

熱帯有用樹セドロの組織培養による植物体再生とプロトプラスト培養の試み

森林総合研究所 細井 佳久・丸山 E. 毅

Trial of protoplast culture and plant regeneration by tissue culture of *Cedreia odorata*, a useful tropical tree

Yoshihisa HOSOI, Tsuyoshi E. MARUYAMA (Forestry and forest products research institute)

1. はじめに

セドロ (*Cedreia odorata*) は、樹高 30m ほどになる高木で、中南米に広く分布するセンダングラの広葉樹である (図 1)。材質が軽軟で加工性に優れており、構造材や合板をはじめ、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。また、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、穿孔性害虫である鱗翅目メイガ科のマホガニーマダラメイガ (*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、生物工学的手法を用いた大量増殖法の開発や、遺伝子組換えによる虫害抵抗性個体の作出は、これらの問題の解決策の一つとなり得る。今回は、その基盤となる組織培養による植物体再生系の確立を行うとともに、エレクトロポレーション法などによる組換え個体作出のためのプロトプラストの培養を試みた。

2. 実験方法

1) 組織培養による植物体再生

培養には、材料として種子、実生、育成苗の各部位を用いた。種子については、胚と子葉部、実生については、葉切片、葉柄、根の切片を用いた。育成苗については、播種後 5 ヶ月間ポットで育成した後、茎頂片を約 1.5cm 切り取って使用した。シュートの伸長・増殖用培地としては、MS (Murashige & Skoog)、B5 (Gamborg's B5)、WPM (Woody Plant Medium)、BTM (Broadleaf Tree Medium) の 5 種について調べた。シュートの発根には無機塩濃度を 1/2 に下げた WPM 培地を用いた。植物生長調節物質として、IBA、NAA、BAP を様々な濃度で添加した。培養は、25°C、16 時間蛍光灯照明下で行った。

2) プロトプラストの単離

継代培養し、維持増殖したフラスコ苗の葉を用いた。酵素処理は、展開している葉をメスで細断し、148 μm 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 0.6M 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 μm 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×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。

た。生存率測定には FDA 法を用いた。

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、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、基本培地として硝酸アンモニウム濃度を 1/4、その他の無機塩濃度を 1/2 にした MS 培地 (1/2MS[1/4NH₄NO₃]) と、硝酸アンモニウム無添加の MS 培地 (MS[-NH₄NO₃]) の 2 種類を用いた。また、両培地とも 10mM グルタミン、1% ショ糖、2% マルトース、0.6M マンニトールを加えた。植物生長調節物質としては、2,4-D を 0.1-80 μ M、BAP を 0-10 μ M の範囲で組み合わせて使用した。培養密度は 2 \times 10⁴ プロトプラスト/ml に調整した。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。

3. 結果と考察

1) 組織培養による植物体の再生

種子については、胚、子葉部ともにシュートと根の形成がみられた。実生については、用いた 3 つの部位で褐変した。ただし、根の切片については根が伸長する場合もみられた。育成苗の茎頂片については、用いた各培地でシュートの増殖と伸長がみられた。特に WPM 培地に BAP を添加した場合にシュートの増殖、伸長ともに効果的であった (表 1、表 2)。増殖したシュートを切り取り、IBA を 6 μ M 添加した発根用培地に移すと 30 日ほどで発根し、植物体を形成した。今回、苗木からの植物体再生が可能であったことにより、今後優良な形質を持つ成木個体からのクローン増殖の可能性が示されたといえる。

なお、この結果より、プロトプラスト培養材料として、IBA を 6 μ M 添加し、無機塩濃度を 1/2 にした WPM 培地を用いて継代培養し、増殖させた植物体を使用した (図 2)。

2) プロトプラストの単離

酵素処理後、得られたプロトプラストのサイズは直径約 20 μ m から 30 μ m であった (図 3)。プロトプラスト収率は、約 15 \times 10⁴ プロトプラスト/ml であった。生存率については 90% 前後と高かった。

3) プロトプラストの培養

プロトプラストは、培養開始数日で細胞壁を再生し、変形、肥大を始めた (図 4)。表 3、4 に培養開始 40 日目のコロニー形成数を示した。1/2MS[1/4NH₄NO₃]培地に 2,4-D を 30 μ M、BAP を 10 μ M 添加した場合にコロニー形成数は 186.8 となり、最高を示した。また、1/2MS[1/4NH₄NO₃]培地の場合、2,4-D が 30 μ M を超えると極端にコロニー形成数が減少したが、MS[-NH₄NO₃]培地の場合、2,4-D 濃度を 80 μ M まで上げてもコロニー形成数に大きな差はみられなかった。BAP に関しては両培地とも無添加の場合に比べ、コロニー形成に有効であった。ただし、濃度別にみてコロニー形成数に大きな違いがみられなかったため、今後 10 μ M 以上の濃度についても調べる必要がある。今回は 2 種類の基本培地について実験を行ったが、2,4-D に対する反応が大きく異なった。基本培地を変えることにより、植物生長調節物質の効果に大きな違いが出たことはセドロのプロトプラストに特有である可能性もある。培養効率向上のため、基本培地の選択に加え、他種のオーキシンに対しても反応を調べる必要がある。生じたコロニーの中で、ごく希に不定胚の初期と思われる緻密な細胞

塊がみられた (図 5)。今後はこうした細胞塊の形成頻度を上げる培養方法と、不定胚を成熟させる培養条件を調べる予定である。

4. まとめ

育成苗のシュートからの植物体再生が可能となり、優良形質を持つ成木の大量増殖の可能性を示すことができた。しかし、個体による培養の難易度についても今後調べる必要がある。プロトプラスト培養についてはまだ初期の段階であるが、エレクトロポレーション法などによる組換え個体の作出には必要な技術であり、今後も実験を進める。

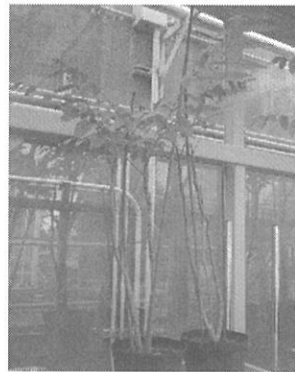


図 1 セドロ成木と温室内で育成中の幼木



図 2 プロトプラスト単離に用いた幼植物

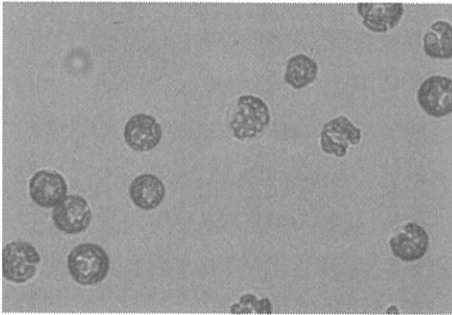


図 3 単離したプロトプラスト

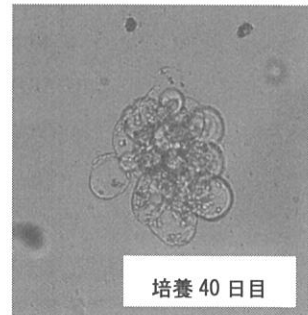
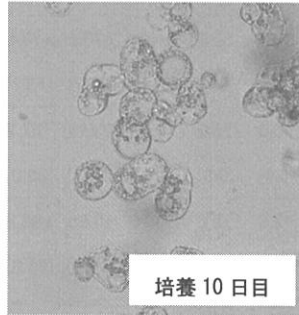


図 4 肥大変形し、コロニー形成する細胞

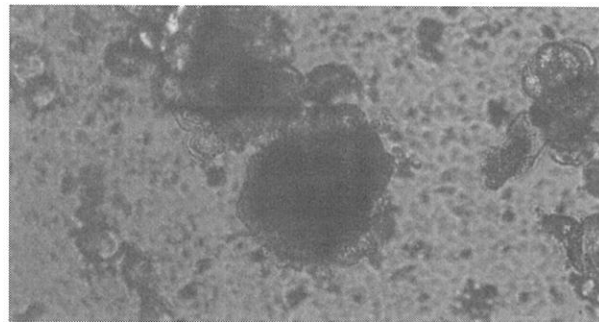


図 5 緻密な細胞でできた初期不定胚様細胞塊

表1 培地別シュート形成数

培地	増殖したシュート数
MS	3.0
WPM	3.6
BTM	2.9
B5	3.1

* 数値は10茎頂片の平均
(BAP 4.44 μ M 添加)

表2 BAP濃度によるシュート形成数の比較
(培地: WPM)

BAP濃度 [μ M]	増殖したシュート数	シュート長 [cm]
0.89	3.5	5.1
8.89	3.9	2.9
88.9	1.3	1.8

* 数値は10茎頂片の平均

表3 1/2MS[1/4NH₄NO₃]培地で得られたコロニー数

BAP [μ M]	2,4-D [μ M]										
	0.1	0.3	1	3	10	30	40	50	60	70	80
0	57.8 (6.7)	54.5 (3.7)	54.0 (5.6)	58.3 (4.2)	66 (8.8)	63.0 (6.8)	32.8 (10.5)	32.0 (10.4)	23.8 (5.0)	22.8 (9.7)	15.5 (4.8)
1	51.5 (5.1)	51.3 (7.9)	57.0 (8.4)	94.8 (35.9)	116.5 (13.7)	177.5 (15.2)	45.5 (6.6)	42.8 (12.0)	37.3 (3.0)	31.5 (8.2)	22.3 (6.8)
3	83.3 (9.1)	76.0 (9.6)	70.8 (9.9)	101.5 (22.6)	130.8 (27.3)	167.3 (35.0)	57.5 (9.6)	50.0 (1.8)	45.5 (7.5)	32.8 (12.0)	24.8 (5.5)
10	77.0 (11.9)	72.5 (8.2)	75.0 (13.0)	109.0 (29.2)	132.8 (17.0)	186.8 (25.3)	63.8 (18.4)	49.5 (10.5)	42.0 (16.8)	35.3 (7.7)	25.5 (7.0)

数値は4ウェルの平均コロニー形成数 (括弧内は標準偏差)

表4 MS[-NH₄NO₃]培地で得られたコロニー数

BAP [μ M]	2,4-D [μ M]										
	0.1	0.3	1	3	10	30	40	50	60	70	80
0	8.5 (1.0)	12.0 (6.4)	13.5 (11.1)	16.8 (9.0)	23.3 (2.6)	31.3 (8.1)	17.8 (1.9)	19.5 (8.3)	23.5 (7.7)	22.3 (5.2)	23.5 (4.7)
1	15.0 (6.5)	14.5 (5.3)	21.5 (9.3)	36.8 (11.7)	61.8 (10.5)	95.0 (12.7)	96.3 (8.8)	80.8 (7.7)	83.3 (12.8)	87.5 (19.2)	89.8 (35.6)
3	17.0 (9.6)	15.5 (8.2)	28.8 (6.6)	42.5 (12.8)	66.3 (5.1)	90.3 (10.7)	87.0 (9.4)	90.3 (13.7)	84.3 (5.7)	88.0 (11.6)	75.0 (9.4)
10	18.5 (8.3)	18.0 (11.9)	23.5 (19.4)	47.3 (5.6)	57.5 (9.3)	72.8 (19.6)	76.3 (14.8)	70.3 (2.8)	69.3 (7.0)	68.3 (9.6)	73.5 (17.9)

数値は4ウェルの平均コロニー形成数 (括弧内は標準偏差)