

ヤクタネゴヨウ、クロマツの針葉・芽切片からのカルス誘導と細胞培養

Callus formation and cell culture from needle and bud segments of *Pinus armandii* var. *amamiana* and *P. thunbergii*細井佳久*¹ ・丸山 E. 毅*¹Yoshihisa HOSOI*¹ and Tsuyoshi MARUYAMA*¹

* 1 国立研究開発法人 森林総合研究所

National Research and Development Agency Forestry and Forest Products research Institute

要旨: ヤクタネゴヨウは絶滅が危惧されている種であるが、大径木となるため、クロマツ同様増殖が可能であれば材利用を期待できる。しかし、両樹種ともスギカミキリが媒介するマツ材線虫病により個体数は減少している。このため、種子胚を利用した増殖法や、組換え技術を利用したザイセンチュウ抵抗性個体の作出研究が進んでいる。しかし、種子胚の細胞は親木とは遺伝的に異なる。そこで針葉や芽の切片を利用した再分化系の開発を目指し、基礎的な実験を行った。両樹種について千代田苗畑（茨城県かすみがうら市）に植栽されている個体から6月に採取した針葉と芽を材料とした。基本培地にオーキシニンとして2,4-Dを0.6 μM、サイトカイニンとしてBAPやゼアチンを6 μM添加した固形培地上で培養した結果、両樹種ともカルスを形成した。得られたカルスについてプロトプラストを単離し、96ウェル培養プレート内で液体培地を用い、暗黒下、培養した。その結果、細胞の分裂が観察され、クロマツではコロニーが形成され、ヤクタネゴヨウではその後、カルスを得ることができた。ヤクタネゴヨウの芽切片由来のカルスから液体培養細胞を誘導し、プロトプラストを単離した。

キーワード: プロトプラスト・液体培養細胞・マツ材線虫病

Abstract: *Pinus armandii* var. *amamiana* is an endemic species, but becomes a large tree. Therefore, the wood can be used like a Japanese black pine (*P. thunbergii*). However, the number of these species decreases by damage of pine wilt disease. Therefore the studies about techniques of propagation and genetic transformation with seed embryo tissues are developed. But the cell of a seed embryo is different from the cell of a stock hereditarily. Basic experiments were made aiming at development of the regeneration system from segments of needles and buds. Experiment samples were extracted as materials from the individual planted in Chiyoda nursery (Kasumigaura city, Ibaraki pref.) in June. After culture on basic media containing of 0.6 μM 2,4-D and 6 μM BAP or Zeatin the tissues of these species were formed calli. Protoplasts isolated from the calli were cultured in liquid media using 96 well plates in the dark. Protoplasts of *P. thunbergii* formed colonies and protoplasts of *P. armandii* var. *amamiana* formed calli. Suspension cells were obtained from bud tip-derived calli and protoplasts were isolated from the cells.

Key-word: Protoplast, Suspension cells, Pine wilt disease

I はじめに

日本には数種のマツ属樹木が生育しているが、マツ材線虫病による被害が甚大な種が多い。ヤクタネゴヨウも近年ではクロマツなどと同様にその被害が深刻化している。ヤクタネゴヨウは現在、環境省レッドリストランクで絶滅危惧 IB 類(EN)に指定されており、成育状況の調査や保護活動がなされている。しかし、大径木となるため、近年までは、丸木舟や建築材として広く利用されてきた。そのため、筆者らは材利用と遺伝資源保全を目的とし、組織・細胞培養技術を用いた増殖方法の開発を行

ってきた。具体的には、種子胚から胚再生能力を持つ細胞を誘導し、その培養細胞から不定胚を多数形成させて、大量増殖法やその保存法に関する研究を進めてきた(4, 5, 6, 7, 8, 10)。クロマツについても主に育種目的のため、種子胚を用いた増殖実験を行っている(2, 3, 9, 11)。しかし、種子胚は生殖器官であり、その組織・細胞は親木のものとは遺伝的に異なる。そのため、種子胚由来の細胞を用いても、育種目的で選抜された個体や、保護のために現地に残された個体そのものを増殖することにはならない。そこで今回は、栄養組織である針葉や芽の組

織・細胞を用いて増殖実験や分化実験を試みた。また、ゲノム編集などの遺伝子改変を行う際に、エレクトロポレーション法や PEG 法などの適用や、遺伝子導入処理後の細胞をキメラにすることなく取り出すことを想定し、細胞壁がなく、細胞が単一の状態で存在するプロトプラストの単離・培養を試みた。

II 方法

1. 実験材料の組織培養 茨城県かすみがうら市の千代田苗畑に植栽されているヤクタネゴヨウとクロマツから、2015年6月に採取した針葉と芽を使用した。針葉は約1.5cmに、芽は先端部を約2cmに切断した切片を殺菌して培養した。殺菌は、針葉切片の場合2%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液でヤクタネゴヨウは20分、クロマツは30分、芽切片の場合ヤクタネゴヨウは2%、クロマツで3%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で50分、それぞれ攪拌して行った。培養は、16時間蛍光灯照明、25℃の環境下、90mmシャーレ内で、基本培地として硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMSとDCR(1)培地を用い、2,4-Dを0.6μM、BAPあるいはZeatinを6μM、ショ糖を2%、寒天を0.7%添加した固形培地で行った。

2. 誘導したカルスからのプロトプラストの単離・培養

① ヤクタネゴヨウ 針葉切片由来カルスをメスで細断したものを、酵素液として1%セルラーゼ[®]オゾカ[®]RS、0.25%ペクトリアーゼY-23、0.6Mマンニトールを40ml入れた100ml広口培養フラスコ内で、約6時間静置処理した。処理後、62μmのナイロンメッシュでろ過したものを80×gで遠心し、沈殿したプロトプラストを回収して0.6Mマンニトールで洗浄・精製した。プロトプラストの培養は、96ウェル培養プレートを用い、暗黒下25℃で静置培養した。培地には、0.6Mマンニトールを含み、オーキシニンとして2,4-Dを1, 10, 30μMと、サイトカイニンとしてBAPあるいはZeatinを0, 1, 10μMの濃度で組合わせて添加した液体培地を用いた。培養密度は 2×10^3 プロトプラスト/mlとした。芽切片由来カルスについても同様に酵素処理し、単離したプロトプラストを培養した。培養は2,4-DとBAPとを組合せた培地条件についてのみ行った。

② クロマツ 針葉切片由来カルスについて、酵素処理はヤクタネゴヨウと同様に行った。培養は、0.6Mマンニトールと10μM 2,4-Dを含むDCR液体培地を用い、 2×10^4 プロトプラスト/mlの密度で培養した。

3. ヤクタネゴヨウ芽切片由来カルスからの液体培養細胞の誘導・プロトプラストの単離

カルスをメスで細

断し、100ml培養広口フラスコで振とう培養した。培地は10μM 2,4-Dを添加した30ml MS液体培地を用いた。振とう回転数は、60r.p.m.とした。培養は暗黒下、25℃で行った。プロトプラスト単離の酵素液組成や処理は、前述した方法で行った。

III 結果と考察

1. 実験材料の殺菌 それぞれの切片についての殺菌効果を表-1に示した。針葉切片の場合、両樹種とも3%代のコンタミ率であった。しかし、芽切片では殺菌剤の濃度を上げたり処理時間を延長したりしたが、コンタミ率は上昇した。芽の部分は鱗片で覆われていることと、材料採取時期が6月と梅雨時であったためと思われる。

2. カルス形成 ヤクタネゴヨウ、クロマツとも針葉切片、芽切片で同様にカルスの形成がみられた(図-1)。

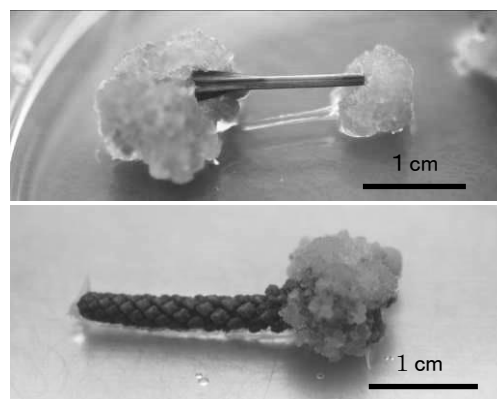


図-1. ヤクタネゴヨウのカルス形成の例
(上: 針葉切片 下: 芽切片)

Fig.1 An example of callus formation from a segment of *P. armandii* var. *amamiana*

(Above: A needle tip Below: A bud tip)

いずれのカルスも同様の形態をしており、誘導時と同じ培地で増殖し、継代培養することができた。しかし、多芽などの器官分化はみられなかった。筆者らは、ヒノキやサワラの葉条切片の培養において、今回用いた改変MS培地で培養し、多芽体を得ている。また、DCR培地はサトウマツ(*Pinus lambertiana*)の茎葉の分化促進に効果があると報告されている(1)。しかし、今回の実験では器官分化に対して効果は認められなかった。基本培地のほか、用いるオーキシニンやサイトカイニンの種類や濃度についてもさらに調べる必要があるかもしれない。

3. プロトプラストの単離・培養

①ヤクタネゴヨウ 針葉、芽切片由来カルスから単離

したプロトプラストの直径は、どちらの場合も約 40 から 60 μm であり、生存率は約 80%であった (図-2)。培養3週間後のコロニー形成率について表-2、3に示した。針葉由来カルスから単離したプロトプラストにつ

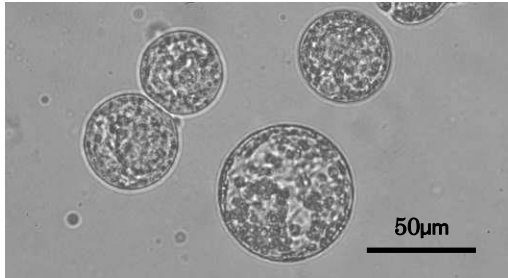


図-2. 針葉切片由来カルスから単離したプロトプラスト

Fig.2 Protoplasts isolated from needle tip-derived calli

いて、2,4-D を 10 μM 添加した培地で培養した場合に、コロニー形成率が 14.5%となり最高値を示した。他の材料や培地条件も含め、2,4-D については 10 μM 以上の添加がコロニー形成に対して効果的であった。5週間後、コロニーを 0.2M マンニトール、10 μM 2,4-D を添加した DCR 液体培地に移植した。培養には 24 ウェル培養プレートを用いて暗黒下培養した。1ヶ月細胞を増殖させた後、0.6 μM 2,4-D と 6 μM BAP、0.7%寒天を添加した DCR 固形培地で16時間蛍光灯照明下、25 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。その結果、緑色のカルスを形成した (図-3)。

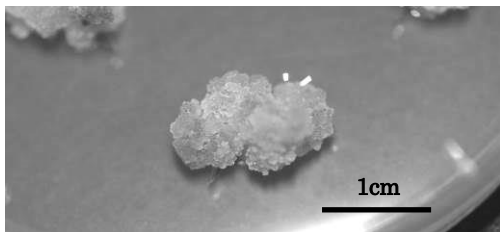


図-3. プロトプラストから得られたカルス

Fig. 3 Calli derived from protoplasts

②クロマツ プロトプラストのサイズ、生存率ともヤクタネゴヨウとほぼ同じであった。培養2、3週間後には少数だが分裂し、コロニーが形成された (図-4)。現在増殖用培地に移植し、観察中である。

4. 液体培養細胞の誘導とプロトプラストの単離 1週間程度で細胞が遊離し、増殖した。増殖細胞は、2週間ごとに誘導時と同じ培地で継代培養可能であった (図-5)。また、カルスからの単離と同様な方法でプロトプラストの単離が可能であった (図-6)。

IV さいごに

今回、栄養組織である針葉や芽切片からカルスを形成

させることができたが、茎葉などの器官分化には至っていない。プロトプラストからのコロニー形成率の向上を図るとともに、分化に適した培地条件を調べる必要がある。

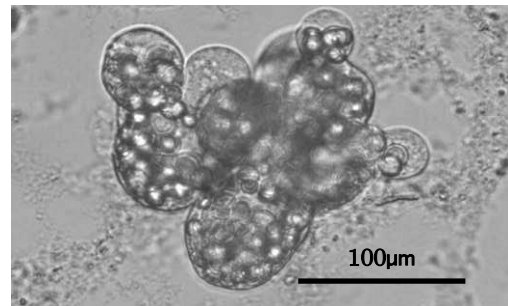


図-4. 針葉カルス由来プロトプラストから形成されたコロニー

Fig.4 Colony formation from protoplasts of needle tip-derived calli

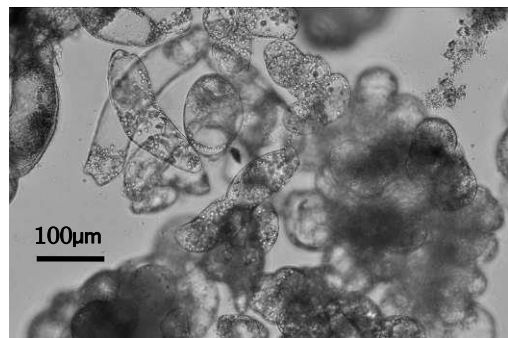


図-5. 茎葉切片由来カルスから誘導した液体培養細胞

Fig.5 Suspension cells obtained from bud tip-derived calli



図-6. 液体培養細胞から単離したプロトプラスト

Fig.6 Protoplasts isolated from suspension cells

表-1. 殺菌後のコンタミ率

Table 1 Contamination rate after sterilization

ヤクタネゴヨウ (*P. armandii* var. *amamiana*)

	コンタミ切片/ 全培養切片	コンタミ 率 [%]
針葉切片	5/146	3.4
芽切片	11/86	12.7

クロマツ (*P. thunbergii*)

	コンタミ切片/ 全培養切片	コンタミ 率 [%]
針葉切片	14/396	3.5
芽切片	127/237	53.6

表-2. 針葉切片由来カルスから単離したプロトプラス
トのコロニー形成率

Table 2 Colony formation rate of protoplasts isolated
from needle tip derived-calli

BAP[μ M]	2,4-D[μ M]			
	1	3	10	30
0	0	0	14.5	8.5
1	0	1	3.5	9
10	0	0	4	5.5

Zeatin[μ M]	2,4-D[μ M]			
	1	3	10	30
0	0	0	5.5	8
1	0	0.5	1.5	5.5
10	0	0	0.5	3

*数値は2 ウェルの平均

表-3. 芽切片由来カルスから単離したプロトプラス
トのコロニー形成率

Table 3 Colony formation rate of protoplasts isolated
from bud tip derived-calli

BAP[μ M]	2,4-D[μ M]			
	1	3	10	30
0	1.25	1.75	4	3.5
1	2	0.5	2.5	1.75
10	0.5	0.25	4.25	1.75

*数値は4 ウェルの平均

謝辞: なお、本研究の一部は、JSPS 科研費 JP16K14949
の助成を受けた。

引用文献

- (1) GUPTA, P. K., DURZAN, D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4 : 177-179
- (2) 細井佳久・丸山 E. 毅 (2015) 国産マツの不定胚形成による再分化と器官培養による分化の試み. 関東森林研究 66(2) : 111-114
- (3) 細井佳久・丸山毅 (2011) クロマツのプロトプラスト培養による不定胚の形成とその発芽. 関東森林研究 62 : 147-150
- (4) 細井佳久・石井克明 (2007) ヤクタネゴヨウのコピーをつくり危急に備える. 屋久島の森のすがた「生命の島」の森林生態学 (文一総合出版) 123-131
- (5) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2005) ヤクタネゴヨウ自生個体の未熟種子からの不定胚形成と茎葉分化. 日本森林学会関東支部大会発表論文集 56 : 113-114
- (6) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2003) 絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの不定胚形成細胞の誘導と分化. 日本森林学会関東支部大会発表論文集 54 : 171-172
- (7) HOSOI, Y., ISHII, K. (2001) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus armandii* var. *amamiana*. In: Morohoshi, N., Komamine, A. (eds.) Molecular Breeding of Woody Plants, Elsevier Science : 313-318
- (8) ISHII, K., Hosoi, Y., MARUYAMA, T., KANETANI, S. (2011) Preservation of an in vitro propagated endangered species *Pinus armandii* var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima. Propagation of Ornamental Plants 11(4) : 210-212
- (9) 丸山 E. 毅・細井佳久 (2015) ポリエチレングリコール又は高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟したクロマツ不定胚からの植物体再生. 関東森林研究 66(1) : 69-72
- (10) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endangered species in Japan. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant 43(1) : 23-34
- (11) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2005) Somatic embryogenesis and plant regeneration of Japanese Black pine. Journal of Forest Research 10(5) : 403-407