

## 化学物質による桑プロトプラスト収量の向上

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	大西, 敏夫 木山, 智之
巻/号	56巻5号
掲載ページ	p. 407-410
発行年月	1987年10月

## 化学物質による桑プロトプラスト収量の向上

大西敏夫・木山智之

京都市左京区松ヶ崎・京都工芸繊維大学繊維学部 (〒 606)

(1987年3月11日 受領)

TOSHIO OHNISHI and SATOSHI KIYAMA: Increase in yield of mulberry protoplasts by treatment with chemical substance

By improving the conventional enzyme solutions for the isolation of protoplasts, the increase in the yield of protoplasts was studied, and the following results were obtained. To the enzyme solution for protoplast isolation which was prepared according to Saito's report (partly modified), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and Benzyladenine (BA) were added to increase the yield of the protoplasts. When mulberry leaves were used, the yield increased upon the addition of 2,4-D at a concentration of 0.02 ppm and BA at a concentration of 0.20 ppm respectively. Furthermore, when the mulberry callus was used, the yield increased upon the addition of 2,4-D at a concentration of 0.20 ppm. When protoplasts were isolated from a mulberry callus after subcultures, the yield decreased compared with that in the primary culture. However, the yield of the protoplasts isolated from a callus subcultured after addition of Dithiothreitol (DTT) to the medium, increased to a much lower degree than that of the protoplasts in the primary culture. (Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Masugasaki Sakyo-ku, Kyoto 606)

従来のプロトプラスト単離用酵素液を改良することにより、プロトプラスト収量の向上を検討し、以下の結果を得た。

一部変更した斉藤による単離用酵素液に2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)とベンジルアデニン(BA)を添加し、プロトプラスト収量の向上を試みたところ、桑葉を材料とした場合では、2,4-D 0.02 ppmとBA 0.20 ppmの添加で収量が増加した。また、桑カルスを材料とした場合では、2,4-D 0.20 ppmの添加で収量の増加がみられた。ところで、カルスを材料とした場合、継代後のカルスからプロトプラストを単離すると、初代に比べ収量が低下するが、ジチオスレイトール(DTT)を培地に添加してカルスを継代培養し、このカルスからプロトプラストを単離することにより、その収量は増加した。しかし、継代初代培養カルスからの収量に比べては、まだ低いものであった。

育種効率の低い木本植物において、プロトプラスト培養を利用した体細胞雑種の育成や細胞レベルでの変異体作出が可能になれば、今後、木本植物の育種に対する貢献度ははかりしれないものがある。しかし、桑において、プロトプラストの培養法は未だ確立されておらず、このプロトプラストを培養するためには、プロトプラストを常時安定して大量に得ることが必要である。

桑におけるプロトプラストの単離については、大山・岡(1975)や矢沢(1985)の報告があるが、筆者らも従来のプロトプラスト単離酵素に植物ホルモ

ンを加えることにより、プロトプラストの収量を更に高めることを試みた。

また、桑カルスからプロトプラストを単離する場合、継代培養2代目以降のカルスからはプロトプラストが単離しにくくなる。そこで、継代2代目カルスの培養条件についても検討し、プロトプラストの収量向上をはかった。

### 材料と方法

供試材料は葉身とカルスの2種類であるが、いずれも桑品種は一ノ瀬である。葉身は展開第2から第

4葉位に着生したものを採択し、また、カルスは新梢茎より誘導し、ナフタレン酢酸 (NAA)  $10^{-5}$ M、ベンジルアデニン (BA)  $10^{-6}$ M を添加した修正 MS 培地 (岡・大山, 1973) で継代培養したものを供試した。プロトプラスト単離酵素液は、斉藤による酵素液 (1976) を一部変更し、マセロザイム R10 (ヤクルト本社, 東京都) 2%, セルラーゼ “オノヅカ” R10 (ヤクルト本社, 東京都) 4%, ジチオスレイトール (DTT) 2mM, 塩化カルシウム 6mM, pH 5.8 に調整した MES 試薬 20mM をマンニトール 0.6M 高張液に加えたものである。

プロトプラスト単離方法は 100 ml エーレンマイエルフラスコに試料 1g を入れ、上記の酵素液を 10 ml 注入し、27°C の恒温槽で往復振盪 (70 回/分) した。試料が桑葉の場合には、主脈を除いた後、葉身を安全カミソリにより細断し酵素液と混ぜ合わせ、1時間おきにこの酵素液を更新すると同時に単離したプロトプラストの状態を検鏡した。試料がカルスの場合には30分おきに酵素液を更新し、単離したプロトプラストの状態を検鏡した。この実験により、まず、プロトプラストの単離に最適な振盪処理時間を決めた。そして、酵素液に 2,4-D と BA を添加し、プロトプラストの単離を行う実験では、葉身の場合は処理時間を 2.5 時間とし、途中、振盪開始 1 時間で酵素液を交換した。また、カルスの場合は処理時間を 2 時間とした。振盪処理後ナイロンメッシュ (40  $\mu$ m) でプロトプラスト浮遊酵素液を濾過することにより、未消化組織を取り除き、5 分間の遠心分離 (1400 rpm) にかかけ、上澄み液を除去することにした。そして、1.0 mM 塩化カルシウムを含む 0.6 M マンニトール高張液で洗浄を繰り返した。なお、プロトプラストの収量の測定は、Thoma 血球計算盤により顕微鏡下でその数を数える事によって行なった。

## 結 果

酵素処理により単離したプロトプラストは、葉肉組織由来のプロトプラストではその大きさは一様に直径 10  $\mu$ m 前後で、内部に葉緑体も認められ、プロトプラスト特有の球形を呈していた。カルス由来のプロトプラストは葉肉プロトプラストに比べ、やや大きく直径 10~50  $\mu$ m の範囲でバラツキがあり、葉緑体も認められなかった。

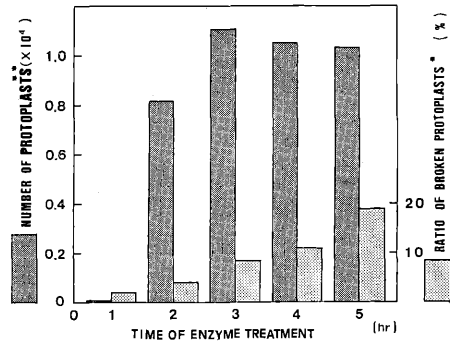


Fig. 1. Relationship between the duration of the enzyme treatment and the isolation of intact and broken protoplasts from mulberry leaf.

$$* : \frac{\text{number of broken protoplasts}}{\text{number of intact protoplasts} + \text{number of broken protoplasts}} \times 100$$

\*\* : Number of protoplasts/10 ml enzyme solutions

酵素処理時間に対するプロトプラスト収量を調べた結果、葉身を試料とした場合、1時間以内ではほとんどプロトプラストは単離せず、未消化の組織や残渣がかなり多く観察された。酵素処理を1時間以上続けると健全なプロトプラストが安定して多量に単離した。しかし、更に長時間の酵素処理を続けると破損したプロトプラストも急激に増加した (Fig. 1)。次にカルスを材料とした場合では、酵素処理開始後 2.5 時間ではほぼ完全にカルスは消化された。酵素処理 2.5 時間で単離するプロトプラスト数を 100 とし、各経過単位時間あたりの単離プロトプラスト数の割合を示したところ (Fig. 2)、酵素処理開始後 0.5~1.0 時間の間では約 40% であり、2 時間経過ではほぼ 90% であった。しかし、更に長時間酵素処理を続けるに従い、葉肉プロトプラストの場合と同様に破損したプロトプラストが急激に増加した。

単離処理を行う際の酵素液にオーキシン (2,4-D)、サイトカイニン (BA) の植物ホルモンを添加した場合の収量を調査した。その結果は Table 1, 2 に示す通りである。なお、表中の数値は 2,4-D, BA 無添加の単離酵素液での単離プロトプラスト数に対する 2,4-D および BA 添加の各試験区における単離プロトプラスト数の比で示してある。

葉肉組織のプロトプラストの場合、BA の添加で収量が向上した。2,4-D は 0.02 ppm ではほとんど

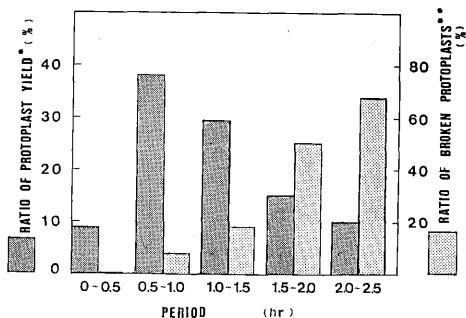


Fig. 2. Composition of ratio depending on the period of isolation of protoplasts from mulberry callus.

$$* : \frac{\text{number of intact protoplasts}}{\text{number of intact protoplasts} + \text{number of broken protoplasts}} \times 100$$

$$** : \frac{\text{number of broken protoplasts}}{\text{number of intact protoplasts} + \text{number of broken protoplasts}} \times 100$$

Table 1. Effect of the addition of 2,4-D and BA to the isolated enzyme solutions on the yield of protoplasts

BA concentration (ppm)	2,4-D concentration (ppm)			
	0	0.02	0.20	2.00
0	1.00	1.02	0.76	0.72
0.02	0.86	1.80	1.30	0.82
0.20	2.06	2.65	1.10	0.46
2.00	1.29	1.21	1.10	0.44

Protoplasts were derived from mulberry leaves.  
Data are calculated as follows ;

$$\frac{\text{Protoplast counts in enzyme mixture containing various plant hormones}}{\text{protoplast counts in hormone-free enzyme mixture}}$$

影響がないが、それより高濃度になると収量が低下する傾向があった。収量は 2,4-D 0.02 ppm, BA 0.2 ppm の場合に最高値を示した (Table 1)。

カルス由来のプロトプラストの場合は葉肉組織の場合と異なり、2,4-D が収量向上を促進し、そして、2,4-D 0.20 ppm の添加で最高収量であった。しかし、BA の添加ではほとんど影響がないか、あるいはわずかな減少が見られた (Table 2)。

Table 2. Effect of the addition of 2,4-D and BA to the isolated enzyme solutions on the yield of protoplasts

BA concentration (ppm)	2,4-D concentration (ppm)			
	0	0.02	0.20	2.00
0	1.00	1.66	2.37	2.03
0.02	0.96	1.67	1.50	1.20
0.20	0.97	1.14	1.28	1.00
2.00	0.82	0.91	1.28	0.86

Protoplasts were derived from mulberry callus.

Data are calculated as follows ;

$$\frac{\text{Protoplast counts in enzyme mixture containing various plant hormones}}{\text{protoplast counts in hormone-free enzyme mixture}}$$

修正 MS 培地で誘導し、継代初代培養のカルスからプロトプラストを単離する場合、継代後 1 週間以内ではそれほど多くのプロトプラストは単離しない (Fig. 3-1)。また、8 日目から 20 日目頃まではかなりの高収量が得られるが、その後急激にプロトプラスト収量は減少し、30日を過ぎるころからほとんどプロトプラストは単離しなかった (Fig. 3-1)。継代初代培養のカルスを 25 日目に、更に同じ修正 MS 継代培地に移植 (継代 2 代目培養) した場合には、再びプロトプラストの単離が見られた (Fig. 3-2a)。しかし、継代初代培養カルスから安定して多量にプロトプラストが単離する時期 (7 日目から 21 日目) に比べ、その収量は少なかった。ところで、この継代 2 代目において、培地に DTT を添加すると、第 2 回継代後 10 日から 15 日の間で無添加の場合に比べ、約 2 倍のプロトプラストが得られ、DTT の効果が認められた (Fig. 3-2b)。なお、この場合でも継代初代培養 7 日目から 21 日目のカルスを供試した時ほどまでにはその収量は到らなかった (Fig. 3-2b)。

### 考 察

Table 1, 2 に示すとおり、単離酵素液に 2,4-D, BA を添加することにより、プロトプラストの収量の増加が認められ、葉肉の場合には 2,4-D 0.02 ppm, BA 0.20 ppm で、また、カルスの場合には 2,4-D 0.20 ppm が最適であった。おそらく、オーキシンにより細胞壁の可塑性が増加し、細胞壁にゆ

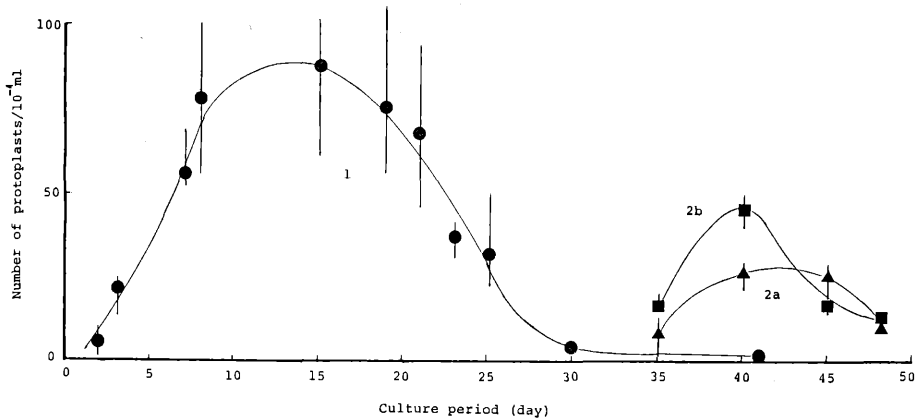


Fig. 3. Number of protoplasts from callus in the first and second passages of subculture 1; callus in the first subculture on modified MS medium. 2a; callus in the second subculture on modified MS after 25 days of the first subculture. 2b; callus in the second subculture on modified MS upon addition of DTT (2.0 mM) after 25 days of the first subculture.

るみ (loosening) が生じ、また、セルラーゼ活性が増大したのではないかと考えられる (Wright, 1985)。

一方、サイトカニンも単独あるいはオーキシンと協調的に何らかの形で細胞壁に働いていると思われるが、これについては明らかでない。

また、葉身を試料とした場合とカルスを試料とした場合で、プロトプラストの単離に対する添加ホルモンの最適濃度が異なるのは、細胞壁組成の違いや内生ホルモン濃度の違い等によることが考えられ、組織器官によって、効果のある植物ホルモン濃度が異なるものと推測される。

継代初代培養20日目あたりからプロトプラストの収量が急激に減少し、そして、カルスの色調が、この時期から茶褐色を示したことからみて、カルスの褐変化によりプロトプラストの単離が阻害され、プロトプラスト収量が減少するのではないかと推測される。そして、カルスの褐変化はポリフェノール系物質の酸化に起因する (岡・大山, 1976) とされており、桑カルスにもこうした反応系の基質や酵素が含まれていると考えられる。そこで、プロトプラスト単離において、単離酵素液の褐変化防止にしばしば使われる DTT (齊藤, 1976, 1978, 1984) を継代2代目培地に添加したところ、DTT 無添加の培地で培養したカルスに比べ、約2倍の収量が得られた。このことからみて DTT はカルスの褐変化防止に働き、プロトプラストの収量に好影響を与えたものであろう。

また、継代初代培養のカルスからのプロトプラストは継代後7日~20日ごろに多く単離するのであるが、30日前後からはほとんど単離しなくなる (Fig. 3-1)。しかし、継代初代培養のカルスを25日目で継代することにより、再びプロトプラストの単離が見られた (Fig. 3-2a)。このことは、培地交換 (継代培養) することにより、新しいカルス組織が出現、増殖し、その組織の健全なプロトプラストが単離しだしたものと考えられる。しかし、継代2代目のカルスは継代初代培養のカルスに比べ、その収量はほぼ1/3から1/2と少なく、従って、大量のプロトプラストを得るにはできるだけ継代初代培養のカルスを用いるのが望ましいと言えよう。なお、得られたプロトプラストが分裂能力、分化能力を維持しているかどうかについては今後の重要な問題点であり、更に検討する必要があると考えている。

## 文 献

- 大山勝夫・岡 成美 (1975) : 日作紀, 44, 121-122.  
 岡 成美・大山勝夫 (1976) : 日蚕雑, 45, 385-391.  
 齊藤 明 (1976) : 日林誌, 58, 301-305.  
 齊藤 明 (1978) : 組織培養, 4(3), 271-279.  
 齊藤 明 (1984) : 昭和59年度日本農学大会シンポジウム講演要旨, 15-24.  
 WRIGHT, D. C. (1985) : Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, 95-100.  
 矢沢盈男 (1985) : 日蚕講要, (55), 18.