

電気融合法による桑と楮のプロトプラスト融合

| | |
|-------|------------------|
| 誌名 | 日本蠶絲學雜誌 |
| ISSN | 00372455 |
| 著者 | 大西, 敏夫 田辺, 宏至 |
| 巻/号 | 58巻4号 |
| 掲載ページ | p. 353-354 |
| 発行年月 | 1989年8月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



電気融合法による桑と楮のプロトプラス ト融合

大西敏夫・田辺宏至

京都市左京区松ヶ崎・京都工芸繊維大学繊維学部
 (〒 606)

(1989年 3月24日 受領)

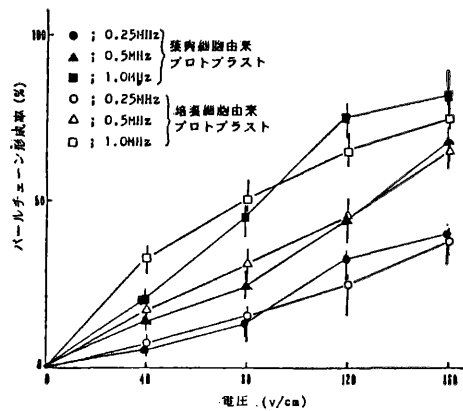
TOSHIO OHNISHI and KOJI TANABE : On
 the protoplast fusion of mulberry and paper-
 mulberry by electrofusion method

細胞融合は、今までポリエチレングリコール法が細胞の種類を選ばないことから、ひろく使われてきたが、最近では融合効率、再現性の良好な点から電気融合法が広がり、植物・動物を問わず各種細胞において研究が進められている。著者らも桑と楮について、電気融合法によるプロトプラスト融合を試み、効率のよい融合条件の検討を行った。その概要を報告する。

材料と方法：材料のプロトプラストは桑(一ノ瀬)、楮ともに葉肉から単離したものと、新梢由来の培養細胞から単離したものの2種類で、融合の組合せは葉肉×葉肉、培養×培養とした。プロトプラストの単離は、葉肉・培養細胞いずれの場合とも、桑については大西・木山の方法(1987)、そして、楮については Oka and Ohyama の方法 (1985) で行った。なお、培養細胞の培地は桑、楮ともに修正 MS 培地(岡・大山 1973)とした。また、融合確認のため、桑のプロトプラストはニュートラルレッドにより生体染色を行った。精製したプロトプラストは桑、楮それぞれ $10^5/ml$ に調整し、等量混合懸濁した。融合メディアは 0.2~0.8 M マンニトール、0~10mM $CaCl_2$ である。この懸濁液を電気融合装置の融合チャンパーに入れ、高周波をかけて誘電電気泳動を起こさせ、プロトプラストを整列させてパールチェーンを形成させる。つぎに、続けて高電圧パルスを与えることにより融合を行った。なお、融合用チャンパーは顕微鏡にあらかじめ設置しておき、融合の状

況を観察した。融合に用いた装置は(株)理工化学研究所製のエレクトリックセルフューザー ECF 2001 型で、セルチャンパーは電極間隔 2.5 mm、長さ 40 mm、高さの 6 mm もを使用した。パールチェーン形成率(%)Aは、全プロトプラスト数をB、高周波電圧印加後に2個以上のパールチェーンを形成しないプロトプラスト数をCとし、 $A = (B - C) / B \times 100(\%)$ で求めた。また、融合率(%)Dは、パルス印加後に面接触にまで至った細胞の組数をE、交流電場によって1点で接触し合った細胞の総組数(3個以上の細胞が集ったパールチェーンは除外)をFとした場合、 $D = E / F \times 100(\%)$ として求めた。

結果と考察：まずパールチェーン形成に対する高周波の周波数と電圧であるが、第1図に示すように、



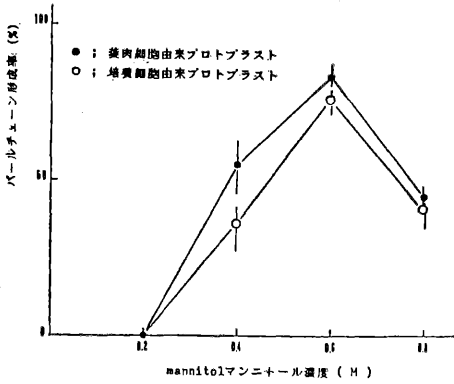
第1図 パールチェーン形成に及ぼす周波数と電圧の影響

葉肉細胞由来、培養細胞由来いずれの場合も周波数が 1.0 MHz で、160 V/cm の電圧を加えた場合、最も形成率が高かった。なお、0.5 MHz の場合にはプロトプラストが回転しながら泳動している像が観察された。融合メディア中の $CaCl_2$ 濃度は第1表

第1表 パールチェーン形成に及ぼす $CaCl_2$ の影響

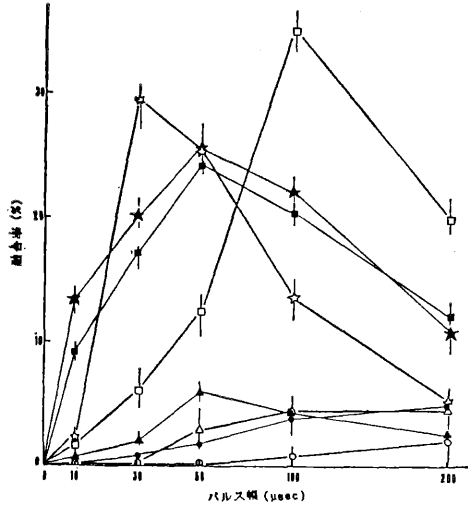
| $CaCl_2$ 濃度 (mM) | 0 | 1.0 | 2.0 | 5.0 | 10.0 |
|------------------|------|------|------|------|------|
| パールチェーン形成率 (%) | 15.2 | 81.0 | 43.8 | 17.0 | 6.3 |

註 1.0 MHz, 60 V/cm, 90 sec



第2図 パールチェーン形成に及ぼすマンニトール濃度の影響

に示す通り 1mM が最も良好で、同じくマンニトールの濃度は第2図に示す通り 0.6 M が最適であった。つぎに、融合であるが、パルス電圧とパルス幅は、葉肉細胞の場合が 2.0 kv/cm と 50 μ sec、培養細胞の場合が 1.2 kv/cm と 100 μ sec で最も融合率が高かった(第3図)。図示はしないが、パルスの回数は2回が、また、その間隔は、短い程良好な傾向が認められ、0.3秒が良好であった。パルス数を増すと融合組数は増加するが、破裂した融合細胞も増加する。上記の各良好であった条件下での葉肉プロトプラストのパールチェーン形成と融合の経過を示すと第4図の通りで、20分から1時間以内には終了するようである。ところで、ポリエチレングリコール法による融合(大西ら, 1989)に比べ、電気融合法の方が簡単に熟練を要せず、短時間で処理でき、しかも効率が良いという結果であった。今後、この



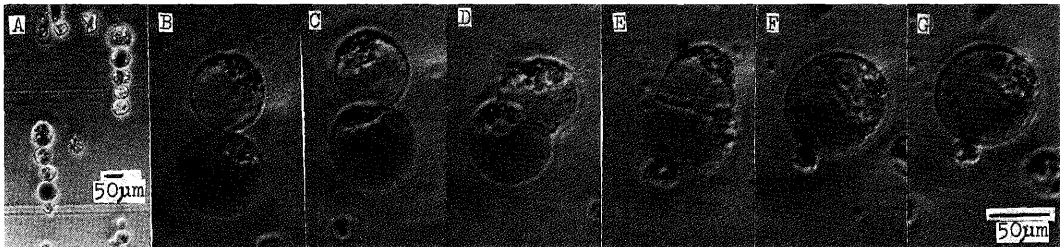
第3図 細胞融合に及ぼす電圧とパルス幅の影響

● : 0.2 kv/cm, ■ : 1.2 kv/cm } 葉肉細胞由来
 ▲ : 0.6 kv/cm, ★ : 2.0 kv/cm } プロトプラスト
 ○ : 0.2 kv/cm, □ : 1.2 kv/cm } 培養細胞由来
 △ : 0.6 kv/cm, ☆ : 2.0 kv/cm } プロトプラスト

方法で得た融合細胞からの植物体の再生の問題が検討されねばならない。

文 献

大西敏夫・木山智之(1987) : 日蚕雑, 56, 407-410.
 大西敏夫・柴山慶三・田辺宏至 (1989) : 日蚕雑, 58, 61-65.
 岡 成美・大山勝夫(1973) : 日蚕雑, 42, 317-324.
 OKA, S. and OHYAMA, K. (1985) : J. Plant Physiol., 119, 455-460.



第4図 細胞融合の経過