

リンゴのプロトプラスト単離条件と培養

小野田 和 夫・榎 本 末 男*

(岩手県園芸試験場・*農業生物資源研究所)

Protoplast Isolation from Apple Scion Varieties and It's Culture

Kazuo ONODA and Suelo ENOMOTO*

(Iwate Horticultural Experiment Station・*National Institute. of Agrobiological Resources)

1 はじめに

リンゴの品種のプロトプラストからの再分化は、成功例が少なく、安定した再分化系の開発が待たれている。ここでは培養系の葉を用いて、好適なプロトプラストの単離条件及び再分化のための培地を検討した。

2 材料及び方法

(1) プロトプラスト単離における酵素の種類、濃度及び処理法の検討

1.0mg/1 BAを含むMS個体培地で培養している、王林の展葉7~10日後の葉を用いた。CPW13Mで3時間浸漬の前処理を行った後、0.7Mマンニトールに溶解した表1に示す酵素液により、25°C 3時間、80rpmで水平旋回振とうし、酵素の種類、濃度を検討した。

また、表2に示す処理により、前処理の有無及び酵素の低濃度長時間処理を検討した。

表1 供試酵素の組合せ

酵 素	①液	②液	③液	④液
セルラーゼR-10	2.0%	1.0%	2.0%	2.0%
ペクトリアーゼY-23	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
マセロザイムR-10	-	-	0.5%	0.5%
ドリセラゼ	-	-	1.0%	2.0%

表2 処理法

処理 前処理		
① CPW13M 3時間	2.0%セルラーゼR-10 0.1%ペクトリアーゼY-23	5時間振とう
② 無し	同上	同上
③ 無し	1.0%セルラーゼR-10 0.1%ペクトリアーゼY-23	13時間静置 3時間振とう

(2) 葉の齢及び培養中の光強度の影響

王林及びガラの培養系の、①未展葉~展葉直後、②展葉後1週間、③展葉後2週間、④展葉後4週間の各ステージの葉を供試し、葉の齢の影響をみた。また、光強度の影響については、2000lx及び1000lxの光条件下で育成した両品種の、展葉1週間後の葉を供試した。

酵素は1.0%セルラーゼR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23を用い、25°C13時間静置後3時間80rpmで水平旋回振とうした。

(3) 培養細胞からのプロトプラスト単離及び精製

王林及びガラの葉を約1mm幅に裁断し、2mg/1 NAA、1.0mg/1 2,4-D及び0.2mg/1 カイネチンを含むMS液体培地を用い、110rpmで水平旋回振とう培養してカルスを誘導すると共に、細胞懸濁液を得た。以後約4週間ごとに継代培養し、単離には継代2週間後の懸濁液を使用した。酵素は試験-1と同じ4種を用い、細胞懸濁液を150×g、5分間遠沈した後、ペレット状の細胞約0.2mlを酵素液6mlに浮遊し、3時間80rpmで振とう培養した。

(4) プロトプラスト培養のための培地の検討

品種ガラ及び王林の培養系の展葉1週間前後の葉から単離したプロトプラストを用いた。

ガラでは30g/1グルコースを含むMS培地に、0.2~0.5mg/1 BA、2mg/1 NAA、1mg/1 2,4-D、10mg/1 カザミノ酸及び5mMグルタミン酸を組み合わせた培地4種、K8P培地、更にK8P培地のゼアチンを0.1~0.5mg/1 BAに変更した培地3種の計8種の培地で培養を行った。

王林では、K8P培地及びK8P培地のゼアチンを0.1~0.5mg/1 BA又は0.1~0.5mg/1 4-PUに、NAAを0.2~2.0mg/1 IBAに変更した培地13種、硝酸アンモニウムと塩化カルシウムをそれぞれ200mg/1、半量に減じて0.1~0.5mg/1 4-PUと0.2~2.0mg/1 IBAを組合せた修正MS培地9種、及びアンモニア態チッソを除いて0.5~1.0mg/1 BA、1mg/1 MAA、1mg/1 IBA及び5~10mg/1 カザミノ酸を組合せた修正MS培地6種の、計29種の培地でのコロニー形成を検討した。プロトプラスト濃度は 1×10^5 とし、1.6mlを30mmシャーレで培養した。培養温度は25°Cとし、暗黒条件下においた。

3 結果及び考察

酵素の種類では、2.0%セルラーゼR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23の組合せでプロトプラスト単離量が多く、マセロザイムやドリセラゼの併用は必要がなかった。CPW13Mによる前処理は処理中に褐変が生じ、プロトプラスト単離量も減ることから不用と思われた。1.0%セルラーゼR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23での13時間静置後3時間振とう処理は単離量が多く、遊離細胞に占める

プロトプラストの割合も高かった。この処理によって単離したプロトプラストのFDA活性テストは、94%が生細胞であることを示した。

表3 酵素の種類とプロトプラスト収量

酵素液	収量 ^a
①	19.0
②	5.1
③	9.7
④	16.0

注. a: 収量の単位は 10^6 個/g
b: 単離率は全遊離細胞に占めるプロトプラストの割合(%). 以下の表も同様。

表4 前処理の有無及び処理法の違い

処理法	収量 ^a	単離率 ^b
①	3.5	29.2
②	11.0	61.1
③	11.0	91.7

葉の齢では、展葉後1週間の葉が、収量及びプロトプラスト形成率が高く、最も良く単離できた。展葉2週間後の葉では、収量、形成率ともにやや劣り、4週間後の葉では、細胞の分離は多いものの、プロトプラストの単離率は極めて劣った。

培養系の光強度の影響は、2000lxに対して1000lxで生育した葉での収率が高かった。

表5 葉の齢の違いの影響

葉の齢	王林		ガラ	
	収量 ^a	単離率 ^b	収量 ^a	単離率 ^b
未展葉~直後	—	—	5.7	30.6
展葉1週間後	60.4	95.7	15.4	96.3
展葉2週間後	6.9	85.1	9.3	72.3
展葉4週間後	17.3	18.6	3.7	1.8

表6 材料育成中の光強度の影響

光強度	王林		ガラ	
	収量 ^a	単離率 ^b	収量 ^a	単離率 ^b
2000 lx	6.9	85.1	9.3	72.3
1000 lx	19.1	98.5	6.3	87.0

これらから、培養系の葉を用いてプロトプラストを単離する場合は、1000lx程度の弱光下で育成した展葉後1週間程度の葉を材料とし、1.0%セルラーゼR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23による13時間静置後3時間振とう処理で、活性のあるプロトプラストが高率に得られることが判明した。

細胞懸濁液からの単離程度は、8~23%と極めて低率であった。酵素の種類による違いは判然としなかった。しかし、得られた粗プロトプラスト溶液をFicollを用いて密度勾配遠心したところ、プロトプラストは5%Ficoll

の上層に集まり、86%に精製することができた。

プロトプラスト培養では、8種類の培地を供試した品種ガラにおいては、8P基礎培地に0.1~0.5mg/1 BA、1.0mg/1 NAB及び0.2mg/1 2.4-Dを加えた培地

表7 細胞懸濁液からの単離

酵素液	収量 ^a	単離率 ^b
①	1.0	11.8
②	2.5	20.8
③	0.5	8.3
④	2.0	22.7

表8 粗プロトプラストの精製

Ficoll 濃度 (%)	単離率 ^b
5.0	86.1
7.5	22.5
10.0	2.0
12.5	1.9

でのコロニー形成が良好であった。培養37日後には20~40細胞のコロニーに生長したが、以後カルスは生長しなかった。

29種の培地を供試した品種王林では、培養後3~4日後には分裂が認められた。8P培地や、硝酸アンモニア及び塩化カルシウムを減じた修正MS培地に比較して、アンモニア態チッソを含まない修正MS培地(1.0mg/1 BA、1.0mg/1 NAA、0~1.0mg/1 IBA及び5~10mg/1 カザミノ酸を含む)が比較的良好であり、培養19日後には20~30細胞のコロニーとなった。しかしカルスの形成には至らなかった。

リングプロトプラストからの再分化の報告は極めて少ないが、台木と穂品種の違い、あるいは品種間でも適する培地及びホルモン組成が異なるとされている。また、カザミノ酸やビタミンB群は必須であるとしている等、今後培地の追加法も含めて検討する必要がある。

4 摘 要

1) 培養系の葉を用いてプロトプラストを単離する場合は、1000lx程度の弱光下で育成した展葉後1週間程度の葉を材料とし、1.0%セルラーゼR-10、0.1%ペクトリアーゼY-23による13時間静置後3時間振とう処理で、活性のあるプロトプラストが高率に得られた。

2) 細胞懸濁液からの単離は低率であったが、粗プロトプラスト溶液をFicollを用いた密度勾配遠心により、精製することができた。

3) プロトプラスト培養では、ガラは8P基礎培地に0.1~0.5mg/1 BA、1.0mg/1 NAA及び0.2mg/1 2.4-Dを加えた培地でのコロニー形成が良好であり、王林ではアンモニア態チッソを除いた修正MS培地(1.0mg/1 BA、1.0mg/1 NAA、0~1.0mg/1 IBA及び5~10mg/1 カザミノ酸を含む)が良好であったが、いずれもカルス形成には至らなかった。