

熱帯有用樹セドロのプロトプラスト培養

細井佳久・丸山エミリオ (森林総合研究所)

要旨：中南米原産でセンダン科に属するセドロ (*Cedrela odorata*) は同科のマホガニーと並び、林業上重要な樹種である。本樹種についてエレクトロポレーション法による遺伝子組換えや、変異細胞の選抜による優良個体作出に向け、プロトプラスト培養を試みた。プロトプラスト単離のための材料としては、MS 改変培地で継代培養したフラスコ苗を用いた。プロトプラスト単離は、細断した葉片を、1%セルラーゼオノズカ RS(Yakult)と 0.1%ペクトリアーゼ Y-23(Kikkoman)を添加し、浸透圧調節剤としてマンニトールを加えた溶液を用いた。得られたプロトプラストは、植物成長調節物質を組み合わせた様々な液体培地中で培養した。培地条件により、プロトプラストは分裂し、コロニーを形成した。コロニー形成は、MS 培地に 10mM のグルタミンを添加した液体培地と無機塩濃度を 1.5 倍に上げた MS 培地で見られた。特にグルタミンを添加した場合にコロニー形成率が高かった。セドロの培養では、高濃度の無機塩添加や、針葉樹では不定胚細胞の培養に有効なグルタミンの添加がコロニー形成に有効であることがわかった。

キーワード：セドロ, プロトプラスト, マダラメイガ, *Hypsipyla grandella* Zeller

I はじめに

セドロ (*Cedrela odorata*) は、中南米に広く分布するセンダン科の広葉樹であり、樹高 30m ほどになる高木である (図-1)。材質が軽軟であり、加工性に優れていることから、同科のマホガニーとともに有用樹として広く利用されている。用途としては、屋外構造材や化粧合板、家具、キャビネットのほか、欧米では昔から葉巻の箱材としての利用も多い。このため、林業上重要な種として現地では各所で植林されている。しかし、芯食い虫による食害として、鱗翅目メイガ科のマダラメイガ (*Hypsipyla grandella* Zeller) の幼虫により甚大な被害を受けている。また、違法な伐採等が進み、絶滅が危惧されている地域もある。そのため、今までに組織培養の手法を用い、実生の茎頂培養によって大量増殖を試みてきた (6)。その結果、器官培養による植物体再生系については確立できた。今回は、得られた継代培養物を利用して、プロトプラスト培養系の確立を目指して実験を行った。本手法の確立は、遺伝子組換え手法の 1 つであるエレクトロポレーション法による虫害耐性の付与、あるいは細胞選抜による有用個体の作出に有効となる。

II 実験方法

1. シュートカルチャーの誘導と継代培養 プロトプラスト単離の材料となるフラスコ苗は、1988 年に播種し、5 ヶ月間屋外で育成した苗木から誘導した。苗木から切り取った茎端を、70%エタノールで 1 分間、次に 0.1%塩化第 2 水銀溶液で 10 分間殺菌した後、滅菌水で 20 分間洗浄し、固形培地に置床した。培地には 0.8%の寒天、10g/l のショ糖と 15 μ M の NAA を添加し、無機塩濃度を 1/2

に下げた WPM(4)固形培地を用いた。その後の継代培養では 0.2%の活性炭を添加した MS 改変培地を用いた (表-1)。培養は、25°C、16 時間蛍光灯照明 (約 3,000lx) 下で行った。プロトプラスト単離には、継代培養により維持増殖した植物体を用いた。

2. プロトプラストの単離 プロトプラストの単離には、茎端を培地に挿しつけてから約 2 ヶ月間培養し、幼植物に生長したフラスコ苗を用いた (図-2)。酵素処理は、展開している幼植物の葉をメスで細断し、148 μ m のメッシュ上に置き、滅菌水を流して細かな切断片を取り除いてから行った。酵素液には 1%セルラーゼオノズカ RS(Yakult)と 0.1%ペクトリアーゼ Y-23(Kikkoman)を添加し、浸透圧調節剤としてマンニトールを加えた溶液を用いた。酵素処理は、酵素液 40ml が入った 100ml フラスコを用い、25°Cで静置して行った。酵素処理後のプロトプラストの回収は、まず 30 μ m メッシュで濾して組織片を除去したものを 0.6M マンニトールで洗浄・遠心した沈殿物として回収した。遠心は低速遠心機で約 60 \times g の遠心力で、3 分間行った。プロトプラストの計数は、血球計算板を用いて顕微鏡下で行った。生存率測定には FDA 法 (1) を用いた。

3. プロトプラストの培養 単離したプロトプラストは、96 ウェルのマルチプレートを用い 1, 25°C、暗黒下で培養した。培地として、1 ウェルあたり 50 μ l の液体培地を分注して用いた。培地組成としては、MS(5)培地、10-20mM のグルタミンを添加した MS 培地、無機塩濃度を 1/2、あるいは 3/2 にした MS 培地、無機塩濃度を 1/2 にした EM(5)培地を用いた。植物生長調節物質としては、

2,4-D を 0.1-30 μM , BAP を 0.3-10 μM の範囲で組み合わせて使用した。培養密度は、 3×10^3 プロトプラスト/ml から 2×10^4 プロトプラスト/ml の範囲で実験を行った。コロニー形成については、プロトプラストが細胞壁を再生し、分裂を 5 回以上繰り返したものを計数した。

III 結果と考察

1. マンニトール濃度の違いによるプロトプラスト収量と生存率について 培養を行うにあたり、プロトプラストの単離に適したマンニトール濃度を調べた。表-2より、比較した 3 種類の浸透圧では、0.6M の場合に収率が大きく、 16.9×10^4 プロトプラスト/ml であった。生存率については比較した 3 濃度とも 90%前後と高かった。この結果から、単離・培養には 0.6M のマンニトール濃度を採用することとした。筆者らは、広葉樹ではポプラのギンドロやヤマナラシの葉片や培養細胞、針葉樹ではスギ、ヒノキ、サワラなどの不定胚形成細胞を用いてプロトプラスト培養を行っているが、いずれの場合も 0.6M の濃度で単離・培養した場合に効率よい結果が得られている。今回の場合も、同様な結果が得られた。

2. 培地別にみたプロトプラスト培養効率 表-3に 1.5 倍の無機塩を添加した MS 培地と 10mM グルタミンを添加した MS 培地で培養した場合のコロニー形成数を示した。培養密度については 2×10^4 プロトプラスト/ml で行った。コロニー形成数は、10mM のグルタミンを添加した MS 培地で多数見られ、2,4-D30 μM と BAP10 μM を添加した場合に最も多く、8 ウェルの平均でウェルあたり 166 個のコロニーが得られた (図-3)。2,4-D, BAP とともに高濃度でのコロニー形成率が高く、更に高濃度の添加がコロニー形成には有効であるように思われる。これは、筆者らが針葉樹不定胚形成細胞のプロトプラスト培養(2, 3, 7)や、ポプラ葉片のプロトプラスト培養時のコロニー形成条件とは大きく異なる結果である。無機塩濃度を 1.5 倍に高めた MS 培地では、コロニーは得られたものの、その数は少なく、植物生長調節物質の濃度によるコロニー形成数にはばらつきがみられ、2,4-D については、はっきりした傾向はみられなかった。しかし、BAP についてはグルタミン添加培地と同様に 10 μM 添加した場合にコロニー形成率が高かった。セドロの葉片を用いたプロトプラスト培養では、よりコロニー形成率の高い条件を調べるためには、植物生長調節物質について更に高濃度の条件で培養実験を行う必要がある。また、MS 培地ではコロニー形成は観察されなかったが、プロトプラストは細胞壁を再生し、肥大化が見られた (図-4)。また、無機塩濃度を 1/2 にした EM 培地では、培養開始から約 10 日経過した時点ではプロトプラストは全

ての培養条件において潰れて褐変枯死した。

3. 培養密度・グルタミン濃度とコロニー形成 グルタミンをそれぞれ 10, 15, 20mM の 3 濃度で添加した MS 培地について、培養密度を 3×10^3 プロトプラスト/ml, 1×10^4 プロトプラスト/ml の 2 つの密度で培養を行った。しかし、いずれの培養密度、グルタミン濃度によってもコロニーは形成されなかった。コロニー形成については 2×10^4 プロトプラスト/ml 以上の培養密度について更に詳しく調べる必要がある。

4. 得られたコロニーの継代培養 96 ウェルマルチプレートで約 40 日培養して得られたコロニーに、それぞれのウェルごとに 50 μl の 0.6M マンニトールを含み、グルタミンを除いた MS 液体培地を加えてさらに培養した。その結果、ごく一部のコロニーから緻密な細胞塊が生じた (図-5)。得られた細胞塊は非常に小さな細胞で構成されているため、倒立顕微鏡下ではほぼ黒色を呈し、内部を見通すことができない。筆者らは、既にマホガニーの組織培養において不定胚形成過程を観察しているが、よく似た構造の細胞塊である(8)。そのため、伸長・成熟すれば不定胚を形成する可能性があると思われる。不定胚経路による植物体再分化を目的として、針葉樹の不定胚形成時によく使用されるポリエチレングリコール添加培地の使用も今後検討していきたい。

引用文献

- (1) 平井篤志・内宮博文・杉浦昌弘 (1982) 生物化学実験法 16 植物細胞培養育種入門 学会出版センター (東京)38p.
- (2) 細井佳久 (2001) ヤクタネゴヨウ, ヒマラヤシロマツの組織, 細胞培養, 林木の育種 特別号 41-43
- (3) 細井佳久 (2006) プロトプラスト培養にヒノキ, サワラ培養細胞の反応の比較 日林関東支論 57: 167-168
- (4) LLOYD G, MCCOWN B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture Comb. Proc. Intern. Plant Proc. Soc. 30: 421-427
- (5) MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures Physiol. Plant. 15: 473-497
- (6) MARUYAMA E, ISHII K, SAITO A, MIGITA K (1989) Micropropagation of Cedro (*Cedrela odorata* L.) by Shoot-tip Culture 日林誌 71(8): 329-331
- (7) MARUYAMA E, HOSOI Y, ISHII K, MOROHOSHIN (2000) Embryogenic cell culture, protoplast

regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don,) *Plant Biotechnology* **17**: 281-296

(8) MARUYAMA E (2006) Tissue culture of *Swietenia macrophylla* King (Big-leaf Mahogany), *Plantation Technology in Tropical Forest Science*, Springer (Tokyo) 131-136



図-1. 植林されたセドロ (*Cedrela odorata*)



図-2. プロトプラスト単離に用いたフラスコ苗

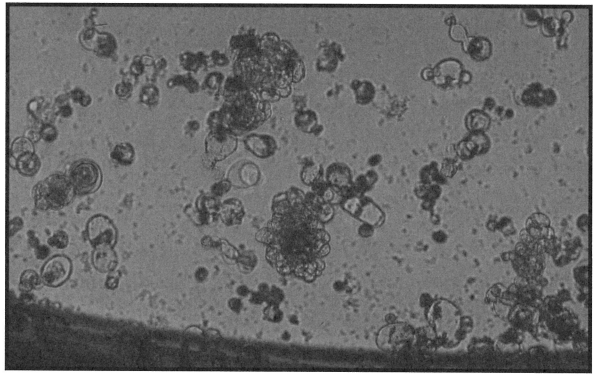


図-3. 分裂増殖するプロトプラスト由来コロニー

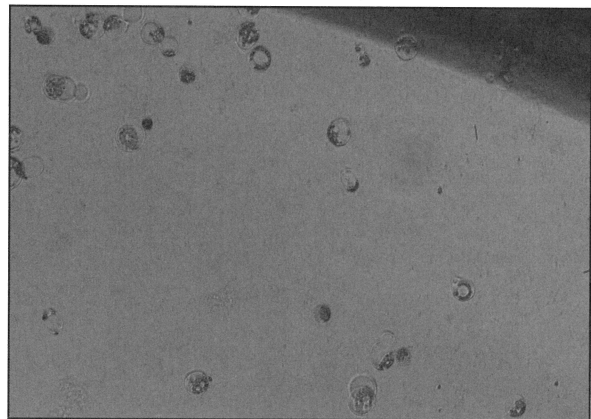


図-4. 肥大するプロトプラスト

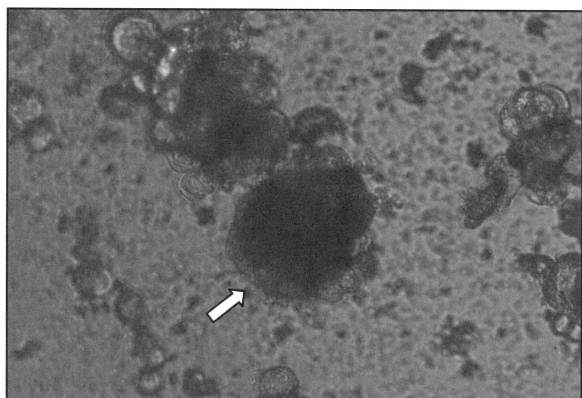


図-5. 不定胚形成時に見られる増殖細胞と同様な形態を示すコロニー

表-1. 継代培養に使用した培地組成

Compound	Amounts [mg/l]
NH ₄ NO ₃	413
KNO ₃	950
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220
KH ₂ PO ₄	85
MnSO ₄ ·4H ₂ O	11.2
H ₃ BO ₃	3.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.3
KI	0.42
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.013
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.13
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.013
FeSO ₄ ·7H ₂ O	14
Na ₂ EDTA	18.7
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine HCl	0.5
Nicotinic acid	0.5
Glycine	2
myo-Inositol	100
Sucrose	20000
Activated Charcoal	2000
IBA[μM]	12
agar	10000
pH5.6-5.8	

表-2. マンニトール濃度がプロトプラスト収率と生存率に与える影響

マンニトール濃度	プロトプラスト収率	生存率
0.5M	6.6 × 10 ⁴ 個/ml	97.0%
0.6M	16.9 × 10 ⁴ 個/ml	91.7%
0.7M	11.0 × 10 ⁴ 個/ml	88.1%

表-3. 植物生長調節物質の組み合わせによるコロニー形成数の違い

培地: MS+0.6M マンニトール+10mM グルタミン						
BAP[μM]	2,4-D[μM]					
	0.1	0.3	1	3	10	30
0.3	0.3 (0.7)	0.13 (0.4)	0.4 (0.7)	4.4 (4.6)	4.9 (3.1)	33 (14.5)
1	1.1 (1.5)	1.5 (1.3)	9.5 (5.6)	24.5 (15.7)	31 (18.3)	126 (45.2)
3	4.9 (5.7)	8 (15.7)	23.8 (17.9)	47.4 (20.6)	73.1 (21.7)	157.8 (28.9)
10	23.8 (24.2)	38.8 (28.7)	66.3 (24.1)	99.1 (20.0)	111.1 (18.8)	166.4 (33.0)

培地: 1.5MS+0.6M マンニトール						
BAP[μM]	2,4-D[μM]					
	0.1	0.3	1	3	10	30
0.3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.3 (1.5)
1	0 (1.5)	0.3 (0.5)	1.3 (1.0)	2.8 (1.3)	0.8 (0.5)	2 (3.6)
3	0.8 (1.5)	0 (0)	0.8 (1.0)	1.5 (1.3)	1.5 (3.0)	1 (2.0)
10	3.3 (2.9)	3 (2.9)	6.5 (4.8)	7.5 (7.9)	5.75 (3.6)	6 (7.4)

太字: 1 ウェルあたりの平均コロニー数 括弧内: 標準偏差