

ラッカセイ葉肉細胞由来カルスからの根の形成

臼井 英夫¹・福島 一永²・上田由美子³

¹ 三重大学生物資源学部, ² 高田高等学校, ³ 城南小学校

Root formation *via* calli derived from mesophyll cells of peanut (*Arachis hypogaea*)

Hideo USUI¹*, Kazunaga FUKUSHIMA² and Yumiko UEDA³

¹ Faculty of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

² Takada High School, 2843 Isshinden, Tsu, Mie 514-0114, Japan

³ Jonan Elementary School, 261-1 Izumi, Kuwana, Mie 511-0838, Japan

Abstract

2-3 × 10⁶ mesophyll cells could be isolated enzymatically from mature leaves of 10 peanut varieties (*Arachis hypogaea* cv. Chiba No. 43, Chiba handachi, Jawa No. 13, Hotaku churyu, Nakateyutaka, Kanto No.56, Chiba shoryu, Enomame, T. M. V.-3, Krapovickas-I). The cells divided, grew actively on a solid, modified NT medium (1) (3.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA, no osmoticum) and formed calli after 3 weeks of culture.

The calli were transplanted on MS solid media (2) (0.5 or 2.0 mg/l 2,4-D and 0.01, 0.15 or 2.25 mg/l kinetin). Some roots were regenerated from the calli of *Arachis hypogaea* cv. Chiba handachi on medium (2) containing 2.00 mg/l 2,4-D and 0.01 or 0.15 mg/l kinetin within 4 weeks of culture. Differences in growth activities of mesophyll cells and root formation from their calli among 10 peanut varieties were discussed.

Key Words: root formation, mesophyll cells, *Arachis hypogaea*, osmoticum, plant hormones

略語 & 略記

BA: 6-Benzylaminopurine

2, 4-D: 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid

FDA: 4-Fluorescein diacetate

MS¹⁾: Murashige & Skoog's inorganic substances

NAA: α -Naphthaleneacetic acid

NT²⁾: Nagata & Takebe's inorganic substances

I. 緒 言

Skoog & Miller³⁾が培地中のオーキシンとサイトカイニンの比率によりタバコ髓カルスからの器官分化が制御できることを報告して以来、現在までに多くの高等植物で、その細胞やプロトプラストからカルスを経て個体再生の系が確立されてきた^{2,4)}。これら遊離細胞から個体再生までの系を確立することは、形質発現や形態形成についての機構を解析する上で大変重要である。

2006年3月10日受理

¹ 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577

² 〒514-0114 三重県津市一身田2843

³ 〒511-0838 三重県桑名市和泉269-1

* For correspondence (e-mail: usui@bio.mie-u.ac.jp)

特に、重要な作物において、個体再生系を確立することは、遺伝子導入による品種改良と共に、育種技術には必須のものとなるであろう。

なかでも、重要な油脂作物であるマメ科植物のラッカセイは、多くの研究者によって細胞からの個体再生系の確立が試みられてきた。Joshi & Ball⁵⁾はメスで機械的に遊離した葉肉細胞の分裂・増殖を初めて行った。また、Mroginski ら⁶⁾は子葉から得られたカルスからの根の分化を、Bajaj ら⁷⁾は花粉からカルスを形成させ、さらに器官を経て個体を再生させた。Oelck ら⁸⁾は、葉肉細胞プロトプラストからのカルス形成を報告した。内野井⁹⁾は酵素的に遊離した葉肉細胞の分裂・増殖条件を検討した。また、Venkatachalam ら¹⁰⁾は未熟胚からのカルス形成を経て個体再生を行った。しかし、今までのところ、大量の材料を得ることのできる成熟葉からの細胞やプロトプラストを起源としての個体再生系の確立の報告はない。

本実験では、蘚類糸状体プロトプラストにおいて、培地の浸透圧が低い方が細胞壁再生後の細胞の成長が速い¹¹⁾ことに着目して、酵素的に大量に遊離できるラッカセイ葉肉細胞の分裂・増殖において、浸透圧調整剤の効果、細胞密度の効果、増殖やカルスからの根の分化における品種間差異などについて新しい知見を得たのでここに報告する。

II. 実験材料と方法

実験材料

本大学のガラス室で栽培したラッカセイ (*Arachis hypogaea*) の 10 品種 (千葉 43 号, 千葉半立, ジャワ 13 号, 飽託中粒, ナカテユタカ, 関東 56 号, 千葉小粒, 鴛鴦豆, T. M. V. -3, Krapovickas-I) の播種後 3-4 カ月目の個体からの成熟葉を用いた。なお、特に記載のない場合は、材料として関東 56 号を用いた。

方法

葉の表面殺菌

濃緑色のラッカセイの葉を 4-6 枚、葉柄の付け根から切り取り、水道水で汚れを落とす。葉柄部分を 70% (v/v) エタノールを含ませた脱脂綿で拭き、次に殺菌溶液 [0.30% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム (旭薬品工業所発売) 溶液に 0.005% (w/v) ライボン F (ライオン株式会社発売の中性洗剤) を加えたもの] に 10 分間浸した。その際、殺菌を確実にするために、殺菌溶液

でぬらした脱脂綿で葉の表面を強くこすり、気泡を除いた。その後、殺菌溶液を取り除くため無菌水で 3 回洗浄した。

葉片の酵素処理

解剖バサミを用いて、小葉の長径に対し直角に約 1 mm の幅で切り、1 枚の小葉で 30-40 枚の切片を作り、4 枚の小葉で計 100-120 枚の切片を切り取り、100 ml の三角フラスコに入れた。この三角フラスコには予め 12 ml の酵素液 (Table 1) を入れておいた。また、フラスコの口には中央に約 5 mm の穴を開け、この穴にも木綿綿を詰めたシリコン栓を用い (この穴を通して空気の流通をさせ、後述の真空浸透を行った)、その上を二重のアルミニウム フォイルで覆った。

このフラスコを真空ポンプで約 60 秒間、1-2 回真空浸透した。次に、このフラスコを 35°C で振幅 2 cm, 1 分間 120 回の往復振盪器に置き、10 分間処理した。遊離してきた細胞や破壊された細胞破片を含む酵素液を捨て、同じ組成の酵素液 10 ml をフラスコに入れ、再び上記と同じ条件で往復振盪器で 20 分間処理した。遊離してきた葉肉細胞を含む酵素液をステンレス メッシュ (孔径 50 μ m) で濾過し、10 ml のスピッツ遠心管に入れた。この遠心管を氷水の入ったビーカーに入れ、酵素反応の進行を止めた。100 ml のフラスコに残った葉片に再び 10 ml の酵素液を加え、さらに上記と同じ条件で往復振盪器で 20 分間処理した。そして、上記と同様に葉肉細胞を含む酵素液をステンレス メッシュ (孔径 50 μ m) で濾過し、10 ml のスピッツ遠心管に入れた。
真空浸透: 葉切片を入れたフラスコ内を真空ポンプで減圧して葉の組織内の細胞間隙にある空気を一旦追い出し、再び常圧に戻し細胞間隙に酵素液をしみ込ませ、組織の内と外から酵素を効果的に作用させる。

Table 1 Compositions of enzyme solution.

Macerozyme R-10	0.20% (w/v)
Driselase	0.50% (w/v)
Cellulase "onozuka" R-10	1.00% (w/v)
Mannitol	0-0.60 (M)
pH: 5.50	

遊離葉肉細胞の洗浄と培地への散布

酵素処理 2 回目と 3 回目の葉肉細胞懸濁液を一緒にし、 $140 \times g$ で 90 秒間遠心分離した。上澄み液を捨て、medium (1) (Table 2) を加えて駒込ピペットで攪拌した後、 $140 \times g$ で 60 秒間遠心した。同様な洗浄と遠心をさらに 2 回行った。

このようにして得られた遊離葉肉細胞の数滴を希釈して、その総個数を数えることで全細胞数を概算した。ラッカセイの成熟した 1 枚の葉（茎の先端から 5~8 枚目の葉）から約 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の遊離細胞が得られたが、通常の実験では 2 枚の成熟葉から約 500 万個が遊離できた。総細胞数から培地への散布細胞数を概算し、洗浄終了後の沈殿された細胞に適度な量の培地を加え、細胞懸濁液を培地上へ散布した。ラッカセイ葉肉細胞の入った 30 ml 三角フラスコは、恒温器内 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 20 w 白色蛍光灯下, 約 5,000 lux) に静置した。

葉の表面殺菌、葉片の酵素処理、及び遊離葉肉細胞の洗浄、地への散布の操作はすべて無菌条件下で行った。

遊離葉肉細胞の成長は 1 つの実験につき 3 フラスコを用い、フラスコ当たり 300 個以上の細胞、あるいはコロニーを観察して全コロニー中の各細胞の割合を算出した。この実験を 3~5 回繰り返して、その平均値をグラフに示

した。また、カルスからの根の形成 (Table 3) については、供試品種当たり、20 個以上のフラスコでの結果をまとめた。

遊離葉肉細胞の培養時の生死の判定

Kadota & Wada の方法¹²⁾により、FDA 染色後の蛍光顕微鏡による U 励起で黄緑色の蛍光を発する細胞を生細胞とし、全細胞中の生細胞のパーセントを生存率とした。

III. 結果と考察

予備実験

内野井⁹⁾は、遊離直後のラッカセイ葉肉細胞を 2,4-D (1.0 mg/l) と Kinetin (0.1 mg/l) を含む培地上で 1 週間培養した後に NAA と BA を含む培地に植継いでいるが、我々が植物ホルモンの種類と濃度のいくつかを試した結果、最初から NAA と BA を含む培地 (Table 2) で遊離葉肉細胞を培養しても盛んに分裂・増殖することが分かった。

また、培地中の寒天の有無による細胞の成長についても予備的に検討した。7 日間の培養では細胞の生存率については差が見られなかった。しかし、液体培地では 75% ほどの細胞がふくらんで細胞の成長を示したのに対し、寒天を含む固形培地ではややふくらんだ細胞の数が 85% 近くになり、さらに数%の細胞は分裂をして 2 細胞になった。

浸透圧調整剤の有無について、Takebe ら¹³⁾は組織から酵素的に遊離されたタバコ葉肉細胞は、低浸透圧条件下ではきわめて不安定で傷つき易く、細胞内の葉緑体が破裂した様態を示しており、また、Usui & Takebe¹⁴⁾は酵素的に遊離したタバコ葉肉細胞を培養する際には、やや高張な浸透圧である 0.70 M のマンニトールを加えた培地中で培養して盛んな分裂を観察した。他方、Usui & Ito¹¹⁾は蘚類プロトプラストにおいて、培養後、細胞壁を再生した細胞では浸透圧調整剤として培地に入れたマンニトールの濃度が低い方が、分裂・増殖がより盛んであることを報告した。

酵素液及び培地の浸透圧の効果

上述の結果をヒントにして、 0.60 M のマンニトールを含む酵素液 (Table 1) で遊離したラッカセイ葉肉細胞を浸透圧調整剤として 0.44 M (マンニトール以外に糖としてショ糖を 2% 入れてあるので、糖の総計として 0.50 M)、 0.24 M (糖の総計 0.30 M)、 0.04 M (糖の総計 0.10 M)、 0 M (糖の総計 0.06 M) のマンニトールを

Table 2 Compositions of media.

	Medium(1)	Medium(2)
Inorganic substances	※NT ²⁾	※MS ¹⁾
Thiamine-HCl	1.0	10.0
Myo-inositol	100.0	100.0
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5	0.5
Casaminoacids	400.0	100.0
Saccharose	20,000.0	30,000.0
Mannitol(M)	0~0.6	0~0.6
Auxin	NAA 3.0	2,4-D 0~2.0
Cytokinin	BA 1.0	Kinetin 0.01~2.0
Agar	3,000.0	6,000.0

Concentration of all components were given in mg/l, except for mannitol (M).

※See 1) and 2) of References.

All media were adjusted to 5.80 (pH) before adding agar and autoclaving.

それぞれの培地に加えてラッカセイ葉肉細胞を8日間培養した。培養開始時に約80%の生存率の細胞はマンニトール0.24~0.44 Mでは、生存率60%以上を示したが、0 Mでは32%に減少した (Fig. 1)。他方、細胞分裂・増殖の割合を比較すると、培養4日間では0.44 Mマンニトールを含む培地でのみ、3細胞以上のものが無い。さらに、培養8日間での5細胞以上のコロニー形成を比べると、0.44 Mマンニトール存在下で57%、0.24 Mでは74%、0.04 Mでは86%、0 Mでは83%という結果

(Fig. 2) を示している。

この結果は、酵素液のマンニトール濃度 (0.60 M) から培地のマンニトール濃度へと急激に浸透圧を下げると生存率が大きく下がるが、生き残った細胞は盛んな成長を行うことを示している。つまり、培地の浸透圧の下げ方を工夫すれば、生存率はあまり下がらず、細胞の成長は盛んになるかも知れないことを示唆している。

そこで、酵素液と培地の浸透圧の差を少なくして遊離葉肉細胞に与えるショックをなるべく少なくすることを

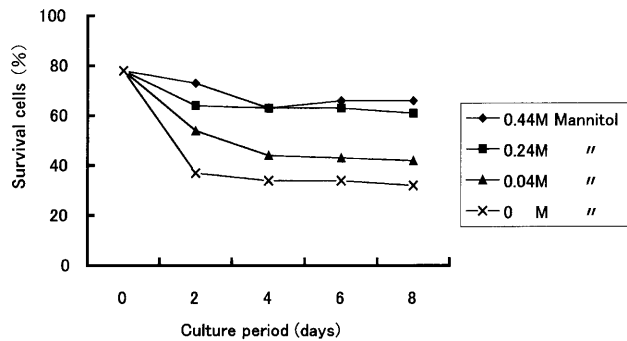


Fig. 1 Effect of mannitol concentrations (M) on survival of peanut mesophyll cells.

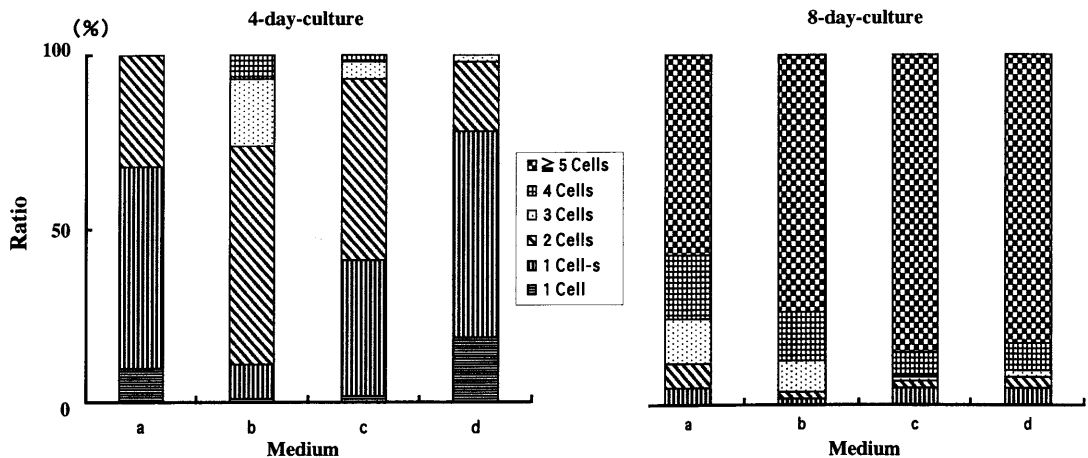


Fig. 2 Effect of mannitol concentrations on growth of peanut mesophyll cells.

Mannitol concentrations of a, b, c and d are 0.44, 0.24, 0.04 and 0 M in solid media (1), respectively.

1 Cell: no increase of cell volume and no cell division, 1 Cell-s: only increase of cell volume without cell division, 2 Cells: 2 cells after cell division, 3 Cells: 3 cells after cell division, 4 Cells: 4 cells after cell division, ≥ 5 Cells: more than 5 cells after cell division.

考えた。まず、マンニトール濃度をそれぞれ 0.60, 0.40, 0.20, あるいは 0 M とした 4 種類の酵素液でラッカセイ葉片を処理し、それぞれマンニトールを 0.60, 0.40, 0.20, あるいは 0 M 含む NT の無機塩類 (pH: 5.80) で 5 日間培養した。その結果、生存率において、マンニトールの濃度による差はほとんど無く、5 日間の培養での生存率の低下は 20% 以内であった。

次に、0.40, 0.20, 0 M のマンニトールをそれぞれ含む酵素液でラッカセイ葉片から葉肉細胞を遊離し、それらを 0.24 M のマンニトールを含む培地 [medium (1) in Table 2, 2% のショ糖を含むので糖の合計 0.30 M, 以下、同様に 2% ショ糖分として 0.06 M を加えたものが糖の合計モル数となる], 0.14 M, 0.04 M, あるいは 0 M (マンニトール) を含む培地に散布した (Fig. 3 a &

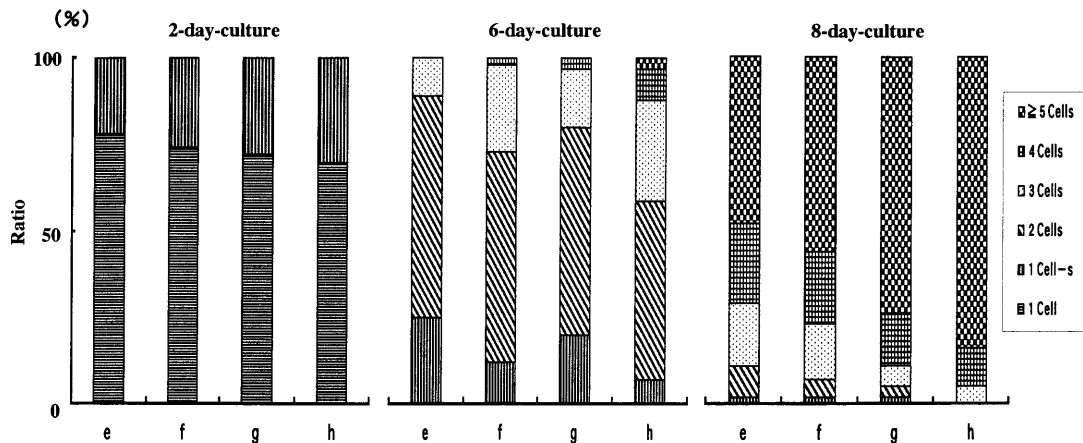


Fig. 3 a Effect of mannitol concentrations in enzyme solution and medium (1) on growth of peanut mesophyll cells.

Mannitol concentrations (M) in enzyme solution and medium (1): e=0.40 and 0.24, f=0.40 and 0.14, g=0.40 and 0.04, h=0.40 and 0.

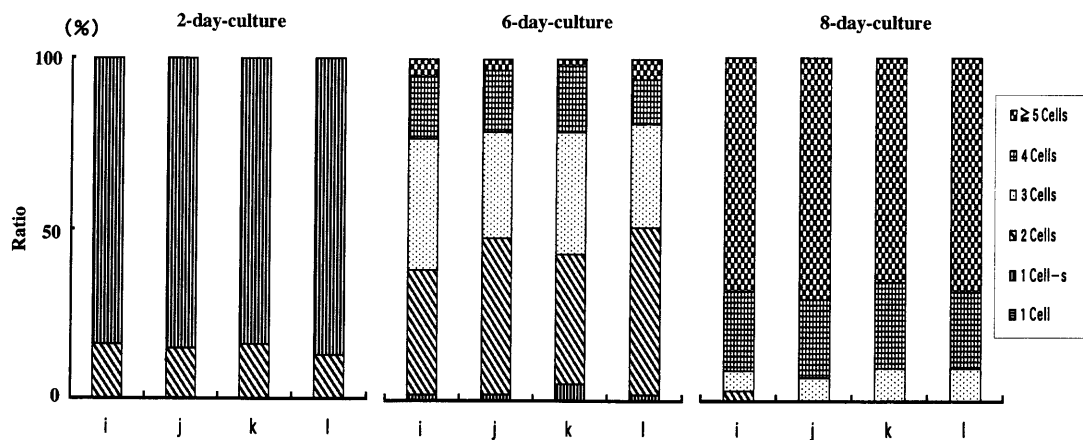


Fig. 3 b Effect of mannitol concentrations of enzyme solution and medium on growth of peanut mesophyll cells

Mannitol concentrations (M) of enzyme solution and medium (1): i=0.20 and 0.14, j=0.20 and 0.04, k: 0.20 and 0, l=0 and 0.

3 b)。8日間の培養で、いずれの培養条件でも葉肉細胞の生存率には差はなく、50~60%であった。しかし、0または0.20 Mのマンニトールを含む酵素液で遊離し、0~0.14 Mマンニトールを含む培地で培養した葉肉細胞の方が、0.40 Mのマンニトールを含む酵素液で遊離し、0~0.24 Mマンニトールを含む培地で培養したいずれの葉肉細胞よりふくらんだ（最初の成長の兆し）細胞が3倍近くであった（培養2日間）。培養6日間でも、培地のマンニトール濃度が低い方が成長がやや速かった。培養8日間では、0.40 Mのマンニトールを含む酵素液で遊離し、0または0.04 Mマンニトールを含む培地で培養した方が、0または0.2 Mのマンニトールを含む酵素液で遊離し、0~0.14 Mマンニトールを含む培地で培養した葉肉細胞の場合より5細胞以上のコロニーからなる割合がやや多かった。しかし、マンニトールを含まない酵素液で遊離した葉肉細胞を、マンニトールを含まない培地で盛んに分裂・増殖させることが可能となった。

細胞密度

酵素液及び培地の浸透圧も遊離細胞の分裂・増殖に大きな影響を与えるが、細胞密度も同様である。タバコ葉肉プロトプラストではその分裂・増殖に対し1 ml当たり1,000個以上の細胞を必要とする²⁾。そこで、浸透圧調整剤としてのマンニトールを含まない酵素液で組織から遊離し、同じくマンニトールを含まない培地（Table 2）で培養したラッカセイ葉肉細胞の分裂・増殖に対する必要な細胞密度を調べた（Fig. 4）。30 ml 三角フラスコに5 mlの固形培地〔medium (1), Table 2〕を入れ、

1ヶ所当たり25万個になるように3ヶ所に計75万個の遊離細胞を散布した（15万個/ml）。以下、同様にして1.5万個/ml, 1,500個/ml, 150個/mlの細胞密度で細胞を培養した。その結果、最低1.5万個/mlの細胞密度で盛んな分裂・増殖が得られた。

品種によるカルス増殖の違い

ラッカセイの10品種（千葉43号、千葉半立、ジャワ13号、飽託中粒、ナカテユタカ、関東56号、千葉小粒、鴛鴦豆、T.M.V.-3、Krapovickas-I）の成熟葉から、上述の方法で酵素的に葉肉細胞を遊離し、上述の培養条件でそれぞれ培養してそれらの分裂・増殖についての観察を行い、Fig. 5の結果を得た。この結果から、用いた品種の葉肉細胞はその増殖速度により3群に分けることができた。

増殖速度が速い品種…ナカテユタカ、関東56号、

T.M.V.-3

増殖速度が中間の品種…千葉43号、千葉半立、

ジャワ13号、鴛鴦豆

増殖速度が遅い品種…飽託中粒、千葉小粒、

Krapovickas-I

カルスからの根の分化の品種間差異

培地中のオーキシシンとサイトカイニンの比率によりタバコ髄カルスからの器官分化が制御されるとの報告¹⁵⁾を参考にして、予備実験的に、器官分化を促進する植物ホルモンの種類と濃度を検討した。すなわち、オーキシシン（濃度0~10 mg/l）としてIAA, NAA, 2,4-Dから1つ、サイトカイニン（濃度0~5 mg/l）としてKinetin, BA, Zeatinから1つの組み合わせで、全81通りの組み合わせ

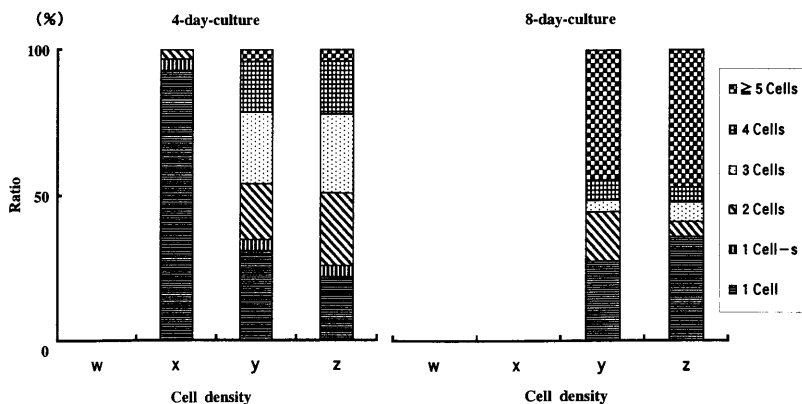


Fig. 4 Effect of cell density on growth of peanut mesophyll cells.

Cell density ($\times 10^5$ /ml) w=0.0015, x=0.0150, y=0.1500, z=1.5000

せの培養を試みた。そして、2,4-D と Kinetin の組み合わせで、根の分化が起こることが分かった。Table 2 の medium (1) で 4 週間培養後、得られたカルスを me-

dium (2) の組成で、6 通りの植物ホルモンを含む分化培地にそれぞれ植継いだ。その結果 (Table 3), 千葉 43 号, 千葉半立, 関東 56 号, Krapovickas-I のカルスから

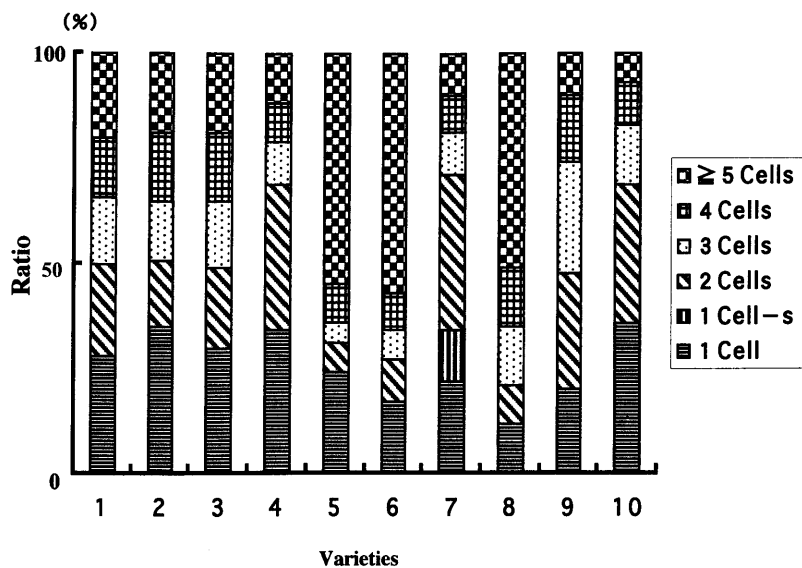


Fig. 5 Growth of peanut mesophyll cells from leaves of 10 varieties after 7-days-culture on medium (1).

1: Chiba No. 43, 2: Chiba handachi, 3: Jawa No. 13, 4: Hotaku churyu, 5: Nakateyutaka, 6: Kanto No. 56, 7: Chiba shoryu, 8: T. M. V.-3, 9: Enomame, 10: Krapovickas-I

Marks of 1 Cell et al show the same in Fig. 2 b.

Table 3 Variety differences in root formation from peanut calli on medium (2) with different combinations of plant hormones.

variety	plant hormones [Ⓞ]					
	m	n	o	r	s	t
1	-	-	-	±	±	-
2	-	-	-	++	+	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	±	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	±	-

Root formation -: no formation, ±: 1~10%, +: 11~30%, ++: 3~60%

No. of variety is the same of Fig. 5.

Plant hormones[Ⓞ] [kinetin(mg/l): 2, 4-D(mg/l)]

m=0.01: 0.50, n=0.15: 0.50, o=2.25: 0.50, r=0.01:2.00, s=0.15:2.00,

t=2.25: 2.00

根の分化が見られた。他の品種のカルスには器官分化は全く見られなかった。この表から、Kinetinの高濃度区(o, t)及び2,4-Dの低濃度(m, n, o)区では根の分化が起きないことが分かる。

ラッカセイ(品種千葉半立)葉肉細胞の培養時の形態変化

今までの浸透圧、細胞密度、植物ホルモンなどの検討結果を踏まえて、形態的变化を経時的に見るとFig. 6のようになる。浸透圧調整剤を含まない酵素液(Table 1)で遊離直後の葉肉細胞は、輪郭がはっきりした緑色の葉緑体を持っている(Fig. 6-a)。これらを浸透圧調整剤としてのマンニトールを含まないmedium (1)で培養すると、培養3日目には細胞はふくらみ、かつ葉緑体はやや黄緑色を呈する(Fig. 6-b)。培養5日目には細胞の形態は不均一になるが、50%以上が細胞分裂をした。他方、葉緑体はかなり緑色が褪せし、細胞当たりの数は減少する(Fig. 6-c)。さらに、培養期間が経つ(培養9日目)と、10細胞近くからなるコロニーを形成し、葉緑体は形態的に確認し難く、その色も全く褪せしてしまう(Fig. 6-d)。medium (1)で4週間培養後、2,4-D(2.00 mg/l)とKinetin(0.01 mg/l)を含むmedium (2)で約2週間培養すると根の分化が開始し、約1カ月で数センチの長さに伸長する(Fig. 6-e)。

以上の結果から、浸透圧調整剤としてのマンニトールの無い酵素液と培地を用いてもラッカセイ葉肉細胞は速い分裂・増殖をし、形成されたカルスから4品種で根の分化がみられた。しかし、葉肉細胞からのカルス増殖の速度は品種間でかなり差があり(Fig. 5)、3群に分けることができるが、カルス増殖速度と根の分化の有無には相関関係は見い出せない。カルスからの器官分化ではオーキシン/サイトカイニンの値が重要視される。タバコ髄カルスではこの値が大きいと根の形成が起り、中間値ではカルス増殖のまま、小さいと芽の分化が生じたとの報告¹³⁾に起因している。今回のラッカセイカルスでも、2,4-Dの濃度が低い場合(Table 3でのm, n, o)や、Kinetin濃度が高い場合(Table 3でo, t)には不定根は生じず、カルス増殖のみが起る。

しかし、同じ量の2,4-DやKinetinを与えても、品種により不定根が生ずる場合と、そうでない場合がある。これは品種によりカルス自身が生成する植物ホルモンの量が異なることが作用しているか、培地に与えた植物ホ

ルモンに対する品種間の感受性の違いがあるのかも知れない。

また、タバコ髄カルスで芽の分化が起こる(培地中の)サイトカイニンの濃度(最大5 mg/l)では、ラッカセイカルスでは何ら芽の分化の兆候は認められない。芽の分化に対して必要な(カルス自身が生産する)サイトカイニンの量が少ないのか、このホルモンに対する感受性の低さが原因かも知れない。葉肉細胞由来のラッカセイカルスでは種々のサイトカイニンの高濃度の量を培地に添加することも考慮する必要がある。オーキシンとサイトカイニンを与える時期やこれらの種類と濃度をさらに詳しく検討することによって、カルスからの芽の分化、さらには個体再生系の確立を目指したい。

ラッカセイで現在使用している酵素は粗酵素なので、細胞間物質のペクチンなどの分解にも効き、単にペクチナーゼ系のMacerozyme R-10のみを使用するよりも多くの葉肉細胞が遊離してくると考えられる。

ところで、酵素液にセルラーゼ(DriselaseとCellulase“onozuka”R-10)が含まれているのに、ラッカセイ成熟葉ではプロトプラストは遊離してこない。タバコ葉肉細胞のように細胞壁に効率的(Table 1の酵素液を使用すれば、タバコでは約1時間で葉肉細胞がプロトプラストになる。)には作用しない。逆に、細胞壁が残った状態で多くの細胞が遊離することと、酵素的細胞の遊離及びその後の細胞培養の際、浸透圧調整剤が必要でないことは関連がある。ちなみに、Takebeら¹³⁾が指摘したように、タバコでは葉肉細胞であっても(細胞壁を持っていた)、酵素的な細胞遊離及びその後の細胞培養¹⁴⁾の際、適度な濃度の浸透圧調整剤(一般的に、0.3~0.7 M程度のマンニトールやショ糖)は絶対必要である。もし無い場合は、即座に葉緑体の破裂などのダメージが起こることを実証している。

ラッカセイやアサガオ¹⁵⁾の葉肉細胞は、丈夫な細胞壁の存在(市販のセルラーゼでは細胞壁の主成分を分解してプロトプラストを得ることはきわめて困難である)により、低張液中でも成長を示す丈夫な細胞が得られる。

他方、マメ科植物での細胞(プロトプラストを含む)からの個体再生系確立は形質発現や形態形成を初めとして、育種の面でもきわめて重要である。ラッカセイでは、未成熟葉より得られたカルスから器官分化を経て個体分化をさせている¹⁰⁾。また、ダイズでは、未成熟葉の子葉

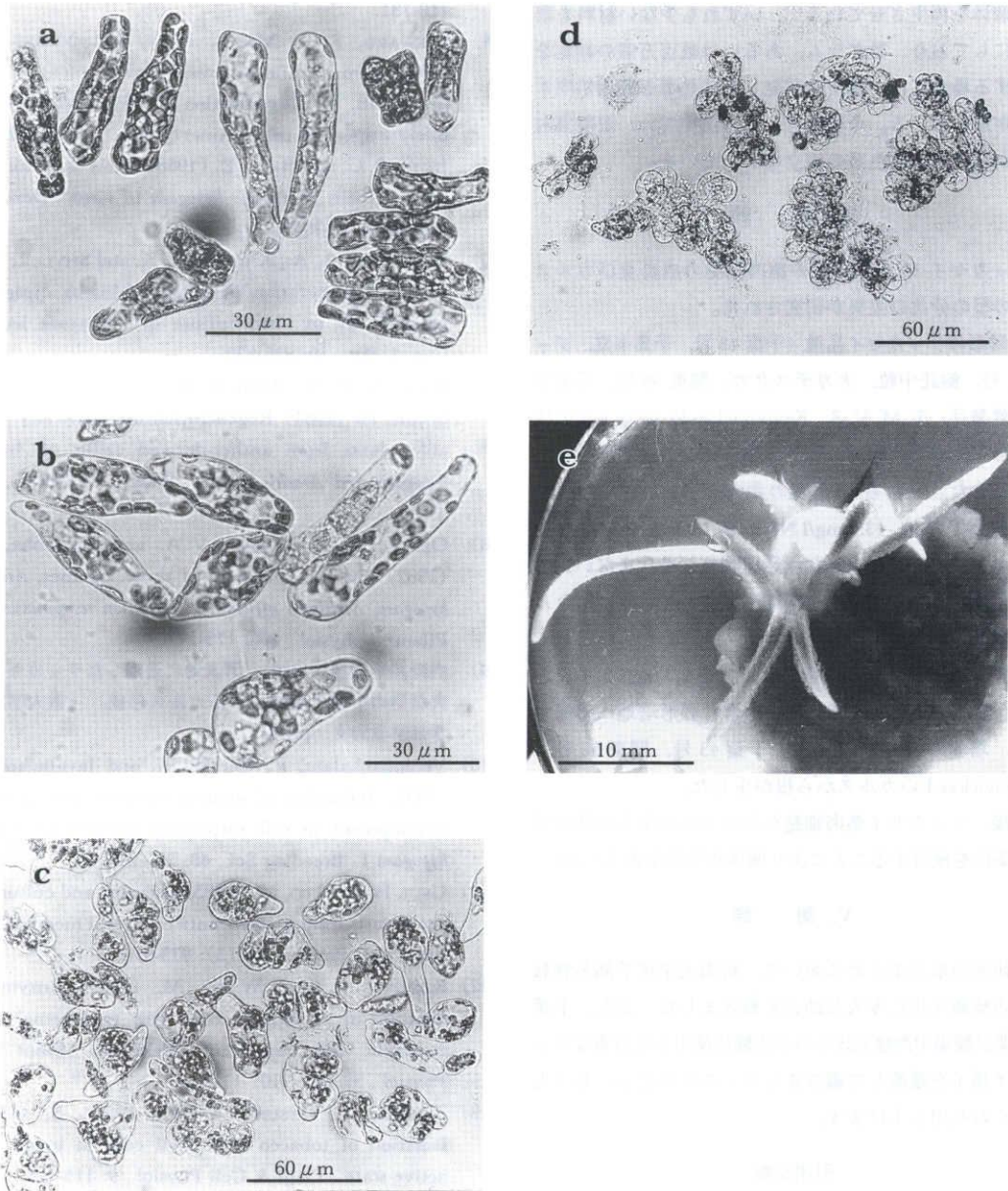


Fig. 6 Successive stages of root formation from peanut (cv. Chiba handachi) mesophyll cells cultured on a solid medium.

a: Mesophyll cells isolated from a leaf enzymatically, **b:** Mesophyll cells increasing their sizes on the 3rd day on medium (1), **c:** Cells undergoing the first cell division on the 5th day of culture, **d:** Cells undergoing successive cell divisions on the 9th day on medium (1), **e:** Root formation from callus on 5-weeks-incubation on medium (2).

を酵素処理して得られたプロトプラストからのカルスを経て個体を再生させている¹⁷⁾。いずれも少ない材料を出発点にしており、数グラム、あるいは数百万個の細胞を使用する場合には、我々が開発した成熟葉を酵素処理する方が適している。今回報告した方法を用い、遊離葉肉細胞からの個体再生系の確立を急いでいる。

IV. 要 約

ラッカセイ 10 品種間での葉肉細胞の成長及びカルスからの根の分化の差異が研究された。

10 種類のラッカセイ品種 (千葉 43 号, 千葉半立, ジャワ 13 号, 飽託中粒, ナカテユタカ, 関東 56 号, 千葉小粒, 鴛鴦豆, T. M. V.-3, Krapovickas-I) の各 1 枚の成熟葉から酵素的に約 300 万個の葉肉細胞を遊離させることができた。これら 10 品種の葉肉細胞はいずれも固形の修正 NT 培地 (3.0 mg/l NAA と 1.0 mg/l BA を含むが, マンニトールのような浸透圧調整剤を含まない) で培養可能となり, 分裂・増殖後, 培養 3 週間後にはカルスを形成した。

培養 4 週間後に, これらのカルスを 2.0 mg/l 2, 4-D と 0.01, または 0.15 mg/l Kinetin を含む固形培地へ移植すると, 培養 4 週間で千葉半立, 千葉 43 号, 関東 56 号, Krapovickas-I のカルスから根が生じた。

今後, ラッカセイ葉肉細胞からのカルスからの芽の分化の条件を検討することにより個体再生系を確立したい。

V. 謝 辞

本研究の取りまとめにおいて, 新潟大学理学部名誉教授の古橋勝久氏に多大な助言を戴きました。また, 千葉県農業試験場中西建夫氏から本実験に使用した貴重なラッカセイ種子を譲渡して戴きました。ここに記し, お二人に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479.
- NAGATA, T. and TAKEBE, I. (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, **99**: 12-20.
- SKOOG, M. and MILLER, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 118-131.
- STEWART, F. C., MAPES, M. O. and MEARS, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, **45**: 705-708.
- JOSHI, P. C. and BALL, E. (1968) Growth of isolated palisade cells of *Arachis hypogaea* in vitro. *Develop. Biology*, **17**: 308-325.
- MROGINSKI, L. A., KARTHA, K. K. and SHYLUK, J. P. (1980) Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by in vitro culture of immature leaves. *Can. J. Bot.*, **59**: 826-830.
- BAJAJ, Y. P. S., RAM, A. K., LABANA, K. S. and SINGH, H. (1981) Regeneration of genetically variable plants from anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. *Plant Sci. Letters*, **23**: 35-39.
- OELCK, M. M., BAPAT, V. A. and SCHIEDER, O. (1982) Protoplast culture of three legumes, *Arachis hypogaea*, *Melilotus officinalis*, *Trifolium resupinatum* Z. *Pflanzen-physiol.*, **106**: 173-177.
- 内野井千登世 (1985): 酵素的に遊離したラッカセイ葉肉細胞の分裂・増殖によるカルス形成, 三重大学教育学部卒業論文, p.1-41.
- Venkatachalam, P., Geetha, N. and Jayabalan, N. (1998) Induction of somatic embryos and plantlet development in cell suspension cultures of *Arachis hypogaea* L. *Breeding Sci.*, **48**: 231-236.
- USUI, H. and ITO, M. (1985) Isolation and culture of protoplasts from protonemata of several moss species. *Plant Cell Physiol.*, **26** (5): 973-976.
- KADOTA, A. and WADA, M. (1989) Enzymatic isolation of protoplasts from fern protonemal cells stainable with fluorescent brightener. *Plant Cell Physiol.*, **30** (8): 1107-1113.
- TAKEBE, I., OTSUKI, Y. and AOKI, S. (1968) Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant & Cell Physiol.*, **9**: 115-124.
- USUI, H. and TAKEBE, I. (1969) Division and growth of single cells isolated enzymatically from tobacco leaves. *Develop. Growth and Differentiation*, **11** (2): 143-151.
- LINSMAIER, E. U. and SKOOG, F. (1965) Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol., Plant*, **18**: 100-127.
- 白井英夫・東田朋子・森田妃美子 (2005): アサガオ

(*Ipomoea nil*) 品種, ムラサキの葉肉細胞由来のカルスからの胚様体形成, 三重大学フィールドサイエンス研究・技術年報, 2・3号併号: 1-8.

17) WEI, Z. H. and XU, Z. H. (1988) Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) Plant Cell Rep., 7: 348-351.