

一般報文

キリ(*Paulownia fortunei*)の葉肉プロトプラストからの植物体再生

衛 志明・鎌田 博・原田 宏

筑波大学遺伝子実験センター

(〒305 つくば市天王台 1-1-1)

(1991 年 4 月 18 日受付)

(1991 年 5 月 20 日受理)

キリの若葉からプロトプラストを単離し、その培養条件および再分化条件について検討した。播種後 1.5～2 カ月目の展開若葉を酵素液 (2% セルラーゼオノズカ RS, 0.3% マセロザイム R 10, 0.1% ペクトリアーゼ Y-23) で 8 時間静置処理してプロトプラストを単離した。得られたプロトプラストを K_{8P} 改変培地を用い、25°C 弱光下で培養した。プロトプラストからの再生細胞分裂およびコロニー形成に対するプロトプラストの適正密度は 1 ml 当り 5×10^5 個で、ホルモンとしては 2, 4-D 0.2 mg/l あるいは NAA 1 mg/l と BA 0.5 mg/l の組合せがもっとも効果的であり、分裂率は 28.6% であった。ビタミン C 5 mg/l, PVP 5 mg/l を添加することによりコロニー細胞の褐変を抑制し、増殖を促進した。3 週間後のコロニー形成率は培養したプロトプラストの約 12% であった。約 1 mm に生育したコロニーを MSB 増殖培地に移植し、2 週間後には直径 3～4 mm のカルスを得た。これらのカルスを MSB 再分化培地に移植し、20 日後には不定芽が得られた。再分化培地のホルモン構成は IAA 0.5 mg/l, BA 1 mg/l, Zeatin 1 mg/l が最適で、その場合の再分化率は 41.7% であった。再分化した不定芽を、2 分 1 希釈 MS 培地に IBA 0.5 mg/l, GA₃ 0.1 mg/l を添加した発根培地に移植することにより、完全な植物体を得ることができた。

1. 緒 言

近年、多くの木本植物から活性の高いプロトプラストが単離され、その培養が試みられている。しかし、林木におけるプロトプラストからの植物体再生は、作物や野菜と比較すると報告例が少なく、現在までのところ、プロトプラストから安定して再分化個体を得られている木本植物は限られている。林木の中では、*Santalum album*¹⁾, *Ulmus*²⁾, *Populus alba* × *P. grandidentata*^{3,4)}, *Populus tomentosa*⁵⁾, *Liriodendron tulipifera* L⁶⁾, *Picea glauca*⁷⁾ についてはプロトプラストからの植物体再生について報告がある。しかしながら、日本、中国、朝鮮半島に分布し、現在中国で広く栽培されているキリ (*Paulownia fortunei*) においてはその組織培養に関する研究は、葉片と葉柄からの植物体再生⁸⁾、成木の生長点培養による植物体再生、大量増殖と無病苗の作出等の報告^{9,10,11)} があるが、いまだ安定したプロトプラスト再生系が確立されていない。今後、林木における形質転換や細胞融合による育種素材の作出のためには対象とする樹

種のプロトプラスト再生系を確立することは極めて重要と考えられる。

本研究ではキリの葉肉プロトプラストの培養条件および再分化条件について検討し、安定して完全な植物体を再生させ得る培養方法を確立したので報告する。

2. 材料および方法

キリの種子を 70% エタノールに数秒浸漬し、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素: 0.5%) に 15 分間浸漬して滅菌処理を行った。滅菌水で 3 回洗浄したのち、これらの種子を 2 分の 1 希釈 MS 寒天培地¹²⁾ に播種し、2,000 lux, 12 時間照明下、25°C で実生を育成した。プロトプラストの単離には、播種後 1.5～2 カ月目の実生の展開若葉を用いた。これらの若葉をメスで 0.5～1 mm 幅に細断し、0.55 M マンニトールの CPW 塩液¹³⁾ に 2% セルラーゼオノズカ RS, 0.3% マセロザイム R 10, 0.1% ペクトリアーゼ Y 23 を加え、pH を 5.7 に調整した酵素液に浸し、26°C、静置状態で 8 時間処理した後、酵素液を 45 μm のナイロンメッシュで濾

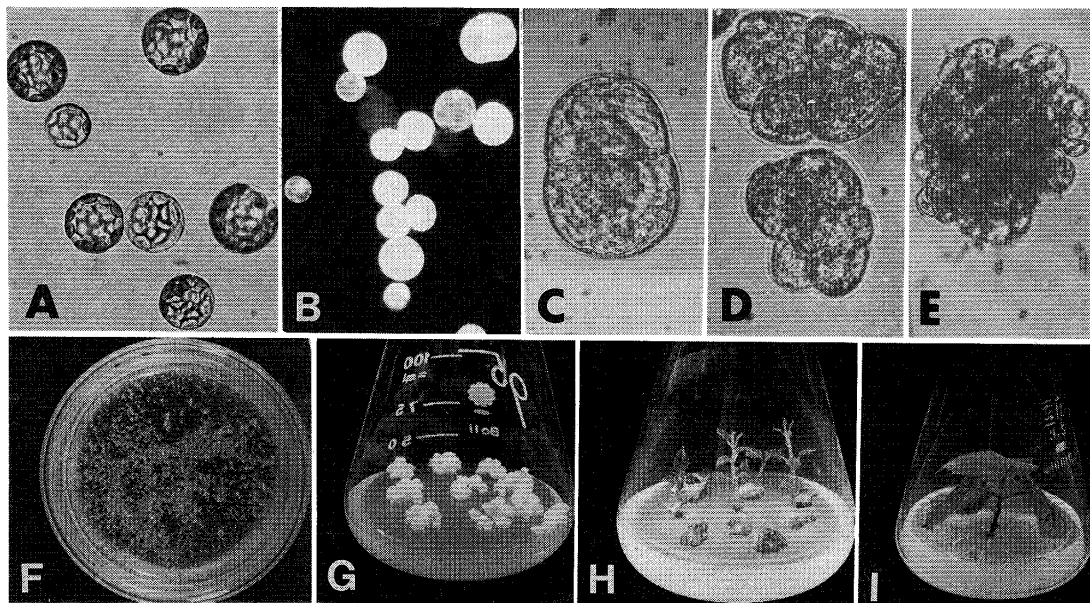


Fig. 1 (A) Freshly isolated mesophyll protoplasts from sterile seedlings of *Paulownia fortunei*.
 (B) The viability of freshly isolated mesophyll protoplasts was confirmed with fluorescein diacetate (FDA) staining, indicating that about 94% of the protoplasts were viable.
 (C) The first cell division occurred 5 days after protoplast isolation.
 (D) The second and third cell divisions occurred 9 days after protoplast isolation.
 (E) A cell colony that had formed 14 days after protoplast isolation.
 (F) Protoplast-derived calli (3 weeks after protoplast isolation).
 (G) Compact and cream-coloured calli formed on MSB proliferation medium (5 weeks after protoplast isolation).
 (H) Shoot buds regenerated on MSB differentiation medium (2 months after protoplast isolation).
 (I) Complete plant regenerated after rooting on 1/2 MS medium with IBA and GA_3 (10 weeks after protoplast isolation).

過し、未消化の残さを取り除き、さらに $100 \times g$ 3 分間の遠心分離でプロトプラスを含む沈澱物を集めた。これを 18% ショ糖に懸濁し、その上に 0.55 M マンニールの CPW 塩液を重ねて二層の密度勾配を作り、遠心分離した。健全なプロトプラスは 18% ショ糖と 0.55 M マンニールの CPW 塩液の界面に浮遊したのでこの分画を回収した。さらに、0.55 M マンニールの CPW 塩液で 3 回洗浄し、プロトプラスを得た。この精製したプロトプラスの活性は FDA 蛍光染色により、蛍光顕微鏡下で観察した。

プロトプラスの培養には MS 培地、 B_5 培地¹⁴⁾、 K_{8P} ¹⁵⁾ 培地を使用し、NAA と 2, 4-D をそれぞれ BA あるいは Zeatin と組合わせて培地に添加した。添加するホルモン濃度は 0.2, 0.5, 1 mg/l とし、各組合せとも合計 18 通りの濃度区を設けた。プロトプラスの密度は 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 個/ml とし、種々の培地に懸濁し、直径 6 cm のシャーレで、

25°C、弱光 (500 lux) 下で静置培養した。そして、細胞分裂ならびにコロニー形成に対するプロトプラスの密度、培地およびホルモンの種類と濃度条件について検討した。培養開始 14 日後に修正 K_8 液¹⁵⁾ (ブドウ糖 2%, ビタミン C と PVP (polyvinylpyrrolidone) 最終濃度 5 mg/l) を培地に添加し、浸透圧を 4 分の 1 に下げた。3 週間後、1 mm に生長したコロニーを 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BA, 3% ショ糖および 0.2% Gelrite を添加した MSB (MS 無機塩, B_5 ビタミン) 増殖培地に移植した。5 週間後、3~4 mm に増殖したカルスを種々の濃度のホルモンを含む MSB 再分化寒天培地に移植し、不定芽の再分化を誘導した。移植後は 25°C, 2,000 lux, 14 時間照明下で培養した。誘導された不定芽が 3~4 cm に伸長した時にそれらを切り出して 0.5 mg/l IBA, 0.1 mg/l GA_3 , 3% ショ糖および 0.75% 寒天を添加した 2 分の 1 希釈 MS 培地に移植して発根させ、完全な植物体を再生させた。

Table 1. Influence of protoplast density on cell division and colony formation.

Protoplast density (Cells/ml)	1st cell division	2nd cell division	Colony formation	% Protoplast divided after 14 days of culture
5×10^4	8*	14*	22*	5.2
1×10^5	6	11	16	14.6
5×10^5	5	9	14	28.6
1×10^6	7	10	16	16.2
5×10^6	9	12	18	11.4

* Figures indicate No. of days required.

Table 2. Effects of the phytohormone components of the differentiation medium on shoot regeneration from mesophyll protoplast-derived calli.

Proliferation medium (mg/l)	Differentiation medium (mg/l)	No. of inoculated calli	No. of calli with shoots	Frequency of shoot formation (%)
NAA 0.1+BA 0.25	IAA 0.1+BA 1.0	55	4	7.2
	IAA 0.1+Zeatin 1.0	52	3	5.7
	IAA 0.1+BA 1.0+Zeatin 1.0	64	18	28.1
	IAA 0.5+BA 1.0	45	4	8.9
	IAA 0.5+Zeatin 1.0	65	8	12.3
	IAA 0.5+BA 1.0+Zeatin 1.0	65	27	41.7

3. 結果および考察

(1) キリプロトプラストの分裂とコロニー形成

キリプロトプラストの収量は若葉 1g 新鮮重当り 5.7×10^6 個程度であった。これらのプロトプラスト (図 1-A) のうち FDA で強く染色された活性の高いプロトプラストは約 94% であった (図 1-B)。プロトプラストを蛍光顕微鏡で観察したところ、培養 1 日目ですでに細胞壁の再生がみられた。プロトプラスト培養開始 5 日目頃から 1 回目の細胞分裂が観察され (図 1-C)、9 日目に 2 回目の細胞分裂が見られた。さらに、14 日後に 3 回目および 4 回目の分裂とマイクロコロニーの形成が認められた (図 1-D, E)。この時点における細胞分裂ならびにコロニー形成に対するプロトプラストの適正密度は 1 ml 当り 5×10^5 個であり、28.6% と高い分裂率が得られた (Table 1)。

また、細胞分裂ならびにコロニー形成に対する培地およびホルモンの種類と濃度について検討した結果、0.2 mg/l 2, 4-D あるいは 1 mg/l NAA と 0.5 mg/l BA を同時に添加した改変 K_8P 培地でプロトプラストの顕著な分裂およびコロニーの急速な形成が認められた。プロトプラスト培養 14 日後に修正 K_8 液 (ブドウ糖 2%, 最終濃度で 5 mg/l のビタミン C と PVP を含む) を培地に添加した場合、細胞の褐変が抑制され、コロニーの増

殖も促進された。3 週間後、約 1 mm に生育したコロニーが観察された (図 1-F)。コロニーの形成率は培養したプロトプラスト総数の約 12% であった。上記の修正 K_8 液を培地に添加しなかった場合には 1 カ月後にすべて褐変し、枯死した。

(2) コロニーの増殖と不定芽の誘導

培養開始 3 週後に直径約 1 mm に増殖したコロニーを 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BA, 3% ショ糖および 0.2% Gelrite を添加した MSB 増殖培地に移植し、2 週間後に直径 3~4 mm に増殖したカルスを得た (図 1-G)。これらのカルスを再分化培地に移植したところ、約 2 週間でグリーンスポットが形成され、20 日後には不定芽が分化した (図 1-H)。2 種類の IAA 濃度 (0.1, 0.5 mg/l) それぞれに BA 1 mg/l, Zeatin 1 mg/l を組み合わせて添加した培地を用いて再分化率に対する影響について検討した (Table 2)。

今回調査した全てのホルモン処理区において不定芽分化が見られたが、IAA 0.5 mg/l+BA 1 mg/l+Zeatin 1 mg/l の培地が最適であり、再分化率は 41.7% であった。IAA に関しては 0.1 mg/l よりも 0.5 mg/l で一般的に高い再分化率が得られた。3 cm 程度に伸長した不定芽を IBA 0.5 mg/l と GA_3 0.1 mg/l 添加した 2 分の 1 希釈 MS 培地に移植したところ茎が伸長し、発根も見られ、その後完全な植物体を得ることができた (図

1-I), プロトプラスト単離から不定芽形成までに2カ月, 完全な植物体形成までに2.5カ月要した。

今まで, 林木のプロトプラスト培養における最大の障害はコロニー細胞における褐変現象であった。本研究ではビタミンC 5 mg/l, PVP 5 mg/l の添加により細胞の褐変を抑制し, コロニーの増殖を促進することができた。また従来, 林木のプロトプラスト培養では再分化までに数カ月を要していたが K_{8P} 液体培地とビタミンC, PVP の使用により2.5カ月という短期間で順化可能な植物体を得ることができた。

文 献

- 1) Rao, P. S., P. Ozias-Akins, 1985. *Protoplasma*, **124** : 80-86.
- 2) Sticklen, M. B., S. C. Domir, R. D. Lineberger, 1986. *Plant Sci.*, **47** : 29-34.
- 3) Ruseell, J. A., B. H. McCown, 1986. *Plant Sci.*, **46** : 133-142.
- 4) Ruseell, J. A., B. H. McCown, 1988. *Plant Cell Reports*, **7** : 59-62.
- 5) 王 善平, 許 智宏, 衛 志明, 1990. 中国科学B輯, **12** : 1260-1263.
- 6) Merkle, S. A., H. E. Sommer, 1987. *Amr. J. Bot.*, **74** : 1317-1321.
- 7) Attree, S. M., D. I. Dunstan, L. C. Fowke, 1989. *Bio/Technology*, **7** : 1060-1062.
- 8) Song, S. L., K. Suda, K. Ishii, A. Saito, K. Ohba, 1991. *J. Jpn. For. Soc.*, **73** : 60-63.
- 9) 宋 碩林, 佐藤 亨, 齊藤 明, 大庭喜八郎, 1989. 日林誌, **71** : 456-459.
- 10) Song, S. L., T. Sato, K. Ishii, A. Saito, K. Ohba, 1990. *J. Jpn. For. Soc.*, **72** : 495-498.
- 11) 宋 碩林, 永野正造, 工藤 亘, 1990. 日林誌, **72** : 139-142.
- 12) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15** : 473-497.
- 13) Power, J. B., M. R. Davey, 1980. *Laboratory Manual: Plant Protoplasts*. Univ. of Nottingham.
- 14) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. *Exp. Cell Res.*, **50** : 151-148.
- 15) Kao, K. N., 1977. *Mol. Gen. Genet.*, **150** : 225-230.

Summary

Plant Regeneration from Leaf Mesophyll Protoplasts of *Paulownia fortunei*

Zhi-Ming WEI, Hiroshi KAMADA and Hiroshi HARADA

*Gene Experiment Center, Institute of Biological Sciences,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan 305*

Leaf mesophyll protoplasts of *Paulownia fortunei* were enzymatically isolated from the leaves of 6-8 week old sterile seedlings and cultured in modified K_{8P} liquid medium. The Protoplast-derived cells started to divide after 5 days of culture, with cell division frequency of about 28.6% at 14 days. After 14 days of culture the addition of K_8 fresh medium containing 5 mg/l each of ascorbic acid and PVP was essential for sustained cell division, colony proliferation and to avoid cell browning. Shoot buds were differentiated from protoplast-derived calli on a regeneration medium containing 0.5 mg/l IAA and 1.0 mg/l each of BA and Zeatin. The frequency of shoot bud formation was about 41.7%. Whole plants were obtained upon transferring 3 cm shoots to 1/2 MS medium with 0.5 mg/l IBA and 0.1 mg/l GA_3 .