

マングローブ植物細胞の耐塩性、好塩性とアレロパシー活性との関係解明

Research on the relationship between salts tolerance and allelopathy at the
cellular level in mangrove plants.

国立大学法人 横浜国立大学大学院

環境情報学府

長谷川 愛

HASEGAWA Ai

2014年3月

マングローブ植物細胞の耐塩性、好塩性とアレロパシー活性との関係解明

Research on the relationship between salts tolerance and allelopathy at the
cellular level in mangrove plants.

横浜国立大学大学院 環境情報学府 環境生命学専攻

学籍番号	11TA004
氏名	長谷川 愛
Name	HASEGAWA, Ai
責任指導教員	笹本 浜子 教授
修了年月日	2014年3月26日

目次

序論	1
略語略号	4
I. <i>Sonneratia ovata</i> 新規液体培養細胞系の確立	
I-1. 緒言	5
I-2. 材料及び方法	6
I-2-1) 供試植物育成方法及び組織切片の調整	
I-2-2) カルス誘導における糖の影響	
I-2-3) <i>Sonneratia ovata</i> 液体培養、固体培養による継代培養	
I-3. 結果	8
I-3-1) カルス誘導初期における糖源の影響	
I-3-2) <i>Sonneratia ovata</i> 継代培養	
I-3-3) <i>Sonneratia ovata</i> 培養における分化	
I-4. 考察	10
II. <i>Sonneratia</i> 液体培養細胞に対する塩類の影響解析	
II-1. 緒言	12
II-2. 材料および方法	14
II-2-1) 供試細胞	
II-2-2) 供試細胞の継代維持	

II-2-3)	多穴シャーレを用いた塩の影響解析方法(SS法)	
II-2-4)	塩の影響のヒートマップ作製	
II-3.	結果	17
II-3-1)	<i>Sonneratia caseolaris</i> 液体培養細胞ガラクトース培地	
II-3-2)	子葉由来 <i>Sonneratia ovata</i> 液体培養細胞スクロース培地	
II-3-3)	根由来 <i>Sonneratia ovata</i> 液体培養細胞ガラクトース培地	
II-3-4)	ヒートマップによる比較	
II-4.	考察	19
III.	プロトプラスト単離・培養系による耐塩性試験	
III-1.	緒言	21
III-2.	材料および方法	22
III-2-1)	供試無菌植物の育成および培養細胞の継代培養	
III-2-2)	プロトプラスト単離条件の検討	
III-2-3)	プロトプラスト培養のための基本培地と浸透圧条件および植物ホルモン条件の探索	
III-2-4)	プロトプラスト培養による5種の塩の影響試験	
III-3.	結果	27
III-3-1)	プロトプラスト単離酵素と浸透圧条件、精製条件など	
III-3-2)	プロトプラスト培養のための基本培地と浸透圧条件および植物ホルモン条件の探索	
III-3-3)	プロトプラスト培養による5種の塩の影響試験	
III-3-4)	ヒートマップによる塩の影響の好塩性、耐塩性の比較	
III-4.	考察	30

IV. アブシジン酸のプロトプラスト中の微量定量と培養に対する影響解析

IV-1. 緒言	32
IV-2. 材料と方法	34
IV-2-1) 液体培養細胞と子葉 プロトプラスト単離と培養	
IV-2-3) プロトプラスト培養における ABA および GA ₃ の影響	
IV-2-4) ABA の微量抽出・精製、定量	
IV-3. 結果	36
IV-3-1) プロトプラスト培養における ABA および GA ₃ による影響	
IV-3-2) 内生 ABA の定量	
IV-4. 考察	37

V. サンドイッチ法によるアレロパシー検定

V-1. 諸言	39
V-2. 材料および方法	40
V-2-1) 供試植物	
V-2-2) サンドイッチ法によるアレロパシー検定	
V-3. 結果	41
V-3-1) <i>S. alba</i> 葉サンドイッチ法	
V-3-2) <i>S. caseolaris</i> 葉サンドイッチ法	
V-3-3) <i>S. ovata</i> 葉 サンドイッチ法	
V-3-3) 3種のサンドイッチ法比較	
V-4. 考察	42

VI. プロトプラスト法によるアレロパシー活性の検定

VI-1. 緒言	43
VI-2. 材料と方法	45
VI-2-1) プロトプラスト単離と精製	
VI-2-2) プロトプラスト培養条件の検討	
VI-2-3) プロトプラスト法によるアレロパシー検定	
VI-3. 結果	49
VI-3-1) プロトプラスト単離条件の検討	
VI-3-2) プロトプラスト培養条件の検討	
VI-3-3) プロトプラスト法によるアレロパシー検定	
VI-4. 考察	52
総合考察	54
謝辞	56
表および図	57
参考文献	117

序論

マングローブ林は熱帯・亜熱帯の汽水域に広がり、多様な種から構成され、それらは100種以上にも及ぶ(Tomlinson 1986, Spalding et al. 2010)。その特徴的な生育環境には、潮の干満により海水に含まれる塩類により Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、などのイオンが多く存在する。

海水の塩濃度は約 3.45%(Lyman and Fleming, 1940)であり海水中のイオンのモル濃度は、海水の密度を沖縄県西表島の年平均海水温度である 25°Cのときの密度 1.024 g/cm³を用いて求めると次のようになる。溶質全体の約 31%を占める Na^+ が約 470 mM、 Mg^{2+} が約 54 mM、 K^+ が約 10 mM、 Ca^{2+} が約 10 mM、溶質の全体の約 55%を占める Cl^- が 550 mM、 SO_4^{2-} が 28 mM の濃度で含まれており、これらのイオンで溶質の質量の 98%以上を占め、イオンの合計の濃度は約 1.1 Mとなる。汽水域の塩濃度は場所により大きく異なるが、構成するイオンとその割合はほぼ一定であることから、マングローブ植物が生育する領域においても、 Na^+ 、 Cl^- が最も多く存在するため、これらの塩構成イオンに対する耐性が必要とされる。さらに海側前面域に生育する種では、1.1 M の塩濃度下で浸透圧に対応しなければならない。

マングローブ林の構成種は純林による帯状群落を形成することで知られており、構成種の分布には、これらのイオンに対する各々の種の持つ耐塩性の程度が、地形や土壌条件などの環境要因と共に大きく関わると考えられる。マングローブ植物自体の耐塩性の強さや、耐塩性メカニズムは種により異なり、これまでに知られるメカニズムとしては、根による塩分濾過、塩類腺(塩腺)での塩類の排出、葉の多肉化など個々の種によって様々なレベルの機構が知られている(川名他 2008)。

さらに、マングローブの細胞レベルでの耐塩性に関する研究として、これまでに初期のカルス誘導に対する塩類の影響に関しては、塩濃度の低い上流側に見られる *Bruguiera sexangula* ロッカクヒルギの、葉や胎生種子を用いてカルス誘導が行われ、後者に対する NaCl 耐性が報告された(Mimura et al. 1997)。*Sonneratia alba* マヤブシキの子葉(Yamamoto et al. 2011)や、*Avicennia marina* ヒルギダマシの葉(Hayashi et al. 2009)を用いて、 NaCl ばかりでなく、海水に多く含まれる他の陽イオン(K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+})を含む塩類に対する反応も調べられ、初期細胞増殖(カルス誘導)における NaCl 好塩性や耐塩性などの特徴が明らかになっている。また、塩濃度の低い生育域の *Sonneratia caseolaris* ベニマヤブシキの子葉、胚軸、葉などを用いた、カルス誘導に対する塩類の影響試験も行われた(Yamamoto et al. 2011)。

マングローブの液体培養細胞系の開発に関しては、塩濃度の高い場所に生育可能な種である、*Sonneratia alba*のめしべ由来のカルス培養細胞において、50 mM NaCl による増殖促進がみられ、核酸塩基代謝研究が行われた(Akatsu et al. 1996)。また、上流側の塩濃度の低い領域に生育する、*Bruguiera sexangula*の葉由来カルスから継代可能な液体培養系が確立され、 NaCl 100 mMにおいても生育阻害を受けないことが明らかになった

(Kura-Hotta et al 2001)。この液体培養細胞株から耐塩性因子「マンダリン」のmRNAが単離されている。そのcDNAをタバコ*Nicotiana tabacum* L.の培養細胞BY-2などに形質転換させたところ耐塩性の向上が確認され(Yamada et al. 2002)、また、同じく樹木のユーカリに形質転換し、その形質転換体の耐塩性が認められている(Yu et al. 2013)。このように、培養細胞系の確立は、植物体における耐塩性に寄与する分子生物学的な研究の基礎につながり、さらなるマングローブ植物の耐塩性の機構解明や、耐塩性付与植物の研究につながるものと考えられる。このように、細胞培養系の確立によりマングローブ植物の細胞自体にも耐塩性が認められ、その耐塩性メカニズムは細胞レベルにおいても存在することが示唆されている。近年、海側域に生育する*Sonneratia alba* マヤプシキの子葉(Kawana et al. 2007)および、*Avicennia alba*ウラジロヒルギダマシ子葉(Hayashi et al. 2009)から、液体培養細胞系が確立され、これらの増殖に対する、各種イオン Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} の影響の特徴が明らかにされた(Kawana and Sasamoto 2008; Hayashi et al. 2009)。また、海側域に生育する*Sonneratia alba*と比較して、上流生育域である*Sonneratia caseolaris*は、測定された塩濃度の高低とその差が明らかにされている(Duke 1992)。他のマングローブ種との塩濃度は重なりが見られ、季節により差が見られないのと対比される。*Sonneratia caseolaris*のseedling(胚軸、子葉)から液体培養細胞系が得られているが、未だ、各種塩イオンの影響については報告されていない。本研究では、海側域に生育するマングローブ種と上流域に生育する種の液体培養細胞を生理学的に比較するため、この*Sonneratia caseolaris*の液体培養細胞について、同様な塩類の影響試験を行うこととした。また別の*Sonneratia*属の中で上流域に生育する種である*Sonneratia ovata* マルバマヤプシキの無菌実生から、新規に液体培養細胞系を誘導確立し、子葉由来ばかりでなく、根組織由来の液体培養細胞を得、これについても、同様な塩類の影響試験を行い、*Sonneratia* 属3種について、比較した。

次に、耐塩性の細胞内機構の解明に迫るため、細胞壁を除き、浸透圧調節を行ったプロトプラストを、海側域のマングローブ種、*Sonneratia alba*、*Sonneratia griffithii* グリフィスハマザクロ、*Avicennia marina*の子葉から単離し、塩類の影響を明らかにした。また、*Avicennia alba*子葉由来液体培養細胞、*Sonneratia alba*子葉由来液体培養細胞の50 mM NaCl添加培地で継代培養されたNaCl株からもプロトプラストを単離培養し、塩の影響を調べ、*Bruguiera sexangula*の培養細胞のプロトプラストの既報(Fukumoto et al. 2004)と比較した。このプロトプラスト研究は、細胞壁を持つ細胞との比較研究の他、いろいろな代謝物の影響評価(Sasamoto and Ashihara 2014)や、植物ホルモンなどの微量代謝物質の簡易定量分析(Sasamoto et al. 2002)、細胞融合などの細胞育種(Wakita et al. 2005, Sasamoto et al. 2006)、細胞レベルの構造物の分化研究(Fukumoto et al. 2005)などの基礎を形作る。本研究では、植物ホルモンとして、オーキシンやサイトカイニンのほかに、耐塩性に関与した植物ホルモンとして、特にアブシジン酸をとりあげ、その微量定量と、プロトプラスト培養に対する影響との関係解明を行った。

このようなマングローブ植物の持つ耐塩性の獲得は植物の生存戦略の一つである。一方、

植物の生育における競合メカニズムの一つにアレロパシー(他感作用)(Molisch 1937)がある。アレロパシーは根からの滲出や葉からの揮発、落葉からの溶脱などの経路により環境中に何らかの化学物質が放出され、その化学物質の作用により植物間で起きる促進・阻害の相互作用を指し、多くの場合は、セイタカアワダチソウに見られるような競合種の生育阻害などの例がある(Fujii 2000)。このアレロパシーとマングローブの分布域との関連性がこれまでに調査された例は少ないが、海側の塩濃度の高い領域では耐塩性の低い植物は容易に侵入できず、高い耐塩性を持つ種は、アレロパシーによる他の種の生育阻害を必要としないことが予測される。一方、上流側の塩濃度の低い領域では、強い耐塩性は必要とされないが、海側よりも競合種の数が増え、アレロパシーによる競合が必要となると考えられる。この作業仮説のもと、同じ *Sonneratia* 属に属して分布域の塩濃度が異なる 2 種 *Sonneratia alba* J. Smith と *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl.(Duke 1992)のアレロパシーについて、従来からアレロパシー活性の検定に用いられているサンドイッチ法 (Fujii 1994, 2004) と、新規アレロパシー検定法として、草本植物において開発されたプロトプラスト法 (Sasamoto et al. 2013) を初めてマングローブ種に応用し、耐塩性とアレロパシーの関係性解明を試みた。すなわち、海側域に生育する *Sonneratia alba* と、上流側に生育する *Sonneratia caseolaris* の子葉由来液体培養細胞のプロトプラストに加えて、*Sonneratia ovata* の子葉、根由来の液体培養細胞のプロトプラストを用いて、レタスプロトプラストとの混合培養法によるアレロパシー試験を行い、レタスに対する阻害効果を定量的に明らかにした。マングローブ研究における新たな細胞実験系を開発し、新たなデータ解析法を考案することにより、マングローブ植物の生育域や耐塩性、好塩性と、アレロパシーとの関係について検討を行った。

なお、本研究における個々の成果については、これまでに学会発表および投稿論文において報告している(長谷川ら 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2012; Hasegawa et al., 2011, 2013; 林ら 2008ab; Hayashi et al., 2009; 早津ら 2011, 2012; 井上ら 2009, 2010; 栗田ら 2008; 森ら 2011, 2012; 小柳ら 2012a, 2012b; 笹本ら 2011, 2012; Sasamoto et al., 2013; 土屋ら 2009, 2011; Tsuchiya et al., 2013)。

略語略号

本文中の略語略号

ABA	:	Absciscic acid
BA	:	6-Benzyladenine
CPPU	:	<i>N</i> -(2-Chloro-4-pyridyl)- <i>N'</i> -phenylurea
2,4-D	:	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
GA ₃	:	Gibberellic acid
TDZ	:	1-Phenyl-3(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea

I. *Sonneratia ovata* 新規液体培養細胞系の確立

I - 1. 緒言

汽水域に生育するマングローブ植物の生育域の塩濃度が測定され(Duke 1992)、*Sonneratia* 属の中では、塩濃度の高い海側域に生育する *Sonneratia alba*(マヤプシキ)の測定塩濃度と、塩濃度の低い上流側に生育する *Sonneratia caseolaris* (ベニマヤプシキ)の塩濃度は、雨季、乾季を通して異なることが明らかにされている。他のマングローブ種の中では、海側に生育する傾向のものは、その生育域の測定塩濃度は高く、上流側に生育する種においては低い傾向が見られるものの、塩濃度の重なりが見られる。同属の中で、はっきりとした差が測定されたものは、*Sonneratia* 属の上記 2 種のみである。同じ属の中には、*Sonneratia griffithii* のように、*Sonneratia alba*と近い分布域のものもあるが、本章で初めて細胞培養を行う *Sonneratia ovata* は、群落を形成せず、潮の干満によって塩類の影響を受ける立地に見られる種であり、上流側に生育する(Tomlinson 1986)。

これまで、*S. alba* の無菌芽生えの子葉から、植物ホルモンとして、2,4-dichlorophenoxyacetic acid 0.1 μ M と、糖源として 3%スクロースを含む、Murashige & Skoog (MS, 1962) の基本培地を用いて、液体培養細胞が誘導された(Kawana et al. 2007)。カルス誘導時および、継代培養により確立された液体培養細胞系を用いて、海水に多く含まれる各種塩の生長に対する影響解析が行われ、*Sonneratia alba* 培養細胞の好塩性が明らかにされた(Kawana & Sasamoto 2008)。また、*Sonneratia caseolaris* の無菌芽生えの子葉や胚軸、および実生の葉を用いて、カルス誘導に対する培地の塩や糖の種類や濃度の影響などが明らかにされ、seedling(根を除く子葉および胚軸組織)からの液体培養細胞系が誘導された(Yamamoto et al. 2009)。その際、カルス誘導に対して、通常の培養に用いられるスクロースに比べ、ガラクトースが有効であることが示された。継代培養により、液体培養細胞系が確立されたが、各種塩の影響解析は未だ行われていない。*Sonneratia ovata* の組織培養の報告もない。

本章では、*Sonneratia ovata* 無菌実生の子葉、胚軸、根の 3 種類の組織切片を、糖源としてスクロースまたはガラクトースと、植物ホルモンを含む MS 基本培地で振盪培養し、それぞれの組織から液体培養細胞を誘導し、継代培養可能な液体培養細胞系を確立した。比較対照として *S. alba* の無菌実生の子葉、胚軸や、非マングローブ樹木の例としてポプラのシュートカルチャーの葉などを用い、*Sonneratia ovata* カルス誘導時における糖源の種類的重要性を明らかにした。また、*Sonneratia ovata* 液体培養細胞からの、根などの器官分化能、色素形成の生化学的分化能についても、*Sonneratia alba* および、*Sonneratia caseolaris* の液体培養細胞と比較し、その特徴を明らかにした。

I-2. 材料及び方法

I-2-1) 供試植物育成方法及び組織切片の調整

Sonneratia alba 無菌苗育成は、既報によった(Kawana et al. 2007)。西表島産種子を 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)水溶液で 1 時間滅菌し、滅菌 RO 水で洗浄後、0.8%寒天培地に播種し、25°C 16 時間明所で育成した。3 ヶ月後、無菌実生から得られた子葉を用いた。

Populus alba (ポプラ)シュートカルチャーの育成は既報によった(Sasamoto et al. 2006)。すなわち、インドール酪酸 4 μM 、3%スクロースを含む MS 基本培地、寒天1%を含む培地で継代培養し、幼葉を用いた。

Sonneratia ovata のタイ産種子を 2.5% NaClO 水溶液で 1 時間滅菌し、平底試験管 15 mL 中の 0.8%寒天培地 5ml 上に播種し、25°C(明培養棚)あるいは 35°Cインキュベータ(TOMY CLE-303)、16 時間日長の明所で培養し、得られた無菌実生の子葉、胚軸、根を用いた。

滅菌したシャーレ上、少量の滅菌超純水中で、葉、子葉、胚軸、根などを 2-5mm 角の切片に細断し、各培地に 2-3 切片を投入し、平底 10 ml 管ビン法によるカルス誘導実験に供した。

I-2-2) カルス誘導における糖の影響

10 ml 平底管ビン培養法によるカルス誘導を行なった(Kawana et al. 2007, Yamamoto et al. 2009)。培養容器として 120°Cで 20 分オートクレーブした透明フィルム(BioHazard Bag 86.1199; Assist Co. Ltd)を被せた 10 ml 平底培養管ビン(Maruemu No. 3)を用いた。

1 ml 液体培地には糖源として、各 1.5%、3%のスクロースまたはガラクトースを含む Murashige & Skoog (MS) 基本培地 (Murashige and Skoog 1962)を用いた。*S. alba*, *S. ovata* に対しては、植物ホルモンオーキシシンとして 0.1 μM の 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した。*Populus alba*に対しては、オーキシシンとして 2,4-D 10 μM 、サイトカイニンとして benzyladenine (BA) 0.1 μM になるように添加した。

インキュベーター(SANYO MIR-553)中にシェーカー(EYELA 社製 MMS-210 または、TAITEC NR-20)をセットし、*Sonneratia alba*, *Sonneratia ovata* は 30°Cにおいて、*Populus alba* は 27°Cにおいて、それぞれ 100 rpm で振とう培養を行った。

透明フィルムを通して、倒立顕微鏡(Olympus CK40)下で観察を行った。

培養を行った 10 ml 管ビン20本の底部から、スキャナー(Canoscan or Epson GT-X970)を用いて得られた画像を、ソフト VIX で切り分けて画像解析を行った。また、透明フィルムを通した倒立顕微鏡観察により、各培養条件における、切片ごとのカルス化率あるいは、切片の各辺ごとの反応程度を 1-4 段階の数値で表し、平均化してデータ処理を行った。

I-2-3) *Sonneratia ovata* 液体培養、固体培養による継代培養

子葉、胚軸、根由来液体培養細胞の維持は、Murashige-Skoog (MS) 基本培地 (Murashige and Skoog., 1962) に 3%スクロース又は 3%ガラクトース及び 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1 μ M を添加した培地を用いて行った。

30 ml の新鮮な維持培地を 100 ml 培養フラスコに分注した後、3 週間程度培養した細胞を 0.5–2 ml 移植した。30°C、暗所、100 rpm の条件で 回転振とう培養を行なった。

また、継代培養移植時に、42 μ m のナイロンメッシュを通し、古い培地を洗い落としたメッシュ上部の細胞を、液体培地へ移植すると同時に、9cm シヤーレ中の寒天 0.8%の固形培地にピンセットで移植した。これらは、30-34°Cの明所 (EYELA FLI-160、60 μ E、16 時間日長)、または 30°C暗所 (SANYO MIR-553) において培養し、カルス増殖、赤色分化や根の分化について観察を行なった。

I-3. 結果

I-3-1) カルス誘導初期における糖源の影響

I-3-1)-(1) *Sonneratia alba* 子葉、胚軸、根

Sonneratia alba 子葉からのカルス誘導時における糖の影響を調べた。図 I-1a で培養2週間後の、ガラクトースとスクロース各 1.5%と 3%の場合のカルス誘導率を表している。子葉に対しては、既報(Kawana et al. 2007)と同じように、3%スクロースによるカルス誘導が再現された。一方、新しく実験を試みたガラクトースによっても増殖が見られ、1.5%ガラクトースが最も増殖した。しかし、辺ごとのカルス誘導率について、スクロースとガラクトースの間の t-検定 ($P<0.1$)の結果は明らかな差が見られなかった。図 I-1b は、子葉からのカルス誘導数ヵ月後の 10 ml 管ビンを底部からスキャンを行った図であり、ガラクトース側は、褐変が見られる。胚軸に対しては 3%ガラクトースが効果的であった(図 I-2a)。図 I-2b は、数ヵ月後の 10 ml 管ビンを底部からスキャンを行った図であり、低率のカルス誘導は見られるが、ガラクトースとスクロースの差は胚軸、根においても見られない。

I-3-1)-(2) *Populus alba* 葉

非マングローブ樹木の *Populus alba* 葉からのカルス誘導は、1.5%、3% 共に、ガラクトースよりも、スクロースが効果的であり、t-検定の結果、3%の時($P<0.1$)、1.5%の時($P<0.005$)、どちらでも有意な差が認められた(図 I-3a)。スキャン図においては、3%スクロースとガラクトースの差は認められないが、1.5%においては、ガラクトースによる褐変が顕著であった。(図 I-3b)。カルス増殖は、マングローブ *Sonneratia alba* と比べ早い。

I-3-1)-(3) *Sonneratia ovata* 子葉、胚軸、根

図 I-4a に示すように、カルス誘導初期の8日においては、子葉、胚軸共に、3%ガラクトース培地の方が3%スクロース培地に比べ、早い反応を示した。ガラクトースとスクロースの間でt-検定を行ったところ、差が見られた ($P<0.01$)。1ヶ月後のスキャン図(図 I-4b)において明らかに、子葉、胚軸、根のどの起源組織においても、細胞増殖が認められる。

図 I-5 に示すように、カルス誘導後1ヶ月の倒立顕微鏡による細胞観察においては、スクロース培地において、子葉(a)、胚軸(b)、根(c)は、3%ガラクトース培地の子葉(d)、胚軸(e)、根(f)に比べ、それぞれ組織片からのカルス増殖反応が遅れており、遊離細胞の量もガラクトース培地の方が多傾向がみられた。

I-3-2) *Sonneratia ovata* 継代培養

図 I-6 は、*Sonneratia ovata* 各組織からのカルス誘導後 1.5 ヶ月後に、100 ml フラスコ中の液体培地にそれぞれ移植され、2 週間培養後の細胞の様子を表すが、スクロース培地において、根由来の培養物の生育がよくなっているが、子葉と胚軸由来の培養物の生育は遅いことがわかる。ガラクトース培地においては、子葉、胚軸、根由来のどの培養物においても、遊離細胞塊が多数見られ、成長がよい。

3%スクロースおよびガラクトースで培養した各組織は、ガラクトースのほうが初期反応は良かったが、時間が経過するとスクロース培地でも増殖し、子葉、胚軸、根各組織由来の培養系が継代培養可能となった(図 I-7)。

液体培養系が確立されたものの中から、子葉由来スクロース培地のストレインと、根由来ガラクトース培地の2ストレインについては、誘導から3年以上の長期間培養を継続している。

I-3-3) *Sonneratia ovata* 培養における分化

カルス誘導後、1.5 ヶ月において、液体培養中に、不定根の分化が認められた。各組織から得られた液体培養細胞の継代培養後でも根の分化が観察された(図 I-8)。カルス誘導誘導継代培養5ヶ月後において、多くの不定根の分化が見られた。子葉由来培養物よりも、胚軸由来培養物からの根分化が顕著であった(図 I-9)。

また、得られた液体培養細胞を寒天培地に移植継代したところ、カルス誘導後、6.5 ヶ月では、明所培養により緑色カルス、赤色カルス、白色カルスなどが観察された(図 I-10)。赤色分化能は、子葉、胚軸、根、全ての組織起源の、カルス培養において観察された。

子葉由来スクロース培地の培養物は、固形培地ばかりでなく、液体培養においても、赤色の細胞が分化する能力があり、(図 I-11)、3年間継代培養されたカルスストレインは、明所培養で、赤色素形成能を安定的に維持している。

I-4. 考察

Sonneratia alba 子葉からのカルス誘導については、これまでに、3%スクロース培地により、液体培養細胞が得られている (Kawana et al. 2007)。本章では、3%スクロースによるカルス誘導が再現された。あらたに 1.5%と3%のガラクトースの影響を調べた結果、1.5%ガラクトースが最も増殖し、ガラクトースも有効であることが明らかになった。胚軸からのカルス誘導に対しては 3%ガラクトースが効果的であった。しかし、辺ごとのカルス誘導率について、スクロースとガラクトースの間の t-検定の結果は明らかな差が見られなかった。10 ml 平底管ビン培養-倒立顕微鏡観察法により、1ml の液体培地中、培養短期間で反応を調べることができることは、これまでの *Sonneratia alba* や、*Sonneratia caseolaris* のカルス誘導実験と同じように有効性が示された(Kawana et al. 2007、Yamamoto et al. 2011)。さらに、新鮮培地に移植しないままの、10 ml 管ビンの底部からのイメージスキャナーを用いた画像処理により、ガラクトース培地においては、組織片の褐変がスクロース培地にくらべ、早く起きることが示された。

非マングローブ植物のポプラの葉からのカルス誘導にはスクロースの方が明らかに有効であり、これは、通常の植物組織培養培地には、スクロースが用いられていることと一致する。すべての実験において、糖を含まない培地を比較として設け、糖フリーの培地においても、若干のカルス誘導がおき、組織切片自身に含まれる糖を利用したと考えられる。いずれの場合においても、糖フリーに比べて、スクロース、ガラクトースを含む方が、生育は促進されていた。

Sonneratia 属の他の種については、*Sonneratia caseolaris* 葉からのカルス誘導においては、固形培地において、スクロースよりもガラクトースの方が増殖に効果的なことが報告されている(Yamamoto et al. 2009)。また、同様な固形培養においては、*Sonneratia griffithii* の胚軸においては、組織片の反応率はスクロースの方がガラクトースに比べて高く、子葉は反応が全体に悪いが、ガラクトースの方がスクロースより高い傾向があることが報告されている(土屋他 2009)。しかし、*Sonneratia alba* 子葉と同じように、継代培養に十分な増殖細胞を得るための培養期間は、ポプラのようなバイオマス生産樹や草本植物と比べると非常に長い傾向がある。

一方本章で初めて培養を試みた *Sonneratia ovata* においては、上記3種の *Sonneratia* 属と比べて反応が早く、液体培養 1 ヶ月で、移植継代に十分な増殖が得られた。各組織に対する糖の影響も、初期のカルス誘導においては、ガラクトースが増殖に明らかに効果的であった。このように、マングローブ *Sonneratia* 属において、ガラクトースがカルス誘導のための栄養糖として有効な結果が得られたことから、*Sonneratia* 属の特徴であると考えられる。

他のマングローブ種においては、未だ培養におけるガラクトースの効果は実験されていないが、*Avicennia marina* 植物体においては、根に特異にスタキオース(スクロースにガラクトース分子が結合した構造)を蓄積することが明らかになっており(Ashihara 1997)、ガラクトースの関与が示唆される。

Sonneratia ovata のカルス誘導時においては、ガラクトースの方が有効であったが、その後の継代培養においては、スクロースも有効であり、一応子葉、胚軸、根のすべてにおいて、

ガラクトース、スクロースの両方の条件での継代培養が可能であった。このような、flexibility は、ガラクトース培地で誘導された *Sonneratia caseolaris* の seedling 由来の液体培養細胞 (Yamamoto et al. 2009) が、継代培養においては、スクロースで可能であったこととも共通する。

今回得られた *Sonneratia ovata* の不定根分化能については、*Sonneratia alba* の子葉の培養初期 (Kawana et al. 2007) や、*S. caseolaris* の培養においても観察されている (山本他 2007)。

赤色色素の形成能に関しては、*Sonneratia ovata* の培養において顕著に観察され、*Sonneratia alba* や、*Sonneratia caseolaris* については、これまで観察されていない。しかし、*Sonneratia alba* の種子を果実から取り出すと、種子は一時的に赤色を呈する。また、*Sonneratia caseolaris* については、この赤色種子を含むジュースは飲用に供されている (ISME news)。これら3種は、条件によって赤色色素を蓄積する代謝能を持っているものと考えられる。

これまで、マングローブの液体培養細胞は、いずれも葉 (*Buruguiera sexangula*, Kura-Hotta 2011)、子葉 (*Sonneratia alba*, Kawana et al. 2007)、実生子葉胚軸 (*Sonneratia caseolaris*, Yamamoto et al. 2009)、子葉 (*Avicennia alba*, Hayashi et al. 2009) などの地上部組織から誘導されており、*Sonneratia ovata* の根起源のものは初めてである。

本章において成功した *Sonneratia ovata* の液体培養系の確立は *Sonneratia* 属間の植物分布域との関係比較や、マングローブの耐塩性の機構解明、アレロパシー活性検定のためのプロトプラスト法などの基礎研究に寄与するものと考えられる。

II. *Sonneratia* 液体培養細胞に対する塩類の影響解析

II-1. 緒言

マングローブは、環境中の塩分(満潮時の海水, 分布域の土壌中塩分)に対する耐塩性のいろいろなレベルの機構が知られている(川名他 2008)。その中でも、マングローブの細胞レベルの耐塩性に関する研究としては、*Bruguiera sexangula* (Lour.)Poir.(ロッカクヒルギ)で葉のカルス誘導時に 100 mM NaCl を添加しても誘導率があまり変化しないことから葉由来カルスの耐塩性が示された(Mimura et al. 1997)。また、*Bruguiera sexangula* 胎生種子からのカルス誘導において、初期段階で 100 mM の NaCl が増殖促進に働くことが示された(Mimura et al 1997)。葉由来の増殖カルスから液体培養細胞が得られ(Kura-Hotta 2001)、この培養細胞を用いて耐塩性遺伝子マングリンが単離され、タバコ BY-2 培養細胞に導入することで耐塩性が向上することが明らかにされた(Yamada et al 2002)。このことから、新たな耐塩性寄与の機構解明や遺伝子単離の基礎研究となる細胞レベルにおける耐塩性の研究は大変重要と考えられる。

初期のカルス誘導に対する塩類の影響に関しては、海水塩濃度の高い場所に生育する種である、*Sonneratia alba* の子葉(Yamamoto et al. 2011)や、*Avicennia marina* の葉(Hayashi et al. 2009)を用いて、NaCl ばかりでなく、海水に多く含まれる他の陽イオン(K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})を含む塩類に対する反応も調べられ、NaCl 好塩性や耐塩性などの特徴が明らかになっている。また、塩濃度の低い生育域の *Sonneratia caseolaris* の子葉、胚軸、葉などを用いた、カルス誘導に対する塩類の影響試験も行われた(Yamamoto et al. 2011)。

長期間継代培養された培養細胞は、植物体を用いた実験系に比べ、実験室内で時を選ばずに用いることができる利点もある。培養細胞に対する塩の影響については、*Sonneratia alba* のめしべ由来の固形培養カルスにおいて、50 mM NaCl による増殖促進がみられ、核酸塩基代謝研究が行われた(Akatsu et al. 1996)。*Sonneratia alba* の子葉由来液体培養細胞(Kawana et al. 2007)においては 25-100mM の NaCl 添加培地において細胞増殖の促進がみられている。また、NaCl ばかりでなく、海水に多く含まれる他の塩類イオン、(K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})に対する反応も調べられ(Kawana & Sasamoto 2008)、*Bruguiera sexangula* 培養細胞や、非マングローブ草本植物としてタバコ BY-2 培養細胞と比較した結果、*Sonneratia alba* の各塩類イオンに対する好塩性が示されている。その際、生長の指標として、24 穴シャーレを用いた Packed Cell Volume(PCV)の簡易定量法が開発された。この手法を用いて、海側域に生育する *Avicennia alba* の子葉由来の培養細胞において、 $MgSO_4$ を含む5種の塩類の影響試験が行われ、10 mM NaCl, KCl による促進効果と、100 mM までの対 NaCl 性が明らかにされた(Hayashi et al. 2009)。

本章では、seedling から誘導され(Yamamoto et al. 2009)継代培養された *Sonneratia caseolaris* 培養細胞、および I 章において開発された *Sonneratia ovata* の子葉と根からそ

れぞれ誘導継代培養された液体培養細胞の増殖に対する、5種の海水塩類の影響について初めて明らかにした。増殖の指標として、PCVの他に、Dry Weight (DW)を加え、24穴シャーレを用いた簡易定量法SS法の改良を行った。

次に、*Sonneratia caseolaris* 液体培養細胞と、*Sonneratia ovata* 液体培養細胞の増殖に対する5種の塩の影響について、各塩濃度でのPCVの平均値の値を、塩ゼロコントロールの増殖を100%とした時の%表示し、10%ごとの増減をヒートマップにより色覚化した。

これらの結果を他のマングローブ類の培養細胞5種の塩に対する反応性と比較するため、*Bruguiera sexangula*, *Sonneratia alba* (Kawana and Sasamoto 2008), *Avicennia alba* (Hayashi et al. 2009)について、文献報告値から、同様な方法でヒートマップを作製し比較した。

II-2. 材料および方法

II-2-1) 供試細胞

Sonneratia caseolaris 液体培養細胞は、タイ産種子の子葉と胚軸を含む seedling から、Murashige & Skoog (MS) 基本培地 (Murashige and Skoog 1962) に、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.1 μ M、3% ガラクトース を含む培地で継代培養された (Yamamoto et al. 2009) ものをを用いた。

Sonneratia ovata 子葉由来液体培養細胞は、I 章により得られたものを用いた。2,4-D 0.1 μ M、3% スクロース を含む MS 基本培地により誘導され、同じ組成の培地で継代培養されたものを用いた。

S. ovata 根から誘導された液体培養細胞は、I 章により得られたものを用いた。MS 基本培地に、2,4-D 0.1 μ M、3% ガラクトース を含む培地で誘導され、同じ組成の培地で継代培養されたものを用いた。

II-2-2) 供試細胞の継代維持

II-2-2)-(1) 培地組成と培地滅菌

供試植物の継代維持に用いた培地の組成を表 1 に示した。培地調整は、表 1 に示した組成に従い、MS 基本培地に添加糖として 3%スクロース、または 3%ガラクトースを用いて継代培養した。pH 5.8 に調整後、121°C、20 分の条件でオートクレーブ滅菌を行った。滅菌処理後の培地は、継代培養に使用した。

II-2-2)-(2) 継代培養

Sonneratia caseolaris 液体培養細胞の維持は、誘導後、MS 基本培地に 2,4-D 0.1 μ M、3%ガラクトースを添加した培地を用いて継代培養を行った。3%ガラクトースの代わりに 3%スクロースを一定期間用いたが、塩の影響を調べる実験の前少なくとも 1 年間はガラクトース培地で継代維持された。

Sonneratia ovata 液体培養細胞は、第 I 章で得られた子葉由来、および根由来液体培養細胞を用いた。子葉由来液体培養細胞の維持は、MS 基本培地に 3%スクロース及び 2,4-D 0.1 μ M を添加した培地を用いて行った。

まず、30 ml の新鮮な維持培地を 100 ml 培養フラスコに分注した後、3 週間程度培養した細胞を 42 μ m 径のナイロンメッシュでろ過し、メッシュ上部に残る細胞塊を、新鮮培地で洗浄し、先太の駒込ピペットにより、0.5–2 ml 移植した。さらに、30°C、暗所、100 rpm の条件で回転振とう培養を行なった。振とう器 (TAITEC NR-20) を設置したインキュベーター (SANYO MIR553) を使用した。

II-2-3) 多穴シャーレを用いた塩の影響解析方法(SS法)

5種の海水塩 KCl, NaCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂ の 10-400 mM 添加と、添加無しの条件で 24 穴シャーレを用いて培養し、増殖に関する影響を Packed Cell Volume (PCV) および Dry Weight (DW) により評価した。

培地には 5 種 (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄) の塩を、0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400mM の濃度で添加した。Small scale (SS) 法 (Kawana and Sasamoto 2008) を用いて、PCV を評価した。24 穴シャーレを利用し、550 μ l/ウェルで培養後、増殖細胞度を PCV として測定した。PCV は、ウェル中の培養細胞を 1.5 ml マイクロチューブ (Microtube MCT-150-C, Axygen, Scientific Inc. CA94587 USA) に、先太のピペットマンチップにより移した後、塩を含まない同組成条件あるいは、植物ホルモンを除いた組成の培地をウェルに 500 μ l /ウェル加えて全量をマイクロチューブへ移した。800 rpm (100g)、5 分間遠心した後、マイクロチューブ中の沈殿物の高さを測定した。高さに対する細胞量については、測定者ごとにマイクロチューブの型番ロットごとに水によりグラフ化し、検量線を求めた。細胞をマイクロチューブに移す際には、ピペットマンにより、先端 15 mm 程度を切除したチップ (1250 μ l, Labcon 1045-800) を用いた。

DW 測定のために、*Sonneratia caseolaris* はマイクロチューブ内の細胞を、純水を加えて高速 (10,000 rpm 10 min) の遠心洗浄後、先太のピペットによって、あらかじめ風袋重量測定済の 10 ml ガラス管ビンに移しとり、SANYO 恒温器 (MOV-212-P) で 80°C 18 時間乾燥した。風袋との重量差から DW を求めた。

Sonneratia ovata の DW 測定法は、上記方法に改良を加え、1.5ml マイクロチューブを用い、あらかじめ風袋重量測定後、PCV 測定を行った後、超純水による遠心洗浄を 2 回繰り返す、ピペットマンの各容量のチップ (1250 μ l, 200 μ l (ART XLP200、マルチフレックスチップ (MultiFlex Round Tips 1-200 μ l, Sorgenson 28481-1, Bioscience, Inc.)) により上澄みを除く。80°C 18 時間乾燥させ、風袋との重量差から DW を求めた。

各データは塩を特別添加していない培地条件を 100% としたときの値を示した。同一塩条件の 2 ウェルの平均化、および異なる実験日の結果を平均化することにより、定量的な塩の影響解析を行った。

II-2-3)-(1) *Sonneratia caseolaris* 液体培養細胞

5 種 (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄) の塩を、0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mM の濃度で添加した。すべての培地に、MS 基本培地に、植物ホルモンとして 2,4-D 0.1 μ M、糖源として 3% ガラクトースを含む。30°C、暗所、恒温加湿インキュベータ (CO₂ インキュベータ, ASTEC APC-30DR。炭酸ガスの供給は無い) 内で静置培養を行った。PCV 初濃度を 1% (体積比) にし、培養 14 日後にマイクロチューブに移し、800g、5 分間遠心した後、塩の影響に対する細胞増殖度として PCV を測定し、10ml 管ビンに培養細胞を移し、DW を測定した。

II-2-3)-(2) *Sonneratia ovata* 液体培養細胞

5種(NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄)の塩を、0,10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mM の濃度で添加した。すべての培地に、MS 基本培地に、植物ホルモンとして 2,4-D 0.1 μM を含む。糖源として、子葉由来の液体培養細胞の場合は、3% スクロースを、根由来の液体培養細胞の場合は、3% ガラクトースを含む。30°C、暗所、恒温加湿インキュベータ(CO₂インキュベータ、WAKENYAKU 9100、炭酸ガスの供給無し)内で加湿条件で静置培養を行った。初濃度を1%(体積比)にし、培養6日後にマイクロチューブに移し、800g、5分間遠心した後、塩の影響に対する細胞増殖度としてPCV、マイクロチューブでDWを測定した。

II-2-4) 塩の影響のヒートマップ作製

Sonneratia caseolaris 液体培養細胞と、*Sonneratia ovata* 液体培養細胞の増殖に対する5種の塩の影響について、各塩濃度での増殖をコントロールのPCVの平均値を100%とし、10%、20%の増減をヒートマップにより視覚化した。

これらの結果を他のマングローブ類の5種の塩に対する反応性と比較するため、*Bruguiera sexangula*, *Sonneratia alba*, *Avicennia alba* について、文献報告値(Kawana and Sasamoto 2008) (Hayashi et al. 2009)から、同様な方法でヒートマップを作製した。

II-3. 結果

II-3-1) *Sonneratia caseolaris* 液体培養細胞ガラクトース培地

5種の塩(NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂)の影響をPCV、DWで測定した(図II-1a, b)。DWは、どの塩においてもPCVと同じような傾向であった。結果、100mM以上の高濃度では*Sonneratia caseolaris*の細胞増殖はすべての塩の200mM添加により、阻害されたが、NaCl、KClに対しては50mMまでは大きな阻害を受けない。特にNaClは他の塩による阻害よりも程度がゆるやかであり、NaCl 10mMにより若干の促進も見られた。また、NaCl 50mMを加えた培地で1, 2週間ごとの継代培養を行っても、数ヶ月以上増殖能が確認され、NaClに対する耐塩性を有していることが明らかとなった。

II-3-2) 子葉由来 *Sonneratia ovata* 液体培養細胞スクロース培地

5種の塩(NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂)の影響を、培養27, 34日後、PCV、DWで測定した(図II-2a, b)。DWは、どの塩においてもPCVと同じような傾向であった。

子葉由来液体培養細胞に対するNaClの影響は200mMまで大きな阻害がなく、NaClに対する顕著な耐塩性を示した。他の塩に関してはKCl、CaCl₂ 50mMで顕著な阻害を示した。MgCl₂、MgSO₄は、中間の程度の阻害が見られた。MgSO₄の方がMgCl₂に比べ阻害の程度が低い傾向があった。図II-3a, bは、培養14日後の倒立顕微鏡下の細胞の様子であり、KClによる低濃度からの阻害と、比べて、NaCl耐性が示された。

II-3-3) 根由来 *Sonneratia ovata* 液体培養細胞ガラクトース培地

5種の塩(NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂)の影響を、培養45, 47日後、PCV、DWで測定した(図II-4a, b)。DWは、どの塩においてもPCVと同じような傾向であった。

根由来液体培養細胞に対し、ほとんどの塩により50mM以下の低濃度で顕著な阻害が見られたが、CaCl₂、10mMにおいて促進の傾向が見られた。MgSO₄は200mMまでゆるやかな阻害を示した。図II-5a, bは、28日培養後の倒立顕微鏡下の細胞の様子であり、各塩による阻害が見られる。

II-3-4) ヒートマップによる比較

*Sonneratia caseolaris*液体培養細胞と、*Sonneratia ovata*液体培養細胞2種の増殖に対する5種の塩の影響について、各塩濃度でのPCVの平均値を、コントロールの増殖を100%とし、10%ごとの増減をヒートマップにより色覚化した(図II-6)。

同じ*Sonneratia ovata*起源であっても、その起源組織によって、各塩に対する反応性は異なり、子葉由来培養細胞は、NaClに対する耐性が見られるが、根由来培養細胞にはみられない。CaCl₂やMgSO₄に対しては、逆に、根由来培養細胞では好塩性が見られるが、子葉由来細胞では阻害が顕著である。

Bruguiera sexangula, *Sonneratia alba*, *Avicennia alba* について、文献報告値 (Kawana and Sasamoto 2008, Hayashi et al. 2009) から、同様な方法でヒートマップを製作した(図 II-7)

Bruguiera sexangula は、*Sonneratia caseolaris* や、子葉由来 *Sonneratia ovata* と同様に、NaCl による若干の促進傾向がみられた。*Sonneratia alba* 液体培養細胞 の4種の塩に対する好塩性は顕著であることがわかる。一方、*Avicennia alba* 子葉由来液体培養細胞 では、KCl、MgCl₂ 低濃度による好塩性と共に、CaCl₂ 低濃度から阻害の傾向が分る。

II-4. 考察

本章で用いた *Sonneratia caseolaris* および *Sonneratia ovata* の結果と、文献による *Sonneratia alba* 培養細胞の報告を含め、5種の塩(NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂)の影響をPCV、DWで測定した結果、DWは、どの塩においてもPCVと同じような傾向が見られた。

Sonneratia caseolaris 実生由来液体培養細胞はNaCl、KCl添加50 mMまでは増殖度が90%程度と、他の塩類に比べてNaCl、KClによる阻害が緩やかであった。植物体は塩分濃度の低い上流域で生育することが知られているが、NaCl低濃度に対する耐塩性が明らかとなった。

Sonneratia ovata は由来組織によって結果が異なった。子葉由来の液体培養細胞はNaCl添加200mMまでは増殖度80%を示し、NaCl耐塩性を示した。子葉の組織は海水に接する可能性が高く、NaCl耐性が高いと考えられる。一方、根由来液体培養細胞は10~25mMの低濃度でMgCl₂、MgSO₄、CaCl₂に対し耐塩性を示したが、子葉由来とは逆転してNaClは低濃度の10mMで60%の増殖度に阻害され、50 mMでは20%と強く阻害された。KClに関しては子葉由来と同じく顕著な阻害を受けた。*Sonneratia* 種の培養細胞の誘導と継代培養に用いたMS基本培地には、硝酸カリウムの形で、K⁺イオンが20 mM程度すでに含まれている影響も考えられる。根由来の液体培養細胞は、*Sonneratia caseolaris* の液体培養細胞と同じく、培地には、ガラクトースが含まれているが、5種の塩に対する耐塩性は、同一ではない。

これらの結果を、これまでに得られている他のマングローブ植物液体培養細胞の塩の影響(Kawana & Sasamoto 2008; Hayashi 2009)と比較するためにヒートマップを作成し、その傾向を俯瞰する事を試みた。これまで、マングローブの液体培養細胞は、いずれも葉(*Bruguiera sexangula*)、子葉(*Sonneratia alba*)、実生の子葉胚軸(*Sonneratia caseolaris*)、子葉(*Avicennia alba*)などの地上部組織から誘導されており、*Sonneratia ovata*の根起源のものは初めてであり、また、この根由来の培養細胞の5種の塩に対する反応性が調べられたのは、本論文が初めてとなる。由来組織が根以外のものはNaClに対してはどの種も耐性あるいは好塩性を示している。*Sonneratia alba*、*Avicennia alba*は、植物体は海側域に生育するので、植物体レベルの耐塩性は強いが、液体培養細胞でも、各種の塩添加による促進がみられるのが特徴である。*Sonneratia caseolaris* や *Sonneratia ovata* は、上流側に生育するので耐塩性の程度は前者より低い、マングローブとしての耐塩性は有していると言える。

上述の液体培養細胞の誘導継代培養に成功したものの他に、海側域に生育する*Sonneratia*属の*Sonneratia griffithii*では若干のカルス誘導が認められ(土屋他 2009)、*Avicennia*属*Avicennia marina*(Hayashi et al. 2009)は、初期カルス誘導に対する塩の影響試験から、好塩性が明らかとなっている。しかし、液体培養細胞は得られていない。

Avicennia 属 *Avicennia marina* の茎と根には、スタキオース(スクロース 1 分子にガラクトース 2 分子が結合した構造)が、地上部には、グリシンベタインが、compatible solutes として蓄積し、耐塩性の元となっていると考えられている (Ashihara et al. 1997)。 *Sonneratia caseolaris* や、 *Sonneratia ovata* 植物体での糖分析の報告は見られないが、培養細胞が、通常植物の組織培養では使われないガラクトースによって培養維持できるのは、興味深い。

本章では、確立された液体培養細胞の増殖に対する海水塩類の影響について明らかにした。これらの結果は、 *Sonneratia alba* の子葉や *Sonneratia caseolaris* の子葉、胚軸、葉 (Yamamoto et al. 2011) および *Avicennia marina* の葉 (Hayashi et al. 2009) からの初期カルス誘導に対する各種の塩の影響結果と、完全に一致しているわけではない。原因の一つとして、液体培養細胞の培養培地に含まれる低濃度塩イオンの影響も考えられる。また、液体培養細胞から単離されたプロトプラスト培養での各種塩の影響とも異なるパターンが得られている。例えば、 *Bruguiera sexangula* の液体培養細胞では NaCl 以外の塩による促進は見られていないが、単離されたプロトプラストの培養では、MgCl₂, CaCl₂ などにより促進が見られ、この促進効果は、培地の pH によって影響を受けることが見出されている (Fukumoto et al. 2004)。この他、 *Sonneratia caseolaris*、 *Sonneratia ovata* 培養細胞のプロトプラスト培養においても、培養細胞自身で見られた塩の影響結果よりも高い促進効果の例が報告されており、培地糖による影響が示唆されている (長谷川 2012)。マングローブ種において、細胞壁を持つ培養細胞と、細胞壁の無い浸透圧ストレスにさらされたプロトプラストとの、耐塩性、好塩性の比較は細胞レベルの機構解明に寄与すると考えられる。

Ⅲ. プロトプラスト単離・培養系による耐塩性試験

Ⅲ-1. 緒言

マングローブ林の中でも、塩濃度の高い領域に生育可能なマングローブ種である *Sonneratia* 属 *S. alba* (Kawana & Sasamoto 2008) や *Avicennia* 属 *A. alba* (Hayashi et al. 2009) の子葉由来液体培養細胞を用いて、海水成分に多く含まれる 5 種の塩による細胞レベルにおける好塩性、耐塩性が示された。これらは、上記 2 種より植物体が上流側に位置する *Bruguiera sexangula* の液体培養細胞において、若干の NaCl 耐塩性のみが示された (Kawana & Sasamoto 2008) のと比較すると、非常に強い好塩性や広範囲の塩濃度における耐塩性の特徴を持つ。*Bruguiera sexangula* においては、耐塩性にかかわる遺伝子が単離され、他の植物種への導入効果が示され、分子育種への道が開かれている。より強い耐塩性、好塩性のマングローブ種は、このような育種の材料としても興味深い。

本章では、植物細胞を細胞壁分解酵素処理し、適浸透圧条件におくことにより単離されるプロトプラストを扱う。プロトプラスト研究は、プロトプラスト培養系の開発を基にした細胞融合により、体細胞雑種育成の目的での多くの研究がある (Wakita et al. 2005; Sasamoto et al. 2006)。一方、植物の生理現象の細胞レベルの機構を明らかにするためのツールとしても考えられる。本論文の主題であるマングローブ植物の耐塩性、好塩性の細胞生理学的機構を明らかにするため、また、植物間の生長阻害、促進などの、アレロパシーの作用機構を明らかにするための基礎研究とも位置付けられる。

これまで、非マングローブ樹木のポプラ葉からのプロトプラストにおいては、Cl⁻イオンの阻害効果で説明できるような、NaCl、KCl のような一価の陽イオンの塩に比べ、MgCl₂、CaCl₂ のような二価の陽イオンの塩による強い阻害効果のみがみられた。一方マングローブ *Bruguiera sexangula* の液体培養細胞から、プロトプラストが単離され、同様な海水塩類による影響が調べられ、NaCl に対する耐塩性や、MgCl₂、CaCl₂ に対する好塩性が示された (Fukumoto et al. 2004)。

本章では、マングローブ林の中でも、塩分濃度の高い領域に生育可能な種である *Sonneratia alba* と *Sonneratia griffithii* Kurz、*Avicennia marina* (Forsk) Vierh の子葉および、*Avicennia alba* 子葉由来液体培養細胞と *Sonneratia alba* 子葉由来液体培養細胞の、細胞壁を取り除いたプロトプラストの培養における耐塩性について、5 種の塩、NaCl、KCl、MgCl₂、MgSO₄、CaCl₂ 添加の影響試験を行い、好塩性、耐塩性などの特徴を明らかにした。

Ⅲ-2. 材料および方法

Ⅲ-2-1) 供試無菌植物の育成および培養細胞の継代培養

Ⅲ-2-1)-(1) *Sonneratia alba* 子葉

Sonneratia alba(マヤプシキ)無菌苗育成は、既報によった(Kawana et al 2007)。西表島産種子を 2.5% NaClO 水溶液で 1 時間滅菌し、滅菌 RO 水で洗浄後、0.8%寒天培地に播種し、25°C16 時間日長の明所で育成した。3 ヶ月後、無菌実生から得られた子葉を用いた。

Ⅲ-2-1)-(2) *Sonneratia griffithii* 子葉

Sonneratia griffithii (グリフィスハマザクロ)無菌苗育成は、*Sonneratia alba* に準じて行った。タイ産 *Sonneratia griffithii* 果実から取り出した種子を、中性洗剤、水道水洗浄後、70%エタノールに浸漬した。その後、3% NaClO 液中で1時間攪拌滅菌し、クリーンベンチ内において、オートクレーブ滅菌した純水で3回洗浄した。15 ml 細長平底管ビン中の 5 ml 0.8%寒天培地に播種し、25°C16時間日長の明所で育成した。3ヶ月後、無菌実生から得られた子葉を用いた。

Ⅲ-2-1)-(3) *Avicennia marina* 子葉

Avicennia marina 種子を西表島で採集後、約 5 か月間、水道水中(適宜水換えを行った)で保存して用いた。

Ⅲ-2-1)-(4) *Avicennia alba* 液体培養細胞

子葉から誘導された液体培養細胞(Hayashi et al. 2009)を、mAA(改変アミノ酸培地、pH 6.3)基本培地に、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、Thidiazuron (TDA) 各 2 μ M、3%スクロースを含む液体培地で継代培養した。

Ⅲ-2-1)-(5) *Sonneratia alba* 液体培養細胞 NaCl 株

Sonneratia alba 子葉から、2,4-D 0.1 μ M、3% スクロースを含む MS 基本培地(pH5.8)で誘導され継代培養された(Kawana et al. 2007)培養物を、50 mM NaCl を加えた培地で継代培養した。

III-2-2) プロトプラスト単離条件の検討

III-2-2)-(1) *Sonneratia alba* 子葉

Sonneratia alba 子葉のプロトプラスト単離は、(Kawana et al. 2009)に従った。

III-2-2)-(2) *Avicennia marina* 子葉

Avicennia marina 子葉のプロトプラスト単離は、(Sasamoto et al. 1997)に従った。

III-2-2)-(3) *Sonneratia griffithii* 子葉および *Avicennia alba* 液体培養細胞

Sonneratia griffithii 子葉および *Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラスト単離は、マングローブ材料における多穴シャーレを用いた簡易検定法 (Sasamoto et al. 1997; Kawana et al. 2004) を利用した。

浸透圧剤を含む細胞壁分解酵素溶液中に子葉切片をピンセットで投入、またはメッシュ上に集めた液体培養細胞を浸透圧剤の液に懸濁し、先端を切り落とした 1ml チップを用いて分注し、プロトプラスト単離条件を検討した。細胞壁分解酵素として、各 1% Cellulase RS (セルラーゼ RS)、Cellulase R-10 (セルラーゼ R10、Yakult Honsha Co. Ltd.)、Driselase 20 (ドリセラーゼ 20、Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.)、Hemicellulase (ヘミセルラーゼ、Sigma H-2125)、Macerozyme R-10 (マセロザイム R10、Yakult Co. Ltd.) および 0.25% Pectolyase Y-23 (ペクトリアーゼ Y23、Seishin Corp. 協和化成) の 6 種類を組み合わせ、計 24 通り作成した。浸透圧調節剤には、ソルビトールおよびマンニトールを用いた。

浸透圧は 0.4 M - 1.8M の範囲で最適浸透圧を検討した。酵素反応は、室温あるいは 30°C、暗条件で行い、時折酵素液を揺らし、倒立顕微鏡 (Olympus CK40) で観察した。

1 晩反応後、24 穴シャーレ内のそれぞれの溶液は、1 ml ピペットマンを用いて、1.5 ml マイクロチューブに移し、シャーレ内に残ったプロトプラストは再び 400 μ l の浸透圧剤溶液を入れることで、洗浄回収した。プロトプラスト懸濁液の入ったマイクロチューブを 100g で 5 分間遠心し (KUBOTA 2410)、上澄みを取り除いた後、プロトプラストの沈殿に 20-100 μ l のマンニトールまたはソルビトール溶液を加えた。

プロトプラストの数は血球計算盤を用いて測定した。沈殿したプロトプラスト液と等量の 0.1% フルオレセイン二酢酸 (FDA, fluorescein diacetate) アセトン溶液を、浸透圧剤で希釈し、プロトプラスト液と 1:1 に混合し、最終濃度 0.002% において、蛍光倒立顕微鏡 (Olympus CK40 または Olympus IX-71) を用いて blue 励起光下、黄緑色の蛍光により、プロトプラストの生存率を決定した。フルオレセイン二酢酸は酵素的に fluorescein に分解される細胞浸透性蛍光前駆体である。2 つのアセトキシ基が細胞内エステラーゼによって加水分解されて fluorescein になると強い蛍光を生じるため、生細胞の確認が可能である (Larkin 1976)。

III-2-2)-(4) *Sonneratia alba* 液体培養細胞 NaCl 株

Sonneratia alba 液体培養細胞 NaCl 株のプロトプラスト単離精製は、以下のように行った。

24穴シャーレによる単離酵素条件の検討で、効率の良かった 1%セルラーゼ RS に加え、各 1%の、ドリセラーゼ 20 または、ドリセラーゼ 20+ヘミセルラーゼまたは、ドリセラーゼ 20+マセロザイムの3組み合わせ酵素条件における、FDA 生存率を調べた。セルラーゼ RS+ドリセラーゼ 20+ヘミセルラーゼの組み合わせ酵素条件で、浸透圧条件を調べるため、ソルビトール 0.6 M から、1.8 M まで変化させた。

プロトプラスト精製は、1M マンニトールまたはソルビトールを含む酵素液でプロトプラストを得たのち、プロトプラスト酵素液をシリンダータイプのメッシュ 80 μm に通し、1.2 M スクロースとの密度勾配遠心により、界面のプロトプラストを回収し、2, 3 回 1 M マンニトールまたはソルビトール液で遠心分離により洗浄した。血球計算盤を用いて細胞密度を求め、FDA で生存率を確認した。

III-2-3) プロトプラスト培養のための基本培地と植物ホルモン条件および浸透圧条件の探索

III-2-3)-(1) *Avicennia marina* 子葉のプロトプラスト培養

各 2%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20 と 1.3M ソルビトールを含む酵素液で最大 76 時間処理した。培養は、基本培地として 2,4-D、TDZ 各 1 μM を含む液体 mAA 基本培地(改変アミノ酸培地、pH6.3 に調整)または、MS 基本培地(pH 5.8-5.9 に調整)を用いた。糖条件として 3%スクロースを含む。浸透圧条件として 1 M または 1.2 M ソルビトールを用いた。96 穴シャーレを用い、各ウェルに 50 μl の培地を調整し、10 倍の密度のプロトプラスト液を 5 μl 加えることにより、最終細胞密度を $5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。ウェル間に、100 μl の滅菌超純水をディストリマンによって加え、パラフィルムで 2 重にまいてシールした。30°C 温室条件(CO₂ インキュベータ、ASTECC APC-30D or WAKENYAKU 9100、CO₂ ガス供給無し)で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大や肥大変形細胞数を測定した。

III-2-3)-(2) *Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラスト培養

液体培養細胞を、各 1%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ20を含む 1.2M ソルビトールを含む酵素液で 30°C、3-12 時間処理した後、42 μm ナイロンメッシュでろ過した後、ソルビトール液で遠心洗浄を行った。

培養は、基本培地として、ホルモンフリーまたはホルモンとして 2,4-D、TDZ 各 1 μM を含み、浸透圧剤としては、1.2 M ソルビトールを含む液体 mAA 培地(改変アミノ酸培地、pH6.3 に調整)または MS 培地(pH 5.8-5.9 に調整)を用いた。96 穴シャーレを用い、各 50 μl の培地を調整し、10 倍の密度のプロトプラスト液を 5 μl 加えることにより、最終細胞密度を $5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。ウェル間に、100 μl の滅菌超純水をディストリマンによって加え、パラフィルムで 2

重にまいてシールした。30℃温室条件（CO₂ インキュベータ、ASTEC APC-30D or WAKENYAKU 9100、CO₂ガス供給無し）で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

III-2-4) プロトプラスト培養による5種の塩の影響試験

III-2-4)-(1) *Sonneratia alba* 子葉プロトプラスト

無菌実生から得られた子葉を用い、セルラーゼ RS、マセロザイム R10 各 1%、0.6M マンニトールを含む酵素液中で 25℃、約 12 時間処理し、プロトプラストを単離した。培養は、基本培地として 0.1 μM 2,4-D、3%スクロース、0.6 M マンニトールを含む MS 培地を用いた。96 穴シャーレを用い、細胞密度 5×10⁴/ml、30℃温室条件で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

III-2-4)-(2) *Sonneratia griffithii* 子葉プロトプラスト

無菌実生の子葉を最適浸透圧条件 0.6 M マンニトール、酵素条件各 1%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20 で単離した。培養は 96 穴シャーレを用い、細胞密度 5×10⁴/ml、30℃温室条件で培養し、NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄ の 5 種の塩 (0, 10, 25, 50, 100, 200 mM) の添加による影響を倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。30℃温室条件で培養した。

III-2-4)-(3) *Avicenia marina* 子葉プロトプラスト

III-2-3)-(1)と同様に、子葉を滅菌後、細断し、各 2%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20 と 1.3 M ソルビトールを含む酵素液で 76 時間処理した。培養は、基本培地として 2,4-D、TDZ 各 1 μM、1.2 M ソルビトールを含む液体 mAA 培地(改変アミノ酸培地)を用いた。96 穴シャーレを用い、細胞密度 2×10⁴/ml および 5×10⁴/ml、30℃温室条件で培養した。NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄ の 5 種の塩 (0, 10, 25, 50, 100, 200 mM) の添加による影響を倒立顕微鏡で観察し、肥大や肥大変形細胞数を測定した。

III-2-4)-(4) *Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラスト

液体培養細胞を、各 1%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ20を含む、酵素液で処理した後、培養は、基本培地としてホルモンフリーまたは、2,4-D、TDZ 各 1 μM、1.2 M ソルビトールを含む液体 mAA 培地(改変アミノ酸培地)を用いた。96 穴シャーレを用い、細胞密度 2×10⁴/ml、5×10⁴/ml、30℃温室条件(CO₂ インキュベータ、ASTEC APC-30D or WAKENYAKU 9100、CO₂ガス供給無し)で培養した。

NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, MgSO₄ の 5 種の塩 (0, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mM) の添加による影響を倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

また、各塩濃度条件でのデジカメ写真撮影後の画像を、ImageJ ソフトを用いて丸肥大を示すプロトプラストの直径を測定し、平均化した。

III-2-4)-(5) *Sonneratia alba* NaCl 株液体培養細胞プロトプラスト

III-2-2)-(4) の単離条件の検討で効率の良かった、各 1%のセルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ 20 の組み合わせを用い、1 M マンニトールまたはソルビトールを含む酵素液で 12–18 時間処理してプロトプラストを得たのち、プロトプラスト酵素液をシリンダータイプのメッシュ 80 μm に通し、1.2 M スクロースとの密度勾配遠心により、界面のプロトプラストを回収し、2, 3 回 1 M マンニトールまたはソルビトール液で遠心分離により洗浄した。96 穴シャーレに 1×10^4 – $2 \times 10^5/\text{ml}$ の密度になるよう各ウェル 5 μl 分注した。

2 種 (NaCl, MgCl_2) の塩を、0, 10, 25, 50, 100 mM の濃度で添加した、30°C 温室条件 (CO_2 インキュベータ、ASTECC APC-30D or WAKENYAKU 9100、 CO_2 ガス供給無し) で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

Ⅲ-3. 結果

Ⅲ-3-1) プロトプラスト単離酵素と浸透圧条件、精製条件

Ⅲ-3-1)-(1) *Sonneratia griffithii* 子葉のプロトプラスト単離

マングローブ材料における 24 穴シャーレを用いた 6 種の酵素の組み合わせによる簡易検定法とマイクロチューブによる簡易計数法により調べた結果、図Ⅲ-1 のように、プロトプラスト単離数は、セルラーゼ R10 に比べ、セルラーゼ RS 側の酵素組み合わせの方が、全体に高い傾向がある。セルラーゼ RS とドリセラーゼ 20 の組み合わせ、または、これにヘミセルラーゼとマセロザイムを加えた酵素条件の方が、単離数は高い。このような結果は、倒立顕微鏡による定性的観察の結果とも一致した。血球計算盤計数によるプロトプラスト数に FDA による生存率を乗じた生細胞数の数は両酵素条件で同じくらいとなり、後者では死細胞の割合が高い。この結果から、最適酵素条件は、セルラーゼ RS とドリセラーゼ 20 の組み合わせと決定した。

また、この酵素条件において浸透圧最適条件を探索した結果、ソルビトール 1.2 M、1.4 M、1.6 M、では、倒立顕微鏡観察により単離数は少なく、0.4 M、0.6 M、0.8 M、1.0 M において、マイクロチューブ遠心後、血球計算盤による計数を行った。図Ⅲ-2 から、プロトプラスト総数は高い浸透圧 1.0 M の方が多いが、FDA による生存率は 0.6 M が最も高く、0.6 M が選択される。図Ⅲ-3 に示すように子葉のプロトプラストが単離された。

Ⅲ-3-1)-(2) *Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラスト単離

24 穴シャーレを用いた簡易検定法による 6 種の酵素の組み合わせから、セルラーゼ RS とドリセラーゼ 20 が、倒立顕微鏡観察から選択された。また、最適浸透圧条件は、図Ⅲ-4 から 1.2 M ソルビトール条件を選択した。図Ⅲ-5 に示すように、培養細胞のプロトプラストが単離された。

Ⅲ-3-1)-(3) *Sonneratia alba* NaCl 株液体培養細胞のプロトプラスト単離

6 種の酵素の組み合わせ 24 通りの中から、セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20 を含む酵素に、ヘミセルラーゼあるいはマセロザイムを加えた 3 条件において、マイクロチューブ法による計数と FDA 染色による生存率を乗じた結果(図Ⅲ-6)から、セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20、ヘミセルラーゼの組み合わせを選択した。この酵素条件により、浸透圧条件を調べた結果(図Ⅲ-7)、1 M マンニトールまたはソルビトールが最も効率的と判断された。図Ⅲ-8 に示すように、プロトプラストが単離された。

Ⅲ-3-2) プロトプラスト培養のための基本培地と浸透圧条件および植物ホルモン条件の探索

Ⅲ-3-2)-(1) *Avicennia marina* 子葉のプロトプラスト培養

図Ⅲ-9 に示すように、分裂細胞は見られないが肥大した生細胞の数を倒立顕微鏡下計数した結果、mAA 基本培地の方が、MS 基本培地に比べ反応がよく、浸透圧剤として 1.2 M ソルビトールと 1 M ソルビトール を比較した結果、細胞密度 $2 \times 10^5/\text{ml}$ において 1.2 M ソルビトールの方が安定してよい結果を得た。 $5 \times 10^4/\text{ml}$ においても同様である。図Ⅲ-10 に、単離プロトプラストと、5 日間培養し肥大した細胞を示す。

Ⅲ-3-2)-(2) *Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラスト培養

において、図Ⅲ-11 に示すように、mAA 基本培地、植物ホルモンとして、2,4-D, Thidiazuron 各 2 μM の条件と、MS 基本培地、ホルモンフリーの条件が低細胞密度から高細胞密度まで、多くの肥大、分裂細胞が計数された。しかし、図Ⅲ-12 の写真で示されるように、培養 2 週間後の細胞は、mAA 基本培地の方が、植物ホルモン培地においても、ホルモンフリーにおいても、大きな肥大細胞が見られるが、MS 基本培地においては、植物ホルモンを含む培地では、細胞の径は小さいことがわかる。これらの結果から、細胞の肥大が顕著な mAA 培地が選択された。また、図Ⅲ-13 に示すように、分裂コロニーも観察された。

Ⅲ-3-3) プロトプラスト培養による5種の塩の影響

Ⅲ-3-3)-(1) *Sonneratia alba* 子葉プロトプラスト

図Ⅲ-14 に示すように、NaCl, KCl, MgCl_2 100 mM において、また 10-50 mM MgSO_4 において、ゼロコントロールと同程度の生長の耐塩性が見られた。NaCl, MgCl_2 では、10-50 mM での促進効果は著しく、好塩性が見られた。CaCl₂ は、他の塩と異なるパターンが得られ、25 mM 以上の濃度で阻害が見られ、100 mM において完全阻害された。

Ⅲ-3-3)-(2) *Sonneratia griffithii* 子葉プロトプラスト

図Ⅲ-15 に示すように、25mM の NaCl, MgCl_2 , KCl において高い促進が見られ、他の塩についても、50 mM までの濃度範囲において阻害が見られない。また、NaCl, KCl は 200mM まで耐塩性を示した。

Ⅲ-3-3)-(3) *Avicennia marina* 子葉プロトプラスト

図Ⅲ-16 に示すように、どの塩においても、100 mM までは、50%程度の阻害程度であり、200 mM まで完全阻害は見られず、広い濃度範囲で耐塩性があると言える。KCl 10, 25 mM では、若干の促進が見られた。また、この培地には、1.2 M のソルビトールが含まれており、非常に高い浸透圧耐性があると言えるが、好塩性は見られない。ここで示された *A. marina*

の結果は、他のマングローブ種における反応結果が、変形肥大や細胞分裂の発達した段階を測定しているのに比べ、反応の程度は低い。

Ⅲ-3-3)-(4) *Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラスト

図Ⅲ-17 に示すように、 CaCl_2 以外のどの塩においても、400 mM の高濃度まで完全阻害は見られず、広い濃度範囲で耐塩性があると言える。 NaCl , MgCl_2 , MgSO_4 については、好塩性が見られる。 CaCl_2 は、10 mM においてすでに阻害が見られ、Ⅲ-3-3)-(1)において *Sonneratia alba* 子葉プロトプラストが、10 mM では、阻害が見られなかったのと比較される。

図Ⅲ-18 は、 CaCl_2 の条件において、丸肥大を示すプロトプラストの数は、塩濃度が高くなると数は減るが、その直径を調べたところ、塩濃度が高くなるに従って、その直径が大きくなる傾向が示された。他の塩条件では、このような肥大は見られない。

Ⅲ-3-3)-(5) *Sonneratia alba* NaCl 株液体培養細胞のプロトプラスト

Ⅲ-3-3)-(1)の *Sonneratia alba* 子葉プロトプラストにおいて、50 mM による強い促進効果が見られた NaCl と MgCl_2 の 100 mM までの影響を調べた(図Ⅲ-19)。実験数が少ない問題があるが、50 mM における促進、阻害的傾向は見られない。

Ⅲ-3-4) ヒートマップによる塩の影響の好塩性、耐塩性の比較

図Ⅲ-20 に示すように、プロトプラスト培養における細胞肥大、分裂などの反応性に対する5種の塩の影響をヒートマップで表した。塩を添加しないコントロールの平均値を 100%とし、10%、20%の増減をヒートマップにより視覚化したところ、いろいろな塩による促進効果や濃度による阻害効果が見られた。 NaCl による促進効果については、*Avicennia marina*子葉以外の種では促進効果がはっきりした。特に、*Sonneratia* 2種の子葉では強く、広い濃度範囲での促進効果が明らかである。

III-4. 考察

III-4-1) プロトプラスト単離精製に関して

Sonneratia griffithii 子葉のプロトプラスト単離に用いられた、セルラーゼ RS とドリセラーゼ 20 の組み合わせ条件は、*Sonneratia alba* 子葉が、セルラーゼ RS とマセロザイムの組み合わせが用いられたのと比較して、強い酵素条件である。*Avicennia marina* の子葉からの単離条件 (Sasamoto et al. 1997) と同じ組み合わせ条件となっているが、しかし後者は各 2% の強い条件を用いている。*Avicennia marina* 子葉からの無菌プロトプラスト単離は、これまで難しかったが、本論文で、水道水中で長期間保存することにより可能となった。また、酵素処理時間は前報告の3倍以上の長さを必要とした。*Avicennia alba* の葉からのプロトプラスト単離は、セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20、マセロザイムの組み合わせが用いられた (Kawana et al. 2004) が、*Avicennia alba* 培養細胞はセルラーゼ RS とドリセラーゼ 20 の組み合わせが選択された。

酵素条件の探索には、24 穴シャーレによる酵素組み合わせによる簡易検定法が有効であった。マイクロチューブ遠心による沈殿物の血球計算盤によるプロトプラスト数の計数と、倒立顕微鏡による観察の結果は一致している。単離総数の最適条件については、両方法共に有効と考えられるが、最適浸透圧条件の探索のためには、FDA による生存率の計数が必須と考えられる。プロトプラストの培養のためには、生存率が 80%以上であることが望ましいと考えられるが、おのおの十分な活性が得られた。

Sonneratia alba 液体培養細胞 NaCl 株のプロトプラスト単離のためには、NaCl 50mM を含まぬ培地で継代培養された *Sonneratia alba* 液体培養細胞からの単離の際に用いられた条件 (Kawana et al. 2009) と比較すると、同様な、マンニトールやソルビトール液とスクロース液との重層による密度勾配 遠心法が必要であった。

III-4-2) プロトプラストの培養条件に関して

Avicennia marina 子葉プロトプラストの培養には、mAA 基本培地、2,4-D 1 μ M, TDZ 1 μ M, 3%スクロース、1.2 M ソルビトールを含む培地が選択され、*Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラストは、2,4-D 2 μ M, TDZ 2 μ M 以外は、同じ培地が選択された。どちらも、非常に高い浸透圧条件を要求している。

Sonneratia 属の 3 種、*S. alba* 子葉、*S. alba* 液体培養細胞、*S. griffithii* 子葉の各プロトプラストは、MS 基本培地、0.1 μ M 2,4-D, 3% スクロースを含む培地が選択された。浸透圧条件は、3 種で異なり、子葉では 0.6 M マンニトール、液体培養細胞では、0.8 M が選択された。0.6 M マンニトール条件も、0.4 M が可能な草本植物のプロトプラスト培養と比較すると、高い傾向があるが、非耐塩性樹木の例として、ポプラの葉プロトプラストの例 (Sasamoto et al. 1995) や、マングローブ培養細胞の例として、*Bruguiera sexangula* においても、0.6 M マンニトールが用いられており、同じような浸透圧が有効である。0.8 M 以上 1.2 M の浸透圧条件

が用いられたのは、非常に高い浸透圧条件と言える。

基本培地に関しては、*Bruguiera sexangula* のプロトプラスト培養において、材料の液体培養細胞は、mAA が適していたが、プロトプラストの培養には、MS 基本培地の方が適していた (Fukumoto et al. 2004)。今回の研究結果では *Sonneratia alba*、*Sonneratia griffithii* においては、どちらも、MS 基本培地が用いられ、*Avicennia alba*、*Avicennia marina* においては、共に mAA の方が選択された。

III-4-3) プロトプラストの培養に対する塩の影響

マングローブ林の中でも、海側域に生育する、*Sonneratia alba* と *Sonneratia griffithii* のプロトプラストにおいて、100 mM より低濃度の、NaCl, MgCl₂ 塩類による強い促進効果が見られた。このような NaCl による促進効果は、初めて見られた現象であり興味深い。また、*Avicennia marina* や *Avicennia alba* においては、広い塩濃度範囲における耐塩性が見られた。高濃度塩類の影響には、高浸透圧の側面もあり、この *Avicennia* 属の結果は、非常に高い浸透圧に耐性があることを示す。

本章では、海側域に生育するマングローブ種のプロトプラストに対する5種の塩の影響について、ヒートマップで表すことにより、好塩性、耐塩性がはっきり示された。II 章の液体培養細胞の生長 (PCV) に対する5種の塩の影響をヒートマップで表した II-3-4) と比較すると、海側域に生育する種には共通して、好塩性か、耐塩性が示されたと考えられる。

緒言に述べた、*Bruguiera sexangula* は、上記のマングローブよりも、上流側に分布があると考えられるが、液体培養細胞ではどの塩に対しても 120%以上の促進はみられず、NaCl に対して、若干の耐塩性がみられた (Kawana and Sasamoto 2008)。また、プロトプラスト培養でも、NaCl に対する好塩性は見られておらず、適基本培地が mAA から、MS 培地に変化し、また、培地の pH により、MgCl₂ や CaCl₂ に対する好塩性が濃度により激しく変化することが示されている (Fukumoto et al. 2004)。このように、プロトプラスト培養については、細胞壁を取り除き、浸透圧ショックを含むストレス条件下にあると考えられ、植物ホルモン条件ばかりでなく、塩類、糖、pH などの条件により、細胞分裂能は変化するものと考えられる。

IV. アブシジン酸のプロトプラスト中の微量定量と、培養に対する

影響解析

IV-1. 緒言

植物ホルモンの一つであるアブシジン酸(ABA)は落葉や種子形成に関係し、植物の栄養生長に対しては阻害的に働き、また耐塩性にも関わるストレス応答ホルモンとして知られる(Clipson et al. 1988)。

マングローブ植物体における ABA 内生量定量では、非マングローブ植物の種子に比べ胎生種子に低い結果と、葉などの栄養器官に高い結果が報告され、マングローブ種における高い耐塩性との関係性が議論された(Farnsworth and Farrant 1998)。

Sasamoto 等(2002)は、非マングローブ樹木のポプラとシラカンバの葉プロトプラスト中の内生 ABA 含量を測定し、前者が低く、後者が非常に高いことと、プロトプラストの培養における細胞分裂能の高低と逆相関の関係を明らかにしている。ポプラ葉のプロトプラスト培養に見られるように(Sasamoto et al. 1995)、一般的に ABA は、培養の時の細胞分裂に対し阻害的に働くため、通常培養に用いられないが、この高い内生量が培養を困難にしている可能性が示唆された。また、後者シラカンバの培養において ABA は細胞分裂を阻害するが、ABA と拮抗するホルモンとして知られる、ジベレリンの一種ジベレリン酸 GA₃ は阻害せず、強いサイトカイニンである CPPU が促進する結果が得られている。これにより、シラカンバの培養困難性が解決された。そこで、このような方法を、これまで培養が困難であったマングローブ種に応用することを考えた。

これまでにマングローブの一種であるメヒルギ *Kandelia obovata* Sheue, Liu & Yong sp.nov. は、*Sonneratia alba* や *Avicennia marina* に比べ内陸側に生育するが、この葉のプロトプラストで高い濃度の ABA 内生量が明らかにされ、培養困難性の原因として議論された(Kaai et al. 2008)。この場合、いずれのサイトカイニンも阻害的なことが示されている(Kaai et al. 2006)。

一方、III章で、耐塩性が高いことが明らかになった、*Sonneratia alba* の子葉プロトプラストの培養では、ABA が細胞分裂を促進する結果が報告されている(Kawana et al. 2009)。同時に、*Sonneratia alba* 子葉と *S. alba* の液体培養細胞からプロトプラストを得、内生 ABA が測定された結果、前者でも相当量(ポプラ葉より高い)の含量が見られたが、後者では非常に高い値が得られ、ABA 高濃度による阻害は見られなかった。

本章では、耐塩性の高い海側に生育可能な種であり、III章において、プロトプラスト培養における非常に広い濃度範囲の耐塩性と耐浸透圧性が明らかになった *Avicennia alba* の液体培養細胞や未だカルス増殖が困難なまま残されている *Avicennia marina* 子葉を用いて、プロトプラストの ABA 内生量と培養における ABA と GA₃ の影響の関係について調べた。また、

同様に海側域に生育する *Sonneratia alba* の液体培養細胞を、NaCl 50 mM を含む培地で継代培養を続けた NaCl 株についても、ABA 内生量を測定し、これまでの知見と比較議論した。

IV-2. 材料と方法

IV-2-1) 液体培養細胞と子葉 プロトプラスト単離

得られたプロトプラストは、一部をすぐに培養に用いた。1.2 ml ガラスチューブ (マルエムマイクロチューブ No.1) 中に移し、プロトプラスト単離に用いた遠心分離条件により沈殿させ、上清を除いた。-80℃フリーザー (SANYO MDF-192) 保存を行った。

IV-2-1)-(1) *Avicennia alba* 液体培養細胞

タイ産種子より得られた子葉から誘導され、各 2 μ M 2,4-D、TDZ を含む mAA 培地で継代移植されている (Hayashi et al. 2009) 液体培養細胞から、プロトプラストを単離した。手法は、III章、III-2-2)-(3)に従った。

IV-2-1)-(2) *Sonneratia alba* 液体培養細胞 NaCl 株

Sonneratia alba 液体培養細胞 NaCl 株は西表島産種子より得られた子葉から誘導され、50 mM NaCl 添加した 0.1 μ M 2,4-D を含む MS 培地で継代移植されている (Kawana et al. 2007, Kawana & Sasamoto 2008)。プロトプラスト単離は、III章、III-2-2)-(4)に従った。

IV-2-1)-(3) *Avicennia marina* 子葉

西表島産種子を水道水で 1.5 ヶ月保存し、開いた子葉を 2% NaClO で 40 分間滅菌して実験に用いた。超純水での保存は種子が変色したため実験には使用できなかった。プロトプラスト単離は、III章、III-2-2)-(2)に従った。

IV-2-2) プロトプラスト培養における ABA および GA₃ の影響

プロトプラスト培養はIII章と同様の基本培地を用いた。*Avicennia alba* は、2,4-D 2 μ M、Thidiazuron 2 μ M、1.2 M ソルビトールを含む mAA 基本培地を、*Avicennia marina* は 2,4-D 1 μ M、Thidiazuron 1 μ M、1.2 M ソルビトールを含む mAA 基本培地を用いた。これに、0, 0.1, 1, 10 μ M ABA または GA₃ を添加し、96 穴シャーレのウェル内 50 μ l で培養した。ウェル間に、100 μ l の滅菌超純水を加え、パラフィルムで 2 重に巻きシールした。30℃、温室条件下 (CO₂ インキュベータ、ASTEC APC-30D or WAKENYAKU 9100、CO₂ ガス供給無し) で培養した。*Avicennia marina* 子葉プロトプラストは 28℃ の培養も行った。倒立顕微鏡 (Olympus CK40) で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

IV-2-3) ABA の微量抽出・精製、定量

プロトプラストからの ABA の抽出・精製、定量は既報に従った (Sasamoto et al. 2002)。

IV-2-3)-(1) プロトプラストからの ABA の抽出・精製

ガラスマイクロチューブ中のプロトプラストに 4℃ に冷やした 80% メタノールを 0.5 ml 加え攪拌

後、4℃に一晚保存した。攪拌後遠心分離(5000rpm 10min)した上清を、別のマイクロチューブに移し取り、沈殿に 0.3 ml の cold 80%メタノールを加え攪拌後、4 時間 4℃に保存した。遠心後の上清を合わせた 0.8 ml を、精製操作にまわした。遠心後の沈殿は 80 度で 18 時間乾燥させ、乾燥重量として測定した。

精製は、上清を遠心エバポレーター(EYELA CVE-3100, UNITRAP UT-1000) を利用して乾固させた。その後、サンプルに 0.5 ml の水を添加、6 N の HCl 溶液を加え pH 2.5 に調整し、ABA を 1/3 量の塩化メチレンで 3 回分別した。攪拌後 10 分間室温放置し、5000 rpm, 10 分間の遠心により、2 層に分離させ、下層を、マルチフレックスチップにより、別のマイクロチューブに移した。さらに、遠心エバポレーターで塩化メチレン層を乾固させ保存し、TLC 精製に用いた。80%メタノール少量に溶解し、5x10cm TLC(Watman Silicagel 60A K6 厚さ 250 μm)で精製した。3 cm 幅に帯状に、マルチフレックスチップにより添加した。展開液はイソプロパノール:28%アンモニア水:水=10:1:1またはイソプロパノール:2Mアンモニア2-プロパノール溶液(Wako):水=3:7:2 で展開し、ドラフト中で乾燥させ、ABA フラクションをミクロスパーテルでかきとり、300 μl の 80%メタノールで抽出し、再び抽出液を蒸発乾固し80℃で保存した。

IV-2-3)-(2) ABA の ELISA による定量

保存したマイクロチューブに、Tris buffered saline (0.125 M NaCl, 2.6 mM MgCl₂, pH 7.4) 200 μl を加え、ABA 定量キット(セパレート型 96 穴シャーレ)の処方に従って、*cis*-(+)-ABA モノクローナル抗体による ELISA test (Sigma PRG-1) (Weiler, 1982) による ABA の定量を行った。アルカリフォスファターゼによる PNPP の分解による PNP の黄色発色を、マイクロプレートリーダー (Multiskan Spectrum Thermo Labsystems) により吸光度を測定し、Log-Logit 検量線から ABA 量を求めた。サンプルの試験濃度は、3 段階を用い、直線関係を確認した。

IV-3. 結果

IV-3-1) プロトプラスト培養における ABA および GA₃ の影響

IV-3-1)-(1) *Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラスト

図 IV-1 に示すように、*Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラストの肥大、分裂に対して反応した細胞の割合を表すと、10⁵/ml の高密度においては、ABA による阻害的傾向が見られた。一方、GA₃による若干の促進が見られている。

2.5×10⁴/ml の低密度側の培養においては、他の密度に比べ、反能率が高い。ABA 10 μM における阻害が見られたが、GA₃ 高濃度による阻害は見られていない。

図 IV-2 は、細胞密度 5×10⁴/ml の培養における実験誤差を加えた結果であり、GA₃ の阻害が見られないことと、ABA の強い阻害効果がはっきりみとれる。

単離プロトプラストや、分裂コロニーの写真図は、Ⅲ章、図Ⅲ-5, 13 に示した。

IV-3-1)-(2) *Avicennia marina* 子葉プロトプラスト

図 IV-3 に示すように、*Avicennia marina* 子葉プロトプラストでは ABA によって肥大分裂が促進され、GA₃による促進は観察されなかった。

図 IV-4 から、低細胞密度から高細胞密度の培養において、ABA は 1 から 100 μM の高濃度になるに従い反応性が増した。10⁵/ml のプロトプラスト高密度において、最も反応性はよく、プロトプラストの低密度 10⁴/ml においても、ABA 100 μM によって促進された。

図 IV-5 写真図は、ABA 1 μM における細胞分裂と、100 μM ABA による、変形肥大細胞を示す。単離プロトプラストや、ABA を添加しない時の、肥大の写真図は、Ⅲ章、図Ⅲ-10, に示した。

IV-3-2) 内生 ABA の定量

Table IV-1 に示すように、*Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラスト 6×10⁶個当りの ABA 内生量は *Avicennia marina* 子葉プロトプラストの約6倍の高い値が得られた。

Table IV-2 に示すように、*Sonneratia alba* 液体培養細胞 NaCl 株の内生 ABA 量は 4.61 pmoles / 6×10⁶ プロトプラストであり、*Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラストと同程度の内生量であるが、既報(Kawana et al. 2009)の、培地に NaCl を添加していない *Sonneratia alba* 液体培養細胞の 21.6 pmoles と比較すると、同じ培養細胞としては低い結果となり、*Sonneratia alba* 子葉プロトプラストの 4.92 pmoles と同程度であった。

IV-4. 考察

Avicennia alba 液体培養細胞と *Avicennia marina* 子葉プロトプラスト培養において ABA と GA₃ による影響は、異なる結果が得られた。これは ABA 内生量の違いが大きく影響しているものと考えられる ABA 内生量が比較的高い *Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラストでは ABA の添加により肥大分裂が阻害されたが、ABA 拮抗ホルモンの GA₃ の添加により、肥大、分裂促進も見られた。

また、*Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラストでは、低密度側の反応効率が、高密度側の反応効率より高かった。このような、プロトプラスト低密度での細胞分裂活性の高さは、内生 ABA 含量が非常に高かったヒノキ芽生えの子葉プロトプラスト (Sasamoto and Ogita 2001) において、10³/ml の低密度において分裂が見られた (Sasamoto et al. 1992) のと同じように、内生の高い ABA の阻害効果が、低密度にすることにより打ち消されると考えられる。

一方、ABA 内生量の比較的低い *Avicennia marina* 子葉プロトプラストでは ABA 100 μM の高濃度添加においても阻害が見られず、ABA の添加濃度に従い肥大分裂が促進された。しかし拮抗ホルモンと考えられる GA₃ による促進は見られなかった。

このようなことから、*Avicennia* 属の 2 種プロトプラストにおいては、内生および培地中の ABA 量が高いと肥大分裂が抑えられるという図式が成り立つ。この内生量と添加ホルモンの影響の関係性は *Kandelia obovata* のプロトプラスト培養に見られたものと同様である (Kaai et al. 2008)。

Avicennia marina 子葉のカルス増殖が困難であったのに比較すると、*Avicennia alba* においては、容易であった。本発表で用いた子葉由来液体培養細胞のほかに、最近、新しく胚軸や子葉から固形培養によってカルス増殖系が得られている (Tsuchiya et al. 2013)。通常の植物では分裂阻害に働き、組織培養培地には用いられない ABA によって、*Avicennia marina* 子葉プロトプラスト培養が促進を受けることが本章で明らかになった。また、III 章において、好塩性や耐塩性が示された *Avicennia alba* 液体培養細胞のプロトプラストに比べ、*Avicennia marina* 子葉のプロトプラストは、培地に 1.2 M ソルビトールを含むことから浸透圧耐性が示されたが、さらなる耐塩性は弱かった。*Avicennia marina* の葉からの初期カルス誘導は、好塩性が見られており (Hayashi et al. 2009)、III 章で用いられた基本培地が本章と異なり、MS 基本培地、2,4-D 1 μM、BA 10 μM であったが、マングローブ植物の葉における ABA 含量が、胎生の種子に比べて高く、耐塩性に関与するという報告 (Farnsworth and Farrant 1998) と一致している。また、原因の一つとして、長期間水道水に保存した種子子葉における、ABA 内生量の低下が考えられる。*Avicennia marina* 種子は、採集時期によりデンプンを大量に蓄積するので、プロトプラスト単離のためには水道水保存が必要である。他の *Avicennia* 種子においても、同様な水道水による種子保存が必要であることと、超純水保存による種子の赤褐変が報告されている (Tsuchiya et al. 2013)。

一方、既報の *Sonneratia alba* 子葉および NaCl を添加していない液体培養細胞のプロトプラストでの内生 ABA 量 (Kawana et al. 2009) と比較して、*Sonneratia alba* 液体培養細

胞 NaCl 株の ABA 内生量は低く、子葉と同程度であった。Ⅲ章で示された、*Sonneratia alba* 液体培養細胞 NaCl 株のプロトプラストに対して NaCl や、 $MgCl_2$ によるはっきりした促進効果がみられなかった原因の一つと考えられる。

本章では、マングローブプロトプラストにおける耐塩性との関係で ABA の内生量や、培養における影響について議論したが、ABA は、植物種により(ブナ科、テンサイ)、アレロパシー物質としての働きが知られている(藤井 2000)。また、アレロパシー活性の強い草本マメ科植物のハッシュウマメは、DOPA がアレロパシー物質とされているが、その生長時期によって ABA 量も高く、アレロパシーに対する関与の可能性も示唆されている(藤井 1990)。

V. サンドイッチ法によるアレロパシー検定

V-1. 諸言

アレロパシー活性は、様々な経路から作用し、作用物質や作用機構が植物によって異なるため画一的な評価は難しい。これまでに、それらの異なる作用経路のアレロパシー活性の検証のための様々な生物検定法が確立されている (Fuji 2000)。生育した苗の根からの滲出物によるアレロパシー活性を実験室レベルで検定するプラントボックス法 (藤井 1991)、乾燥葉からの活性を検定するサンドイッチ法 (藤井 1994; 2003)、葉からの揮発成分による影響を検定するディッシュパック法 (藤井 2000) が確立されており、作用経路が異なるアレロパシー活性をそれぞれ評価することが可能である。このうち、プラントボックス法は幼苗を使い、生きた植物体同士の影響を検定することができるため実際の植物同士の環境に近いと考えられ、アレロパシー活性の検定に大変有効である。しかし、材料のマングローブ植物は種子の入手や保存、幼苗の育成を定常的に行うことが困難であり、プラントボックス法での検定はまだ行われていない。一方、落葉などのリターからの活性を測るサンドイッチ法はプラントボックス法よりも簡易に材料である葉を入手可能であるため、まずはサンドイッチ法を用いることとした。

本章では、塩濃度の高い領域に生育可能な *Sonneratia alba*、上流側に生育する *Sonneratia caseolaris* の葉のアレロパシー活性を検定した。両者は、それぞれの生育域の塩濃度は異なり (Duke 1992)、分布が重ならないことから、耐塩性とアレロパシー活性の関係性を検討する上で非常に優れた材料である。また、純林の形成は見られないうちが上流側で生育する同じ属の *Sonneratia ovata* についても検討を行った。

V-2. 材料および方法

V-2-1) 供試植物

Sonneratia alba 葉は、沖縄県西表島において、2回異なる年に採集した。

Sonneratia caseolaris 葉は、タイ国 Khanom 川および Pan Yi 川 の異なる流域で採取された葉を用いた。

Sonneratia ovata 葉は、タイ国で採取された。乾燥後7ヶ月保存した葉についても、実験を繰り返した。

供試植物の葉は、収穫後、1日から1週間以内に、60℃、18時間の乾燥を行い、シリカゲル青を入れた缶に密閉保存した。

V-2-2) サンドイッチ法によるアレロパシー検定

60℃、18時間、恒温器(SANYO MOV-212P)で乾燥させた各供試植物の葉を、10 mg または 50 mg 量りとり、それぞれ6穴のマルチディッシュ(Nunc)のウェルに置床する。0.5%低温ゲル化寒天末(ゲル化温度 30℃-31℃ Nacalai tesque, inc)をオートクレーブ 115℃、15分で滅菌後、45℃に保温する。各ウェル 10 ml ピペットマンにて、5ml ずつ分注し、完全に固まる前に浮上した試料はピンセットで沈めた。乾熱滅菌(180℃、2時間)したキムタオルで覆い、1層目が固まった後、さらに2層目の寒天を5 ml 分注し、完全に固まった後、その寒天上にレタス種子(グレートレーク 366)を1ウェル5粒置床、20℃暗黒条件で60時間(3日間)培養(MEE クールインキュベータ CN-25)後、幼根、胚軸の伸長を測定した。

結果は1ウェルにつき5本の芽生えの結果を平均したものを、3ウェル分平均した値である。

供試植物の葉を含まないコントロール条件の、レタス胚軸や根の伸長を100%としたときの、供試植物葉側の胚軸や根の伸長率で活性を表した。阻害率は100%から伸長率を差し引いた値となる。

V-3. 結果

V-3-1) *Sonneratia alba* 葉サンドイッチ法

2回の異なる年の実験の伸長率の結果を平均値として示した(図V-1)。レタス胚軸は 10mg および 50mg の添加ではあまり阻害が見られず、根の伸長は 10 mg で約 20%、50 mg で約 40%の阻害が示された。

V-3-2) *Sonneratia caseolaris* 葉サンドイッチ法

2ヶ所の採取場所の異なる葉の伸長率の結果をそれぞれ示した (図V-2)。レタス胚軸は 10 mg では約 40%、50 mg では約 50%程度の阻害が見られ、採取場所による差異は見られなかった。レタス根の伸長は 10mg で約 70%、50mg の添加で約 80%の強い阻害が見られた。胚軸と同じく、採取場所による差異は見られなかった。

V-3-3) *Sonneratia ovata* 葉 サンドイッチ法

同時に採取された葉を、保存期間を変えて2回測定し、それぞれの伸長率の結果を示した (図V-3)。レタス胚軸の伸長は 10 mg の添加では 10–20%の阻害を示し、50 mg 添加では約 40%の阻害を示した。レタス根の伸長に対しては、10 mg 添加で約 50%、50 mg 添加では約 70–80%の阻害を示した。

また、7ヶ月の保存期間を経た葉における活性の差異は認められなかった。

V-3-4) 3種のサンドイッチ法比較

図V-4 に示すように、*Sonneratia caseolaris* の阻害率が最も高く、*Sonneratia alba* は、3種の中では最も低い阻害率であった。*Sonneratia ovata* は、中間的な値を示した。

V-4. 考察

同属の3種 *Sonneratia alba*, *Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia ovata* のサンドイッチ法の結果では、種による活性の差異が見られた。特に上流側に生育する *Sonneratia caseolaris* は高い阻害活性を示した。*Sonneratia alba* については、3種の中では最も低い阻害活性であった。

Sonneratia ovata の生育域の塩濃度の測定についての文献は知られていないが、2種、*Sonneratia alba* と *Sonneratia caseolaris* では、生育域の塩濃度の差異が明らかとなっている(Duke 1992)。上流側の塩濃度の低い領域に生育する、植物との競合戦略が必要とされる *Sonneratia caseolaris* のアレロパシー活性が、海側の塩濃度の高い領域で比較的競合種の少ない *Sonneratia alba* よりも高い結果となり、このことから、この両者では耐塩性とアレロパシー活性は逆相関的な関係にあると推察できる。

生育時期、生育場所、乾燥葉の保存期間などによる差は、今回認められなかった。しかし、これまでに葉の成長時期や植物体の生育環境によって、同じ種の葉であっても活性の強弱が異なる植物が報告されており(笹本他 2012)、今後、生育段階の違う葉の活性の測定など、さらなるデータの蓄積が必要である。

Sonneratia caseolaris, *Sonneratia ovata* においては、これまでに薬効成分の研究が進められ、果実に含まれるフラボノイドの同定が行われている(Wu et al. 2009)。アレロパシーの作用物質＝アレロパシー物質がどのような経路で作用するのかは樹種により異なり、乾燥葉の影響を調べるサンドイッチ法の結果の傾向と、プラントボックス法の結果の傾向は必ずしも一致しないため、プラントボックス法による検定も今後望まれる。

VI. プロトプラスト法によるアレロパシー活性の検定

VI -1. 緒言

V章で述べたように、これまで実験室内でのアレロパシー検定法は、幼苗の生きた根からのレタス発根に対する作用を検定する「プラントボックス法」、乾燥葉からの作用を検定する「サンドイッチ法」が知られている。しかし、従来の検定法ではマングローブ植物は検定に適した幼苗や葉の入手が困難な種類もあり、台風など自然環境の変化により、年間を通じての供給が困難な問題があった。このため、本研究では、安定して得られる培養細胞のプロトプラストを用いた新たなアレロパシーの活性検定法である「プロトプラスト法」を、初めてマングローブ樹木種に応用した。

この新規アレロパシー検定法は、生きた根の活性を測定する「プラントボックス法」の原理を発展させ、生きた細胞間の反応を検定する手法である(図VI-1、Sasamoto et al. 2012, 2013)。草本植物における最初の例として、アレロパシー物質L-DOPAを含有し、活性が非常に強いマメ科のムクナ (*Mucuna pruriens*) が用いられた。プロトプラスト単離培養条件を確立した後、レタス(グレートレイク 366)のプロトプラストと、あるいはイネ培養細胞のプロトプラストとを混合培養し、レタスおよびイネのプロトプラスト分裂生長阻害活性に対する影響を定量的に測定することでアレロパシー活性を検定し、サンドイッチ法やフィールドテストと同様なアレロパシー活性が認められた。このプロトプラストを用いたアレロパシー検定法は、2種の植物のプロトプラストの混合培養により、植物相互の他感作用を調べる事が可能であり、将来的に、マングローブ種間の混合培養による相互作用の影響も観察できると期待される。

本章では、V章の乾燥葉のサンドイッチ法を行ったのと同じマングローブ種である、*Sonneratia alba*, *Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia ovata* を用いた。*Sonneratia alba* 植物は海側の塩濃度の高い生育域であり、*Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia ovata* 植物は、上流側の塩濃度の低い生育域に生育する。また、*Sonneratia alba* と *Sonneratia caseolaris* の生育域の測定された塩濃度は、雨季乾季を通して、塩濃度の差が示されている (Duke 1992)。また、II章において、*Sonneratia alba* 子葉の好塩性が示され、子葉由来培養細胞 (Kawana and Sasamoto 2008) と同様であった。また、*Sonneratia caseolaris* の実生由来の培養細胞では、*Sonneratia alba* のような好塩性は見られないが、低濃度 NaCl 塩による若干の促進が見られた。*Sonneratia ovata* の培養細胞では、起源組織により大きな違いが見られ、根由来では NaCl による阻害が顕著であったが、子葉由来では広い濃度範囲の NaCl 耐性が見られた。このような細胞レベルの好塩性、耐塩性と、アレロパシー活性の関係を探るため、本VI章では「プロトプラスト法」によるアレロパシー検定を試みた。

3種のマングローブ培養細胞のプロトプラスト単離培養条件の検討については、*Sonneratia alba* 子葉由来液体培養細胞、*Sonneratia ovata* 子葉由来液体培養細胞、*Sonneratia ovata* 根由来液体培養細胞については、III章において開発された手法を用い

たが、さらにプロトプラスト単離法の簡略化も行った。*Sonneratia caseolaris* 液体培養細胞からのプロトプラスト単離については、これまで困難であったが、カルス誘導時のガラクトースの促進効果の報告 (Yamamoto et al. 2009) を参考にし、本章において培養細胞の継代培養培地の糖条件の検討を加え、効率的プロトプラスト単離を初めて可能にした。プロトプラスト培養のための植物ホルモン、培養細胞密度条件などを検討した後、レタスプロトプラストとの混合培養試験を行った。ムクナでの報告 (Sasamoto et al. 2013) を参考にし、レタスの各密度での細胞肥大や細胞分裂に対する、マングローブプロトプラストの影響を定量的に解析した。次に、新しい解析法として、レタスの異なる密度におけるマングローブの影響を平均化する解析法や、検定植物レタスと、供試植物マングローブの各プロトプラストの密度比を考慮した解析法を試みた。

VI -2. 材料と方法

VI-2-1) プロトプラスト単離と精製

VI-2-1)-(1) *Sonneratia alba* 培養細胞 NaCl 株の継代培養、プロトプラスト単離、精製

液体培養細胞の継代培養はⅢ-2-1)-(5)により、プロトプラスト単離はⅢ-2-2)-(4)に、プロトプラストの精製は、Ⅲ-2-4)-(5)によった。

VI-2-1)-(2) *Sonneratia caseolaris* 培養細胞継代培養培地の栄養糖条件の検討とプロトプラスト単離、精製

継代培養培地の栄養糖条件の検討については、MS 基本培地、2,4-D 0.1 μ M、3%スクロースで継代培養された *Sonneratia caseolaris* 実生由来液体培養細胞 (Yamamoto et al. 2009) を、24 穴シャーレ中の糖のみ改変した培地 (3% ガラクトース、3%スクロース) に定量的に移植し培養後、細胞の様子を倒立顕微鏡観察すると共に、Ⅱ-2-3) の 24 穴シャーレ SS 法により、Packed Cell Volume(PCV)と Dry Weight(DW)の測定を行い、細胞の増殖度を評価した。この結果から、以降は、3% ガラクトース培地で継代培養し、プロトプラスト単離に供した。

プロトプラスト単離のため、Ⅲ章 Ⅲ-2-2)-(3) と同様に、24 穴シャーレを用いた簡易検定法 (Sasamoto et al. 1997) を利用し、最適酵素条件を 6 種類の細胞壁分解酵素 (セルラーゼ R-10: R10, セルラーゼ RS: RS, ドリセラーゼ 20: D20, ヘミセルラーゼ: H, マセロザイム R-10: M, ペクトリアーゼ Y-23: P) と 2 種類の浸透圧調節剤、ソルビトールとマンニトールを用いて検討した。倒立顕微鏡 (Olympus CK40) により観察した。

プロトプラストの精製は、酵素 1%セルラーゼ RS、ドリセラーゼ 20、0.25%ペクトリアーゼと、0.8M ソルビトールを含む酵素液でプロトプラストを得たのち、プロトプラスト酵素液をシリンダータイプのメッシュ 42 μ m に通し、酵素液を洗浄するため 50 ml 丸底ガラス遠心管に入れ、200g、5 分遠心し少量のマンニトールまたはソルビトール液を加え懸濁後、0.8M ソルビトール液を加え、太穴パスツールピペットで 10 ml 丸底ガラス遠心管に移し、再び遠心した。この遠心洗浄作業をもう 2 回行った。沈殿にソルビトール液を約 1 ml 入れ、5 ml アシストチューブに移した。少量をマイクロチューブにとり、血球計算盤で密度を求め、FDA で生存率を確認後、培養に供した。

VI-2-1)-(3) *Sonneratia ovata* 液体培養細胞継代培養とプロトプラスト単離精製

Sonneratia ovata の根由来液体培養細胞は、I 章で誘導され、継代培養された細胞を、MS 基本培地、2,4-D 0.1 μ M、3%ガラクトース培地で継代培養した。

Sonneratia ovata の子葉由来液体培養細胞は、I 章で誘導され、継代培養された細胞を、MS 基本培地、2,4-D 0.1 μ M、3%スクロース培地で継代培養した。

プロトプラスト単離条件検討のため、Ⅲ-2-2)-(3)と同様に、24穴シャーレを用いた簡易検定法(Sasamoto et al., 1997)を利用し、最適酵素条件を6種類の細胞壁分解酵素(セルラーゼ R-10: R10, セルラーゼ RS: RS, ドリセルラーゼ 20: D20, ヘミセルラーゼ: H, マセロザイム R-10: M, ペクトリアーゼ Y-23: P)と2種類の浸透圧調節剤、0.4-1.8 M ソルビトールと0.4-0.8 M マンニトールを用いて検討した。倒立顕微鏡(Olympus CK40)で観察した。マイクロチューブ遠心法による簡易定量の際は、プロトプラストの数は血球計算盤を用いて測定した。生存率はFDA 蛍光染色によった。

プロトプラストの精製は、根由来培養細胞プロトプラストは、各1%セルラーゼ R10, ヘミセルラーゼ, ドリセルラーゼ 20, マセロザイム R10 の組み合わせと浸透圧調節物質 0.6 M マンニトールを含む酵素液で処理した。子葉由来 *Sonneratia ovata* 培養細胞プロトプラストは、1%セルラーゼ RS, ヘミセルラーゼ, ドリセルラーゼ 20, 0.6 M マンニトールを含む酵素液でプロトプラストを得た。プロトプラスト液をシリンダータイプの 42 μm メッシュに通し、酵素液を洗浄するため 50 ml 遠心管に入れ、100g、5分遠心して上澄みを捨て、少量のマンニトール液を加え、10 ml 遠心管に移し、再び遠心した。この遠心洗浄作業をもう2回行った。沈殿にマンニトール液を約 1ml 入れ、5 ml アシストチューブに移した。少量をマイクロチューブにとり、細胞数、FDA による生存率を測定し、培養に供した。

VI-2-1)-(4) レタス無菌苗育成とプロトプラスト単離精製

レタス幼苗の育成は、Sasamoto et al. (2013) に従った。準備として、100 ml の培養フラスコに、超純水 30 ml に 0.8%の寒天を加え、アルミホイルカバーしたものと、滅菌水として超純水を約 200 ml を、オートクレーブ 121°C、20 分間滅菌後、室温に保存する。寒天フラスコは、オートクレーブ後すぐに攪拌しておく。

レタス種子を、ミラクロスを袋状にした中に入れ、周囲3箇所をホチキスで止めた。中性洗剤マレモンを加えた水道水中で1分攪拌後、水道水洗浄を数回行い、1.5-2% 次亜塩素酸ナトリウム液(NaClO) 15 分間スターラーで攪拌滅菌した。その後、クリーンベンチに持ち込み、滅菌水で3回交換して洗浄した。滅菌したシャーレ中でメスとピンセットを使い袋を開け、種子を取り出し、寒天培地上に、1フラスコ50種子程度を蒔く。25°Cの明培養(16時間日長、60 μE)インキュベータ(TOMY CLE-303,) 中で、4日から30日間育成する。

プロトプラストの単離は、芽生えの子葉を、滅菌水を入れた滅菌 9 cm ϕ シャーレ内でカットした。セルラーゼ RS, マセロザイム R10 各1%を含む、0.6 M マンニトールまたはソルビトール液 10 ml の入った 100 ml フラスコに葉をピンセットで移し、一晩から 24 時間室温処理し、プロトプラストを単離する。42 μm や 63 μm のシリンダータイプのメッシュに通し、酵素液を洗浄するため 50 ml 遠心管に入れ、100g、5分遠心して上澄みを捨て、少量のマンニトール液を加え、10 ml 遠心管に移し、再び遠心した。この遠心洗浄作業をもう2回行った。沈殿にマンニトールまたはソルビトール液を約 1 ml 入れ、5 ml アシストチューブに移した。少量をマイクロチューブにとり、細胞数、FDA による生存率を測定し、培養に供した。

VI-2-2) プロトプラスト培養条件の検討

Sonneratia caseolaris 培養細胞ガラクトース株のプロトプラスト培養時の最適ホルモン条件について、96 穴シャーレを用い検討した。各ウェルに、50 μl の、3%ガラクトースあるいは、3%スクロースを含む MS 基本培地に、オーキシンとして、2,4-D 0.1–5 μM と、BA 0.1–5 μM を組み合わせて添加した培地を用いた。培養浸透圧は 0.6 M ソルビトールを用いた。

Sonneratia ovata 子葉由来液体培養細胞のプロトプラスト培養時の最適ホルモン条件について、96 穴シャーレを用い検討した。各ウェルに、50 μl の、MS 基本培地 3%スクロース、0.6 M マンニトールに、植物ホルモン 2,4-D と BA 各々 0, 0.1, 1, 10, 100 μM の組み合わせになるように添加した液体培地を用意した。これに、VI-2-1)-(3) により、単離精製されたプロトプラストを、最終密度の 10 倍の密度になるようにマンニトール液で調整し、5 μl を投入した。最終培養密度は、10 倍の密度のプロトプラスト液を 5 μl 加えることにより、最終細胞密度を 2×10^4 /ml, 9×10^4 /ml に調整した。

培養のための最適細胞密度については、ホルモンフリーの条件と、2,4-D 0.1 μM を含む 2 条件において、 5×10^3 /ml から 2×10^5 /ml まで変化させて調べた。

ウェル間に、100 μl の滅菌超純水をディストリマンによって加え、パラフィルムで 2 重にまいてシールした。30°C 湿室条件(CO₂ インキュベータ、ASTECC APC-30D or WAKENYAKU 9100、CO₂ ガス供給無し)で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

VI-2-3) プロトプラスト法によるアレロパシー検定

VI-2-3)-(1) *Sonneratia alba* NaCl 株とレタスの混合培養

培地は、レタスに適ホルモン培地として、MS 基本培地、2,4-D 1 μM , BA 0.1 μM 、3%スクロース、0.8 M マンニトールまたはソルビトールを含む、50 μl の液体培地を、96 穴シャーレ (Falcon 3075) の最外側列から 1 列ずつ内側の 60 ウェルの中に分注した。

VI-2-1-(1) により単離精製された *Sonneratia alba* NaCl 株プロトプラストを、マイクロチューブの中で最終密度の 10 倍の密度になるようマンニトール液で調整し、96 穴シャーレに 1×10^4 – 2×10^5 /ml の密度になるよう各ウェルにピペットマン(P20)により、5 μl ずつ分注した。交差する列のウェルに、レタスプロトプラストを 4×10^3 – 2×10^5 /ml になるよう 5 μl ずつ分注した。ゼロコントロールには、プロトプラストの代わりにマンニトール液を加えた。各ウェルの外側の空所に 100 μl ずつ滅菌超純水をディストリマンを用いて分注した。28°C 湿室インキュベーター (CO₂ インキュベーター、ASTECC APC-30DR、CO₂ 供給無し) 内で培養した。

レタス子葉は播種 4–5 日後の芽生えを用いて VI-2-1)-(4)により、プロトプラストを単離精製した。

VI-2-3)-(2) *Sonneratia caseolaris* ガラクトース株とレタスの混合培養

培地は、レタスに適ホルモン培地として、MS 基本培地、2,4-D 1 μ M, BA 0.1 μ M、3%スクロース、0.6 M ソルビトールを含む、50 μ l の液体培地を、96 穴シャーレ (Falcon 3075) の最外側列から 1 列ずつ内側の 60 ウェルの中に分注した。

VI-2-1-(2) により単離精製された *Sonneratia caseolaris* ガラクトース株プロトプラストを、マイクロチューブの中で最終密度の 10 倍の密度になるよう 0.8 M ソルビトール液で調整し、96 穴シャーレに $1 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ /ml の密度になるよう各ウェルにピペットマン(P20)により、列状に 5 μ l ずつ分注した。交差する列のウェルに、レタスプロトプラストを $4 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ /ml になるよう 5 μ l ずつ分注した。ゼロコントロールには、プロトプラストの代わりにマンニトール液を加えた。各ウェルの外側の空所に 100 μ l ずつ滅菌超純水をディストリマンを用いて分注した。28°C 温室インキュベーター (CO₂ インキュベータ、ASTECC APC-30DR、CO₂ 供給無し) 内で培養した。

レタス子葉は播種 4 から 5 日後の芽生えを用いて VI-2-1)-(4)により、プロトプラストを単離精製した。

VI-2-3)-(3) *Sonneratia ovata* 液体培養細胞とレタスの混合培養

培地は、レタスに適ホルモン培地として、MS 基本培地、2,4-D 1 μ M, BA 0.1 μ M、3%スクロース、0.6 M マンニトールを含む、50 μ l の液体培地を、96 穴シャーレ (Falcon 3075) の最外側列から 1 列ずつ内側の 60 ウェルの中に分注した。

VI-2-1)-(3) により単離精製された、根由来 *Sonneratia ovata* のプロトプラスト、あるいは子葉由来 *Sonneratia ovata* のプロトプラストを、マイクロチューブの中で最終密度の 10 倍の密度になるよう 0.6 M マンニトール液で調整し、96 穴シャーレに $5 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ /ml の密度になるよう各ウェルにピペットマン(P20)により、列状に 5 μ l ずつ分注した。交差する列のウェルに、レタスプロトプラストを $4 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ /ml になるよう 5 μ l ずつ分注した。ゼロコントロールには、プロトプラストの代わりにマンニトール液を加えた。各ウェルの外側の空所に 100 μ l ずつ滅菌超純水をディストリマンを用いて分注し、パラフィルムで 2 重にまいてシールした。30°C 温室条件 (CO₂ インキュベータ、ASTECC APC-30DR CO₂ ガス供給無し) で培養した。倒立顕微鏡で観察し、肥大変形や分裂細胞数を測定した。

レタス子葉は播種 12 日~1ヶ月後の芽生えを用いて、VI-2-1)-(4)により、プロトプラストを単離精製した。

VI-2-3)-(4) *Sonneratia* 属 3 種とレタスの混合培養試験のデータ解析

VI-2-3)-(1)、VI-2-3)-(2)、VI-2-3)-(3)、のデータについて、マングローブを含まないゼロコントロールに対する生長率を、レタスの低密度から高密度までの値を平均化して表した。

同様のデータについて、マングローブとレタスのプロトプラスト密度がそれぞれ1:1に投入された時の、各データの平均値を求めた。

VI-3. 結果

VI-3-1) プロトプラスト単離条件の検討

VI-3-1)-(1) *Sonneratia caseolaris* 培養細胞継代培養培地の栄養糖条件の検討

スクロース培地とガラクトース培地の増殖度は PCV と DW では有意な差は見られなかった(図VI-2a,b)。しかし、*Sonneratia caseolaris* 3%スクロース株よりも 3%ガラクトース、2,4-D 0.1 μM を含む MS 基本培地で培養することで均一な細胞塊が得られた(図VI-3)。この得られた *Sonneratia caseolaris* ガラクトース株は継代培養が可能であった。

VI-3-1)-(2) *Sonneratia caseolaris* ガラクトース株のプロトプラスト単離条件

Sonneratia caseolaris ガラクトース株を用い、1% セルラーゼ R、ドリセラーゼ 20、0.25% ペクトリアーゼ、0.8 Mソルビトールでプロトプラストを得ることができた。プロトプラストの直径が 15 μm -20 μm 以下で小さく(図VI-4) 100gで 5 分間の遠心では完全にプロトプラストが沈殿しなかったため、200gで 5 分間遠心した。

また、継代培養 2 週間以上経過すると培養細胞は褐変し、プロトプラスト単離は効率が落ちることが明らかとなり、継代培養 1 週間-2 週間以内で継代培養および単離することが望ましい。

VI-3-1)-(3) *Sonneratia ovata* 液体培養細胞のプロトプラスト単離

根由来 *Sonneratia ovata* 液体培養細胞のプロトプラスト単離において、24 穴シャーレを用いて反応させ、プロトプラスト単離の程度を倒立顕微鏡下における観察により、4 段階で表し、グラフ化することにより、適酵素条件が明らかになった。この結果は、III 章において用いられた、マイクロチューブ中で遠心沈殿させ、血球計算盤で計数する手法での定量的結果とも同じ酵素が選択され、比べて、材料量が少ない時も可能な探索法である。各 1%セルラーゼ R10、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ 20、マセロザイム R10 で単離が効率的であった(図VI-5)。浸透圧は 0.6 M マンニトールが最適であった(図VI-6、図VI-7)。

子葉由来 *Sonneratia ovata* 液体培養細胞のプロトプラストの単離において、24 穴シャーレ、マイクロチューブ遠心法での酵素条件探索により、各 1%セルラーゼ RS、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ 20 の組み合わせで最も効率的に単離することができた(図VI-8)。浸透圧は 0.6 M マンニトールが最適であった(図VI-9)。

VI-3-2) プロトプラスト培養条件の検討

Sonneratia caseolaris 培養細胞ガラクトース株のプロトプラスト培養では、3%ガラクトース培地または 3%スクロースを含む MS 基本培地に浸透圧剤ソルビトール 0.6 M を含む条件で、オーキシシン 0.1-1 μM で肥大・分裂が観察され低濃度が促進的であった。サイトカニン

BA は 0.1–1 μM の低濃度で肥大分裂が促進され、ホルモンの添加により細胞の肥大・分裂が促進された。

Sonneratia ovata 子葉由来液体培養細胞のプロトプラスト培養では、浸透圧剤を含む MS 基本培地、3%スクロースを含む条件で、2,4-D 0–1 μM 、BA 0–10 μM の広い濃度範囲で肥大・分裂が観察されたが、それぞれ、高濃度では阻害した。培養密度が 2×10^4 /ml の低密度の時は、2,4-D 0.1 μM 単独の条件が良かったが、培養密度が 9×10^4 /ml の高密度の時は、ホルモンフリーの条件が適していた。(図VI-10 a,b)そこで、ホルモンフリーと、2,4-D 0.1 μM の2条件で、プロトプラスト培養密度を変化させたところ、 10^4 /ml、 2×10^4 /ml が、適密度であったが、広い密度範囲で、肥大・分裂は起きる(図VI-11)。 9×10^5 /ml の高密度では、50 μm 直径の大きな肥大も観察された。

Sonneratia ovata 根由来液体培養細胞のプロトプラスト培養では、浸透圧剤を含む MS 基本培地、ホルモンフリー、3%ガラクトース培地においては、肥大分裂は起きなかったが、3%スクロース培地においては分裂が見られた。

VI-3-3) プロトプラスト法によるアレロパシー検定

VI-3-3)-(1) *Sonneratia alba* NaCl 株とレタスの混合培養

図VI-12a に示すように、混合培養試験において、*Sonneratia alba* NaCl 株のプロトプラストはレタスのレタスのプロトプラストと比較して径が大きくまた、レタスが緑色の違いがあるので、レタスプロトプラストに対する影響を計測可能であった。

培養 7 日目に倒立顕微鏡で観察し、レタスの分裂細胞およびコロニー数を計測した。結果は 2 ウェルの平均値で示した。(図VI- 13、*S. alba* 青)

レタス低密度 5×10^3 – 2×10^4 /ml において(図VI- 13a, b、*S. alba* 青)同じ密度の *Sonneratia alba* が添加されても、分裂は添加していないものに比べ 80%–100%と、あまり阻害がないが、添加される *Sonneratia alba* の密度が高くなると分裂が阻害された。また、*Sonneratia alba* の細胞は大きく、 2×10^5 /ml での観察は大変困難だった。

レタス高密度 5×10^4 /ml – 10^5 /ml においては(図VI- 13c, d、*S. alba* 青)、同じ密度以上の *Sonneratia alba* が添加されると *Sonneratia alba* の密度が高くなるにつれて阻害が見られた。

VI-3-3)-(2) *Sonneratia caseolaris* ガラクトース株とレタスの混合培養

図VI-12b に示すように、混合培養試験において、*Sonneratia caseolaris* ガラクトース株のプロトプラストはレタスのレタスのプロトプラストと比較して径が小さく、レタスが緑色の違いがあるので、レタスプロトプラストに対する影響を計測可能であった。

VI-3-3)-(1)の *Sonneratia alba* と同様に培養 7 日後、レタスの分裂細胞数とコロニー数を計数した。結果は 2 ウェルの平均値で示した(図VI- 13、*S. caseolaris* 赤)。レタスの低密度

から高密度において、同じ密度の *Sonneratia caseolaris* が添加されると、コロニーの形成が 50%–10%以下になる強い阻害を受けた(図VI-13a, b, c, d、*S. caseolaris* 赤)。サンドイッチ法と同じく *Sonneratia caseolaris* による阻害の方が、VI-3-3)-(1)の *Sonneratia alba* による阻害より強い傾向が見られた。

VI-3-3)-(3) *Sonneratia ovata* 培養細胞とレタスの混合培養

図VI-14a に示すように、混合培養試験において、*Sonneratia ovata* 子葉由来培養細胞とレタスのプロトプラストは、レタスの緑色により区別でき、レタスプロトプラストに対する影響を計測可能であった。また、図VI-14b に示すように、根由来培養細胞のプロトプラストは、混合培養培地において 2, 3 日後に分裂活性を示したが、レタスの緑色による区別、あるいは、レタスプロトプラストの肥大分裂とは、倒立顕微鏡下で区別でき、レタスプロトプラストに対する影響を計測可能であった。

VI-3-3)-(1)、VI-3-3)-(2)と同様に培養 8 日後、分裂細胞数と変形肥大数を計数した。このデータに対して、VI-2-3)-(4)により、マングローブプロトプラストを含まないゼロコントロールに対する%生長率を計算し、レタスの 5×10^3 – $10^5/\text{ml}$ の各密度における値の平均値を求めた。*Sonneratia ovata* 子葉由来培養細胞と根由来培養細胞ではパターンが異なり、子葉由来培養細胞(図VI-15a)の方が、根由来培養細胞(図VI-15b)のプロトプラストより、レタスプロトプラストに対する阻害効果が強い傾向が見られた。

VI-3-3)-(4) *Sonneratia* 属の液体培養細胞とレタスの混合培養における比較データ解析

VI-3-3)-(3) *Sonneratia ovata* 培養細胞とレタスプロトプラストとの混合培養試験と同様な、異なるレタス密度における「平均値による解析」を、VI-3-3)-(1)、VI-3-3)-(2)の *Sonneratia alba* と *Sonneratia caseolaris* の混合培養試験にも応用した(図VI-16a, b)。まとめ図VI-17 から、*Sonneratia caseolaris* による阻害が、最も強く、次に *Sonneratia ovata* 子葉由来培養細胞、次に *Sonneratia alba* NaCl 株のプロトプラストの順になり、*Sonneratia ovata* 根由来培養細胞は最も弱い阻害率であった。

次に、*Sonneratia alba* 培養細胞、*Sonneratia caseolaris* 培養細胞、*Sonneratia ovata* 2種の培養細胞のプロトプラストと、レタスプロトプラストとの混合培養試験の結果から、レタス対マングローブが1対1の割合で混合培養された時のレタスの生長率の平均値を計算したところ(図VI-18)、*Sonneratia caseolaris* の強い阻害が確認された。

VI-4. 考察

「プロトプラスト法」によるアレロパシー検定のためには、供試植物のプロトプラストの単離と、培養条件の開発が必須となる。

Sonneratia caseolaris の液体培養細胞のプロトプラスト単離は、これまで非常に難しかったが、継代培養培地の栄養糖をガラクトースに変えることにより、細胞肥大が抑えられ分裂活性の高い細胞塊を得ることができ、プロトプラスト単離が容易になることが明らかになった。これは、同じ *Sonneratia caseolaris* の葉からのカルス誘導が、通常用いられるスクロースよりガラクトースが効率的という報告 (Yamamoto et al. 2009) の他、I 章において、新規の *Sonneratia ovata* の培養細胞誘導時にも、ガラクトースが効率的であったので、同じ *Sonneratia* 属に共通の現象と考えられる。プロトプラスト単離酵素および浸透圧の最適条件の検索については、倒立顕微鏡観察と24穴シャーレを用いた簡易検索法とが有効であった。

Sonneratia 3種各々のプロトプラスト培養における植物ホルモン条件は、2,4-D, BAの広い濃度組み合わせとホルモンフリーの条件でも、肥大分裂反応がおきたので、レタスプロトプラストと、共通の、2,4-D 1 μM , BA 0.1 μM のホルモン条件での混合培養試験が可能であった。しかし、マングローブ側が、ホルモンフリーでも反応するのに対し、レタスでは、反応が見られない (Sasamoto et al. 2013)。

マングローブ種の中では、同じ分類属の中で、海側と上流側の、塩濃度の差が異なる生育域を持つ例は、あまり見られないが、同じ属で、分布域の差が明らかとなっている2種 (Duke 1992)、海側の塩濃度の高い領域に生育する *Sonneratia alba* と陸の塩濃度の低い領域に生育する *Sonneratia caseolaris* について、「プロトプラスト法」により、レタスプロトプラストの分裂に対する影響を明らかにした。両者で阻害の程度が異なり、上流側の *Sonneratia caseolaris* のほうがプロトプラスト法において強い活性を示した。これはV章のサンドイッチ法で得られた傾向と同じ結果といえる。

II章において、液体培養細胞の耐塩性が比較され、*Sonneratia alba* の強い耐塩性 (Kawana & Sasamoto 2008) と *Sonneratia caseolaris* の弱い耐塩性が示された。これは、2種の分布域における塩濃度の差を反映しており、耐塩性の強さとアレロパシー活性の程度が逆相関の関係にあると考えられる。本論文の序章で述べた、マングローブの耐塩性とアレロパシーに関する作業仮説と矛盾しない結果であった。

I章で初めて誘導された *Sonneratia ovata* の培養細胞については、純林を作らず、他の2種との生育域の塩濃度の差も、明らかになっていないが、そのアレロパシー活性は、*Sonneratia caseolaris* に比べ弱いと判断される。II章で明らかになったように、その培養細胞の由来組織の違いや、培養培地の糖の種類により、耐塩性が変化する。また、プロトプラスト法によるアレロパシー検定においては、検定植物レタスプロトプラストの密度により、*Sonneratia ovata* の阻害率が変化する。この活性の差を比較するために、レタスのいろいろな密度での阻害率を平均化する解析法を試みた。また、それぞれのレタス細胞密度に対して、同じ密度のマングローブプロトプラストが添加された場合の分裂活性を比較したところ、

*Sonneratia alba*と*Sonneratia caseolaris*の結果には有意な差が見られた。

以上のように、生きた細胞であるプロトプラストの混合培養によって、細胞の相互作用を観察することでアレロパシー活性を検定可能であると考えられる。

本論文では、基礎として、レタスプロトプラスト側の分裂の好条件を、混合培養の際のホルモン条件として設定したが、将来的には、異なるホルモン条件、あるいは、異なる培地塩類条件、培地糖条件、温度条件など、実際の環境を模した検定条件におけるアレロパシー検定が可能と考えられる。

アレロパシー物質としては、非常に多くの代謝物が知られている(藤井 2000)。ハッシュウマメにおけるL-DOPAや、*Leucaena leucocephala*(ギンネム)におけるL-ミモシンのようなアミノ酸類も強いアレロパシー活性が知られているが、マングローブ *Sonneratia alba* の培養細胞や子葉のプロトプラストのアミノ酸分析の結果では、通常のアミノ酸以外に含量の多いものは認められていない(Tsuchiya et al. 2013)。*Sonneratia caseolaris* や、*Sonneratia ovata* の果実からフラボノイドが同定され、動物細胞に対する薬効が調べられた(Wu et al. 2009)。トリテルペノイドやステロールも、*Sonneratia* 種について報告されているが、アレロパシー物質としての報告はみられない。「プロトプラスト法」で用いた、レタスプロトプラスト培養系は、強い阻害活性の基となるアレロパシー物質の検定あるいは、その作用機構を探る際にも応用可能と考えられる(Sasamoto and Ashihara 2014)。

総合考察

植物の生存戦略は多岐にわたり、マングローブ植物の生育する汽水域という特殊な環境においては、特に耐塩性の獲得が優占種にとって重要である。一方、生存戦略の一つであるアレロパシーと耐塩性との関係性は、これまで研究されていない。マングローブ植物 (Tomlinson, 1986, Spalding et al. 2010) は海水による影響を受けるため、耐塩性が強いと考えられるが、100 種以上の種が持つ耐塩性の程度はそれぞれ異なる。マングローブ植物の各樹種の分布は、これらの耐塩性の差異やその他の要因によると考えられる。分布域が異なる、つまり生育環境の塩濃度が異なる種では必要な戦略が変化し、塩濃度の高い下流域海側ではアレロパシー (競合する他の種に対する生長阻害) よりも塩ストレスに対する耐塩性が必要とされ、塩濃度の低い上流側では耐塩性が必要とされず、生存戦略としてアレロパシーが必要になり、互いに逆相関的な関係にあるという仮説を立てることができる。このことは、植物の C-S-R 戦略 (Grime 1977) の関係性とも合致すると考えられる。

本論文では、上記の仮説を検証するため、マングローブの中ではあまりみられない、同じ属に属し且つ生育域の異なる種が見られる *Sonneratia* 属を中心に、耐塩性の強弱とアレロパシー活性の関係性について細胞培養系を用いて検討した。植物体が海側に生育可能な *Sonneratia alba* と植物体が上流側に生育する *Sonneratia caseolaris* とは分布域の塩濃度が明らかに異なる (Duke 1992)。本論文で初めて液体培養細胞系を確立した *Sonneratia ovata* も上流側に生育する種として比較した。

海側に生育する *Sonneratia alba*、*Avicennia alba*、および上流側に生育する *Bruguiera sexangula*、などの、子葉または葉由来液体培養細胞の生長に対して、NaCl に加えて、海水に多く含まれるイオン (Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+}) の塩の影響が解析された既報の結果 (Kawana & Sasamoto 2008; Hayashi et al. 2009) をヒートマップ化して、*Sonneratia caseolaris* や *Sonneratia ovata* と比較したところ、海側に生育可能な種と陸側に生育する種では明らかな差が見られ *Sonneratia alba* や *Avicennia alba* の好塩性の特徴が示され、また各塩に対するマングローブ種各々の異なる特徴が確認された。*Sonneratia caseolaris* と *Sonneratia ovata* は植物体の耐塩性は高くないと考えられたが、*Sonneratia caseolaris* 子葉・胚軸由来液体培養細胞は 50 mM まで耐性が見られた。また、*Sonneratia ovata* 子葉由来液体培養細胞は、NaCl 100 mM の濃度に対して耐性が見られ、海水に含まれる濃度が最も高い Na^{+} と Cl^{-} に対する耐性は、海側、上流側のマングローブ種の共通の特徴と言える。このように、植物体が有する好塩性や耐塩性が細胞レベルでも示され、その耐塩性の強弱は分布域との関連性が示された。しかし、マングローブ種において根由来の培養細胞はこれまで無かったが、本論文で初めて開発された *Sonneratia ovata* 根由来の培養細胞は、NaCl により阻害され、子葉由来と異なるパターンがみられた。子葉や胚軸は海水の影響を直接受ける可能性が高いと考えられる。

さらに、植物体が海側に生育可能な耐塩性の強い種について、細胞壁を取り除いたプロトプラストの系における塩の影響を解析した。プロトプラストの作出には、各々の細胞に適した浸透圧調節を行う必要があり、各々の培養培地には 0.6–1.2 M の浸透圧調節物質が含まれる。*Sonneratia alba* 子葉や培養細胞 NaCl 株、*Sonneratia griffithii* 子葉、*Avicennia alba* 培養細胞における好塩性や耐塩性が明らかとなった。*Avicennia marina* の子葉プロトプラストについては、NaCl に対する耐性が弱い。これは、ストレス耐性植物ホルモンとして知られるアブシジン酸 (ABA) の内生量を測定したところ、*Avicennia alba* 液体培養細胞プロトプラストに比べて非常に低く、培養培地に加えた ABA によりプロトプラスト分裂が促進された。水道水中保存の間に、耐塩性が低下していた事も考えられる。ABA は通常生長阻害に働くが、*Sonneratia alba* 子葉や培地に NaCl を添加しない培養細胞プロトプラストにおいては、内生 ABA 量は高く (Kawana et al. 2009)、好塩性との関係が考えられる。

細胞レベルでの好塩性が示された *Sonneratia alba* と弱い耐塩性の *Sonneratia caseolaris* について、乾燥葉の、サンドイッチ法によるアレロパシー検定を行なった。また、各液体培養細胞から、プロトプラストの単離の際の細胞壁分解酵素条件や、浸透圧条件、および培養の際の浸透圧条件、植物ホルモンや、培養密度などの最適条件を検討し、プロトプラスト培養系を開発した後、レタスプロトプラストとの混合培養試験による、「プロトプラスト法」によるアレロパシー活性の検定法を、初めてマングローブ種を用いて行った。サンドイッチ法におけるレタス胚軸・根の生長に対する阻害のアレロパシー活性、およびレタスプロトプラストの細胞分裂に対する阻害のアレロパシー活性は、どちらの方法でも *Sonneratia caseolaris* の阻害活性の方が、*Sonneratia alba* に比べて強いことが明らかとなった。この結果は、耐塩性の程度とアレロパシー活性の程度がこの 2 種の間で逆相関の関係にあり、海側域と上流側に生育するマングローブの耐塩性とアレロパシーの関係性に関する仮説と矛盾が無い。*Sonneratia ovata* については、子葉由来培養細胞を、*Sonneratia alba* や *Sonneratia caseolaris* と比較すると、サンドイッチ法、プロトプラスト法共に、両種の間中間的な活性となったが、根由来培養細胞のプロトプラストでは、*Sonneratia alba* より弱い傾向がみられた。

Sonneratia ovata 根由来培養細胞は、*Sonneratia caseolaris* 培養細胞と同様に、培地栄養糖として、ガラクトースを用いて誘導継代培養されている。*Sonneratia* 属3種において、通常植物組織培養に用いられるスクロースに比べ、ガラクトースの有効性が本論文で明らかになった。本論文では、プロトプラスト法によるアレロパシー検定において、レタスプロトプラスト側の分裂の好条件を、混合培養の際のホルモン条件として、またスクロースを栄養糖として設定したが、将来的には、異なるホルモン条件、あるいは、異なる培地塩類条件、培地糖条件、温度条件など、実際の環境を模した検定条件におけるアレロパシー検定が可能と考えられる。また、アレロパシー物質については、*Sonneratia caseolaris* 培養細胞や *Sonneratia ovata* 培養細胞の色素生産能も興味深い。プロトプラスト培養系は、強い阻害活性の基となるアレロパシー物質の検定あるいは、その作用機構を探る際にも応用可能と考えられる。

謝辞

本研究は、2008年から2010年および2011年から2014年までの期間に横浜国立大学大学院環境情報学府において行った。本研究の遂行および本論文の執筆に当たり、終始懇切な御指導と校閲の労を賜りました横浜国立大学大学院環境情報研究院 笹本浜子教授に、厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するに当たり終始有益な助言と御指導、御鞭撻を賜りました同大学の持田幸良教授、雨宮隆教授、酒井暁子准教授、国立大学法人 東京農工大学 藤井義晴教授に、ここに厚く御礼申し上げます。

学校法人 東京農業大学 皆川礼子 博士には、本研究における実験で供試したマングローブの種子を分譲していただくと共に、有益なご助言を受け賜りました。厚く御礼申し上げます。

研究遂行中は本大学環境生命学専攻の 平塚和之教授、尾形信一准教授、中村達夫准教授には大変お世話になりました。感謝申し上げます。

本学環境生命学専攻の各位に公私共々絶大な協力を頂き、心から御礼申し上げます。本研究の遂行及び論文の執筆にあたり、国立大学法人香川大学農学部研究科植物病理学研究室の福元健志 博士、株式会社 マイロプス 川名祥史 博士には公私共に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

表1. 本論文で用いた培地の組成

		MS		mAA	
		mg/l	mM	mg/l	mM
Macronutrients	NH ₄ NO ₃	1650	20.61	-	-
	KNO ₃	1900	18.79	-	-
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	2.99	440	3
	Ca(NO ₃) ₂ /4H ₂ O	-	-	-	-
	KH ₂ PO ₄	170	1.25	170	1.25
	KCl	-	-	1491	20
	MgSO ₄ /7H ₂ O	370	1.5	370	1.5
Micronutrients	FeSO ₄ /7H ₂ O	27.8	0.1	27.8	0.1
	Na ₂ -EDTA	37.3	0.1	37.3	0.1
	Zn-EDTA	-	-	-	-
	MnSO ₄ /4H ₂ O	22.3	0.1	22.3	0.1
	ZnSO ₄ /7H ₂ O	8.6	0.03	8.6	0.03
	CoCl ₂ /6H ₂ O	0.025	0.00011	0.025	0.00011
	CuSO ₄ /5H ₂ O	0.025	0.0001	0.025	0.0001
	NaMoO ₄ /2H ₂ O	0.25	0.00103	0.25	0.00103
	KI	0.83	0.005	0.83	0.005
	H ₃ BO ₃	6.2	0.1	6.2	0.1
Vitamine	nicotinic acid	0.5	0.0041	0.5	0.0041
	pyridoxine-HCl	0.5	0.0024	0.5	0.0024
	thiamine-HCl	0.1	0.0003	0.1	0.0003
	myo-inositol	100	0.55	-	-
	L-glycine	2	0.03	7.6	0.101239
Amino acids	glutamine			877	6
	aspartic acid			266	2
	arginine			174	1

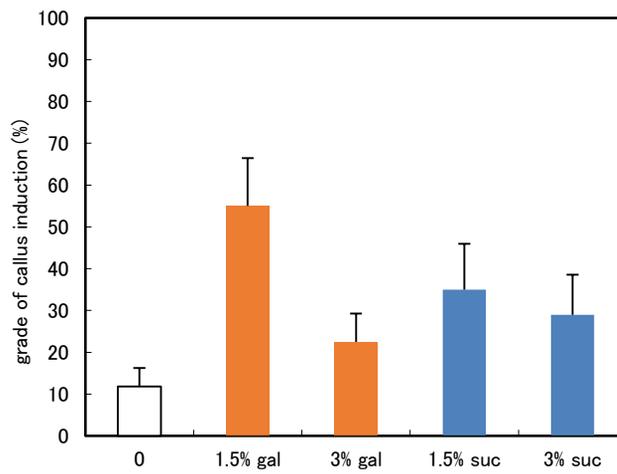


図 I - 1a. *S. alba* 子葉からの初期カルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響。2,4-D 0.1 μM を含むMS基本培地.培養14日目に倒立顕微鏡観察。

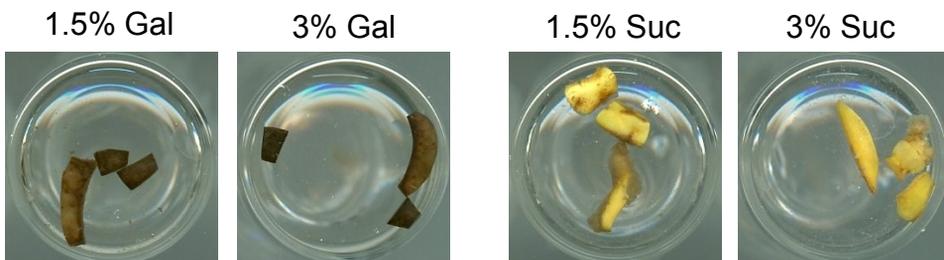


図 I - 1b. *S. alba* の子葉からのカルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響。2,4-D 0.1 μM を含むMS基本培地. 4ヶ月後にスキャン。

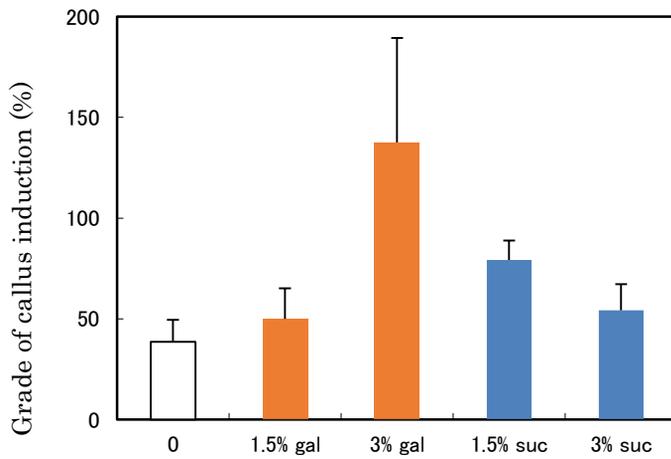


図 I - 2a. *S. alba* の胚軸からの初期カルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. 培養14日目に倒立顕微鏡観察.

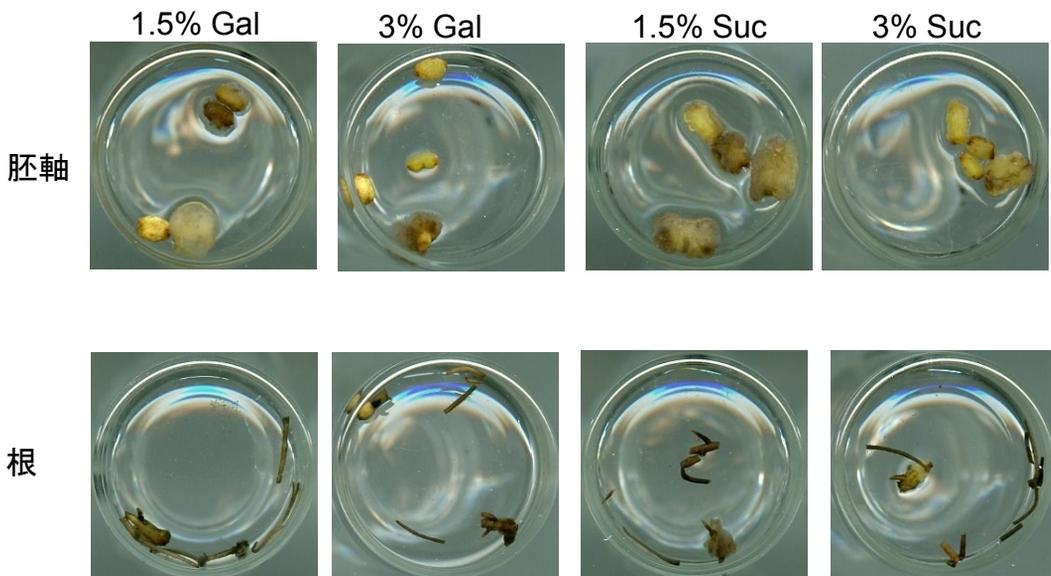


図 I - 2b. *S. alba* の胚軸と根からのカルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. 培養4ヶ月後にスキャン.

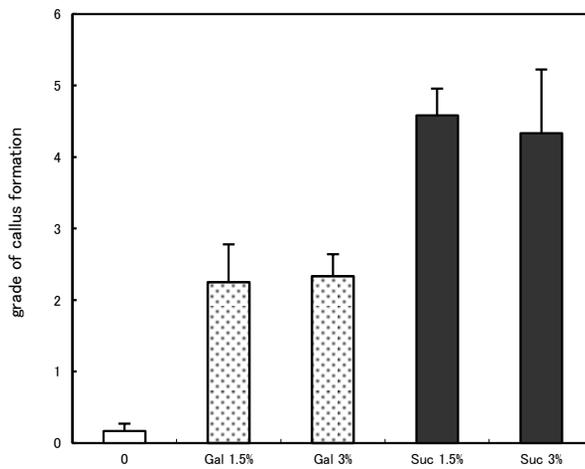


図 I - 3a. *Populus alba* 葉の初期カルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D 10 μ M, BA 0.1 μ M を含むMS基本培地. 培養7日目倒立顕微鏡観察.

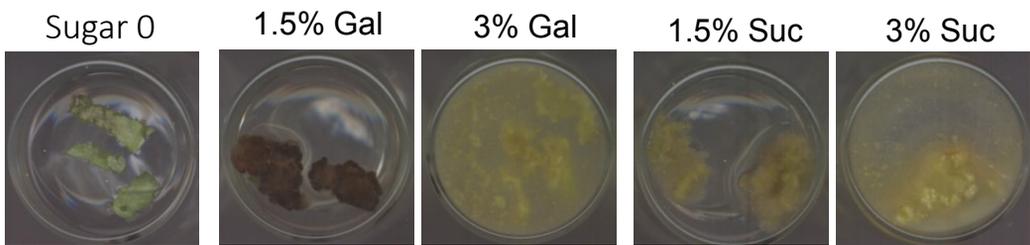


図 I - 3b. *Populus alba* カルス誘導に対するガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D10 μ M, BA 0.1 μ M を含むMS基本培地培養. 3ヶ月後にスキャン.

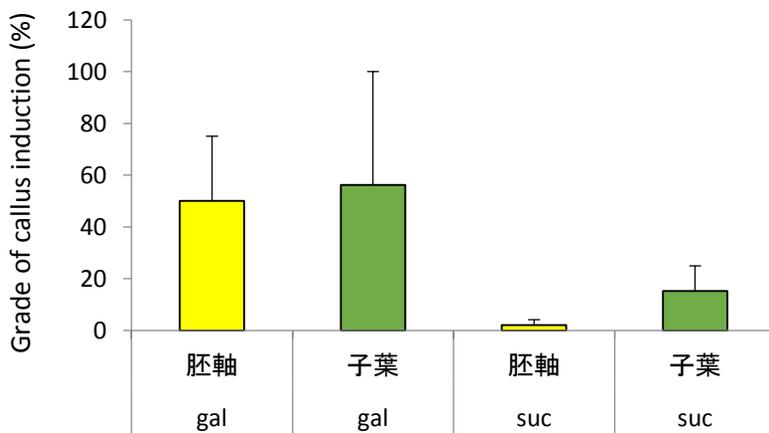


図 I - 4a. *S. ovata* の子葉、胚軸からの初期カルス誘導に対する3%ガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. 培養8日後。

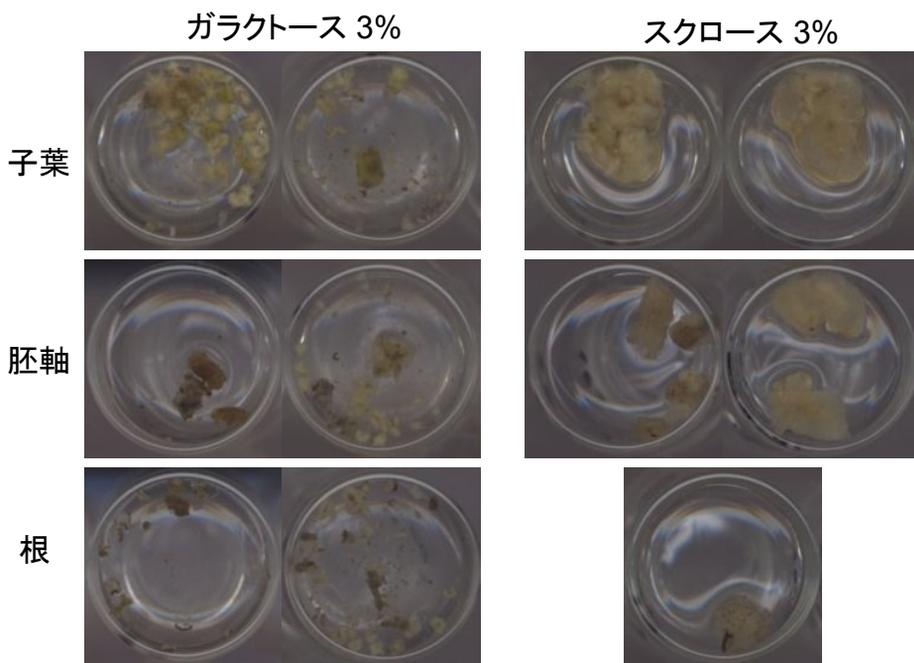


図 I - 4b. *S. ovata* の子葉、胚軸、根からのカルス誘導に対する3%ガラクトースとスクロースの影響. 2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. 培養1ヶ月後にスキャン.

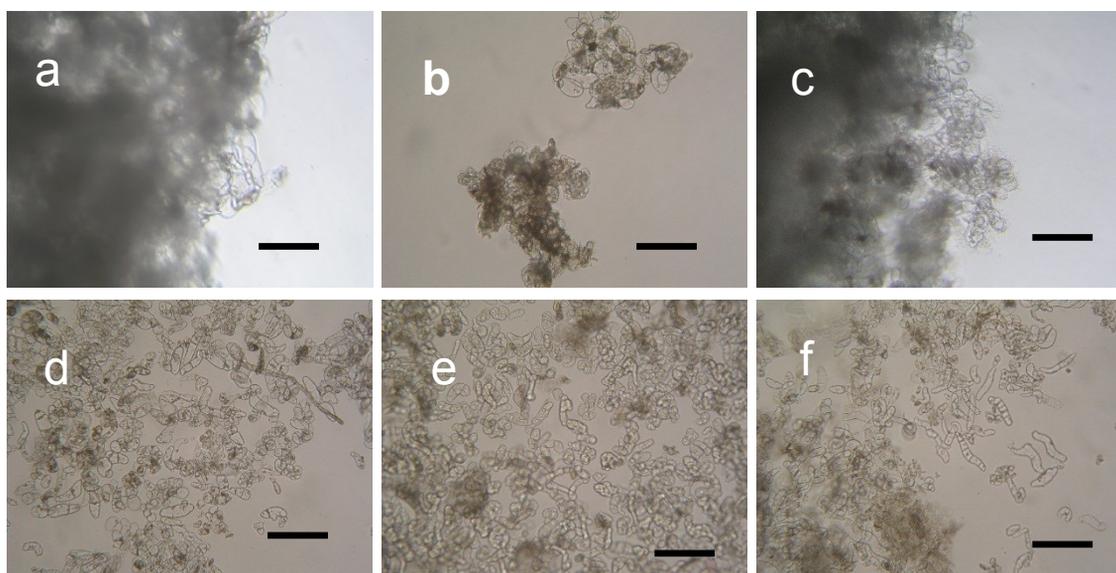


図 I - 5. *S. ovata* 子葉、胚軸、根からのカルス誘導に対する3%スクロースとガラクトースの影響。2,4-D 0.1 μ M を含むMS液体基本培地。培養1ヶ月。
a,b,c: スクロース、d,e,f: ガラクトース
a, d: 子葉; b, e: 胚軸; c, f: 根。 Bar= 200 μ m

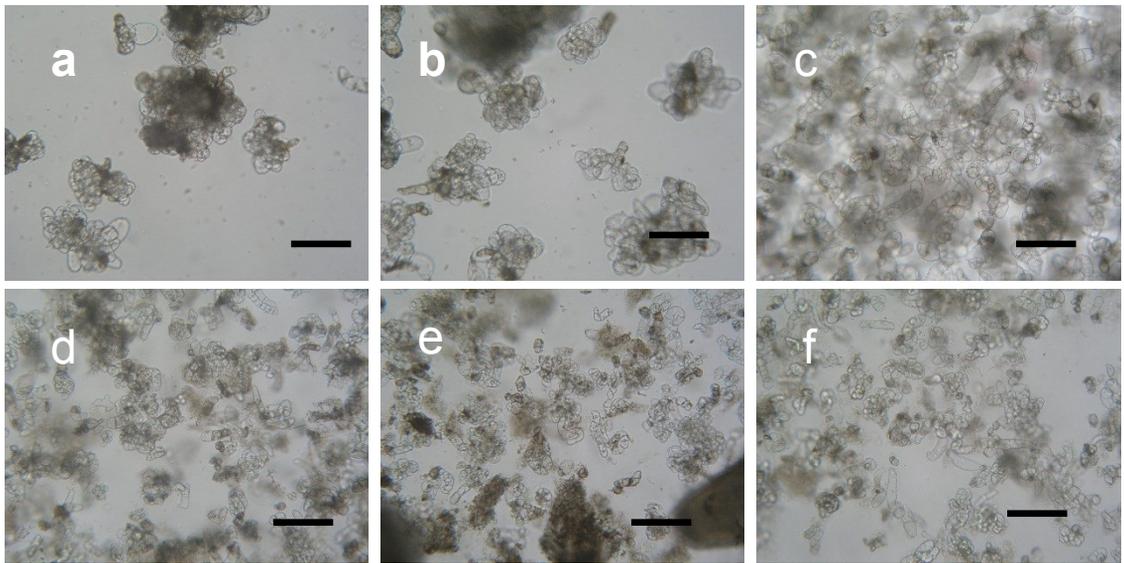


図 I - 6. *S. ovata* 子葉、胚軸、根からの、100 mLフラスコ継代培養初期におけるスクロースとガラクトースの影響。2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. カルス誘導後1.5月。継代培養後2週間。
a,b,c: 3%スクロース、d,e,f: 3%ガラクトース
a, d: 子葉; b, e: 胚軸; c, f: 根。 Bar= 200 μ m

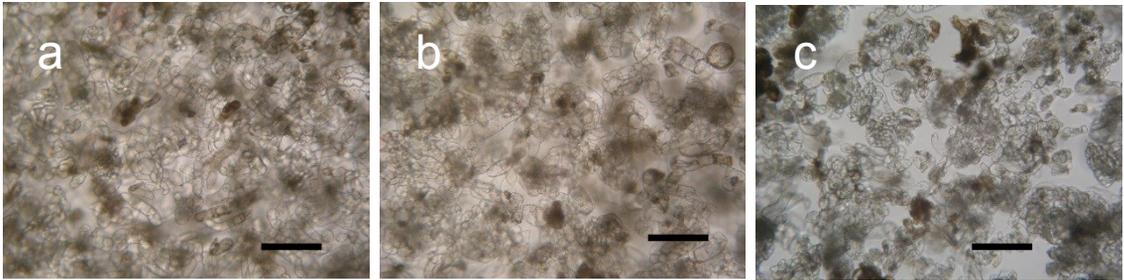


図 I - 7. *S. ovata* 子葉、胚軸、根からの、100 mL フラスコ継代培養8ヶ月における3%スクロース培地での増殖。2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本液体培地。
a: 子葉; b: 胚軸; c: 根。 Bar= 200 μ m

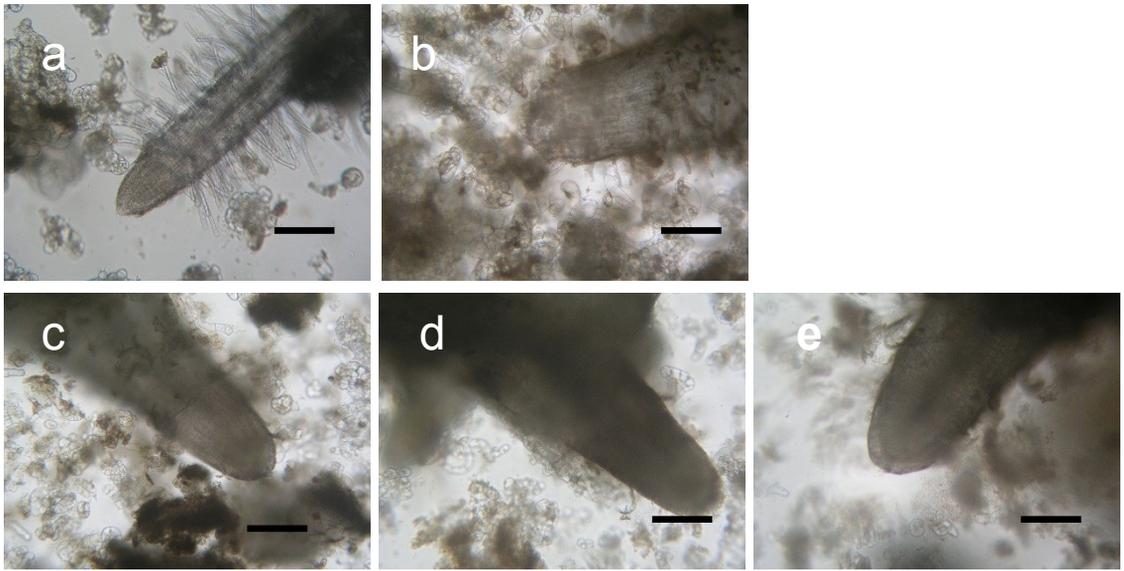


図 I - 8. *S. ovata* 子葉、胚軸、根からのカルス誘導後1.5ヶ月における、100 mL フラスコ継代培養初期における不定根分化。2,4-D 0.1 μ Mを含むMS基本液体培地。

継代培養後2週間。

a,b: 3%スクロース、c,d,e: 3%ガラクトース

a, c: 子葉; b, d: 胚軸; e: 根。 Bar= 200 μ m

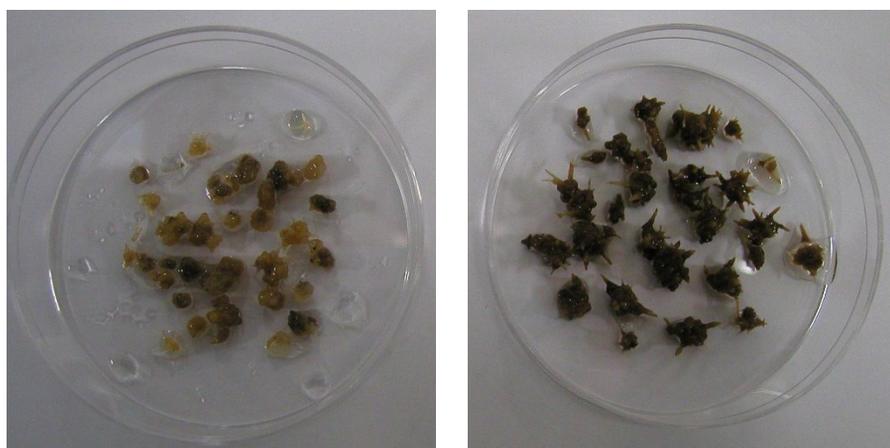


図 I - 9. *S. ovata* 子葉由来培養細胞と胚軸由来培養細胞からの不定根分化.
2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地. 3%ガラクトース培地でカルス誘導後、同
じ組成の培地で継代培養5ヶ月.
左:子葉由来、右:胚軸由来.

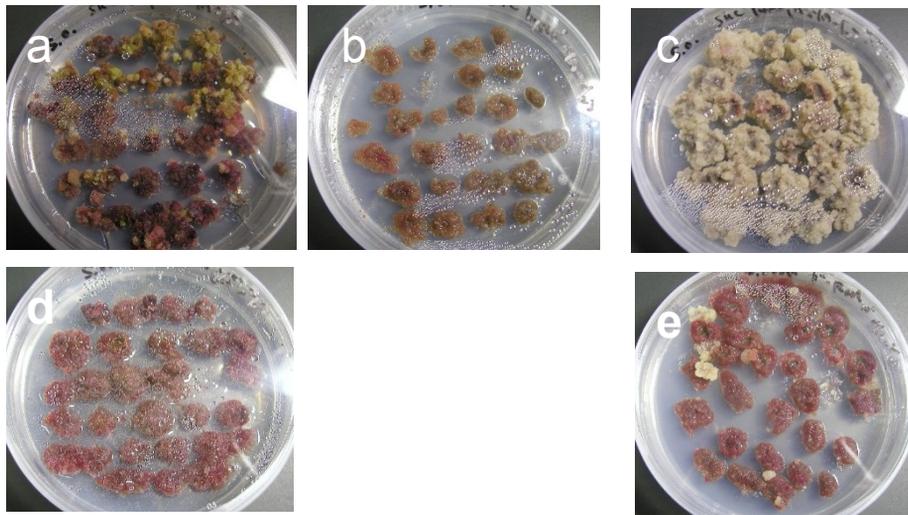


図 I - 10. *S. ovata* 子葉、胚軸、根からの、カルス継代培養におけるスクロースとガラクトースの影響. 2,4-D 0.1 μ Mを含むMS基本固形培地によるカルス誘導後6ヶ月.
a,b,c: 3%スクロース、d,e: 3%ガラクトース
a, d: 子葉; b: 胚軸; c, e: 根.

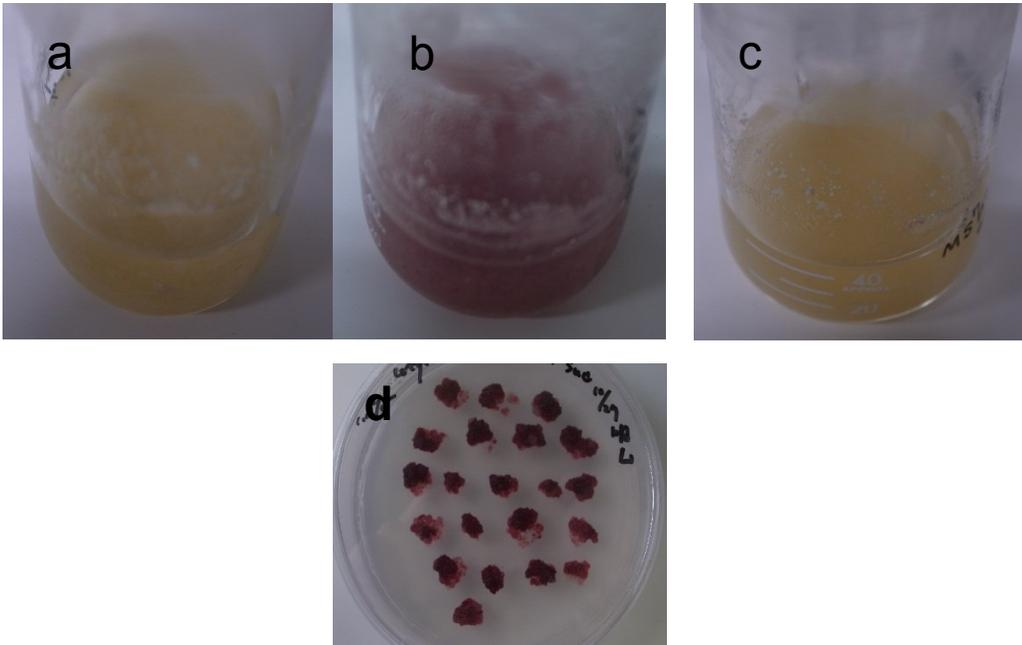
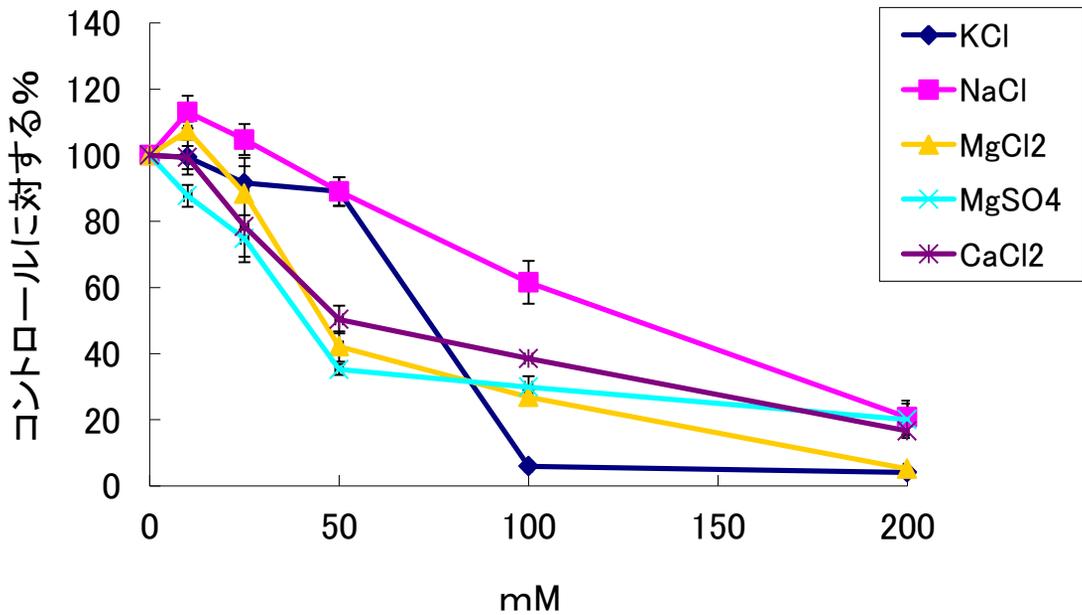


図 I - 11. *S. ovata*子葉および根から誘導され1年以上継代培養、確立された液体・個体培養系.
100 mLフラスコ中液体培地、または9 cm径シャーレ中固形培地.

培地: 2,4-D 0.1 μ M を含むMS基本培地

a,b,d: 子葉由来3%スクロース培地、c: 根由来3%ガラクトース培地

a. PCV



b. DW

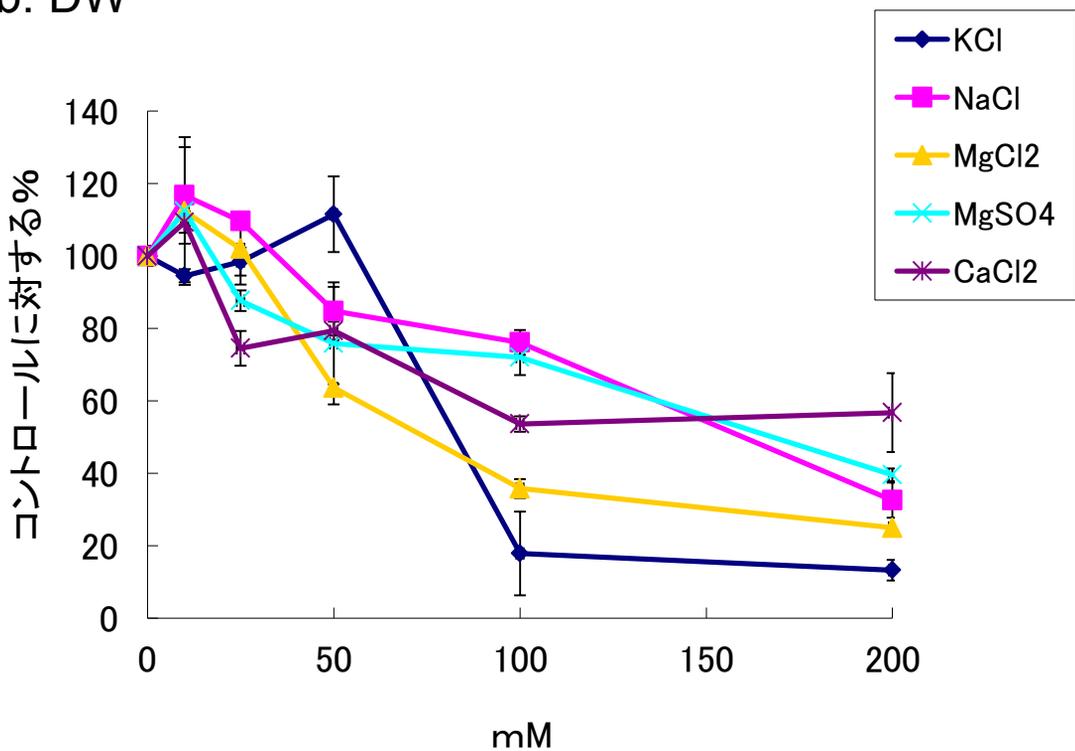
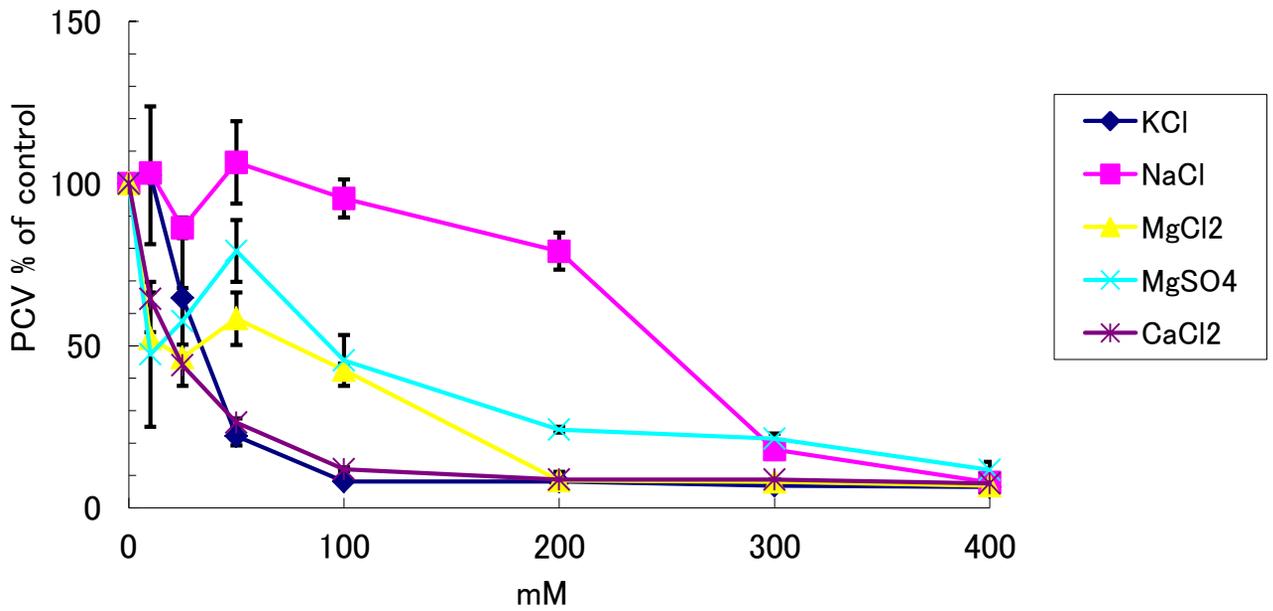


図 II - 1a,b. *S. caseolaris* 子葉由来液体培養細胞ガラクトース株の生長に対する5種の塩の影響. MS基本培地、2,4-D 0.1 μ M, 3% ガラクトース.

a. PCV



b. DW

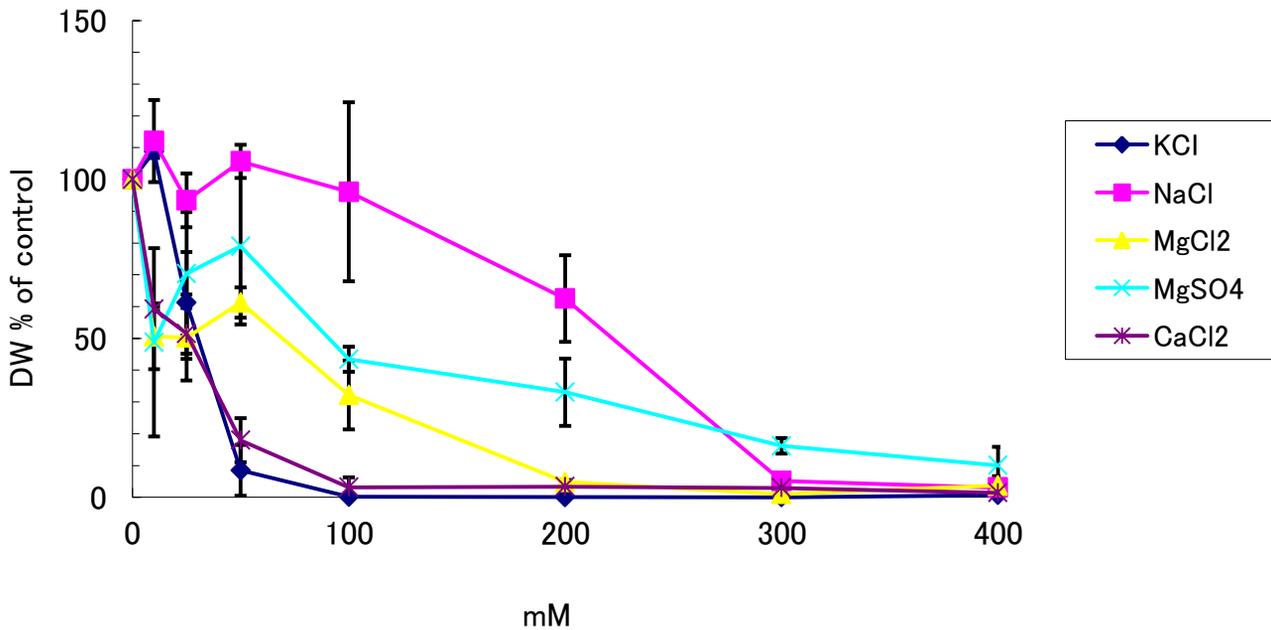


図 II - 2a,b *S. ovata* 子葉由来液体培養細胞スクロース株の生長に対する5種の塩の影響. MS基本培地、2,4-D 0.1 μ M, 3%スクロース.

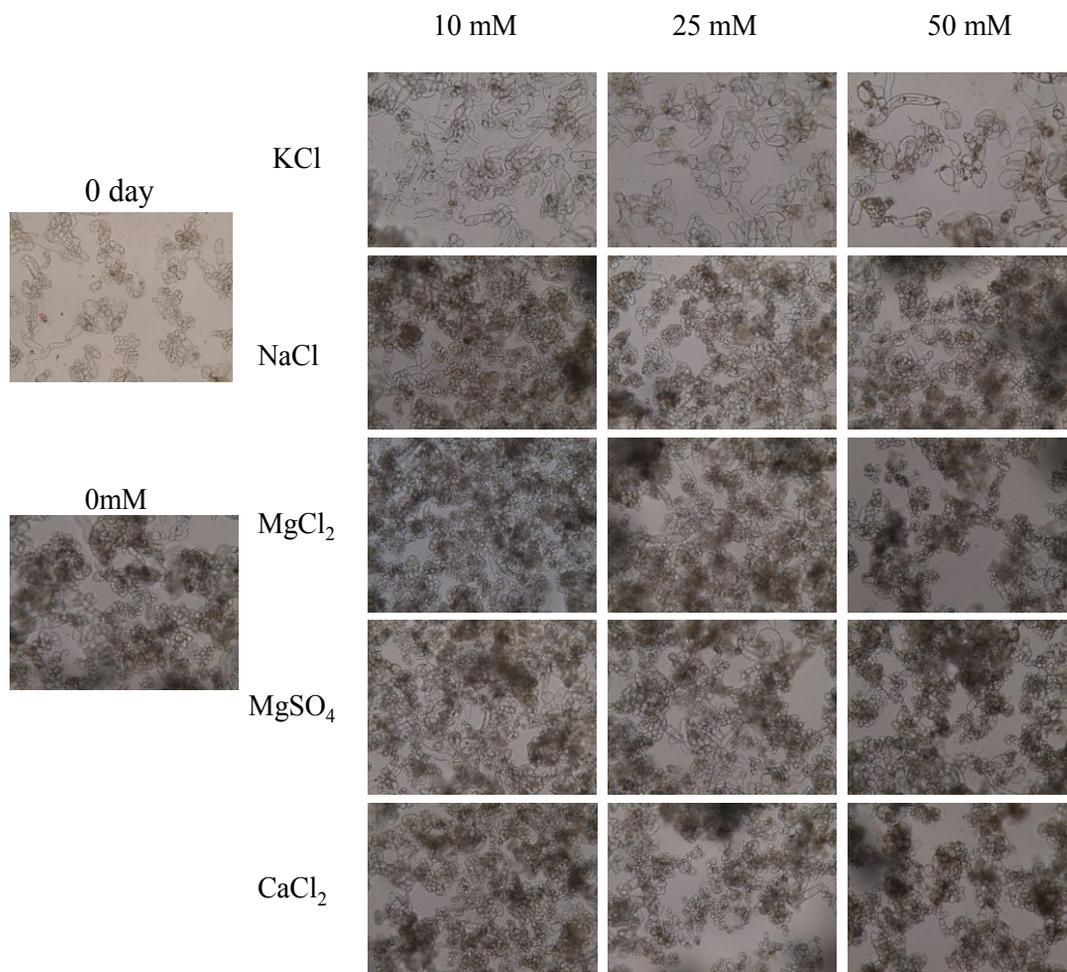


図 II -3a. 子葉由来*S. ovata* 培養細胞の生長に対する5種の塩の影響.
培養14日後観察.低塩濃度 (10-50 mM).

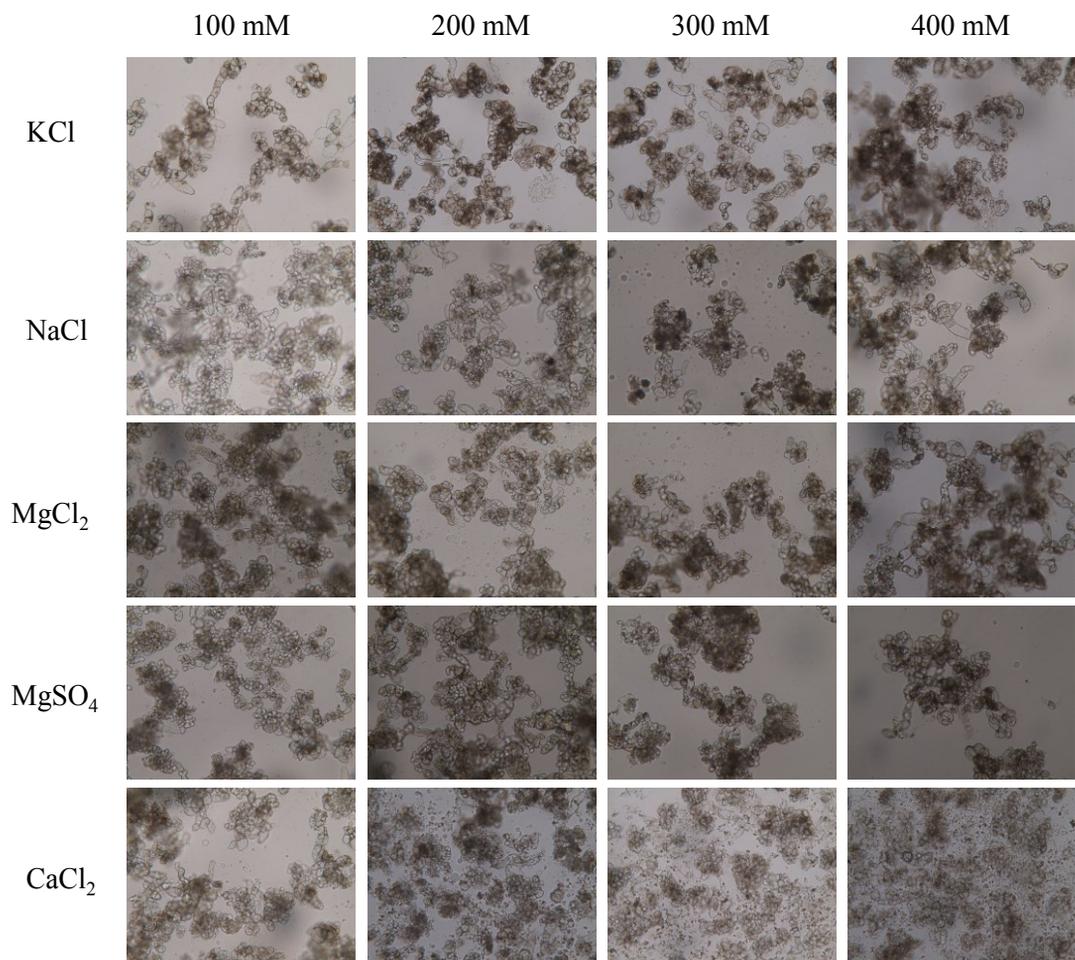
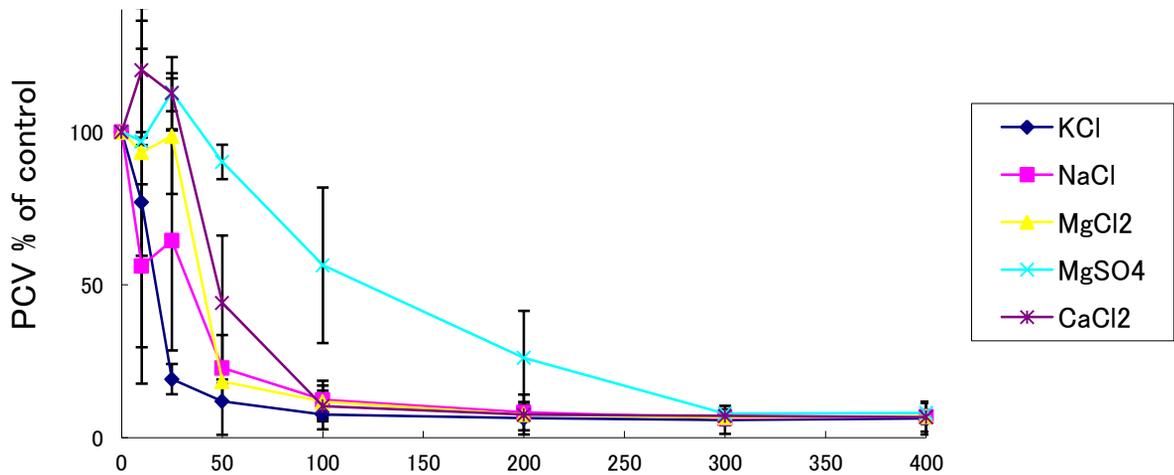


図 II -3b. 子葉由来*S. ovata* 培養細胞の生長に対する5種の塩の影響.
培養14日後観察. 高塩濃度 (100-400 mM).

a. PCV



b. DW

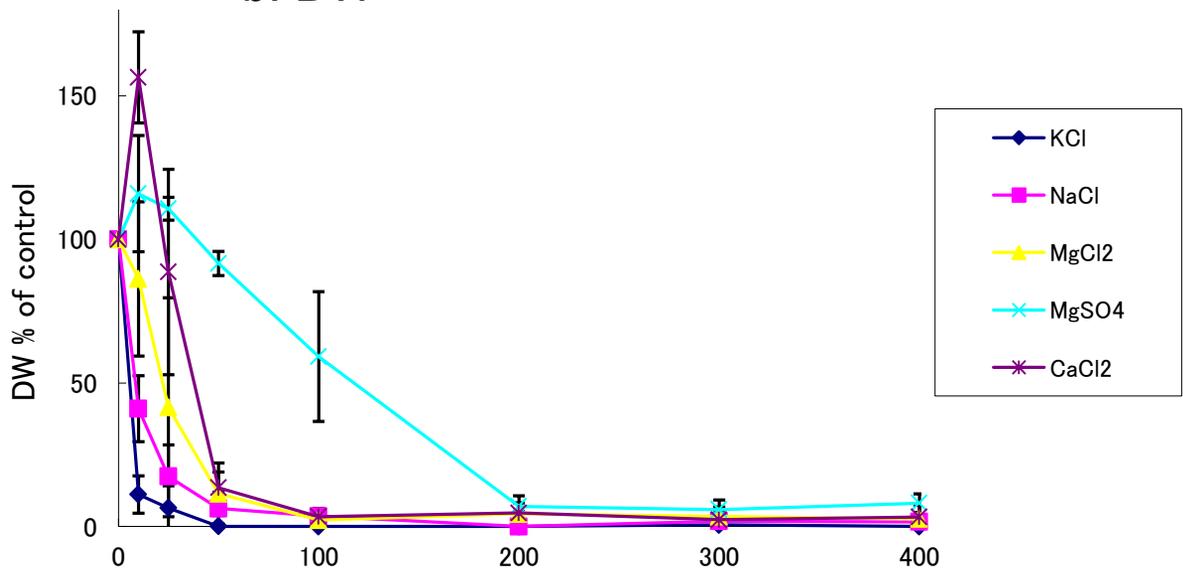


図 II - 4a,b *S. ovata* 根由来液体培養細胞ガラクトース株の生長に対する5種の塩の影響. 2,4-D 0.1 μ M, 3% ガラクトースを含むMS基本培地

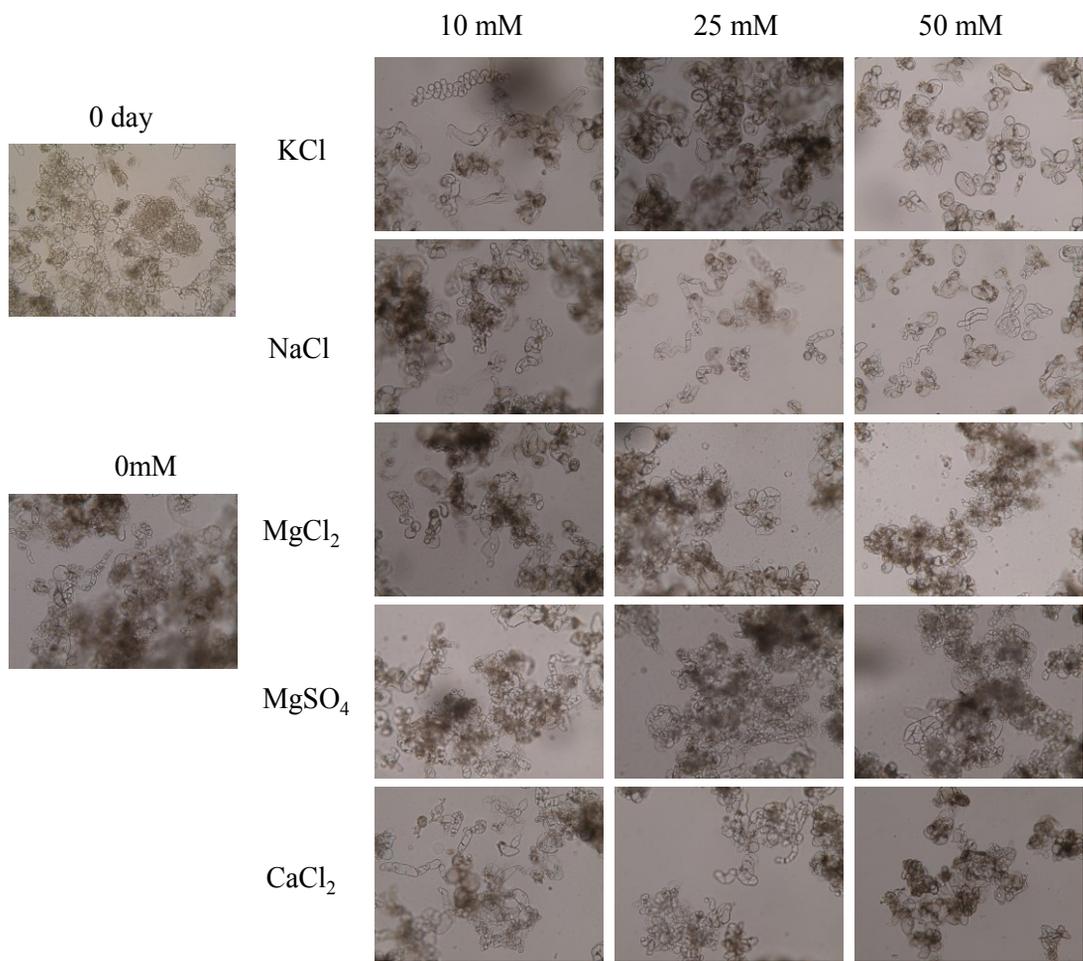


図 II -5a. 根由来 *S. ovata* 培養細胞の生長に対する5種の塩の影響.
28日後観察. 低 塩濃度 (10-50 mM).

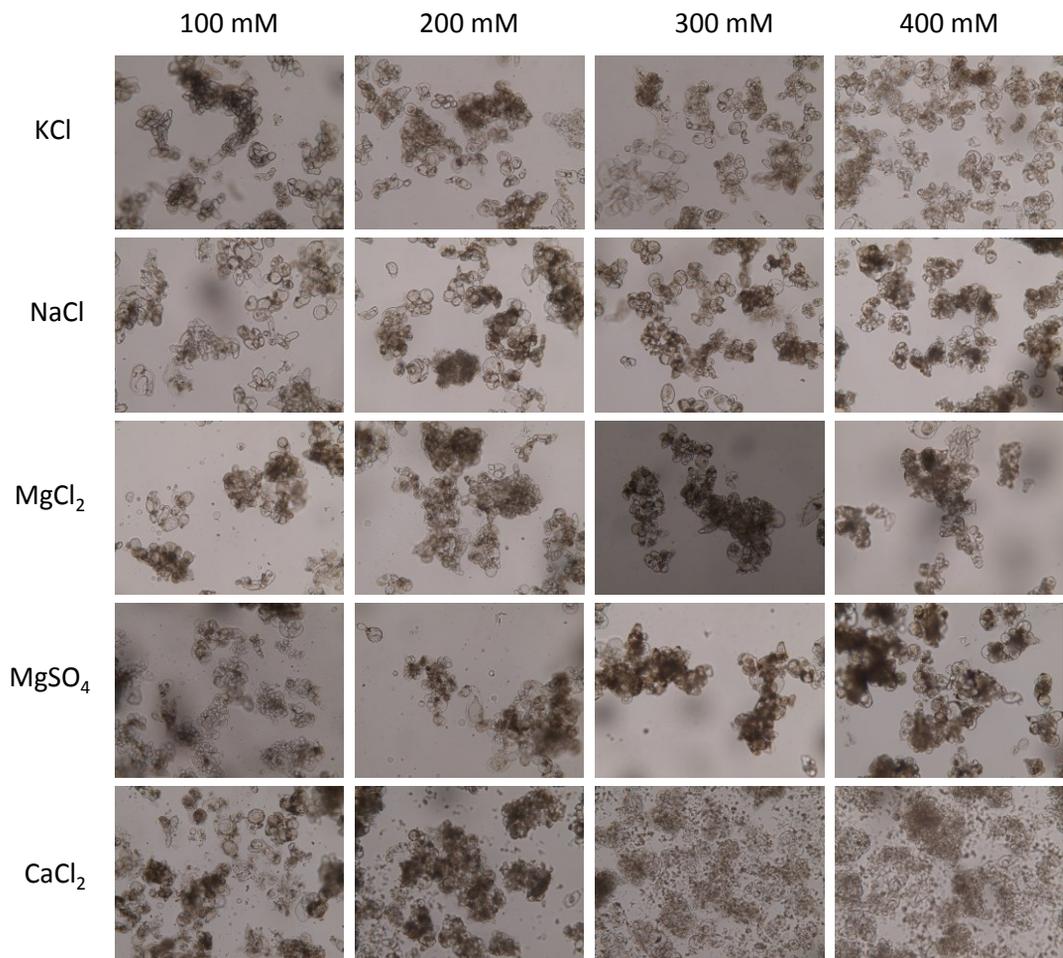


図 II -5b. 根由来 *S. ovata* 培養細胞の生長に対する5種の塩の影響.
28日後観察. 高塩濃度 (100-400 mM).

		Salts(mM)	10	25	50	100	基本培地およびホルモン条件	添加糖
<i>S. caseorialis</i>	子葉・胚軸 由来	NaCl	pink	white	light blue	dark blue	MS 2,4-D 0.1μ M	ガラクトース
		KCl	white	light blue	light blue	black		
		MgCl ₂	pink	light blue	black	black		
		CaCl ₂	white	light blue	black	black		
		MgSO ₄	light blue	dark blue	black	black		
<i>S. ovata</i>	子葉由来	NaCl	white	light blue	pink	light blue	MS 2,4-D 0.1μ M	スクロース
		KCl	white	dark blue	black	black		
		MgCl ₂	black	black	dark blue	black		
		CaCl ₂	dark blue	black	black	black		
		MgSO ₄	black	dark blue	light blue	black		
	根由来	NaCl	dark blue	dark blue	black	black	MS 2,4-D 0.1μ M	ガラクトース
		KCl	light blue	black	black	black		
		MgCl ₂	light blue	white	black	black		
		CaCl ₂	pink	pink	black	black		
		MgSO ₄	white	pink	light blue	dark blue		

% of control	color
146 ≤	yellow
126-145	red
116-125	pink
106-115	light pink
96-105	white
86-95	light blue
76-85	medium blue
56-75	dark blue
55 ≥	black

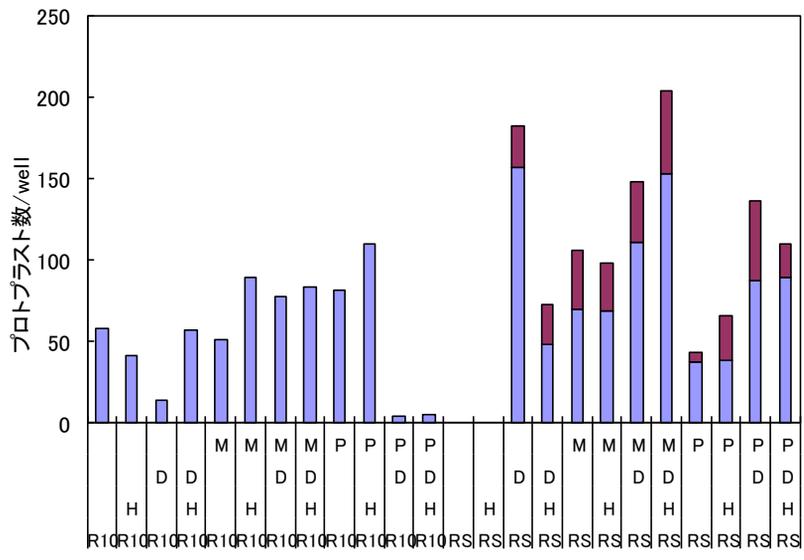
図 II - 6. 液体培養細胞の生長に対する塩の影響ヒートマップ

		Salts(mM)	10	25	50	100	基本培地およびホルモン条件	添加糖
<i>B. sexangula</i> ¹	葉由来	NaCl		pink	light blue	dark blue	mAA CPPU2μ M、 2,4-D 0.02μ M	スクロース
		KCl	light blue			black		
		MgCl ₂		light blue	dark blue	black		
		CaCl ₂	dark blue	black	black	black		
		MgSO ₄	stippled	stippled	stippled	stippled		
<i>S. alba</i> ²	子葉由来	NaCl	yellow	yellow	yellow	red	MS 2,4-D 0.1μ M	スクロース
		KCl	yellow	light blue	dark blue	black		
		MgCl ₂	yellow	yellow	pink	dark blue		
		CaCl ₂	red	yellow	light blue	black		
		MgSO ₄	stippled	stippled	stippled	stippled		
<i>A. alba</i> ³	子葉由来	NaCl		stippled	stippled	black	mAA TDZ 2μ M、 2,4-D 2μ M	スクロース
		KCl	red	stippled	stippled	black		
		MgCl ₂	red	stippled	stippled	black		
		CaCl ₂	black	stippled	stippled	black		
		MgSO ₄	pink	stippled	stippled	dark blue		

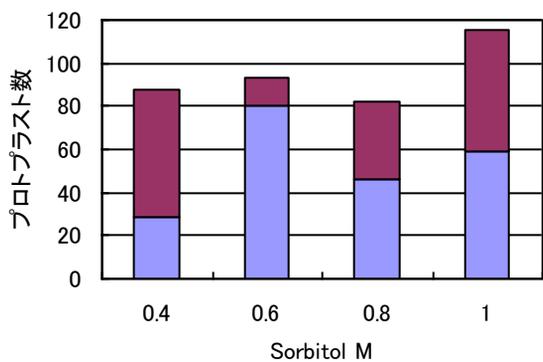
% of control	color
146 ≤	yellow
126-145	red
116-125	pink
106-115	light blue
96-105	white
86-95	light blue
76-85	dark blue
56-75	black
55 ≤	black
実験データなし	stippled

1、2 : Kawana & Sasamoto 2008
3 : Hayashi et al., 2009

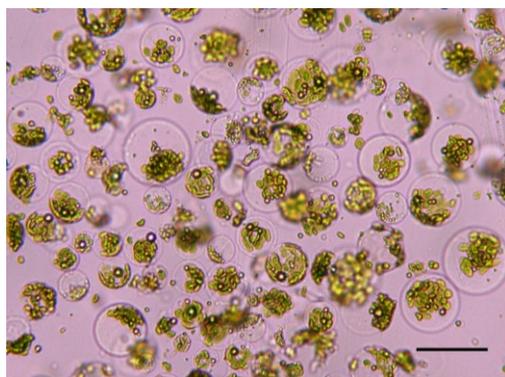
図 II - 7.文献による液体培養細胞の生長に対する塩の影響のヒートマップ



図Ⅲ- 1. *S. griffithii* 子葉のプロトプラスト単離酵素最適組み合わせ条件探索. セルラーゼRS側の赤色は、FDAで発色しない死細胞.



図Ⅲ- 2. *S. griffithii* 子葉のプロトプラスト単離最適浸透圧条件探索. 赤色は、FDAで発色しない死細胞.



図Ⅲ- 3. *S. griffithii* 子葉の単離プロトプラスト. bar= 50 μm.

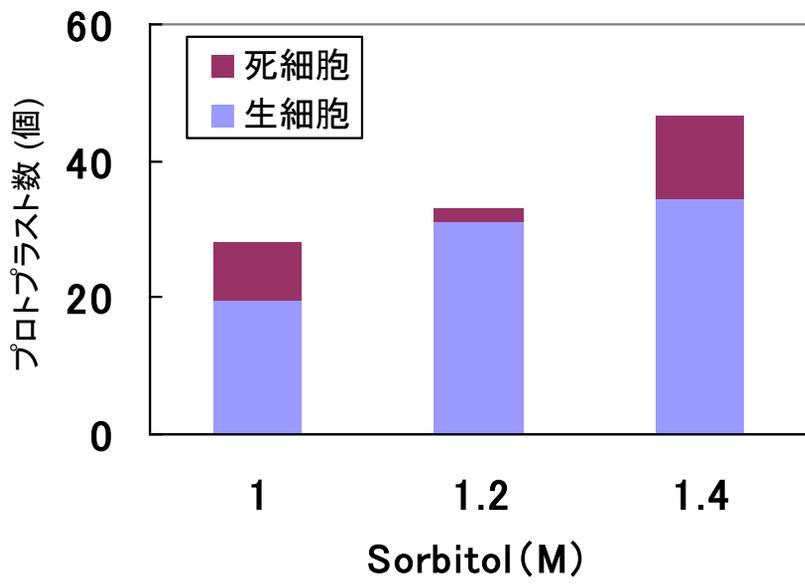


図 III-4. *A. alba* 液体培養細胞プロトプラスト単離最適浸透圧条件探索.
1%セルラーゼRS、1%ドリセラゼ20.

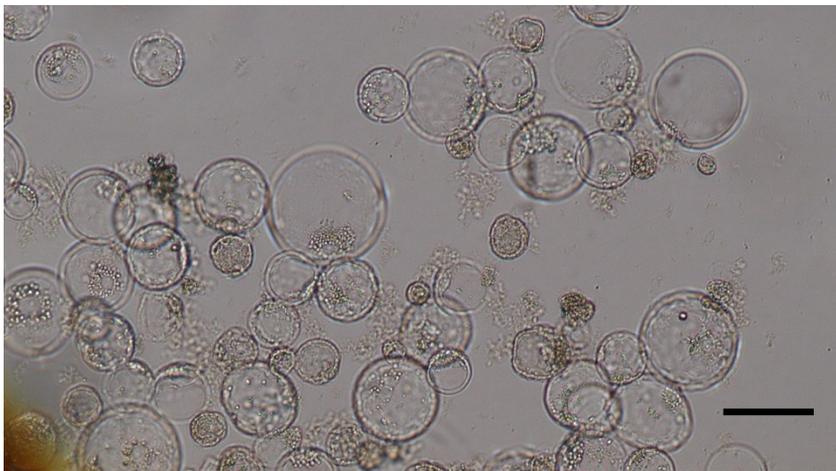


図 III-5. *A. alba* 液体培養細胞プロトプラスト.
Bar= 50 μ m.

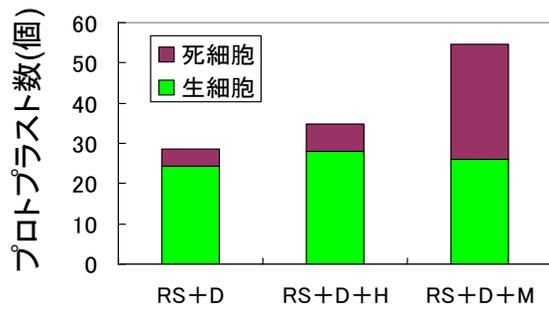


図 III-6. *S. alba* 子葉由来液体培養細胞NaCl株のプロトプラスト単離酵素条件. RS: セルラーゼRS、D: ドリセラーゼ20、H: ヘミセルラーゼ.

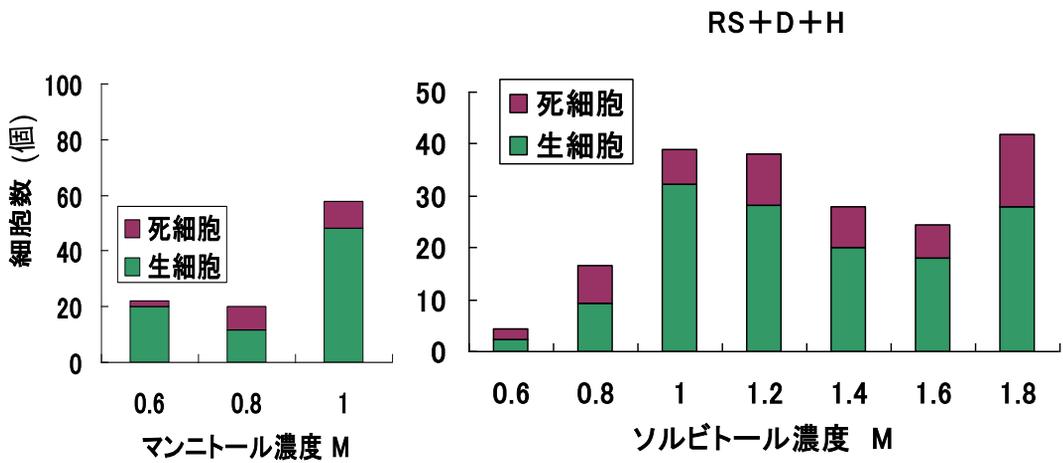


図 III-7. *S. alba* 子葉由来液体培養細胞NaCl株のプロトプラスト単離最適浸透圧条件. セルラーゼRS、ドリセラーゼ20、ヘミセルラーゼ.

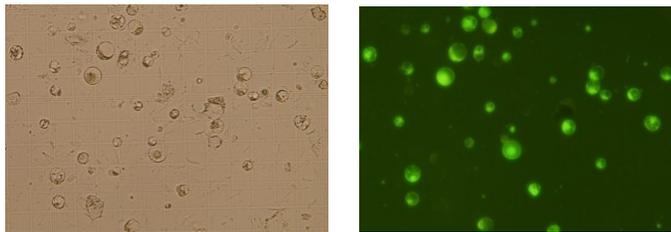


図 III-8. *S. alba* 子葉由来液体培養細胞NaCl株の単離プロトプラスト. FDA蛍光染色による生細胞の検出.

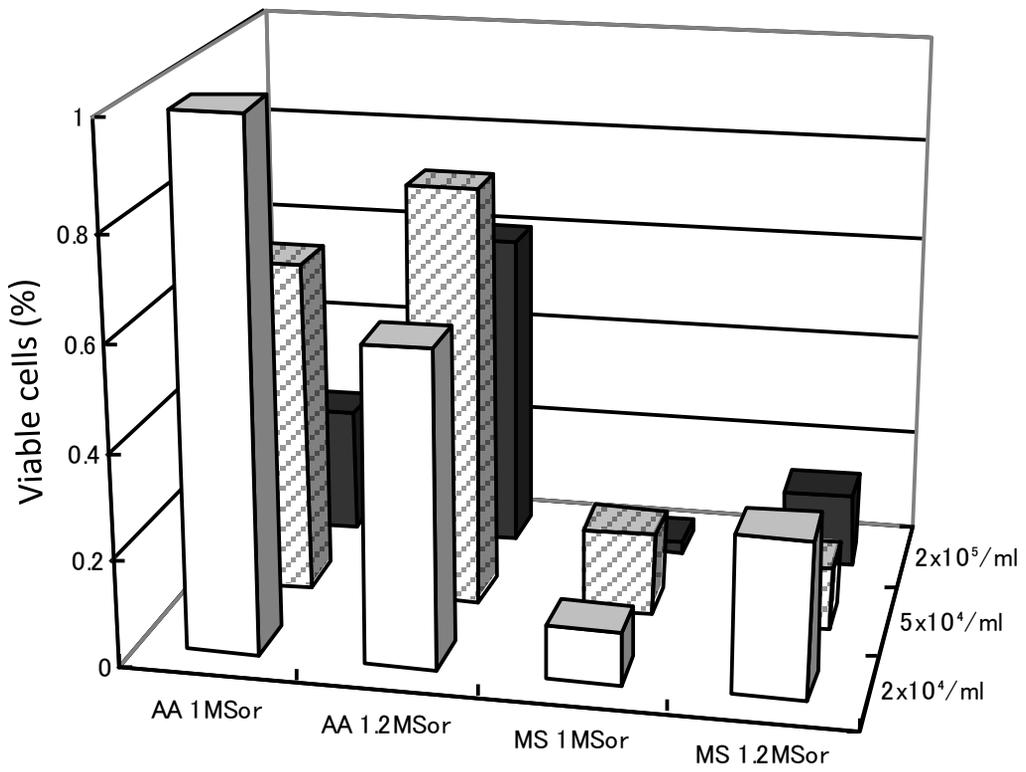


図 Ⅲ-9. *A. marina* 子葉のプロトプラスト培養に対する基本培地と浸透圧ソルビトール濃度、細胞密度の影響。MS、mAA基本培地。

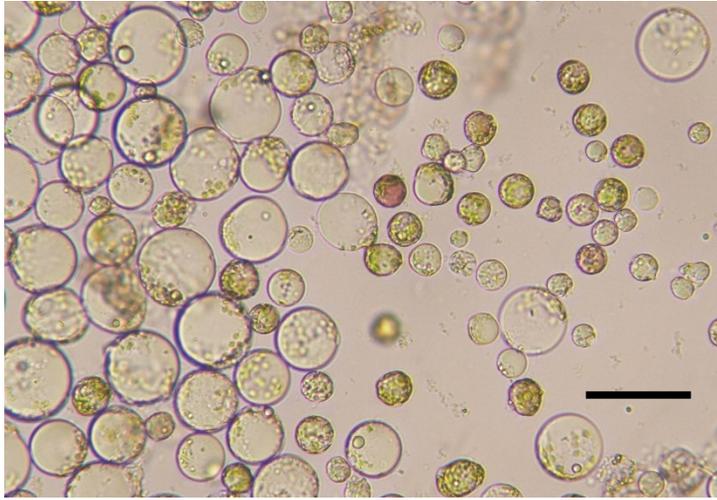


図 Ⅲ- 10a. *A. marina* 子葉の単離プロトプラスト. Bar = 50 μ m.

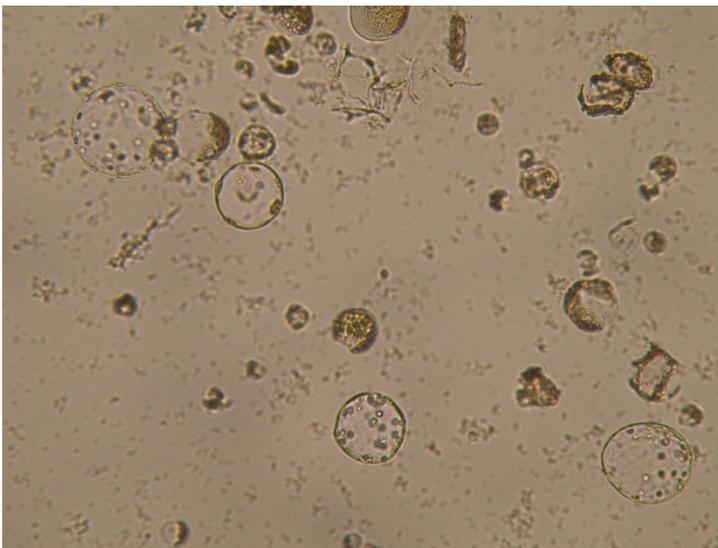


図 Ⅲ- 10b. *A. marina* 子葉のプロトプラスト培養. 5日培養後の細胞肥大.
mAA基本培地、2,4-D 1 μ M、TDA 1 μ M、3%スクロース、1.2 M ソルビトール.

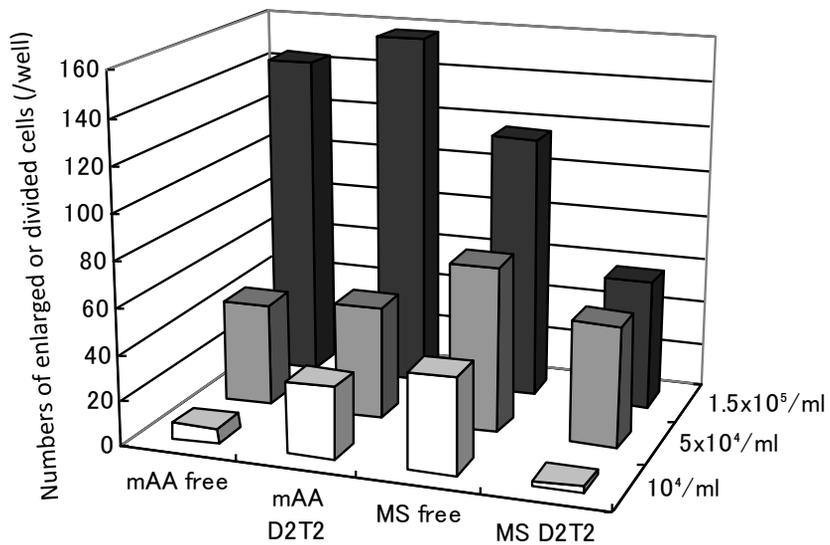


図 Ⅲ- 11. *A. alba*液体培養細胞のプロトプラスト培養に対する基本培地と植物ホルモンの有無、細胞密度の影響. 8日培養後の細胞肥大、分裂. 3%スクロース、1.2 M ソルビトールを含む、mAA基本培地 or MS基本培地. ホルモンフリー or 2,4-D 2 μ M、TDA 2 μ M.

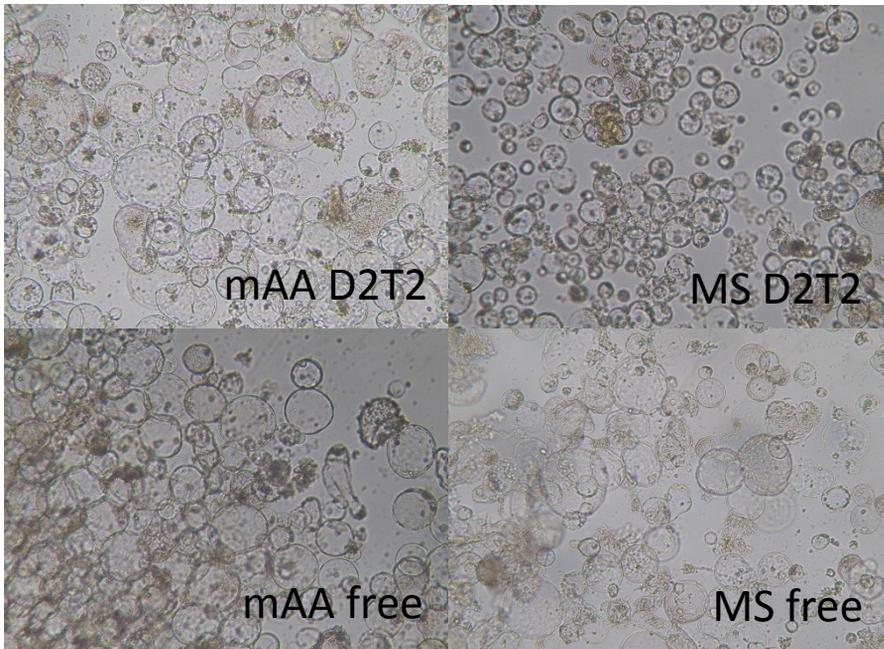


図 III- 12. *A. alba*液体培養細胞のプロトプラスト培養に対する基本培地と植物ホルモンの有無、細胞密度の影響. 14日培養後の細胞. 3%スクロース、1.2 M ソルビトールを含む、mAA基本培地 or MS基本培地. ホルモンフリー or 2,4-D 2 μ M、TDA 2 μ M.

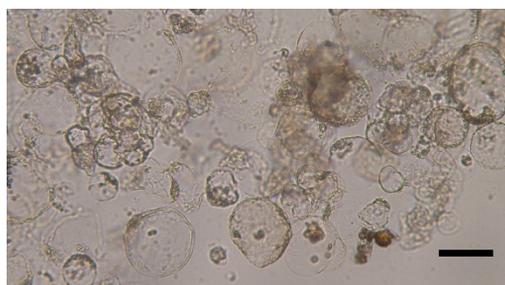
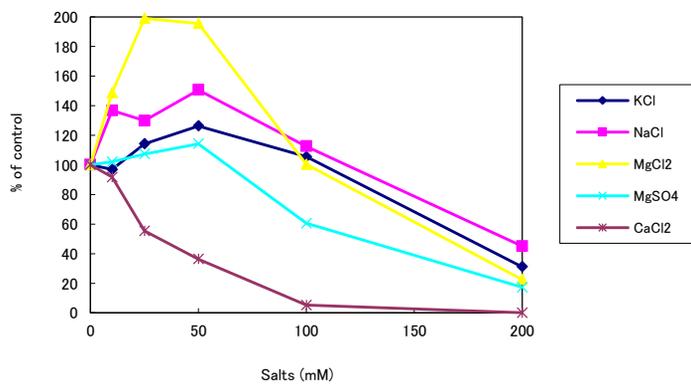
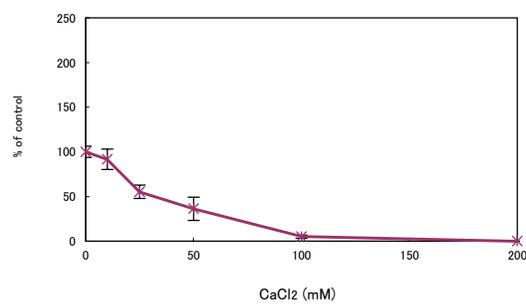
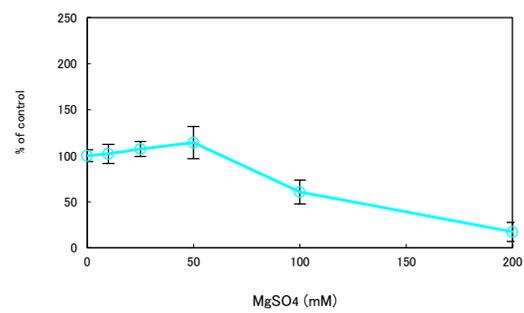
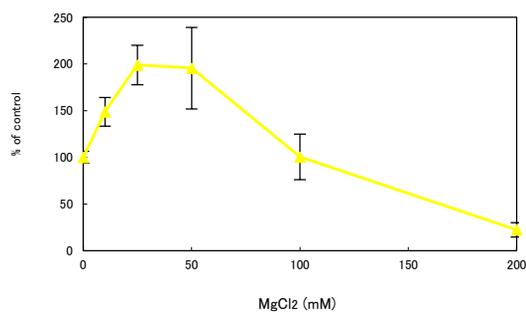
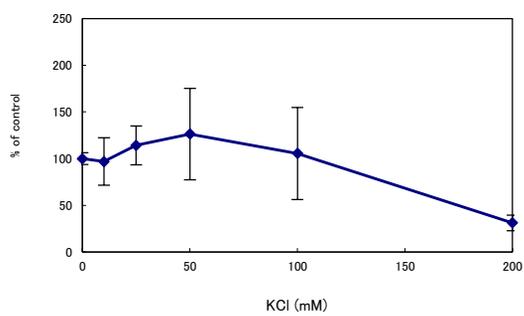
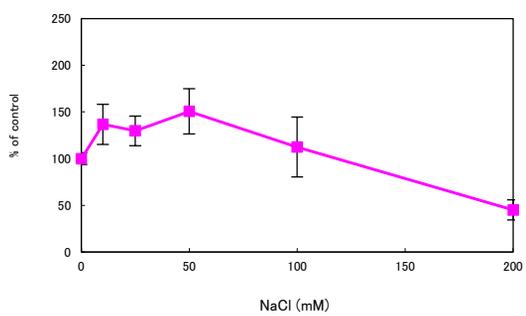
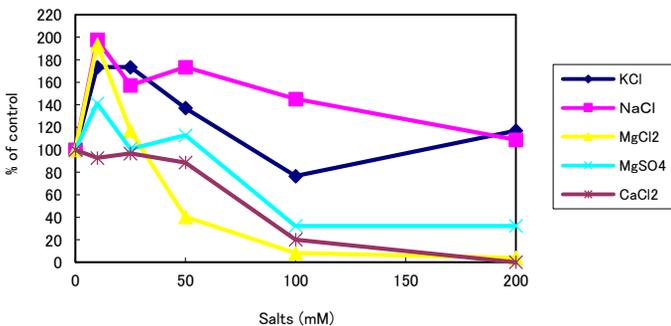
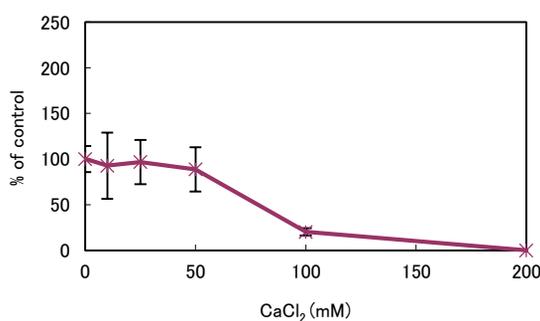
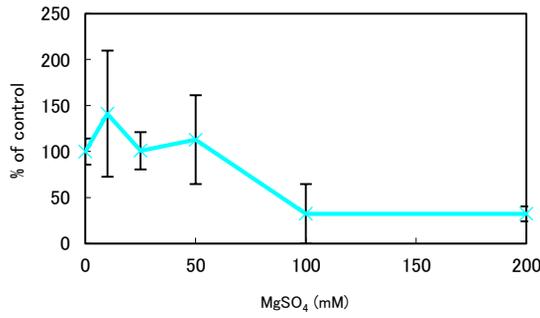
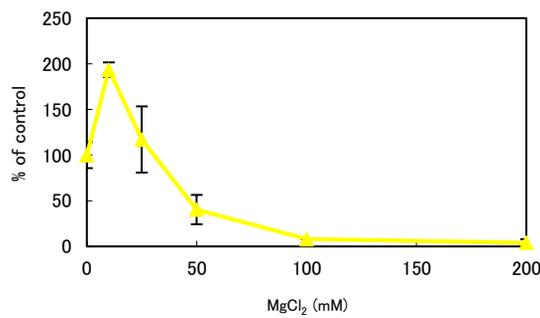
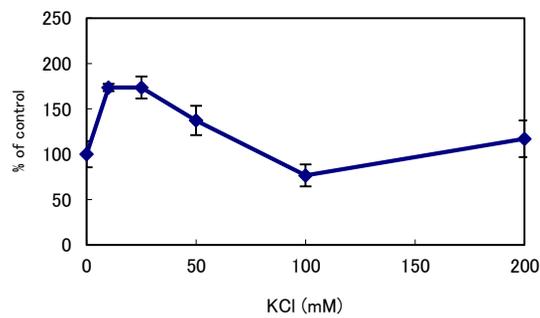
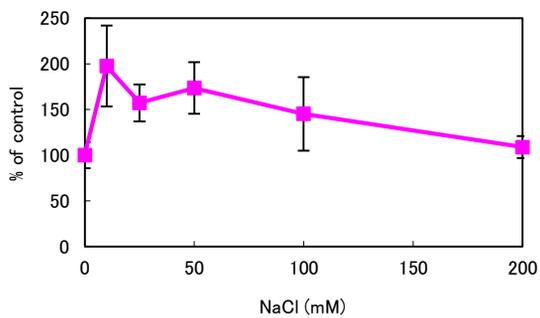


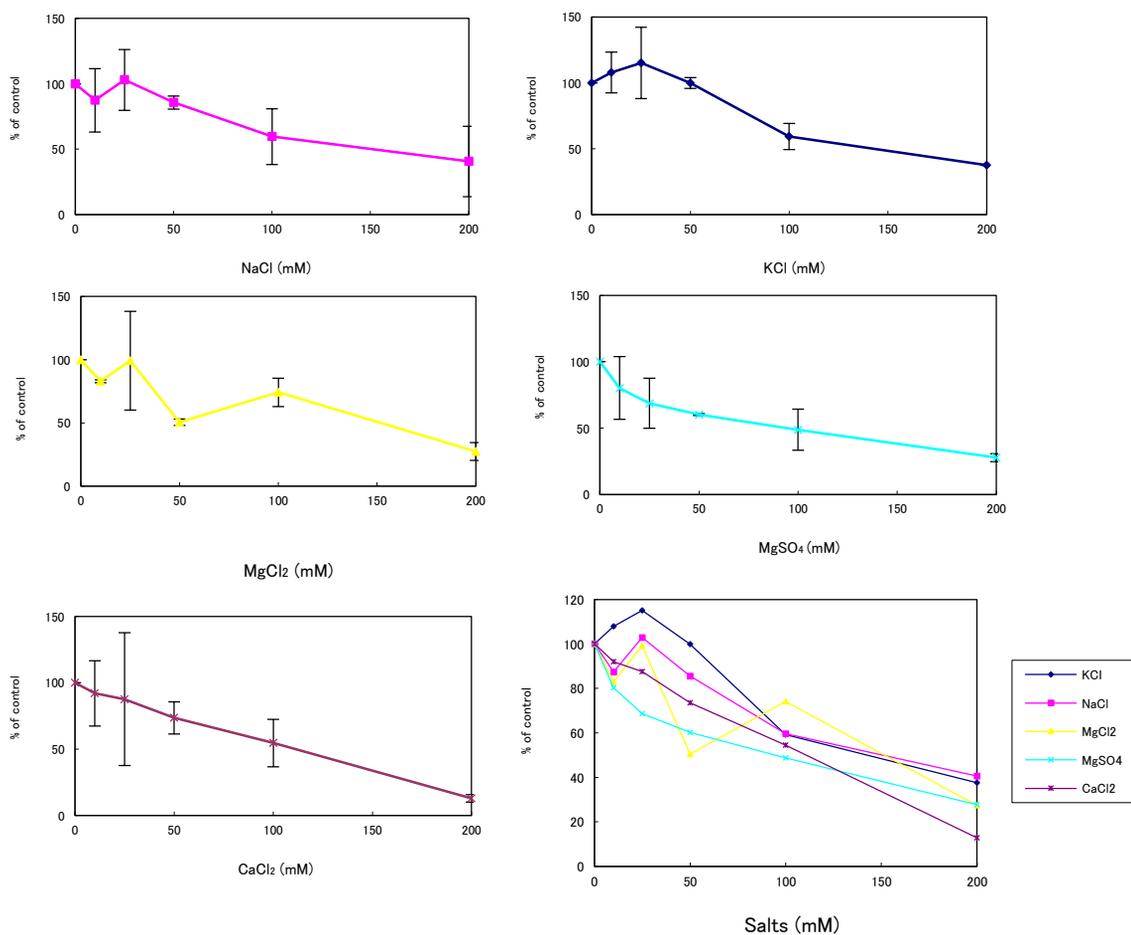
図 III- 13. *A. alba*液体培養細胞のプロトプラスト培養による分裂コロニー. mAA基本培地、2,4-D 2 μ M、TDA 2 μ M 3%スクロース、1.2 M ソルビトール. bar= 50 μ m.



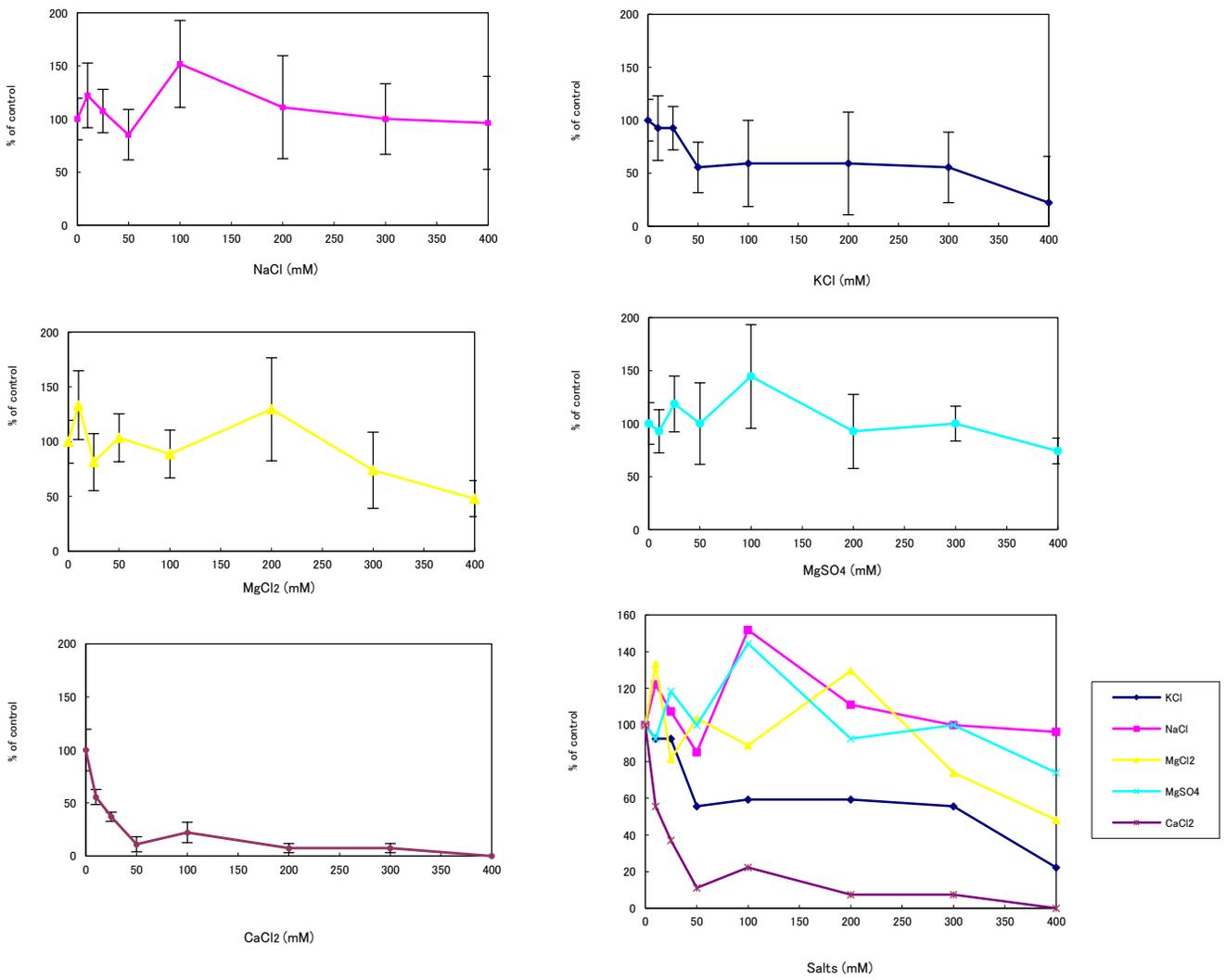
図Ⅲ-14. *S. alba* 子葉プロトプラストの生長に対する5種の塩の影響.



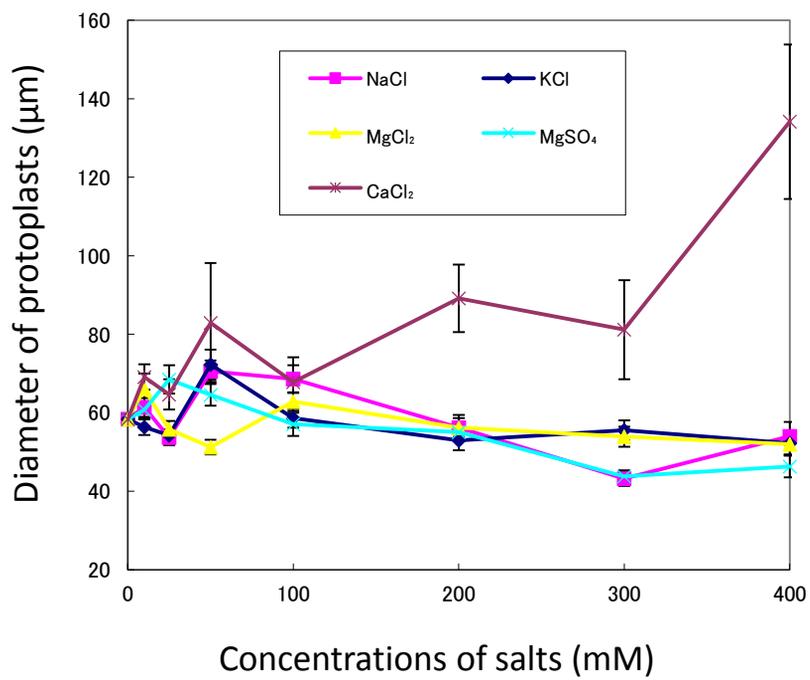
図Ⅲ-15 *S. griffithii* 子葉プロトプラストの生長に対する5種の塩の影響.



図Ⅲ-16 *A. marina* 子葉プロトプラストの生長に対する5種の塩の影響.



図Ⅲ-17. *A. alba* 子葉由来液体培養細胞のプロトプラストの生長に対する5種の塩の影響.



図Ⅲ-18 A. *alba*子葉由来 液体培養細胞のプロトプラスト肥大に対する5種の塩の影響.

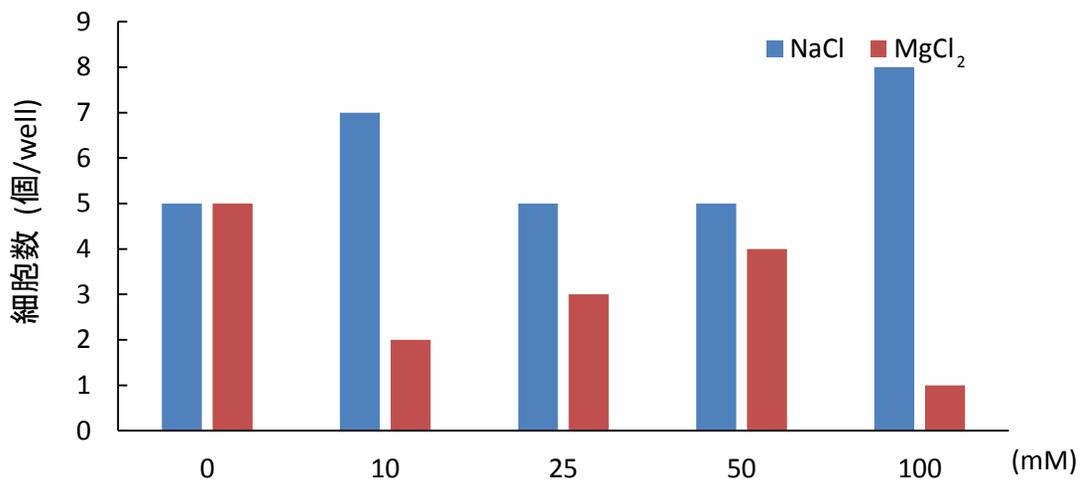


図 Ⅲ-19. *S. alba* 子葉由来液体培養細胞NaCl株のプロトプラストに対するNaClとMgCl₂塩の影響.

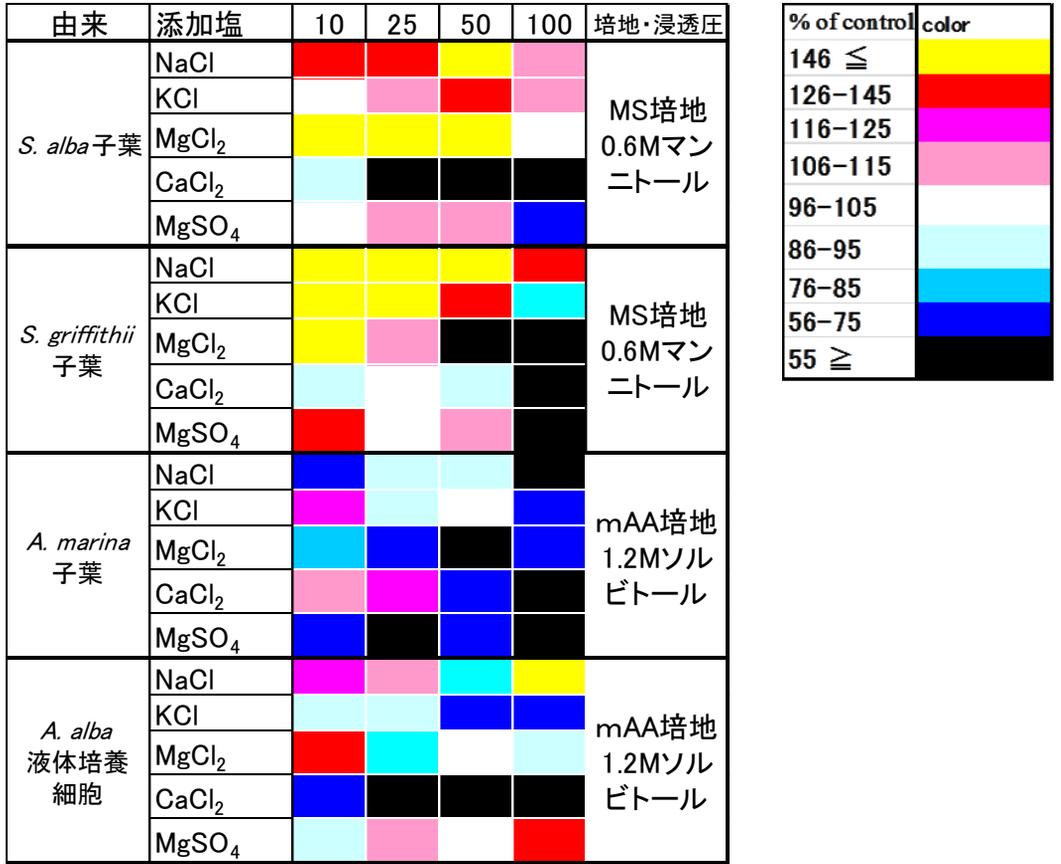


図 Ⅲ- 20. *S. alba* 子葉、*S. griffithii*子葉、*A. marina*子葉、*A. alba*液体培養細胞の各プロトプラストに対する5種の塩の影響のヒートマップ。

表IV- 1. *A. alba* 液体培養細胞と *A. marina* 子葉のプロトプラスト中の内生 ABA 量

	pmoles / 6x10 ⁶ protoplasts	pmoles / mg dry weight
<i>A. alba</i> 液体培養細胞 ^a	3.74 ± 1.42	0.866 ± 0.433
<i>A. marina</i> 子葉 ^b	0.625 ± 0.066	0.059 ± 0.006

^a 4サンプルの平均値±SE (22 - 35 日間培養).

^b 2サンプルの平均値±SE. (水道水 1.5 ヶ月保存種子).

表IV- 2. *S. alba* 液体培養細胞 NaCl 株のプロトプラスト中の内生 ABA 量

	pmoles / 6x10 ⁶ protoplasts
<i>S. alba</i> 液体培養細胞 NaCl 株	4.61 ± 0.489
<i>S. alba</i> 液体培養細胞 ^a	21.6 ± 7.65
<i>S. alba</i> 子葉 ^a	4.92 ± 1.31

^a 平均値±SE. (Kawana et al. 2009)

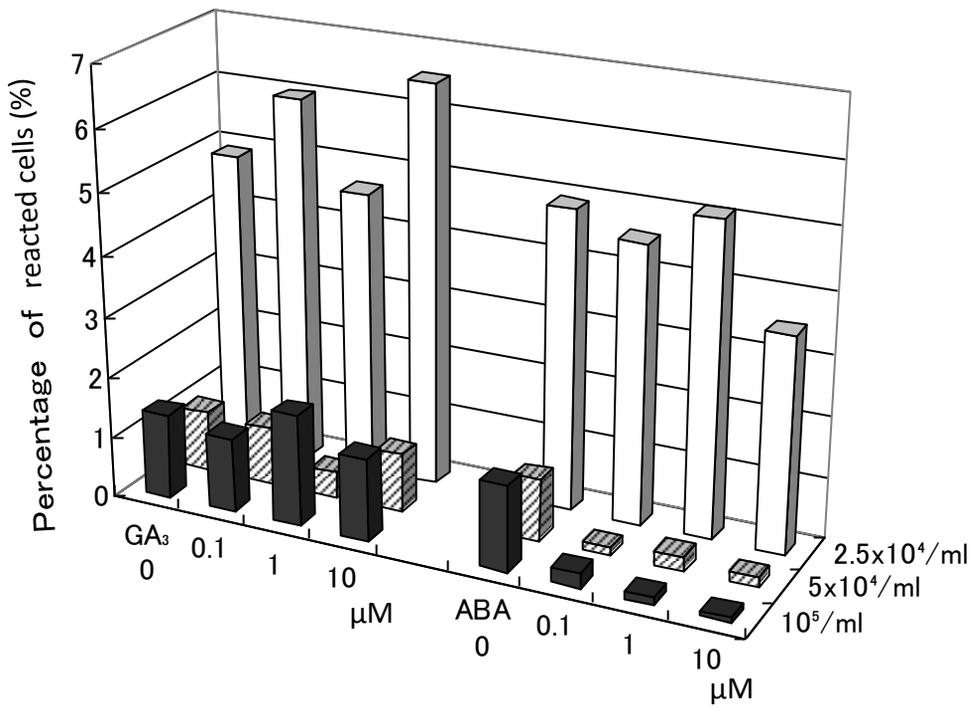


図 IV- 1. *A. alba* 液体培養細胞プロトプラストの肥大、分裂に対するABAとGA₃、細胞密度の影響.
 mAA 基本培地、2,4-D 2 μM、TDA 2 μM、3%スクロース、1.2 M ソルビトール.

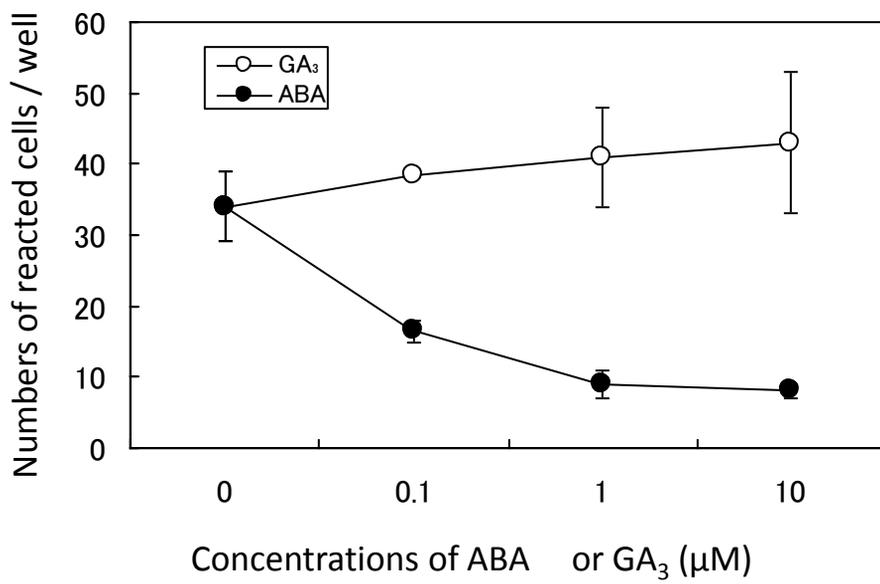


図 IV-2. *A. alba* 液体培養細胞プロトプラストの肥大、分裂に対するABAとGA₃の影響.
細胞密度 5×10^4 /ml. mAA 基本培地、2,4-D 2 μM、TDA 2 μM、3%スクロース、
1.2 M ソルビトール.

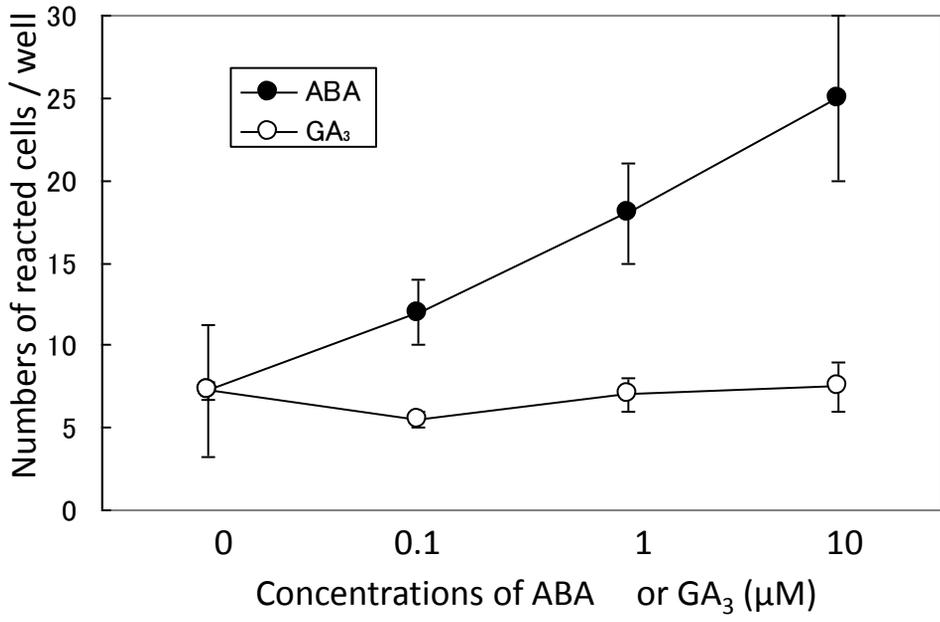


図 IV-3. *A. marina* 子葉の単離プロトプラストの肥大変形、分裂に対するABAとGA₃の影響.
細胞密度 5×10^4 /ml. mAA 基本培地、2,4-D 1 μM、TDA 1 μM、3%スクロース、
1.2 M ソルビトール.

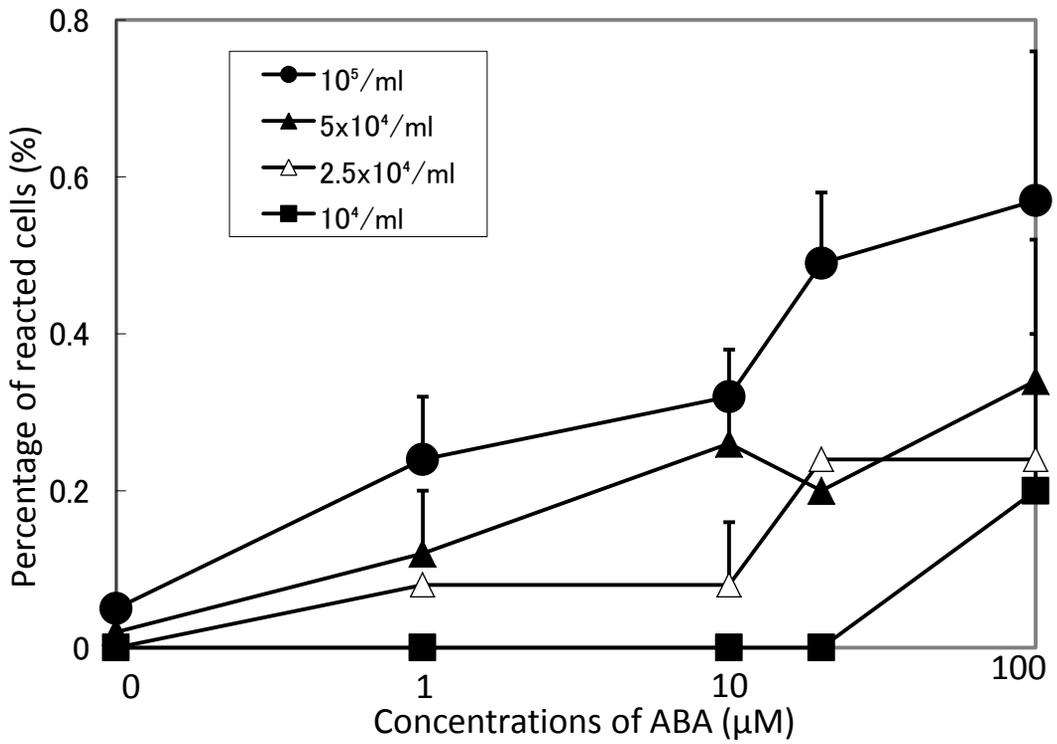


図 IV-4. *A. marina* 子葉プロトプラストの肥大変形、分裂に対するABAと細胞密度の影響. mAA 基本培地、2,4-D 1 μM、TDA 1 μM、35スクロース、1.2 M ソルビトール.

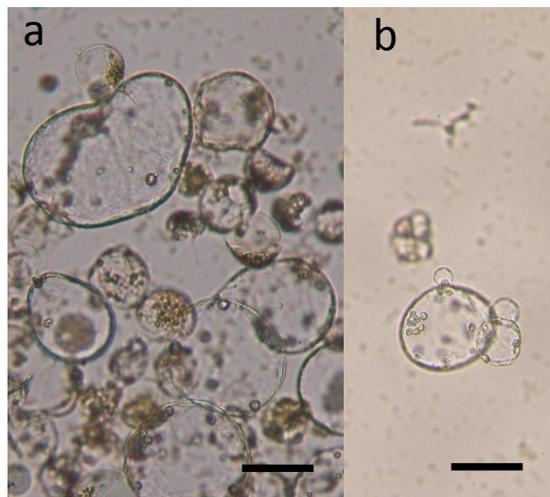
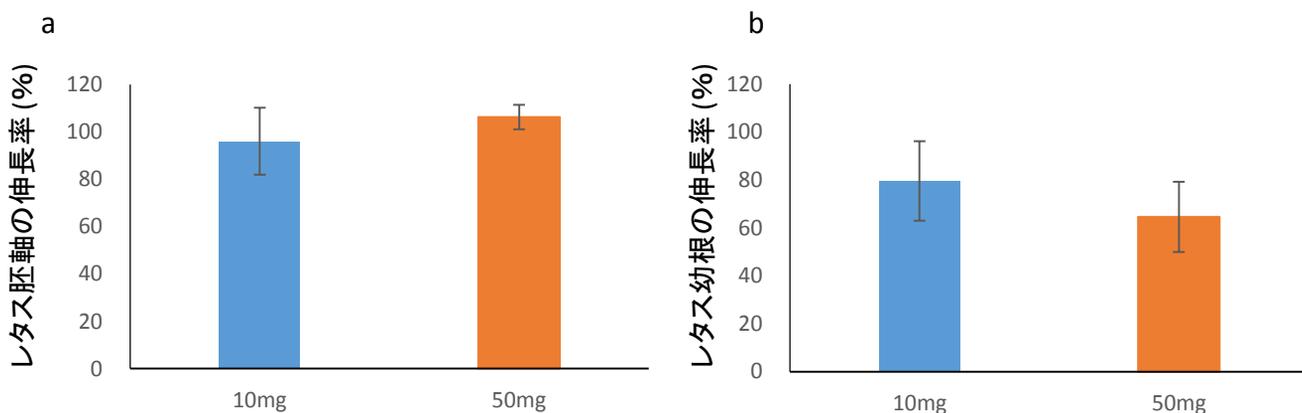


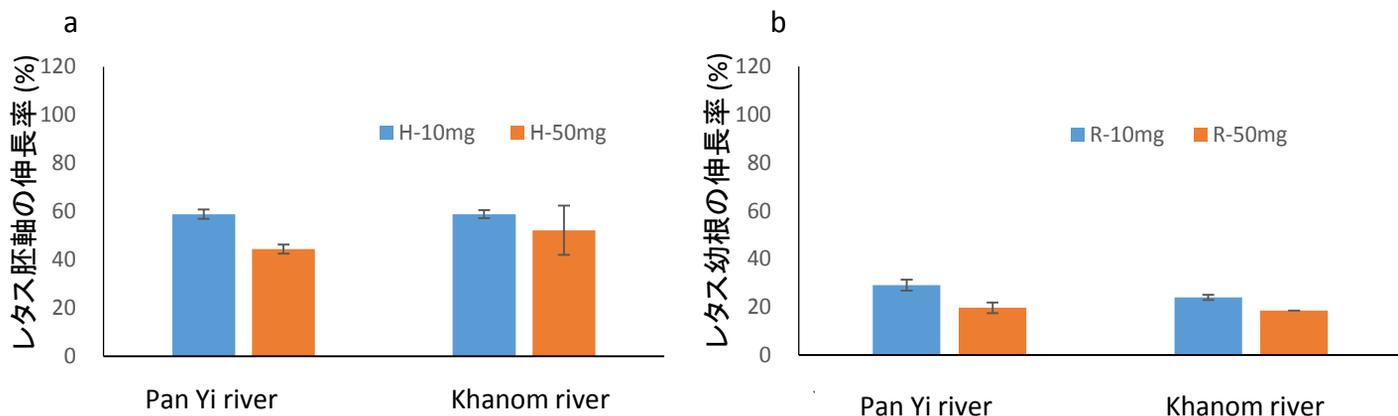
図 IV-5. *A. marina* 子葉プロトプラストの肥大変形、分裂に対するABAと細胞密度の影響. mAA 基本培地、2,4-D 1 μM、TDA 1 μM、35スクロース、1.2 M ソルビトール. a: ABA 100 μMによる肥大変形、b: ABA 1 μMによる分裂。



図V-1. *S. ovata*サンドイッチ法の結果

マングローブ乾燥葉を10mg,50mg添加aaレタス杯軸およびb:根のコントロールに対する伸長率。

値は各ウェル5個のレタス杯軸・根の伸長の値のうち、最も高い値と低い値を除いた3個の値を3ウェル平均したものである。



図V-2. *S. caseolaris*サンドイッチ法の結果

a:レタス杯軸およびb:根のコントロールに対する伸長率を示した。値は各ウェル5個のレタス杯軸・根の伸長の値のうち、最も高い値と低い値を除いた3個の値を3ウェル平均したものである。

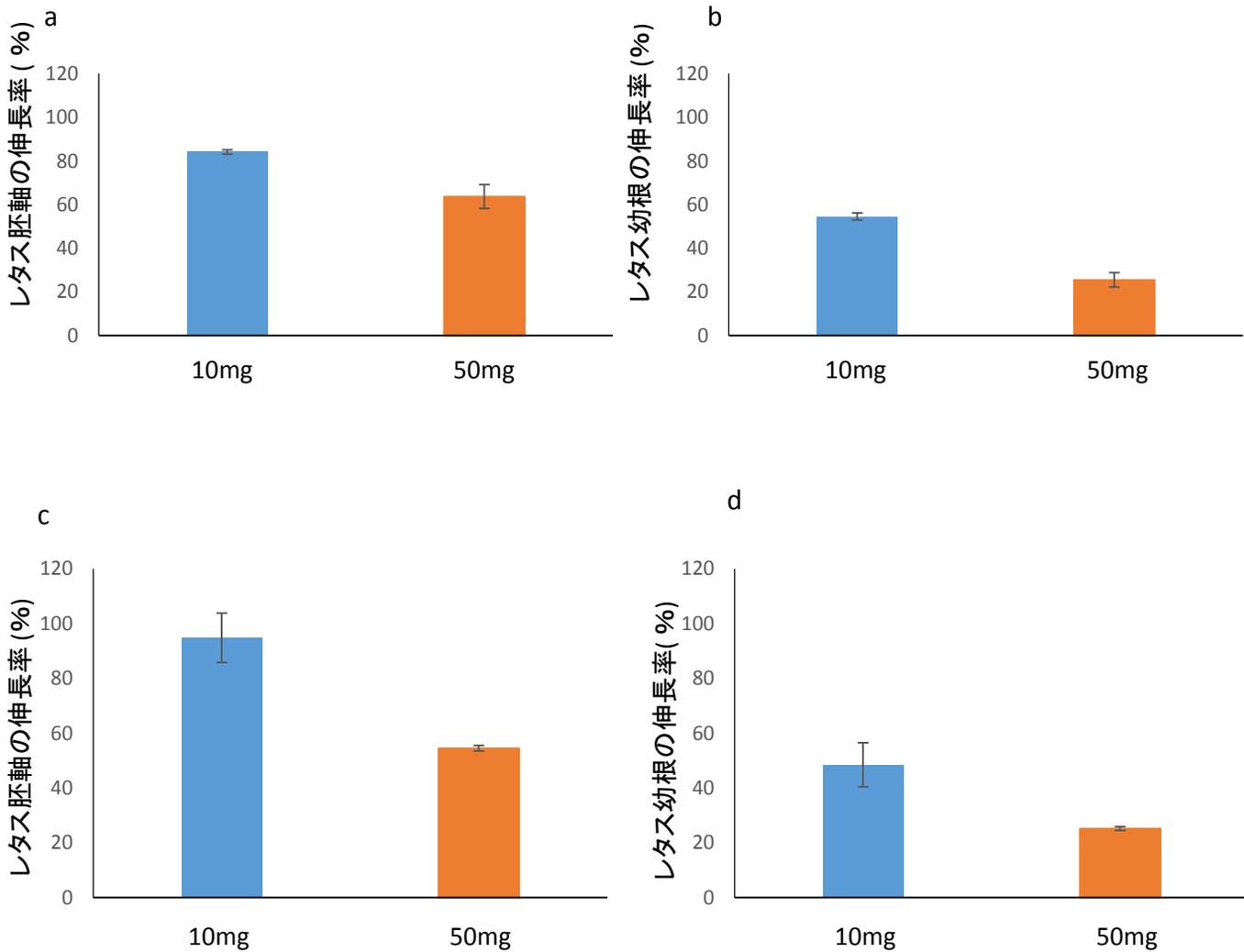


図 V-3a,b,c,d. *S. ovata*サンドイッチ法の結果.

a、c:レタス杯軸およびb、d:根のコントロールに対する伸長率を示した。
 値は各ウェル5個のレタス杯軸・根の伸長の値を3ウェル平均したものである。

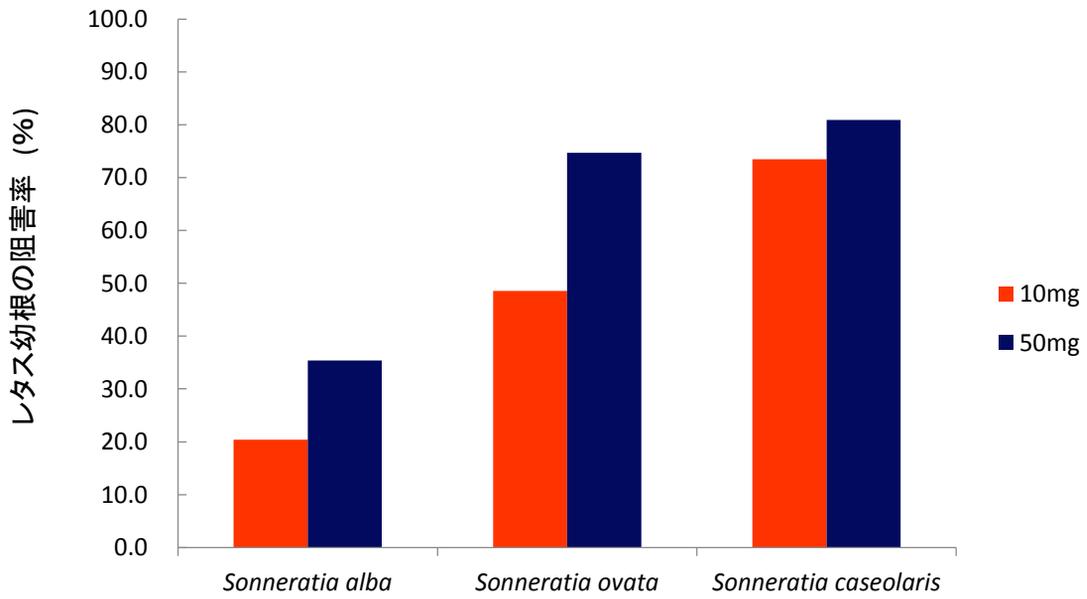
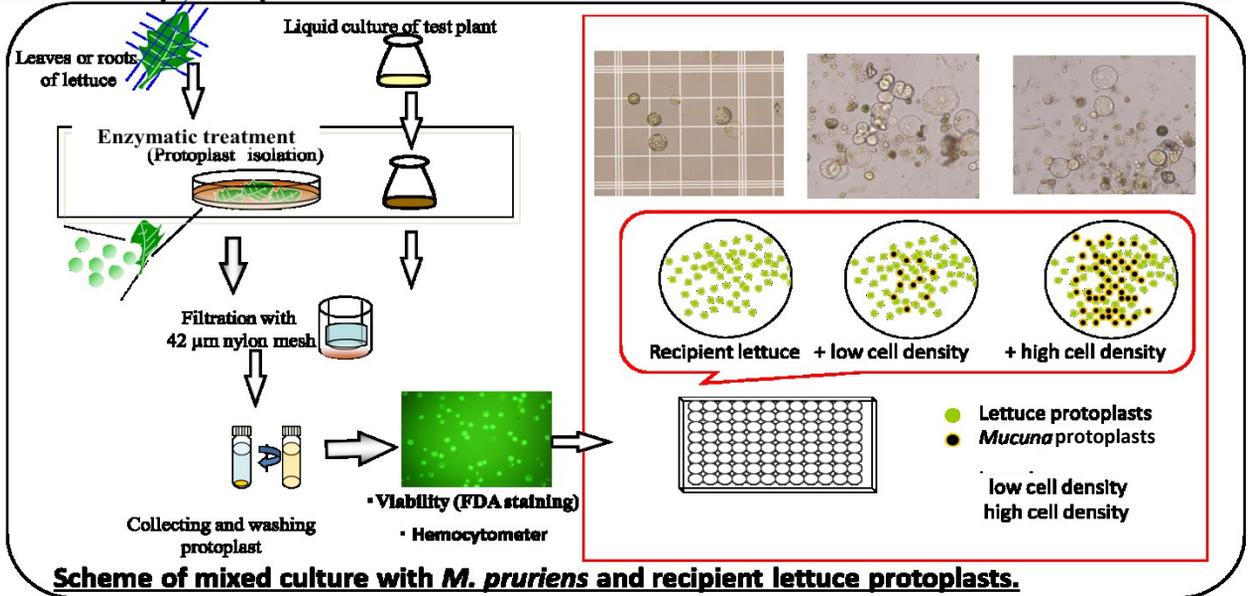


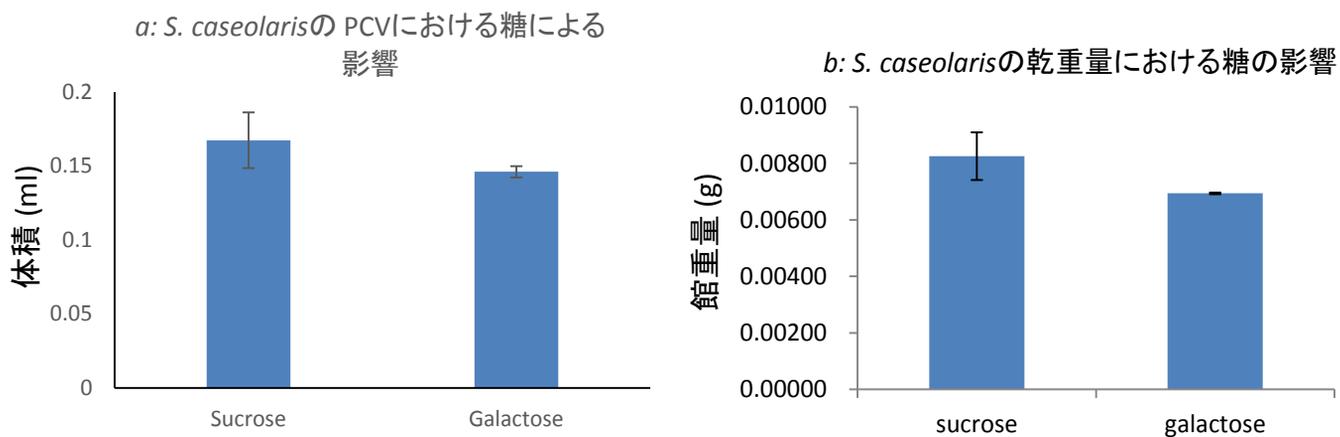
図 V-4. マングローブ乾燥葉10mg,50mg添加によるレタス幼根の阻害率.

—New protoplast method—



WCA 2011長谷川原図

図VI-1 . プロトプラストの混合培養におけるアレロパシー検定の概要.



図VI-2ab. SS法による*S. caseolaris*液体培養細胞への3%スクロース、3%ガラクトースの影響をPCV(a),DW(b)で測定。0.1 μ M 2,4-Dを含むMS基本培地。

スクロース



ガラクトース



図 VI-3. *S. caseolaris*液体培養細胞に対する3%スクロースとガラクトースの影響. MS基本培地、2,4-D 0.1 μ M. Bar=100 μ m

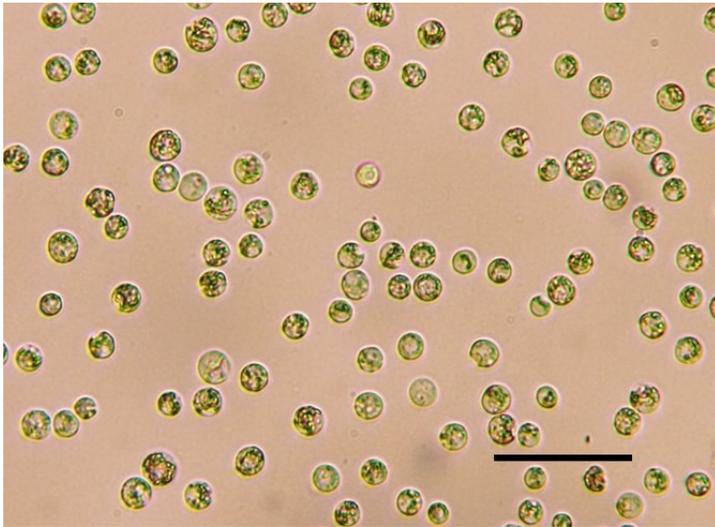


図 VI-4. *S. caseolaris*培養細胞ガラクトース株から単離されたプロトプラスト.
Bar=50 μm

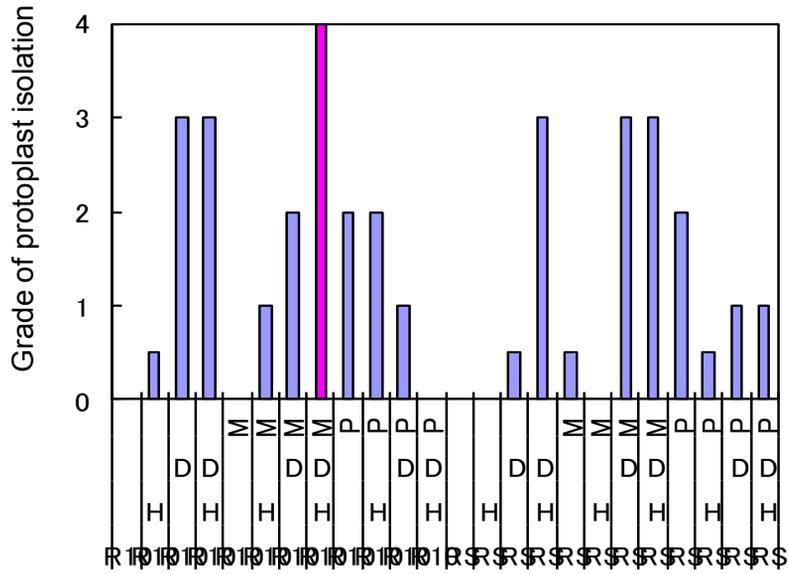


図 VI-5. *S. ovata*根由来培養細胞ガラクトース株のプロトプラスト単離最適酵素条件の探索. 0.6 M マンニトール.

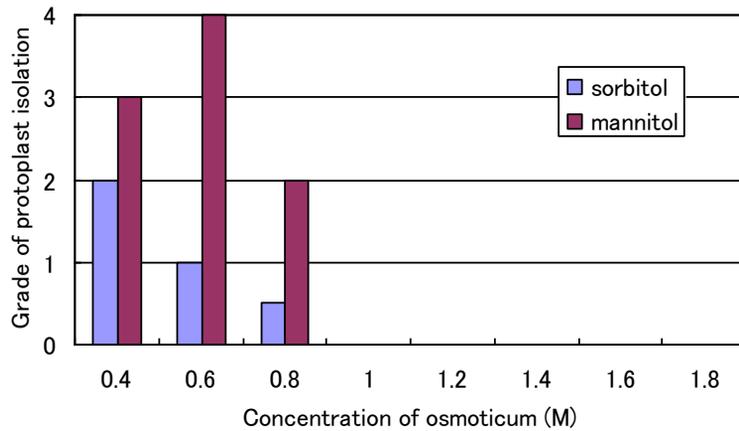


図 VI-6. *S. ovata*根由来培養細胞ガラクトース株のプロトプラスト単離最適浸透圧条件の探索. セルラーゼR10、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ20、マセロザイム各1%.



図 VI - 7. *S. ovata*根由来培養細胞ガラクトース株のプロトプラスト.
セルラーゼR10、ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ20、マセロザイム、
0.6 M マンニトール. Bar=50 μm

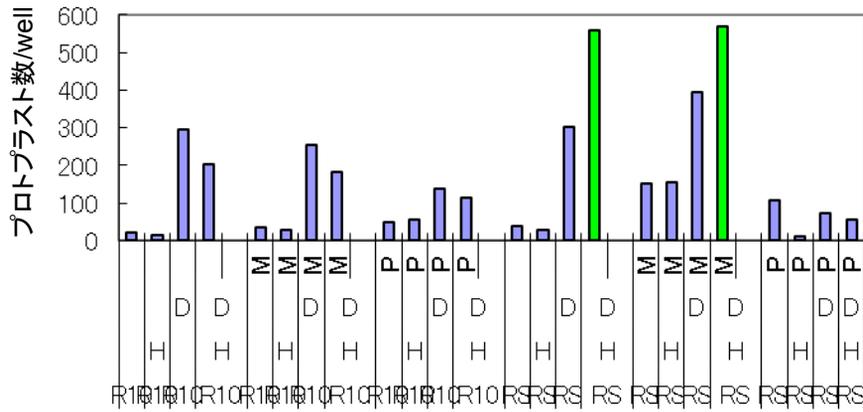
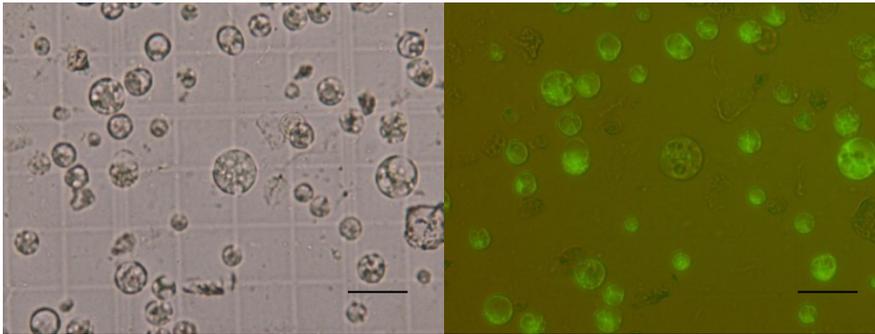
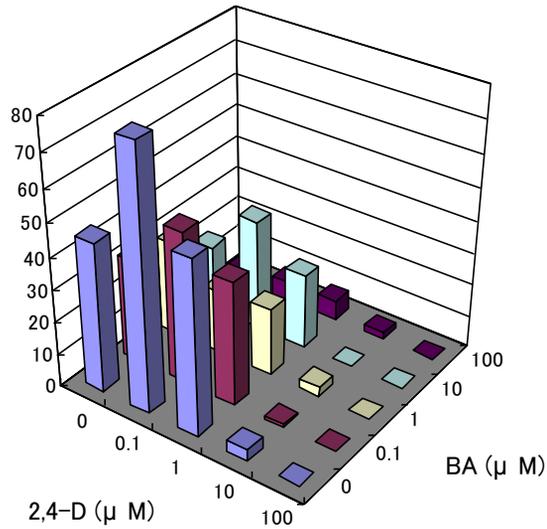


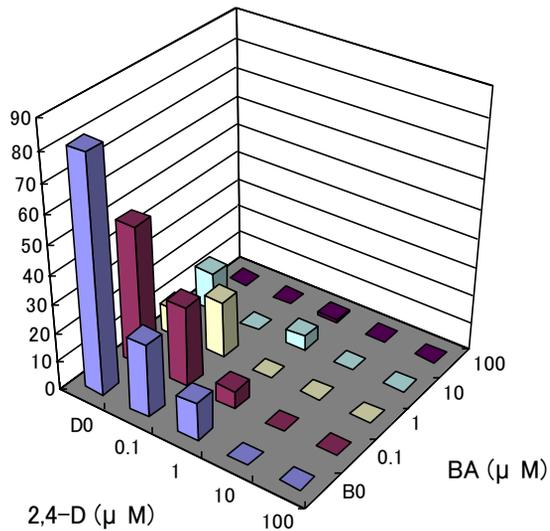
図 VI-8. *S. ovata*子葉由来培養細胞のプロトプラスト単離最適酵素条件の探索. 0.6 M マンニトール.



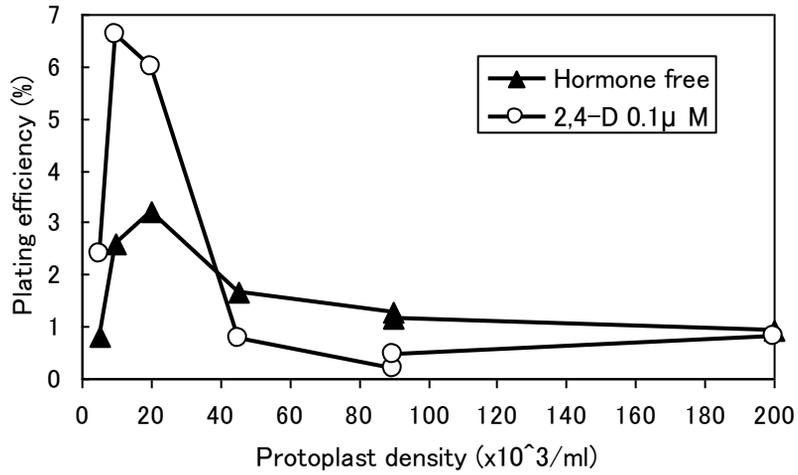
図VI-9. *S. ovata* 子葉由来培養細胞の単離プロトプラスト. セルラーゼRS, ヘミセルラーゼ、ドリセラーゼ20各1%, 0.6 M マンニトール. FDA蛍光染色による生細胞. Bar=50 μ m



図VI-10a. *S. ovata* 子葉由来培養細胞のプロトプラスト培養に対する2,4-DとBAの影響. 細胞密度 2×10^4 /ml. MS基本培地、0.6 M マンニトール、3%スクロース.



図VI-10b. *S. ovata* 子葉由来培養細胞のプロトプラスト培養に対する2,4-DとBAの影響. 細胞密度 9×10^4 /ml. MS基本培地、0.6 M マンニトール、3%スクロース.



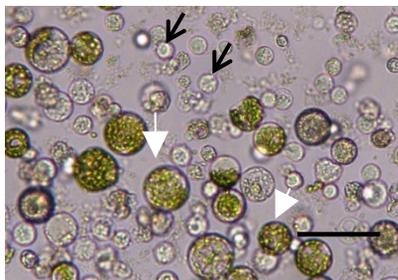
図VI-11. *S. ovata* 子葉由来培養細胞のプロトプラスト培養に対する細胞密度とホルモンの影響.
MS基本培地、0.6 M マンニトール、3%スクロース.

a

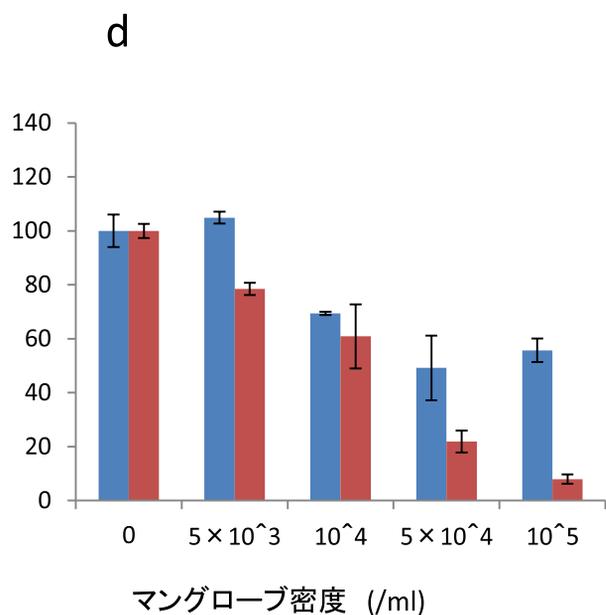
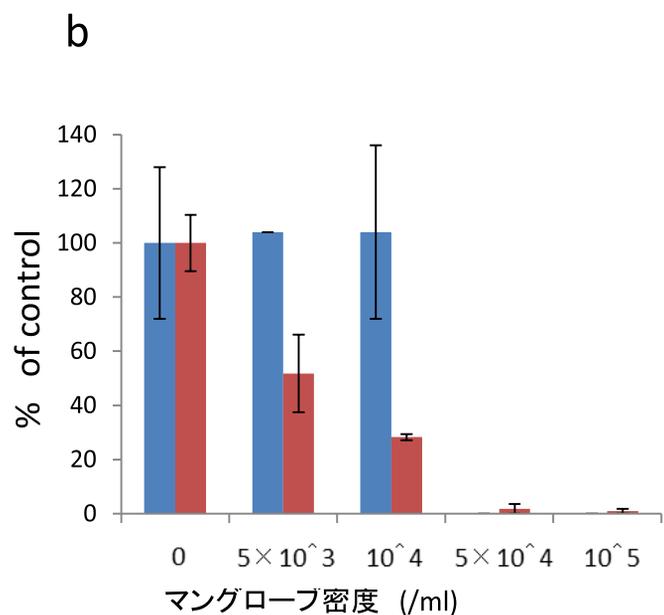
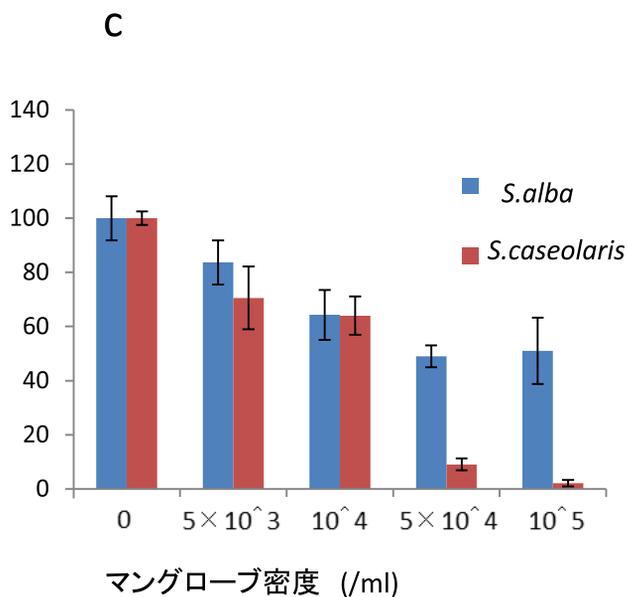
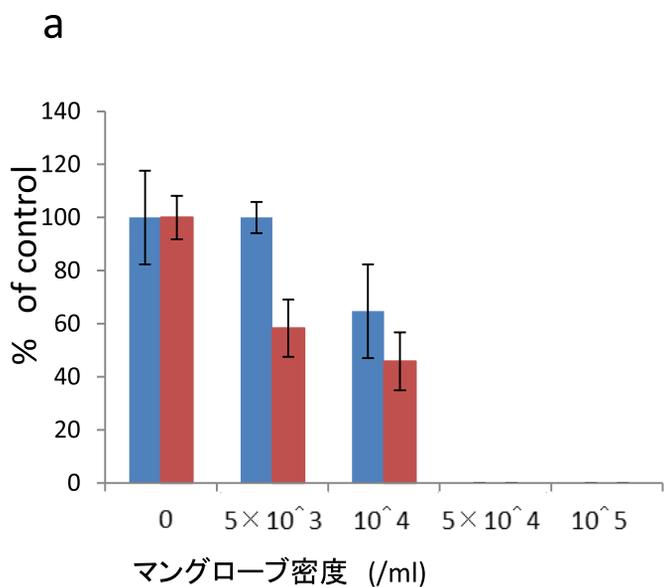


図VI - 12a. *S. alba* 培養細胞NaCl株プロトプラストとレタスプロトプラストの混合培養. Bar = 50 μ m

b



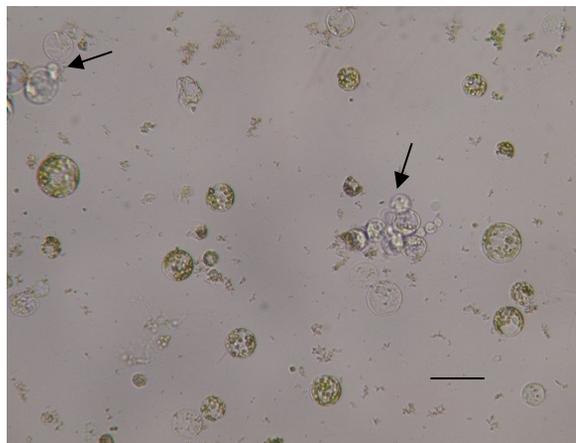
図VI - 12b. *S. caseolaris* 培養細胞ガラクトース株プロトプラストとレタスプロトプラストの混合培養. Bar = 50 μ m



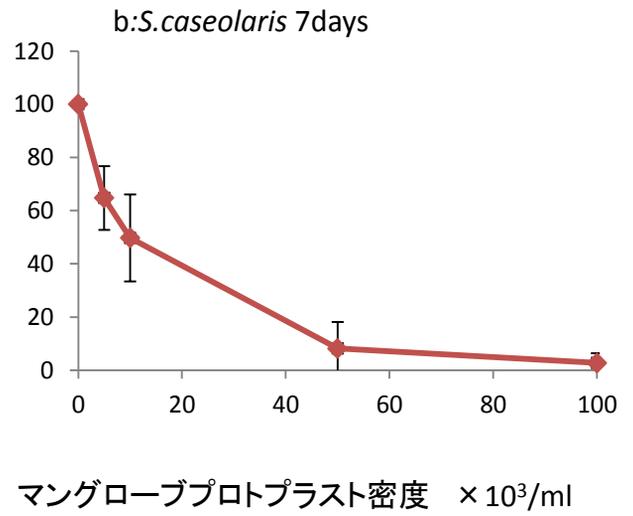
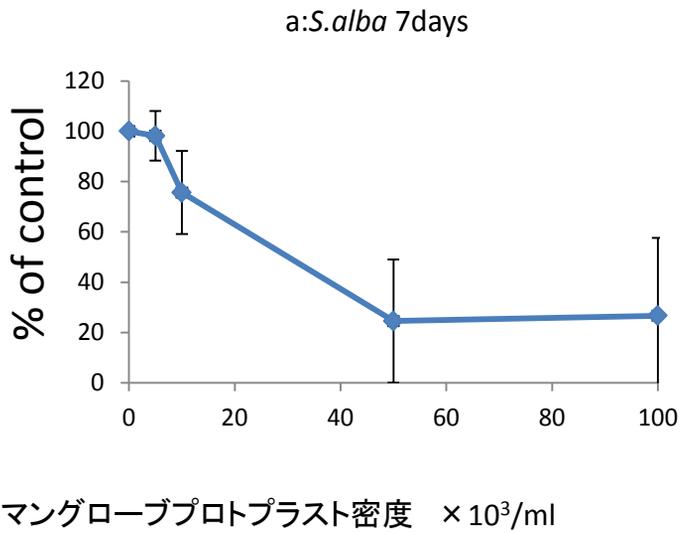
図VI-13a,b,c,d
 各レタス密度における*S.alba*と*S.caseolaris*による影響の比較.
 a: 5×10^3 、b: 10^4 、c: 5×10^4 、d: 10^5 /ml



図VI -14a. *S. ovata* 子葉由来培養細胞プロトプラストとレタスプロトプラストの混合培養. Bar = 50 μ m

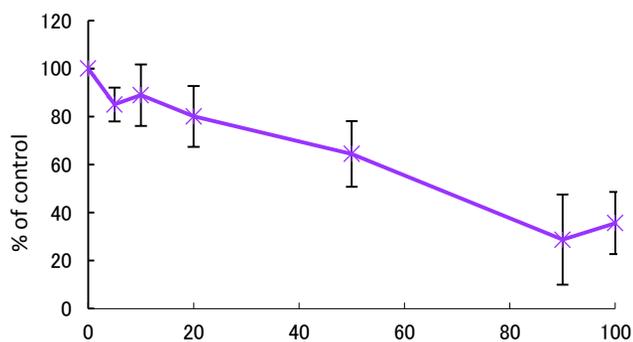


図VI- 14b. *S. ovata* 根由来培養細胞プロトプラストとレタスプロトプラストの混合培養. 2日培養. MS基本培地、2,4-D 1 μ M, BA 0.1 μ M, 3% スクロース、0.5 M マンニトール. Bar = 50 μ m.



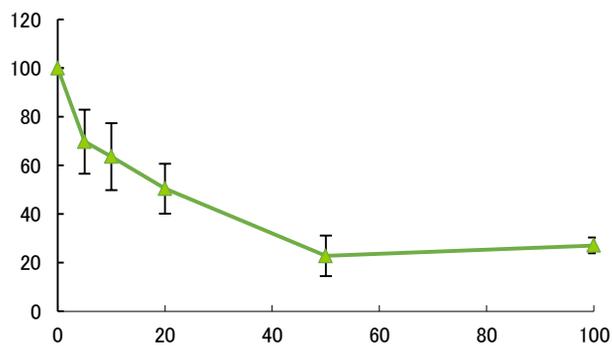
図VI-15a,b. レタスに対するマングローブプロトプラストの影響
 レタス密度 $5 \times 10^3 \sim 10^5$ /mlの結果を平均して示した.

a: *S. ovata*根由来



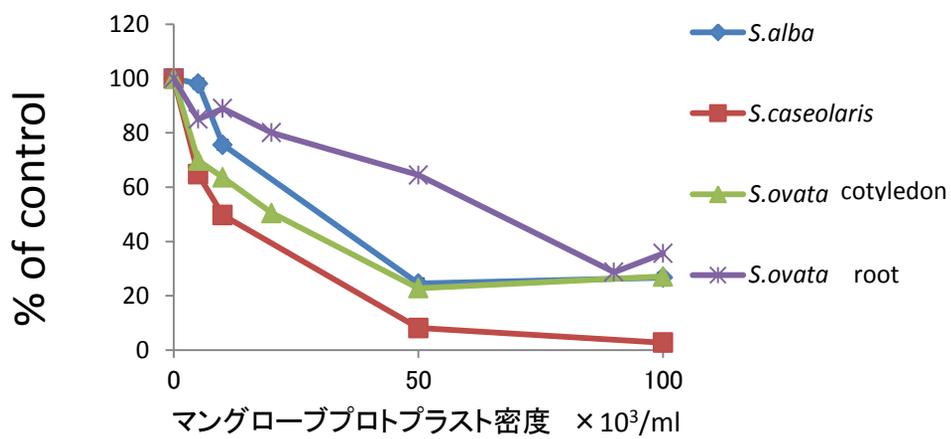
マングローブプロトプラスト密度 × 10³/ml

b: *S. ovata*子葉由来

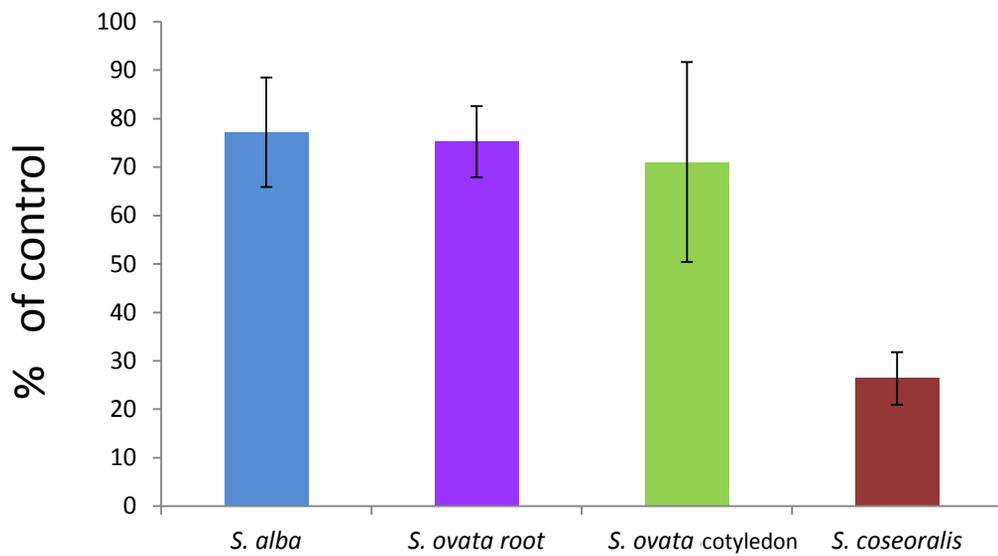


マングローブプロトプラスト密度 × 10³/ml

図16ab. マングローブプロトプラストのレタスに対する影響を各レタス密度による値を平均して示した.



図VI-17. 各マングローブプロトプラストのレタスに対する影響.



図VI-18. レタス対マングローブが1:1で混合されたときのレタスの分裂活性の比較.

参考文献

- Akatsu M, Hosoi Y, Sasamoto H, Ashihara H (1996) Purine metabolism in cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, in tissue culture. *J.Plant Physiol.*149,133- 137
- Ashihara H, Adachi K, Otawa M, Yasumoto E, Fukushima Y, Kato M, Sano H, Sasamoto H, Baba S (1997) Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant, *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. *Z. Naturforsch.*52c,433-440
- Chou CH (2006) Introduction to Allelopathy. In: Reigosa MJ, Pedrol N, Gonza'lez L(eds) *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Dordrecht, pp 1-9
- Clipson NJW, Lanchno DR, Flowers TJ (1988) Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum: Abscisic acid concentrations in response to constant and altered salinity. *J Exp Bot*, 39,1381-1388.
- Duke NC (1992) Mangrove Floristics and Biogeography. In: Robertson AI, Alongi DM (eds) *Coastal and Estuarine Studies 41, Tropical Mangrove Ecosystems*. American Geophysical Union, Washington, pp 63-100
- Farnsworth EJ, and Farrant JM (1998) Reductions in abscisic acid are linked with viviparous reproduction in mangroves. *Amer J Bot* 85,760-769
- 藤井 義晴 (1990) マメ科植物「ムクナ」とは(2) 農業および園芸 第 65 巻 pp945-948
- 藤井 義晴 (1991) ササ・タケ落葉の他感作用－80 種類の落葉の溶脱物質の Sandwich 法による検定－1991 雑草研究 36 pp94-95
- 藤井 義晴 (2000) アレロパシー:他感物質の作用と利用 農文協
- Fujii Y (2003) Allelopathy in the natural and agricultural ecosystems and isolation of potent allelochemicals from Velvet bean (*Mucuna pruriens*) and Hairy vetch (*Vicia villosa*). *Biological Sciences in Space* 17:1-8

- Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y, Iida O (2003) Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biol Manage* 3:233-241
- Fujii Y, Shibuya T, Nakatani K, Itani T, Hiradate S, Parvez MM (2004) Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biol Manage* 4:19-23
- Fukumoto T, Nakamura T, Suzuki M, Ogita S, Mimura T, Sasamoto H (2004) Different effects of four salts and pHs on protoplast cultures of a mangrove, *Bruguiera sexangula* suspension cells, *Populus alba* leaves and tobacco BY-2 cells. *Plant Biotechnol* 21:177-182
- Grime JP. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist* 111:1169–1194.
- Hasegawa Ai, Hayashi Shinji, Kurita Asami, Kaai Fumiki, Kawana Yoshifumi, Fukumoto Takeshi, Sasamoto Hamako (2011) Stimulatory and inhibitory effects of abscisic acid on cell growth in protoplast cultures and the relation to its endogenous levels in Avicenniaceae mangrove cells. *Mangrove Science* 8, 11-18.
- Hasegawa A, Kurita A, Hayashi S, Fukumoto T, Sasamoto H (2013) Halophilic and salts tolerant protoplast cultures of mangrove plants, *Sonneratia alba* and *Avicennia alba*. *Plant Biotechnol Rep* 7:205-209
- 長谷川愛、林晋司、栗田麻未、川名祥史、福元健志、笹本浜子 (2008)
マヤプシキ液体培養細胞のプロトプラスト単離と培養—細胞レベルのアレロパシー検定法開発—14回日本マングローブ学会'08年次大会講演要旨集 p14
- 長谷川愛、笹本浜子 (2009a) 5種の塩によるマングローブ子葉プロトプラストの分裂促進・阻害 27回日本植物細胞分子生物学会大会シンポジウム講演要旨集 p61
- 長谷川愛、林晋司、栗田麻未、河合 史樹、川名祥史、福元健志、笹本浜子 (2009b)
マングローブ樹木プロトプラストのアブシジン酸内生量と培養促進・阻害効果
73回日本植物学会大会研究発表記録 p220
- 長谷川愛、土屋慎平、井上文、笹本浜子 (2010)
*Sonneratia*属マングローブ樹木の耐塩性とアレロパシー活性比較 -液体培養細胞のプロトプラストによる他感作用検定法開発-74回日本植物学会大会研究発表記録 p222

- 長谷川愛, 小柳朋也, 速水しおり, 藤瀬恒平, 笹本浜子 (2011) マングローブ樹木 *Sonneratia caseolaris* および *Caesalpinia crista* の液体培養細胞増殖とカルス誘導に対する海水塩イオンの促進阻害効果の特徴 75 回日本植物学会大会研究発表記録 p219
- 長谷川愛, 小柳朋也, 藤瀬恒平, 皆川礼子, 笹本浜子 (2012)
Sonneratia ovata 細胞培養に対する海水塩類の影響解析と、プロトプラスト法によるアレロパシー検定の試み 18 回日本マングローブ学会大会講演要旨集 p18
- 林晋司, 栗田 麻未, 長谷川 愛, 栗山 真悟, 笹本 浜子 (2008a)
マングローブ *Avicennia alba* 子葉由来培養細胞とプロトプラストに対する塩と浸透圧の影響 72 回日本植物学会大会研究発表記録 p235
- 林晋司, 長谷川愛, 山本来紀, 皆川礼子, 藤井義晴, 笹本浜子 (2008b)
サンドイッチ法によるマングローブ類のアレロパシー検定
14 回日本マングローブ学会'08 年次大会講演要旨集 p13
- Hayashi S, Kuriyama S, Kawana Y, Hasegawa A, Kurita A, Minagawa R, Sasamoto H (2009)
Stimulatory effects of sea salts on cell growth in liquid culture of Avicenniaceae mangrove.
Plant Biotechnol 26:561-564
- 早津学, 小野真奈美, 長谷川愛, 土屋慎平, 鈴木季直, 笹本浜子 (2011)
外液イオン濃度変化に伴う耐塩性マングローブ培養細胞内の元素分布変化の解析
17 回日本マングローブ学会'11 年次大会講演要旨集 p13
- 早津 学, 小野真菜美, 長谷川愛, 土屋慎平, 鈴木季直, 笹本浜子 (2012)
Avicennia alba カルスとプロトプラスト培養時に Ca が及ぼす影響と細胞内イオン分布
18 回日本マングローブ学会大会講演要旨集 p14
- 井上文, 矢野裕太, 林晋司, 長谷川愛, 皆川礼子, 笹本浜子 (2009)
マメ科マングローブのカルス化とプロトプラスト単離・培養
(*Caesalpinia crista*, *Dalbergia candenatensis*, *Derris indica*)
15 回日本マングローブ学会'09 年次大会講演要旨集 p4
- 井上文, 土屋慎平, 皆川礼子, 笹本浜子 (2010)
マングローブマメ科木本植物3種のプロトプラスト単離と培養
74 回日本植物学会大会研究発表記録 p234

- Kaai F, Kawana Y, Sasamoto H: Endogenous levels of abscisic acid and gibberellins and recalcitrancy of leaf culture of a mangrove tree, *Kandelia obovata*. Abst of 11th IAPTC&B congress, P1361, p138, 2006
- Kaai F, Kawana Y, Sasamoto H (2008) The relation between recalcitrancy of a mangrove plant, *Kandelia obovata*, and high endogenous level of abscisic acid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 94, 125-130.
- Kawana Y, Sasamoto H (2008) Stimulation effects of salts on growth in suspension culture of a mangrove plant, *Sonneratia alba*, compared with another mangrove, *Bruguiera sexangula* and non-mangrove tobacco BY-2 cells. *Plant Biotechnol* 25:151-155
- Kawana Y, Sasamoto H, Mochida Y, Suzuki K (2004) Leaf protoplast isolation from eight mangrove species of three different families; Avicenniaceae, Rhizophoraceae and Sonneratiaceae. *Mangrove Sci*, 3, 25-31.
- Kawana Y, Yamamoto R, Mochida Y, Suzuki K, Baba S, Sasamoto H (2007) Generation and maintenance of suspension cultures from cotyledons and their organogenic potential of two mangrove species, *Sonneratia alba* and *S. caseolaris*. *Plant Biotechnol Rep* 1:219-226
- Kawana Y, Kaai F, Sasamoto H (2009) Abscisic acid stimulates cell divisions in cultures of protoplasts isolated from cotyledons and suspension cells of a mangrove plant, *Sonneratia alba*: Small-scale measurements of abscisic acid and gibberellins in protoplasts. *Mangrove Science* 6:9-15
- 川名 祥史, 笹本 浜子, 芦原 坦. (2008) マングローブの耐塩性. 日本海水学会誌 第 62 巻 第 4 号 平成 20 年 8 月 pp207-214
- Kura-Hotta M., Mimura M., Tsujimura T., Washitani-Nemoto S., Mimura T. (2001) High salt-treatment-induced Na⁺ extrusion and low salt-treatment-induced Na⁺ accumulation in suspension-cultured cells of the mangrove plant *Bruguiera sexangula*. *Plant Cell Environ*, 24, 1105-1112.
- 栗田麻未、長谷川 愛、林 徳子、笹本 浜子 (2008)
マングローブプロトプラストが生産する新規カロースファイバー
72 回日本植物学会大会研究発表記録 p233

Lyman, J., and R. H. Fleming. 1940. Composition of seawater. J. Marine Res., 3: 134-146.

Mimura T, Mimura M, Washitani-Nemoto S, Sakano K, Shimmen T, Siripatanadilok S (1997)
Efficient callus initiation from leaf of mangrove plant, *Bruguiera sexangula* in amino acid
medium: Effect of NaCl on callus initiation. J Plant Res, 110, 25-29.

Minqing T, Haofu D, Xiaoming L, Bingui W (2009) Chemical constituents of marine medicinal
mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. Chinese J Oceanology and Limnology 27, 2,
288-296.

Molisch H. (1937) Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie, Jena., Fisher

森大祐、速水しおり、井上文、土屋慎平、長谷川愛、笹本浜子 (2011)

Derris indica 液体培養細胞の耐塩性試験とプロトプラスト法によるアレロパシー検定
17 回日本マングローブ学会'11 年次大会講演要旨集 p7

森大祐、長谷川愛、福元健志、渡辺信、笹本浜子 (2012)

Bruguiera sexangula と *Kandelia obovata* のプロトプラスト法によるアレロパシー活性測定
の試み 18 回日本マングローブ学会大会講演要旨集 p17

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco
tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Ogita S, Yeung EC, Sasamoto H (2004) Histological analysis in shoot organogenesis from
hypocotyls explants of *Kandelia candel* (Rhizophoraceae). J Plant Res, 117, 457-464.

小柳朋也、長谷川愛、福元健志、林徳子、笹本浜子 (2012a)

マングローブ *Sonneratia caseolaris* 培養細胞のプロトプラスト培養における細胞分裂と
カロールファイバー形成 62 回日本木材学会大会講演要旨集 p116

小柳朋也、長谷川愛、福元健志、笹本浜子 (2012b)

Sonneratia caseolaris のプロトプラスト培養における細胞分裂と新規カロール繊維形成制
御 18 回日本マングローブ学会大会講演要旨集 p16

- Sasamoto H, Kondo A, Hosoi Y, Maki H, Odani K (1992) Callus regeneration from cotyledon protoplasts of *Chamaecyparis obtusa* (Hinoki Cypress) In Vitro Cell. Dev. Biol. 28P,132-136
- Sasamoto H, Hosoi Y, Koshioka M (1995) Endogenous levels of four plant hormones may affect the culture conditions of poplar protoplasts to regenerate plants. In Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology, M.Terzi, R.Cella, A.Falavigna eds. Kluwer Academic Publishers. P481-486.
- Sasamoto H, Wakita Y, Baba S (1997) Effect of high sorbitol concentration on protoplast isolation from cotyledons of mangroves, *Avicennia marina* and *A. lanata*. Plant Biotechnol, 14, 101-104.
- Sasamoto H, Ogita S (2001) Endogenous plant hormones in protoplasts of embryogenic cells. Molecular Breeding of Woody Plants, N.Morohoshi & A.Komamine eds., 279-288, 2001, Elsevier Science
- Sasamoto H, Ogita S, Wakita Y, Fukui M (2002) Endogenous levels of abscisic acid and gibberellins in leaf protoplasts competent for plant regeneration in *Betula platyphylla* and *Populus alba* Plant Growth Regulation 38, 195-201.
- Sasamoto H, Wakita Y, Yokota S, Yoshizawa N, Katsuki T, Nishiyama Y, Yokoyama T, Fukui M (2006) Effects of electric cell fusion treatment among leaf protoplasts of *Populus alba* and *Alnus firma* on growth, leaf morphology, and RAPD pattern of eleven acclimatized plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 42: 174-178
- Sasamoto H, Murashige-Baba T, Inoue A, Sato T, Hayashi S, Hasegawa A (2011) Development of a new bioassay method, 'Protoplast method', using protoplast culture system of a leguminous plant *Mucuna pruriens*, containing strong allelochemical L-DOPA the 6th World Congress on Allelopathy proceedings pp.86-95
- 笹本浜子、森大祐、小林陽介、藤瀬恒平、小柳朋也、長谷川愛 (2012) 新規植物アレロパシー検定法:プロトプラスト法の開発 76 回日本植物学会大会研究発表記録 p128

- Sasamoto H, Murashige-Baba T, Inoue A, Sato T, Hayashi S, Hasegawa A (2013) Development of a New Method for Bioassay of Allelopathy Using Protoplasts of a Leguminous Plant *Mucuna pruriens* With a High Content of the Allelochemical L-DOPA. *Journal of Plant Studies* 2(2):71-80
- Sasamoto H, Ashihara H (2014) Effect of nicotinic acid, nicotinamide and trigonelline on the proliferation of lettuce cells derived from protoplasts. *Phytochemistry Letters* dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.09.008
- Spalding M, Kainuma M, Collins L (2010) *World Atlas of Mangroves*, Earthscan, UK and USA
- Thompson JA, Abdullah R, Cocking EC, (1986) Protoplast culture of Rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. *Plant Sci*, 47, 123-133.
- Tomlinson PB (1986) *The Botany of Mangroves*, Cambridge University Press, New York 419pp.
- 土屋慎平、長谷川愛、福元健志、皆川礼子、笹本浜子 (2009)
Sonneratia 属マングローブにおけるプロトプラスト単離効率化のための条件検討
 15 回日本マングローブ学会'09 年次大会講演要旨集 p3
- 土屋慎平、井上文、長谷川愛、小林陽介、萩田信二郎、笹本浜子 (2011)
Mucuna pruriens とマングローブ *Caesalpinia crista* のプロトプラストのアミノ酸分析:アレロケミカル L-DOPA 含量とプロトプラスト培養 75 回日本植物学会大会研究発表記録 p225
- Tsuchiya S, Ogita S, Kawana Y, Oyanagi T, Hasegawa A, Sasamoto H (2013) Relation between amino acids profiles and recalcitrancy of cell growth or salt tolerance in tissue and protoplast cultures of three mangrove species, *Avicennia alba*, *Bruguiera sexangula*, and *Sonneratia alba*. *American Journal of Plant Sciences* 4,1366-1374.
- Wakita Y, Yokota S, Yoshizawa N, Katsuki T, (2005) Nishiyama Y, Yokoyama T, Fukui M, Sasamoto H : Interfamilial cell fusion among leaf protoplasts of *Populus alba*, *Betula platyphylla* and *Alnus firma*: assessment of electric treatment and in vitro culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83(3)319-326, 2005.
- Weiler EW (1982) An enzyme-immunoassay for *cis*-(+)-abscisic acid. *Physiol Plant*, 54, 510-514.

- Wu SB, Wen Y, Li XW, Zhao Y, Zhao Z, Hu JF (2009) Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris* and *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae). *Biochemica Systematics and Ecology* 37:1-5
- Xin K, Zhou Q, Armdt SK, Yang X (2013) Invasive capacity of the mangrove *Sonneratia apetala* in Hainan island, China. *Journal of Tropical Forest Science* 25 (1):70-78
- Yamada A, Saitoh T, Mimura T, Ozeki Y (2002) Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast, and tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 43:903–910
- Yamamoto R, Kawana Y, Minagawa R, Sasamoto H (2009) Effects of carbon and nitrogen sources on induction of cell proliferation in tissue cultures of a mangrove plant, *Sonneratia caseolaris*. *Mangrove Science* 6:1-8
- Yamamoto R, Kawana Y, Minagawa R, Sasamoto H (2011) Effects of sea salts on induction of cell proliferation in liquid cultures of mangrove plants, *Sonneratia caseolaris* and *S. alba*. *American J Plant Sciences* 2, 35-42,
- 山本来紀、川名祥史、皆川礼子、鈴木邦雄、笹本浜子 (2007) マングローブ植物 *Sonneratia caseolaris* の組織培養に及ぼす塩ストレスの影響
71 回日本植物学会大会研究発表記録 p226
- Yokohama Waterworks Bureau (2009):
<http://www.city.yokohama.jp/me/suidou/os/suidou-suishitsu/suidou/suishitsu-kekka.html>
- Yu X, Kikuchi A, Shimazaki T, Yamada A, Ozeki Y, Matsunaga E, Ebinuma H, Watanabe KN (2013) Assessment of the salt tolerance and environmental biosafety of *Eucalyptus camaldulensis* harboring a mangrin transgene. *Journal of Plant Research* January 2013, Volume 126, Issue 1, pp 141-150