結果と一致した。さらに、同組成の培地で継代を行い、カルス増殖およびカルスから根を分化させることができた。しかし、シュート誘導には至らなかった。この理由としてカルス増殖培地に継代したのみで、再分化培地の検討を行なわなかったことが挙げられる。

また、*G. scabra* のプロトプラスト培養では、培養初期にプロトプラストが褐変し、分裂を行わないで枯死するものが多く観察され、プロトプラストの褐変防止に効果があるとされている褐変化防止物質（ルチン、PVP、アスコルビン酸（ビタミンC））（Pierik 1987）を培地に添加し、その効果を検討した。本実験では、アスコルビン酸を添加した区では培養20日目まではプロトプラストの褐変化はみられず、単離後のプロトプラストの褐変化防止に効果があることが示されたが、それ以外の褐変防止物質添加区では培養初期において、プロトプラストの褐変化がみられ、褐変化防止効果はみられなかった。また、プロ

トプラストの分裂は、ルチン0.01%添加区のみでみられ、プロトプラストの褐変防止による分裂促進の効果はみられなかった。プロトプラスト褐変防止の効果については、一般法として (Pierik 1987) はポリフェノール化合物の吸着剤のPVP、抗酸化剤のクエン酸、アスコルビン酸、システイン、活性炭などを培地に添加することを褐変防止の提案している。キリのプロトプラスト培養では、ビタミンC5.0mg/lおよびPVPを培地に添加した場合に細胞の褐変が抑制され、コロニーの形成も促進したことを報告している (衛ら 1991)。また、*G. triflora* およびトルコギキョウにおいて、活性炭ブロックの培地への添加によりコロニーおよびカルス形成期間の短縮 (田中・小代 1995) や褐変防止効果とプロトプラスト分裂率増加 (Kunitake et al. 1995) が報告されている。しかし、*Solanum melongena*ではPVPおよび活性炭の添加と褐変防止との明確な関連は認められなかったの報告があり (Nishio et al. 1987)、褐変防止剤の効果は植物種によって異なるものと考えられた。

一方、*G. triflora* のプロトプラスト培養では、サイトカイニンとしてBAよりもTDZのほうがプロトプラストの分裂およびコロニーに対して効果的であった。これは、Nakano et al. (1995) が *G. triflora* でプロトプラストの分裂およびコロニー形成にTDZが効果的であったとの報告と一致した。しかし、本研究の結果、Nakano et al. (1995) の0.1mg/lに比べて0.5 mg/lがより効果的であった。前章の *G. triflora* の葉片培養でもシュート誘導にTDZが効果的であったことを考えあわせ、TDZはリンドウの組織培養に効果の大きいサイトカイニンと考えられ、今後オーキシンなどの他の植物成長調節物質と組み合わせによりプロトプラストからのシュート誘導への効果が期待される。