

プロトプラストの教材化に関する基礎的研究 III*

—身近な自然から採集される植物のプロトプラストの単離について—

楠元 守**

神奈川県立教育センター

A Basic Research on Making Teaching Materials of Protoplast

—The Isolation of Protoplasts from the
Plants Collected in the Immediate Nature—

Mamoru KUSUMOTO

KANAGAWA PREFECTURAL EDUCATION CENTER

SUMMARY

For the effective observation of protoplasts, experiments were made about the kinds of plants to collect in the immediate nature, the pick-off position of leaves, the material, and the appropriate season, and so forth. The conclusion is as follows :

1. As to *Erigeron sumatraensis*, *E. annuus*, *Taraxacum officinale*, the younger the leaves, the better was the isolation. And the isolation of protoplasts was more successful from winter leaves than from summer leaves.

2. As to *Lamium amplexicaule*, *Ajuga decumbens*, *E. philadelphicus*, *Brassica juncea* and *Vormica percica*, extremely good was the isolation of protoplasts, and rather good with the following plants : *E. annuus*, *Oenanthe stolonifera*, *Capsella Bursa-postoris*, *Lapsana humilis* and *Saxifraga stolonifera*.

3. As to *E. philadelphicus* and *E. annuus*, these are obtainable in the immediate nature all the year round, and as the isolation of protoplasts is easy from these plants, they are recommended for the ideal teaching materials to observe protoplasts.

はじめに

プロトプラストに関する研究は、近年著しく進展^{2,10,11)}し、細胞融合による体細胞雑種植物や遺伝子

の取込みによる新形質植物の育成等が、バイオテクノロジーという言葉とともにマスコミでも大きく取り扱われるようになった。現代社会の大きな話題の一つであるプロトプラストを生徒に実際に観察させることは、生物学に対する生徒の興味・関心を高めるとともに、生命の基本単位としての細胞についての理解を深めることができるものと考えられる。

1992年3月20日受理

*本研究の概要は昭和60年度日本生物教育学会で口頭発表した。

**現在、神奈川県立厚木高等学校

筆者ら^{3,4)}は、すでにプロトプラストの教材化のために、材料となる植物の種類、酵素の種類および濃度、酵素処理時の裏表皮の有無、吸引処理、植物が育っていた環境等について実験し、それらの結果の検討から、50分間の授業でもプロトプラストの単離・観察が可能であることを報告したが、今回は、教材化という視点から、身近かな自然で容易に採集される野生植物について、種によるプロトプラストの単離の難易、季節や供試部位の違いがプロトプラストの単離に及ぼす影響等について実験を行った。

材料および方法

1) 供試材料

供試材料は、県立教育センター近くの休耕地およびその周辺に自然に生えていたもので、それらのうち日のよく当たる場所のものを選んで採集した。

供試材料は、材料の採取位置(高さ)とプロトプラストの単離との関係を明らかにするために、夏(7月11日)に採集したものと、プロトプラストの単離に季節がどのように関係しているかを明らかにするために冬(12月18日)にロゼット状の株から採集したものをを用いた。

供試した種は、ハルジオン(*Erigeron philadelphicus*)、ノボロギク(*Senecio vulgaris*)、ノゲシ(*Sonchus oleraceus*)、ヨメナ(*Aster yomena*)、オオアレチノギク(*Erigeron sumatrensis*)、ヒメジオン(*Erigeron annuus*)、ホトケノザ(*Lamium amplexicaule*)、セイヨウタンポポ(*Taraxacum officinale*)、キランソウ(*Ajuga decumbens*)、セイヨウカラシナ(*Brassica juncea*)、オオイヌノフグリ(*Vormica percula*)、セリ(*Oenanthe stolonifera*)、ナズナ(*Capsella Bursa-pastoris*)、タバシラコ(*Lapsana humilis*)、ユキノシタ(*Saxifraga stolonifera*)、ヨモギ(*Asteris vulgaris* var *indica*)、セイタカアワダチソウ(*Solidago serotina*)、カキドオシ(*Glechoma hederacea*)、スイバ(*Rumex Acetosella*)、ムシトリナデシコ(*Silene Armeria*)、ハコベ(*Stellaria media*)、ウシハコベ(*Stellaria acutata*)、オランダミミナグサ(*Cerastium viscosum*)、ムラサキカタバミ(*Oxalis martiana*)の24種であった。種の学名は、牧野⁹⁾および石戸¹⁾によった。

オオアレチノギクは、夏には高さ70cmの未開花株を用い、冬にはロゼット状の葉を用いた。

ヒメジオンでは、夏は最初の花がつぼみの状態で高さが21cmの未開花株と、高さ96cmの開花株、および、冬のロゼット葉を用いた。セイヨウタンポポでは、夏の株の外側・中間・内側の葉、および、冬のロゼット葉の中位のものを用いた。その他の種は、冬だけの実験で、同一個体の中位の大きさの葉を供試した。

2) 材料の処理

プロトプラストの単離に用いる葉は、これまで酵素処理を容易にするために、葉の裏側の表皮をはがすという前処理を行ってから酵素液に入れていた。しかし、裏表皮をはがれにくい種も多く、はがれやすい種でも、裏表皮をはがすのは容易ではない。

筆者⁶⁾は、単子葉植物の裏表皮の極めてはがれにくい種から、簡単にプロトプラストを得る方法として、葉脈に直角に切って2mm幅の切片を作ってから酵素処理をすることを報告した。本研究の供試材料は双子葉植物であるが、予備実験によって単子葉植物と同様に2mm幅の切片を作ることによって容易にプロトプラストを単離することができたので、本実験でも単子葉植物と同様の方法を用いた。

すなわち、採集した材料をよく水洗いして布で水分を除き、大きい葉脈のある材料では主脈を切り取り、葉の中央部を利用するように切り揃えた。これを葉脈がほぼ同一方向になるように重ね、よく切れる安全カミソリで、葉脈に直角になるように切片を作った。双子葉植物は平行脈ではないので、必ずしも葉脈と直角にはならないが、全体的にみてもできるだけ主葉脈に直角に近いように心掛けた。

切片の幅は1.5~2.0mm、長さ25mmを最大とし、各1gを供試した。

3) 酵素処理とプロトプラストの計数

100mlの三角フラスコに酵素液(0.1%ペクトリアーゼ、Y-23, 2%セルラーゼ オノヅカ RS, 0.5%デキストラン硫酸カリウム, 0.6mol D-マンニトールをpH5.5に調整した液)を10ml入れ、30℃にして、試料1gを加え、酵素液を試料の組織内に浸透させるために真空ポンプで1分間吸引した。これを30℃に設定した恒温槽内で、毎分60回・振幅3cmの往復振とうを振とう機を用いて行った。酵素処理開始後15分毎に、ピペットを用いて、三角フラスコの液面下5mm位のところから酵素液0.1mlととも

にプロトプラストを採集してプレパレートを作り、150倍で検鏡して3視野中の平均値を四捨五入して示した。

結果と考察

筆者ら^{3,4)}が行ったプロトプラストの教材化に関する研究では、栽培植物であるコマツナを供試してきたが、身近な自然の植物が利用可能なら、材料の入手という面から大変便利になる。しかし、野生植物からのプロトプラストの単離についての報告に接したことがない。野生植物を教材として利用する場合、どんな種がプロトプラストの単離に適するか、どの位置の葉がよいか、また、季節はいつがよいかなどを明らかにする必要がある。このようなことから、特に草丈が高く、採集位置がはっきりするオオアレチノギクとヒメジョオンに注目して位置(高さ)について調べ、また、これと比較のため草丈の低いセイヨウトンポポを取り上げた。

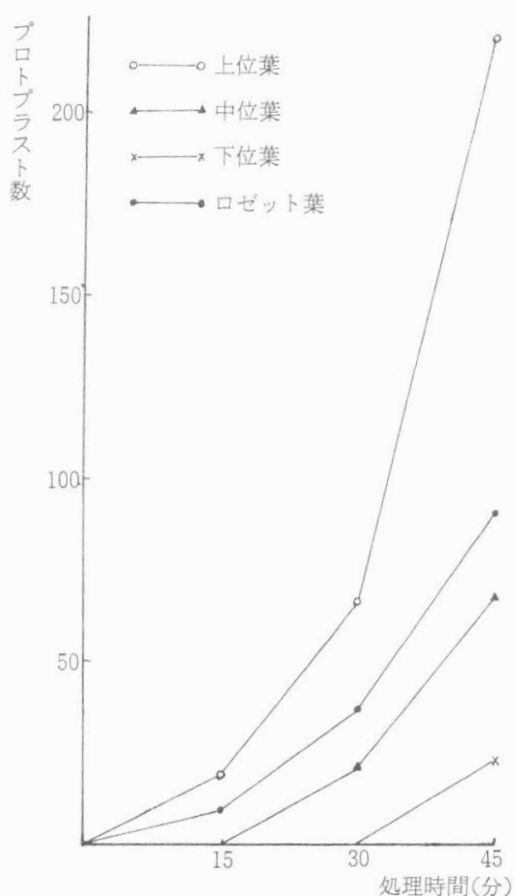
季節がプロトプラストの単離に及ぼす影響については夏と対比のため冬を選び、同種のロゼット状の株の葉を用いて比較した。また、プロトプラストの単離に適する種を見出すために計24種を供試した。

1) オオアレチノギクのプロトプラストの単離

オオアレチノギクは、1m以上にも草丈が伸びるが、どの位置の葉がプロトプラストの単離に最も適するか、また、季節が異るとプロトプラストの単離に差異が生ずるか否かについて調べた。

結果は、第1図のように、上位葉(地上55～60cmの間の葉)では、酵素処理開始15分後には1視野中18個、30分後には65個、45分後には219個のプロトプラストが観察された、中位葉(地上30～35cmの間の葉)では酵素処理開始15分後には観察されず、30分後に20個、45分後に67個、下位葉(地上5～10cmの間の葉)では、酵素処理開始15分後には観察されず、30分後に1個、45分後に21個のプロトプラストが観察された。

筆者^{5,7,8)}は、細胞の単離には葉齢が関係しており、若齢葉のほうが細胞の単離が早いキクタイプと老熟葉の方が細胞の単離が早いダイコンタイプがあることを明らかにしたが、オオアレチノギクはこのような分類に従うと、若齢葉のほうが老熟葉よりプロトプラストの単離が早いキクタイプであることがわかった。このことからオオアレチノギクでは細胞を



第1図 オオアレチノギクのプロトプラストの単離。

接着している主な成分リグニンの沈着と細胞壁を構成している主要成分セルロースの沈着は、共に葉齢が進むにつれて増加しているものと推察される。

実際にオオアレチノギクを教材として利用するときは、1本の個体では上位の若い葉を利用し、15分～30分間の酵素処理によって、観察に必要な多数のプロトプラストを単離できることがわかった。

夏の材料と比較するために冬のロゼット葉を夏の葉と同様にして供試した。その結果、酵素処理開始15分後には8個、30分後には37個、45分後には89個のプロトプラストが単離された。このロゼット葉は株全体からみると中位葉であるので、夏の中位葉と比較すると、冬の葉のほうが単離されやすいことがわかった。このことは季節による差異というより、ロゼット葉のほうが若齢であったことが主な原因かも知れない。また、冬は日照が夏より弱いので、このことが関係しているかも知れない。

以上のことから、オオアレチノギクを供試材料と

してプロトプラストの観察をする場合は、上位の若齢葉および冬のロゼット葉がよいことがわかった。

2) ヒメジョオンのプロトプラストの単離

ヒメジョオンもオオアレチノギクと同様に草丈が高くなる同じ科の植物である。種が異なることによつてプロトプラストの単離がどのようなかわるか、またヒメジョオンの未開花株(草丈21cm)と開花株(草丈96cm)を選び、個体の成熟度(老若)がプロトプラストの単離にどのような差異を生ずるか、さらに、季節によつてどのような差異があるかなどについて実験を行った。

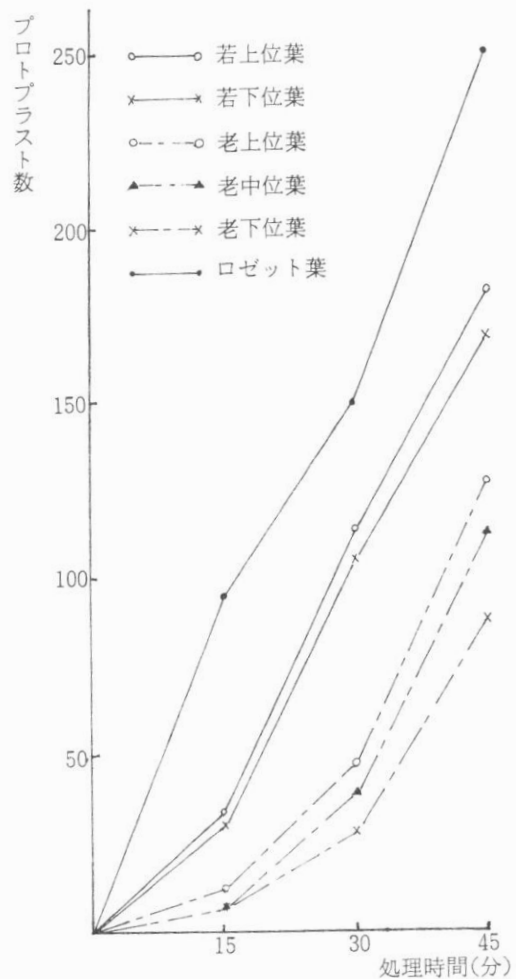
夏の材料は、未開花株の上位葉(地上15~20cmの間の葉・若上位葉)・同じく下位葉(地上5~10cmの間の葉・若下位葉)・開花株の上位葉(地上75~80cmの間の葉・老上位葉)・同中位葉(地上35~40cmの間の葉・老中位葉)・同下位葉(地上5~10cmの間の葉・老下位葉)に区分して供試し、冬のロゼット葉は中位の大きさの葉を供試した。結果は、第2図に示した通りであった。

未開花株の若上位葉では、酵素処理開始15分後には1視野中34個、30分後には114個、45分後には186個のプロトプラストが単離された。また若下位葉でも、ややプロトプラスト数は減少するものの、ほぼ同様の単離傾向を示し、若上位葉と若下位葉の間では、一定時間内におけるプロトプラストの単離数に大きい差は認められなかった。これは、ヒメジョオンの抽台は短期間に起り、若上位葉と若下位葉との老若の差があまり大きくなかったためと考えられる。

草丈96cmの開花株では、老上位葉を供試した場合は酵素処理開始15分後に12個、30分後に60個、45分後に153個のプロトプラストが単離された。これはオオアレチノギクの上位葉とほぼ同様の結果で、ヒメジョオンの未開花株と比較するとやや少なくなっている。老中位葉では、酵素処理開始15分後に6個、30分後に41個、45分後には114個のプロトプラストが単離された。また、老下位葉では、酵素処理開始15分後に6個、30分後に30個、45分後に89個のプロトプラストが単離された。

これらの結果から、ヒメジョオンの老中位葉・老下位葉では、オオアレチノギクの中位葉よりややプロトプラストが単離され易いが、おおまかにみるとほぼ同様であると考えられる。

ロゼット葉では、酵素処理開始15分後に92個、30



第2図 ヒメジョオンのプロトプラストの単離。

分後に150個、45分後には252個のプロトプラストが単離され、15分処理でも充分観察に適するプロトプラスト数であった。ロゼット葉と開花株の中位葉(老中位葉)と比較すると、冬のロゼット葉のほうがプロトプラストの単離がよいことがわかる。しかし、このことはオオアレチノギクで考察したように、季節による差異というより、ロゼット葉のほうが若齢であることが主な原因ではないかと考えられる。また、冬は日照が弱く日照時間も短いので、このことが関係しているのかも知れない。

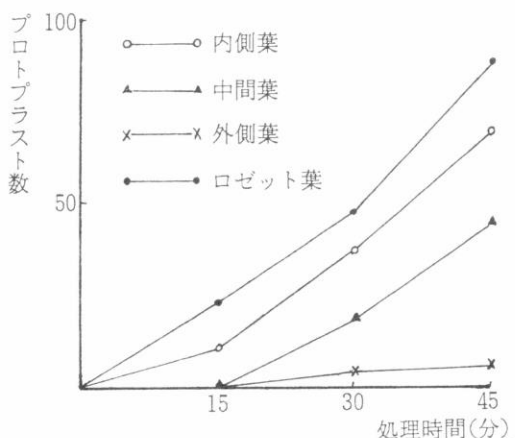
これらのことから、ヒメジョオンもオオアレチノギクと同様に若齢葉ほどプロトプラストの単離が早いキクタイプの植物であることがわかった。また、冬のロゼット葉の方が夏の株のどの位置の葉よりもプロトプラストの単離が早いことがわかった。

以上のことから、ヒメジョオンをプロトプラスト

観察の材料として利用する場合は、冬のロゼット葉がよく、夏には若い株の上位の葉がよいことがわかった。また、冬のロゼット葉はプロトプラストの単離が大変よいので、使用する酵素を前記の量より少なくすることも可能であろうと推察される。

3) セイヨウタンポポのプロトプラストの単離

夏でも茎が地上から高く伸びることなく、冬はロゼット状になる植物にタンポポがあるが、このような植物ではどの位置の葉を利用するのがよいかを調べるために、夏のセイヨウタンポポの外側の葉、中間の葉、内側の葉に区分して供試した。また、夏と冬とではいずれがよいかを中間葉で比較した。



第3図 セイヨウタンポポのプロトプラストの単離。

この種では、プロトプラストの単離は前2種に比べるとあまり多くはなかったが、内側と外側の葉の比較では、前2種同様に若齢葉がよく、夏と冬の比較では冬のロゼット葉がよかった。冬の中間葉と夏の内側葉では、酵素処理開始30分後には1視野中30~38個のプロトプラストが観察された。1視野中にこれ位のプロトプラストが観察されれば、生徒に観察させる数としては充分であると考えられる。

タンポポもキク科であるので、若齢葉を供試したとき、プロトプラストの単離数の多いキクタイプの種であることがわかった。

以上3種ともに、細胞の単離の場合^{5,7,8)}と同様に、葉齢が進むにつれて、細胞を接着しているリグニンなどが増加することや細胞壁へのセルロースの沈着量が増加しており、さらに季節や日照量がこれらの増加に影響して酵素処理によるプロトプラストの単

離に差異を生じたものと考えられる。これらの実験結果から明らかのように、キクタイプの植物は、若い葉ほどプロトプラストの単離がよく、季節については推定の域を出ないものと考えられる。

4) その他の種のプロトプラストの単離

プロトプラストの単離され易い種を検索するために、冬に身近かで入手できる24種について、その株の中で中位の葉を材料として供試した。

第1表 その他の種のプロトプラストの単離数。

グループ	種 名	数
A	ホトケノザ	296
	キランソウ	272
	ハルジョオン	268
	セイヨウカラシナ	196
	オオイヌノフグリ	165
B	ヒメジョオン	150
	セリ	133
	ナズナ	126
	タビラコ	124
C	ユキノシタ	107
	ヨメナ	71
	ノゲシ	58
D	ノボロギク	50
	オオアレチノギク	37
	セイヨウタンポポ	37
	カキドオシ	37
	セイトカアワダチソウ	36

酵素処理開始30分後、3視野平均、1視野数

第1表に示すように、プロトプラストの単離数が150個以上のものをAグループとした。このグループの種は酵素処理開始30分後では極めて多数のプロトプラストが単離されており、この実験で用いた酵素量では30分処理でなく15分程度の処理でもよいのではないかと推察される。Aグループの中で、オオイヌノフグリ、ホトケノザは生徒が扱うには葉がやや小さいかも知れない。キランソウはグリーンのプロトプラストのほかにも赤味を帯びた色素を含むものが観察された。これは裏側の細胞から単離したプロトプラストである。

ハルジョオンは先に示したオオアレチノギクやヒメジョオンと比べると、プロトプラストの単離が大変よいことがわかった。このことから、ハルジョオンは、冬から初夏の抽台・開花期までの長い期間に

わかって大変よい供試材料であると推奨される。このことを確認するため、翌年(1986年)の6月20日に、開花株を用いて、地上から10cm間隔で葉をとり、本実験と同様の処理をして確かめたところ、どの位置の葉からも極めて多数のプロトプラストが単離された。データはここでは省略しておきたい。

ハルジョオン、ヒメジョオンはプロトプラストの単離が早く、プロトプラストの観察材料として供試可能な状態でほぼ1年中存在すること、および、葉の大きさや厚さが適当であることなどから、今後大いに利用されるようになる種であると考えられる。

セイヨウカラシナは、近年、河畔や荒地などに分布が広がり、葉が大きく、材料を用意するのが容易である。また、切片を作る作業も簡単にできる。この実験では中位の大きさの葉を用いたが、すでに報告したように^{3,4,5,7,8)}アブラナ科の植物は外側の老齢葉(最も大きい葉)のほうが若齢葉より細胞の単離が早い(ダイコンタイプ)ので、この種も、外側の最も大きい葉を用いることによってさらにプロトプラストの単離数は多くなるものと推察される。

プロトプラストの単離数が酵素処理開始30分後に100個以上150個未満であったものをBグループとした。これらのうちセリの葉は羽状複葉で小葉は小さく、ナズナとタバコは羽状に深裂しており、これらは葉も薄いので、材料の扱いにはやや難点がある。ユキノシタは葉が厚いので前処理作業が容易で、プロトプラストも大きい。また、細胞内で形成された針状結晶が観察される。このBグループもプロトプラストの単離が大変よいので、この実験より酵素量を少なくしても観察だけの目的は達成されるかも知れない。

プロトプラストの単離が、酵素処理開始30分後に50個以上100個未満であった種をCグループとしたが、このグループの種は、葉の厚さや大きさが材料の前処理に適しており、分布も広い。

プロトプラストの単離数が、酵素処理開始30分後に30個以上50個未満であった種をDグループとした。これらの種はいずれも材料の入手が容易であり、プロトプラストの観察にはこれ位の数の単離で充分であると考えられる。

プロトプラストの単離数が、酵素処理開始30分後に30個以下の種をEグループとした。このグループのうちヨモギは17個、スイバは3個のプロトプラストが単離されたが、ハコベ、ウシハコベ、オランダ

ミミナグサ、ムラサキカタバミ、ムシトリナデシコの5種は、全く単離されなかった。

適 要

プロトプラストの観察を効果的にするために、身近な自然から得られる植物の種類、材料の葉の採取位置、季節等について実験した。

(1)オオアレチノギク、ヒメジョオン、タンポポは、若い葉ほどプロトプラストの単離がよかった。また、夏より冬の葉のほうがプロトプラストの単離がよかった。

(2)ホトケノザ、キランソウ、ハルジョオン、セイヨウカラシナ、オオイヌノフグリはプロトプラストの単離が極めてよく、ヒメジョオン、セリ、ナズナ、タバコ、ユキノシタもプロトプラストの単離がよかった。

(3)ハルジョオンとヒメジョオンは、身近な自然から1年中得られ、プロトプラストの単離もよいので、プロトプラストの観察に大変よい教材として推奨される。

引用文献

- 1) 石戸 忠. 1975. 原色植物検索図鑑, 北隆館.
- 2) 馳澤盛一郎. 1984. プロトプラストの単離と培養, 遺伝. 38(3): 34-39.
- 3) 楠元 守・見富信義・葛西一恵. 1983. プロトプラストの教材化に関する基礎的研究, 生物教育. 24(2): 5-9
- 4) ———. 沼田俊作. 1984. プロトプラストの教材化に関する基礎的研究Ⅱ, 神奈川県立教育センター研究集録, 3: 51-56
- 5) ———. 1983a. 酵素の働きを利用した植物の組織及び細胞の観察法, 生物教育. 24(3): 15-20.
- 6) ———. 1983b. 体細胞雑種植物の育種に関する研究. 園学要旨, 296-297.
- 7) ———. 1984. 酵素の働きを利用した組織及び細胞の観察Ⅲ, 神奈川県立教育センター研究集録. 2: 44-51.
- 8) ———. 1985. 酵素の働きを利用した組織及び細胞の観察Ⅱ, 生物教育. 24(3・4): 121-126.
- 9) 牧野富太郎. 1975. 新日本植物図鑑, 北隆館.
- 10) 西 貞夫. 1983. 注目を浴びる植物の育種法, 日本の科学と技術. 24(221): 56-65.
- 11) 建部 到. 1979. 植物細胞のプロトプラスト, 遺伝. 33(3): 2-7.