

ヒノキ成木組織からの植物体再生と再生シュートからのプロトプラスト単離の試み

細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (森林総研)

要旨: ヒノキの成木組織から多芽体を誘導し、植物体を再生させるとともに多芽体からプロトプラストを単離し、培養した。まず、1つのヒノキ精英樹品種の葉条を採取し、1%次亜塩素酸ナトリウムで50分間滅菌し洗浄した後、多芽形成用の寒天培地に置床した。多芽形成用培地として4種類の培地を比較したが、硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMS培地に $0.6\mu\text{M}$ 2,4-Dと $6\mu\text{M}$ BAPを添加した寒天培地で形成数が最高であった。次に多芽の伸長を促すため、植物ホルモンを除いた4つの培地に移したところ、硝酸アンモニウムを除いたMS寒天培地で伸長量が最高であった。伸長したシュートをメスで切り出して、 $6\mu\text{M}$ IBAを添加し硝酸アンモニウムを除いた1/2MS寒天培地に移すと発根し、幼植物体が得られた。次にプロトプラスト培養により植物体再生系を開発するための初期段階として、多芽体からプロトプラストの単離を試みた。 0.6M マンニトールとセルラーゼRS、ペクトリアーゼY-23を組み合わせた酵素液で約5時間静置処理したところ、プロトプラストを単離することができた。得られたプロトプラストを、 0.6M マンニトールを含む改変MS培地で培養すると初期分裂が観察された。

キーワード: ヒノキ, 多芽体, プロトプラスト

I はじめに

針葉樹の組織培養による個体再生系では、今まで多くの場合、種子胚を使って不定胚形成細胞を誘導し、その細胞から個体再生させる方法が採られてきた。筆者らもスギ、ヒノキ、サワラ、ヤクタネゴヨウなどの国産針葉樹について未熟種子胚から得た不定胚形成細胞を培養し、個体再生に成功している(1,2,3,4,5,6,7,8,9)。この方法を用いると、正常な胚の再生にさえ成功すれば、その後の発芽・伸長、植物体再生については比較的単純な培地で、しかも短期間で行うことが可能である。しかし、この場合得られた植物体は親の個体とは遺伝的に異なるため、クローンの増殖を目的とする場合には問題となる。そこで今回はこの問題が生じないように、材料として成木の葉条を用いて植物体再生系の確立を試みた。また、成木の葉条組織から得られた多芽体を材料にプロトプラストの単離・培養を試みた。

II 実験方法

1. 多芽体の誘導と植物体形成 2006年7月上旬、茨城県林業技術センター構内のヒノキ精英樹から1つの品種を選び、当年枝先端部の葉条を約3cm切り取り、材料とした。葉条は1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で50分殺菌し、洗浄した後に多芽形成用の培地へ置床し、 25°C 16時間蛍光灯照明下で培養した。培地としては、A: 1/2濃

度の硝酸アンモニウムと2%ショ糖を含み、 $0.6\mu\text{M}$ 2,4-D、 $6\mu\text{M}$ BAPを添加したMS寒天培地、B: 1/2濃度の硝酸アンモニウムと2%ショ糖を含み、 $0.6\mu\text{M}$ 2,4-D、 $6\mu\text{M}$ チジアズロン(TDZ)を添加したMS寒天培地、C: 1/4濃度の硝酸アンモニウムと2%ショ糖を含み、 $0.6\mu\text{M}$ 2,4-D、 $6\mu\text{M}$ BAPを添加した1/2MS寒天培地、D: 1/4濃度の硝酸アンモニウムと2%ショ糖を含み、 $0.6\mu\text{M}$ 2,4-D、 $6\mu\text{M}$ TDZを添加した1/2MS寒天培地、の4つの培地を用いた。次に得られた多芽体を伸長させ、シュートを得るために、a: 硝酸アンモニウムを除き2%ショ糖を含む1/2MS寒天培地、b: 硝酸アンモニウムを除き2%ショ糖を含むMS寒天培地、c: 1/2濃度の硝酸アンモニウムと2%ショ糖を含むMS寒天培地、d: 2%ショ糖を含むMS寒天培地、の4つの培地を用いた。培養は 25°C 、16時間蛍光灯照明下で行った。伸長したシュートはメスで2cmに切り出し、硝酸アンモニウムを除き、 $6\mu\text{M}$ IBAと1%ショ糖を加えた1/2MS寒天培地へ移植した。培養は 25°C 、16時間照明下で行った。

2. プロトプラストの単離と培養 生重約4gの多芽体をメスで細断し、プロトプラスト単離の材料とした。単離用酵素液の酵素組成として、①: 0.6M マンニトール、2%セルラーゼRS、0.1%ペクトリアーゼY-23、②: 0.6M マンニトール、2%セルラーゼRS、0.2%ペクトリ

Yoshihisa HOSOI, Emilio MARUYAMA, and Katsuaki ISHII (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Plant regeneration and protoplast isolation from multiple buds derived from leaflets of an adult Hinoki tree.

アーゼ Y-23, ③: 0.6M マンニトール, 4%セルラーゼ RS, 0.2%ペクトリアーゼ Y-23, ④: 0.6M マンニトール, 4%セルラーゼ RS, 0.4%ペクトリアーゼ Y-23, の4つの組み合わせを試した。酵素処理は30ml 酵素液の入った100ml フラスコに細断した組織を入れて25°C, 弱光下で行った。5時間処理した後, 遠心器を用いて0.6M マンニトールで2回洗浄し, 精製した。単離したプロトプラストは96 ウェルプレートで 3×10^3 個/mlの密度で培養した。培地として0.6M マンニトールを含み, $1 \mu\text{M}$ 2,4-D, $0.3 \mu\text{M}$ BAP を添加し硝酸アンモニウムを除いたMS培地で培養した。培養は25°C, 暗黒下で行った。

III 結果と考察

1. 多芽形成とサイトカイニン 多芽形成用培地に置床して約30日程度経過すると, 葉条の一部で細胞の肥大・分裂が観察された(図-1)。置床後40日目に同一組成の培地に継代培養した。その後, 50日後に生じた芽の数を調べた。その結果, 最も形成数が多かったのはA培地で, 平均33個の芽が形成された(図-2, 図-3)。B, D培地では形成数も少なく, 置床組織が褐変する傾向が見られた。芽の分裂には植物ホルモンとしてサイトカイニンが必要だと考えられるが, 今回の実験ではヒノキの多芽形成にはTDZよりBAPが適していた。ただし, TDZの場合でも, より低濃度で培養すれば褐変せず, 芽の形成数も増加する可能性はあると思われる。

2. 硝酸アンモニウムがシュート伸長に与える影響

A培地上に形成された多芽体を約300mgの大きさに切り出し, シュート伸長用培地に移植して50日後, 5mm以上伸長したシュートを計数した。図-4は, それぞれ9個から20個の多芽組織上に生じたシュートの平均を示している。最も伸長シュート数が多かったのはb培地で, 平均35本のシュートが得られた(図-5)。a培地とb培地の比較では, シュート伸長にはMS培地の塩濃度を下げない方がよいことがわかった。また, b, c, d培地での結果から, 硝酸アンモニウムに関してはシュート伸長には阻害的に働くことがわかった。

3. 発根培地上での発根・個体再生 シュートはIBAを添加した発根培地に移植すると発根し, 植物体へと分化した(図-6)。供試した25本のシュートのうち, 21本のシュートで発根が見られた。発根までには約40日程度と長時間必要であり, 一部シュートでは発根前にカルス化する場合があったため, さらに短期間で発根可能な基本培地やオーキシンの種類を検討する必要がある。

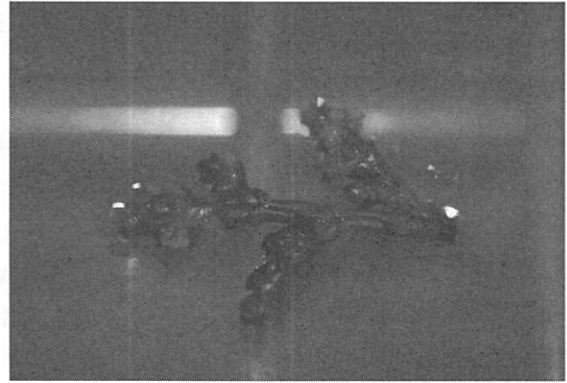


図-1. 培地上で分裂増殖を始めた葉条先端部

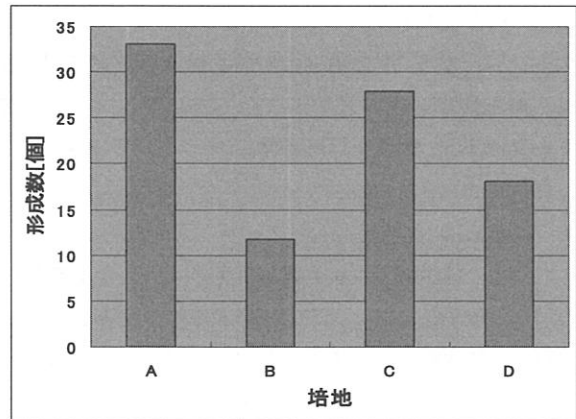


図-2. 培地別多芽形成数(多芽体20個の平均)

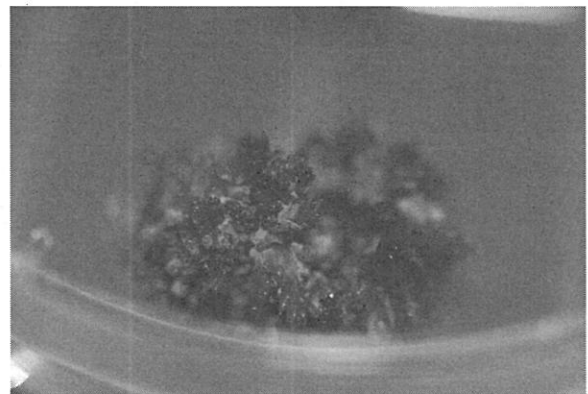


図-3. 形成された多芽体

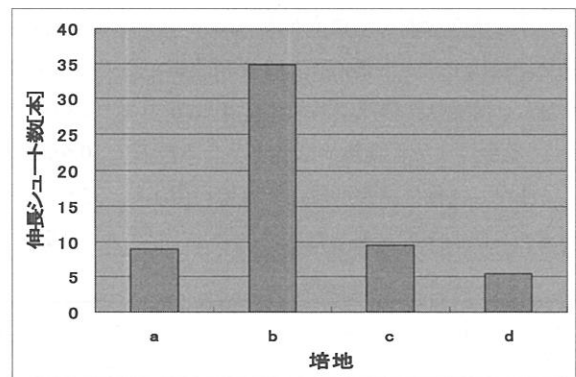


図-4. 多芽体からの伸長シュート数



図-5. 伸長するシュート

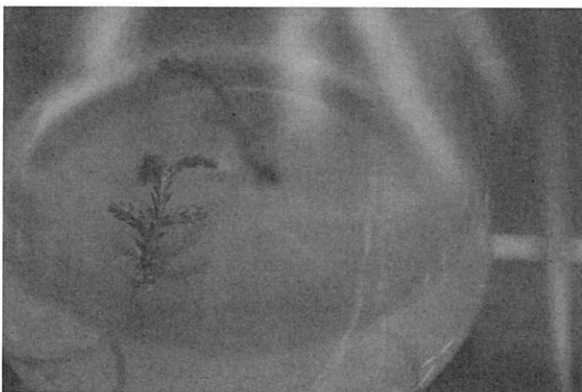


図-6. 葉条組織から得られた再生植物

3. プロトプラストの単離・培養 直径 $20\mu\text{m}$ から $150\mu\text{m}$ までの、大きさにばらつきのあるプロトプラストが得られた(図-7)。このばらつきは、分化や成長段階の異なる細胞が多数混在しているためと思われる。用いた4つの酵素液による単離では、FDAの蛍光発光による生存率測定では約70%の生存率であった。収量については、①, ②, ③の酵素液で処理した場合にはあまり差が見られなかった(図-8)。④では酵素濃度が高過ぎるせいか、単離された後に壊れていくプロトプラストが多く観察された。単離材料に不定胚形成細胞を用いた場合に比べ、生存率や収量が低く単離方法の改善を行う必要があるといえる。また、酵素液中に壊れた細胞破片が多く見られるため、用いる組織片の状態や、酵素条件に更に検討を加える必要があることがわかった。単離したプロトプラストを96ウェルプレートで培養すると、3週間ほどで分裂する細胞が観察された(図-9)。

IV おわりに

針葉樹では今まで種子胚から誘導した不定胚形成細胞から個体再生させる方法が採られてきたが、不定胚形成

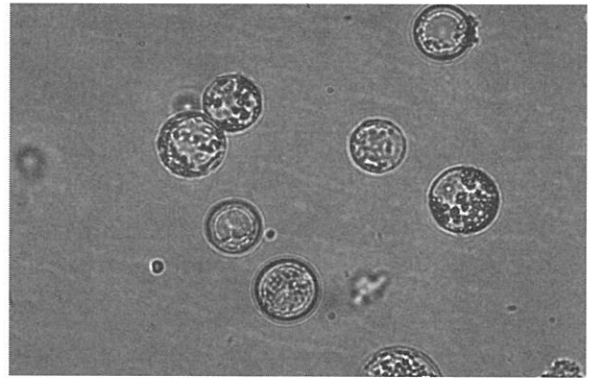


図-7. 単離されたプロトプラスト

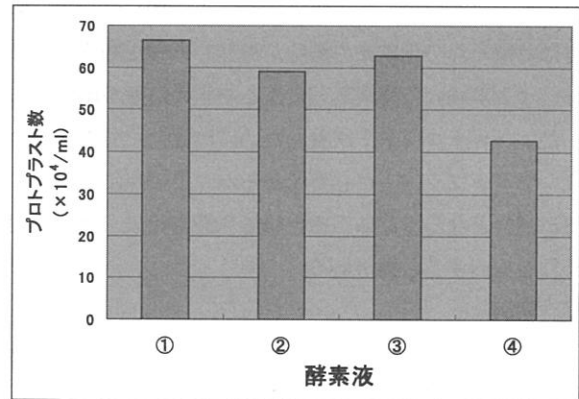


図-8. 酵素液別にみたプロトプラスト単離効率

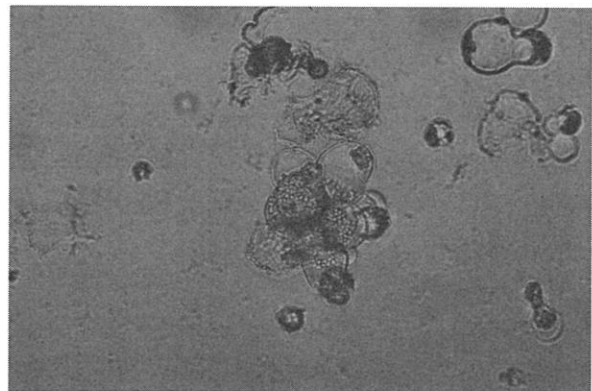


図-9. 細胞壁を再生し、分裂する細胞

細胞の分化能力を長期間維持し続けることは非常に困難であることが明らかになってきている。数ヶ月から1年程度で分化能力を失う場合も少なくない。一方、多芽体の場合、筆者らの経験ではヒノキの実生から誘導した多芽体が20年以上、また、不定胚から誘導した多芽体で5年以上分化能力を維持しているのを確認している。今回ヒノキについて成木の葉条組織から多芽体を誘導することができたが、この場合も長期間分化能力を維持できる可能性が高い。この多芽体からの再分化システムの開発

は、葉条由来であるため遺伝的に親の個体と同じという利点とともに、安定した分化能力を維持できる点でも優れているといえる。このように組織培養レベルで植物体再生系を開発する場合に、葉条を使って多芽体を誘導する方法はかなり有効な手段である。しかし、今回の結果から、プロトプラスト(細胞)培養による植物体再生系の確立を目指す場合には、まず培養に適したプロトプラストをいかに用意するかの重要性が明らかになった。プロトプラスト化材料に不定胚形成細胞を用いる場合、液体培地で培養しているため単離に際しても酵素処理しやすく、細胞も均質で材料として扱いやすい。一方、多芽体の場合には様々な分化段階の細胞が混在し、また細胞同士の結びつきが強固で酵素処理による細胞の解離が困難であった。プロトプラスト培養のためには健全で分裂活性の高いプロトプラストが必要であるが、この点については更に材料となる多芽体組織の状態や酵素組成、酵素処理条件を検討する必要がある。

V 謝辞

ヒノキ精英樹の葉条採取に協力していただいた茨城県林業技術センターの方々に感謝いたします。

引用文献

- (1) 細井佳久, 丸山エミリオ, 石井克明 (2007) 日森林 関東支論 58: 91-94,
- (2) 細井佳久, 丸山エミリオ, 石井克明 (2007) 日森林 関東支論 57: 167-168
- (3) 細井佳久, 丸山エミリオ, 石井克明 (2006) 日本植物細胞分子生物大会講演要旨 24: 166
- (4) 細井佳久, 丸山エミリオ, 石井克明: 日森林学術講要 114: 50, 2003
- (5) Ishii K., Maruyama E., Hosoi Y. (2003) Propagation of Ornamental Plants 3(2): 19-22,
- (6) Maruyama E., Hosoi Y., Ishii K. (2007) In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 43: 28-34
- (7) Maruyama E., Ishii K., Hosoi Y. (2005) J. For. Res. 10: 73-77
- (8) 丸山エミリオ, 細井佳久, 石井克明 (2004) 日森林学術講要 115: 162
- (9) Maruyama E., Hosoi Y., Ishii K. (2003) Int. Cong. of Plant Molecular Biol. 7:57