

## ヒノキ葉条組織における多芽形成能力のクローン間差とプロトプラスト単離に適した培養条件の検討

細井佳久・丸山エミリオ・石井克明（森林総合研究所）

要旨：ヒノキ 20 クローンの成木葉条から、培養により多芽を形成させた。葉条あたりに生じる芽の数にはクローン間差があったが、全てのクローンで多芽体の形成がみられた。増殖した多芽体の一部はホルモンフリーの改変 MS 培地に移植して莖葉を伸長させた。プロトプラストを単離するため、基本培地と植物ホルモンの組み合わせを変えて培養した多芽体を、3 種類の酵素液で 3 時間静置処理した。その結果、久慈 7 号では、2,4-D を  $0.6 \mu\text{M}$ 、BAP を  $6 \mu\text{M}$ 、2% ショ糖、0.6% 寒天、硝酸アンモニウムを 1/2 量添加した MS 培地で培養した多芽体を、2% セルラーゼオズカ RS、1% ドリセラゼ、0.1% ペクトリアーゼ Y-23、0.6M マンニトールから成る酵素液で 3 時間静置処理した場合にプロトプラスト収量は最高となり、 $254 \times 10^4$  個/g であった。これは前回報告した手法を用いて久慈 7 号の多芽体からプロトプラスト単離した場合の約 1.9 倍であった。大田原 2 号を用いた場合には、用いた酵素液の違いによる単離効率の差ははっきりしなかったが、多芽体の培養に関しては久慈 7 号の場合と同じ培地で培養した場合にプロトプラストの単離効率が高かった。

キーワード：ヒノキ、多芽体、プロトプラスト

### I はじめに

現在まで、針葉樹では不定胚や不定胚形成能力を持つ培養細胞を使った組織培養系や細胞培養系が開発されてきた。その場合、スタートとなる組織や細胞は種子や実生を使ったものがほとんどである。我々は、ヒノキについて精英樹などの、目的とする成木と遺伝的に同一な体細胞組織からの培養系の開発を行っており、既報の研究で、ヒノキの一つの精英樹クローンについて成木の葉条切片からの多芽体形成について報告した(1)。今回は、同様の培養方法を用いて、他のクローンでも多芽体を形成させることができるかどうか試した。また、前回は得られた多芽体からプロトプラストを単離し、その培養についても実験を試みた。しかし、プロトプラストの単離が困難で、培養に十分な収量を得ることができなかった。これは培養で得られた多芽体組織の細胞同士の結びつきや、個々の細胞の物理的性質によるものと思われる。そこで今回は多芽体形成後の培地条件を様々に変え、プロトプラスト単離に適した多芽体を得られるような継代培養条件を検討した。

### II 実験方法

1. 各精英樹個体からの多芽体の誘導 今回使用した材料は、全て茨城県林業技術センター構内の採種園より採取した葉条切片を用いた。2007 年 9 月上旬に採取した 12 品種、2008 年 7 月上旬に採取した 8 クローンについて、枝先の葉条約 3 cm を殺菌して培養した。葉条切片の殺菌

は、1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 50 分行い、その後、滅菌水で 4 回洗浄した。これらの葉条切片について、既報の久慈 7 号 (2006 年 7 月上旬採取・誘導) の場合に多芽体形成率の高かった培地として、硝酸アンモニウム濃度を 1/2 に下げ、 $0.6 \mu\text{M}$  の 2,4-D と  $6 \mu\text{M}$  の BAP、2% のショ糖、0.6% 寒天を含む MS 培地を用いて培養した。培養は  $25^\circ\text{C}$ 、16 時間蛍光灯照明 (約 3,000lx) 下で行った。2007 年採取の場合は培養開始 4 ヶ月後、2008 年採取の場合には 3 ヶ月後に、各クローンごとに葉条切片に生じた多芽の数について測定した。また、どちらの場合も初代培養物を用いて計数した。

2. 多芽の伸長 得られた多芽体の一部については、植物ホルモンを含まないシュート伸長用の培地に置床した。培地の組成については、既報の研究(1)で、久慈 7 号の場合に多芽からのシュート伸長に最も効果の高かった培地として、硝酸アンモニウムを除き、2% ショ糖と 0.6% 寒天を添加した MS 培地を用いた。培養は  $25^\circ\text{C}$ 、16 時間蛍光灯照明 (約 3,000lx) 下で行った。

3. プロトプラストの単離に適した多芽体用継代培地の検索 久慈 7 号と大田原 2 号の 2 クローンについて、多芽体の誘導には硝酸アンモニウムを 1/2 量、2,4-D を  $0.6 \mu\text{M}$ 、BAP を  $6 \mu\text{M}$ 、2% ショ糖、0.6% 寒天を添加した MS 培地を用いた。その後同様の培地で約 1 年間以上継代培養した後、MS 培地の塩濃度を変化させ、植物ホルモンとして 2,4-D と BAP 濃度を組み合わせた 10 種類の培地で

Yoshihisa HOSOI, Emilio MARUYAMA, and Katsuaki ISHII (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1., Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Comparison of the ability to form multiple buds between Hinoki plus trees and study of culture conditions suitable for protoplast isolation from multiple buds.

培養した(表-1)。培養は25℃,16時間蛍光灯照明(約3,000lx)下で行った。

4. 多芽体からのプロトプラストの単離 得られた多芽体は、メスで細断した後、6 ml 酵素液の入った6 cm のプラスチックペトリディッシュに各処理区あたり生重200mg ずつ置床した。酵素液には3種類用いて、約3時間静置処理した後、プロトプラストを回収し、数と生存率を測定した。計数は2回行い、その平均を示した。酵素処理は25℃,弱光下で行った。酵素液は浸透圧調整用に0.6M マンニトールを用い、酵素には2%セルラーゼオノズカRS, 1%ドリセラゼ, 0.1%ペクトリアーゼY-23を組み合わせたものを使用した(表-2)。酵素処理後のプロトプラストの回収は、まず100 $\mu$ m メッシュで濾して組織片を除去したものを0.6M マンニトールで洗浄・遠心した沈殿物として回収した。遠心は低速遠心機で約60 $\times$ gの遠心力で、3分間行った。プロトプラストの計数は、血球計算板を用いて顕微鏡下で行った。生存率測定にはFDA法を用いた。

### III 結果と考察

1. 各クローンにおける多芽体形成について 今回用いた各クローンにおける葉条切片あたりの多芽形成数について、表-3に示した。培養した全てのクローンにおいて多芽の形成が見られ、前回、久慈7号について報告した培養方法が、他クローンについても適用可能であることがわかった(図-1)。材料となる葉条の採取に際しては、採種園内の各個体の地上高2~3mの位置の当年枝の先端部分を切り取って使用した。しかし、クローンによる多芽形成数の違いは、用いた葉条の生育ステージの違いや各個体の樹齢によるものである可能性もあると思われる。また、実験は7月と9月に採取した葉条を使用した。同一のクローンについて時期を変えた実験は行っていないため、採取時期による多芽形成数に違いはよくわからなかった。しかし、9月採取の各クローン全体の平均多芽形成数についてみると、12.2個となり、7月採取の場合の平均の6.5個と、約2倍の差がみられることから、採取時期について検討を加えることは重要であると考えられる。ところで、一度誘導した多芽体は、その後の継代培養による増殖により、多芽数の多い多芽体を得ることが可能であった。これは一度誘導してしまえば、継代培養によって多芽体組織を、より分裂・増殖活性の高い組織に若返らせることができるためだと思われる。

2. 得られた多芽体からのシュート伸長について 多芽体誘導に用いたクローンのうち、大田原2号、河内3号、野尻7号、久野3号の4クローンについて、久慈7号の場合と同様の植物ホルモンを含まないMS改変培地に置

床すると、同様にシュートが伸長した(図-2)。全てのクローンについて培養実験を行っていないが、同様に伸長するものと思われる。

3. プロトプラスト単離用に培養した多芽体について 久慈7号と大田原2号の2クローンについて、10種類の培地で多芽体を培養したところ、それぞれが多芽を形成し、形態的には類似していたが、多芽の形成数に違いがみられる場合があった(図-3)。また、実際にプロトプラスト化のための酵素処理前に、各多芽体をメスで細断した際に、組織の硬さにも若干違いがみられた。

4. 多芽体の各培養条件、酵素処理条件で得られたプロトプラストについて 2つのクローンとも、プロトプラスト収量の多かった培養条件は、基本培地にかかわらず、植物ホルモンとして0.6 $\mu$ Mの2,4-Dと6 $\mu$ MのBAPを添加した培地(⑦~⑩培地)であった(図-4)。さらに、久慈7号では酵素処理条件としてはC液を使用した場合に最も高い収量が得られた(図-5)。今回最も収量が多かったのは、久慈7号の多芽体を処理した場合で、継代培養に用いた培地が⑦培地で処理した酵素液がC液の時、収量が $254 \times 10^4$ 個/gであり、以前報告した方法を用いた場合(⑧培地、C液処理)に比べ、約1.9倍の収量であった。プロトプラストの生存率については、ばらつきがあり、はっきりした傾向はつかめなかった(図-6)。今後はプロトプラスト収量とともに生存率の高く、分裂活性の高いプロトプラスト単離条件を調べる必要がある。

### V 謝辞

ヒノキ精英樹の葉条採取に強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 (2008) 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, 関東森林研究 No.59: 117-120

表-1. 多芽体の培養に用いた 10 種類の培地組成

培地名	基本培地	植物ホルモン	
		2,4-D[ $\mu$ M]	BAP[ $\mu$ 1M]
①	MS(-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	3	1
②	MS(1/2NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	3	1
③	MS	3	1
④	MS(-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	2	1
⑤	MS(1/2NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	2	1
⑥	MS	2	1
⑦	MS(-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	0.6	6
⑧	MS(1/2NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	0.6	6
⑨	MS	0.6	6
⑩	1/2MS(-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	0.6	6

表-2. プロトプラスト単離に用いた 3 種の酵素液組成

添加酵素及び浸透圧調節剤	酵素液名		
	A	B	C
Cellulase Onozuka RS	2%	2%	2%
Driselase	1%		1%
Pectolyase Y-23		0.10%	0.10%
Mannitol	0.6M	0.6M	0.6M

表-3. 各クローンごとの多芽形成数の比較

精英樹名	葉条切片数	平均多芽形成数	標準偏差
札郷4	9	19	5.4
野尻5	10	8.2	6.5
野尻7	13	11.2	7.4
多賀1	21	16.1	9.1
富士4	8	6.5	3.9
大月3	15	19.9	7.2
安倍2	4	3.5	1.3
沼田2	6	2.3	1.2
河内3	15	12.5	7.3
久野3	19	7.7	6
宇治1	25	20.5	6.6
大田原2	20	19.5	10.4
久慈3	12	8.5	5.2
久慈5	19	5.8	3.5
久慈6	16	7.1	2.8
札郷2	8	2.8	1.3
富士5	17	6.4	2.3
鎌沢4	6	2.7	1.6
三保4	11	4.4	2.3
鬼沼7	20	11.4	3.2
久慈7	12	9.2	6.3

注: 札郷4号から大田原2号までは2007年9月採取, 久慈3号以降は2008年7月採取の葉条切片を使用。2007年採取の場合は培養4ヶ月、2008年の場合は3ヶ月目の多芽体を用いて計数。平均多芽形成数は、1つの葉条切片に生じた芽の数の平均。

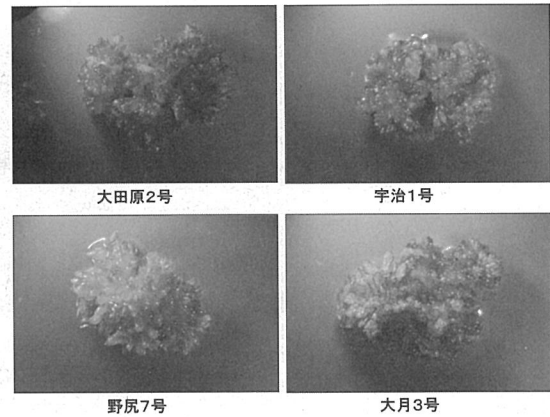


図-1. 葉条切片からの多芽体形成の例

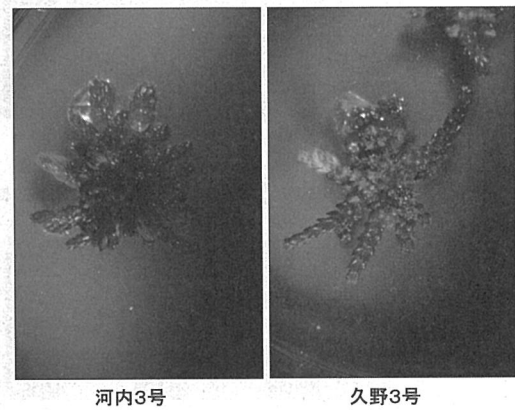
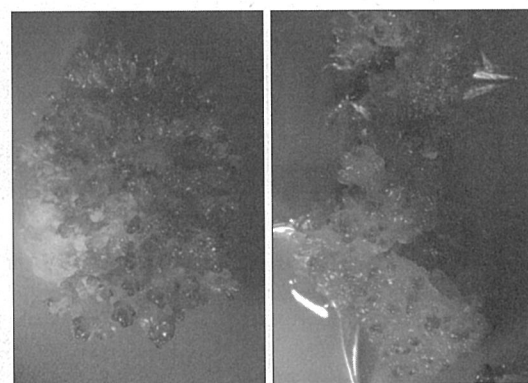


図-2. 植物ホルモンを除いた改変 MS 培地上で伸長するシュート



① MS(-H<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)+2,4D3 $\mu$ M,BAP1 $\mu$ M ⑦ MS(-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)+2,4-D0.6 $\mu$ M,BAP6 $\mu$ M

図-3. 異なる培地上で増殖する多芽体 (久慈7号)

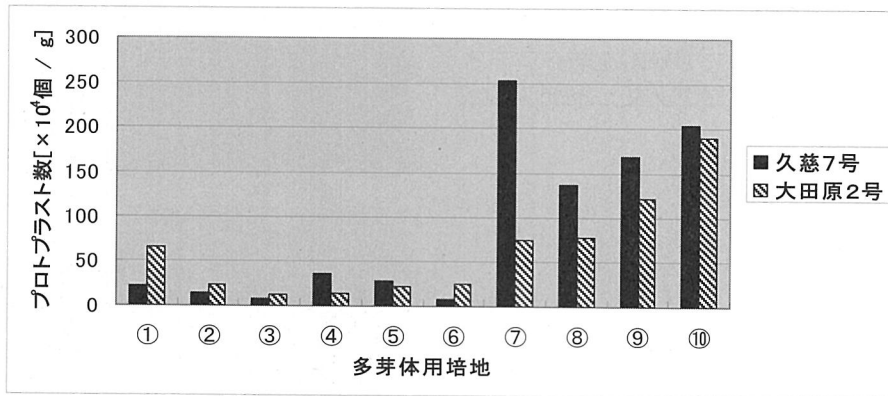


図-4. 培地別にみたプロトプラスト収量

注：多芽体組織をC酵素液で処理した場合。

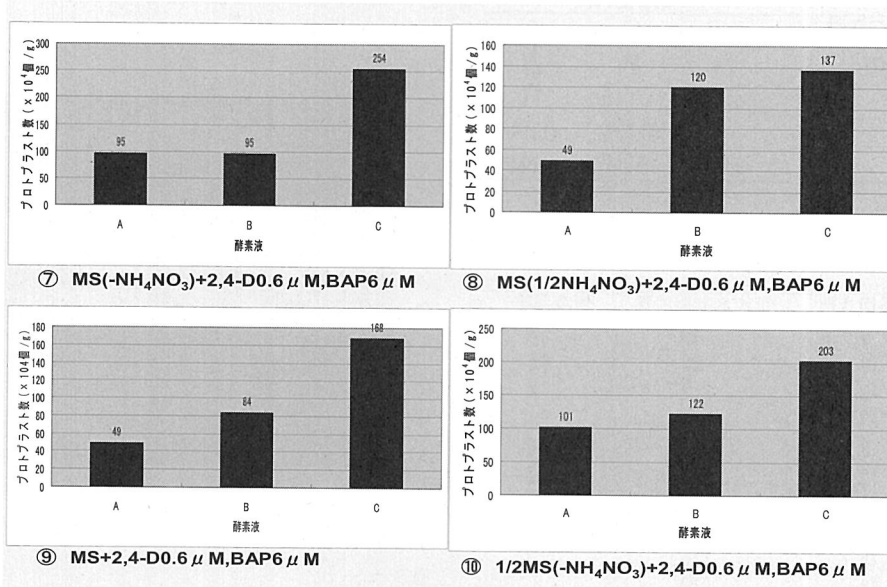


図-5. 酵素液の違いによるプロトプラスト収量の差 (久慈7号)

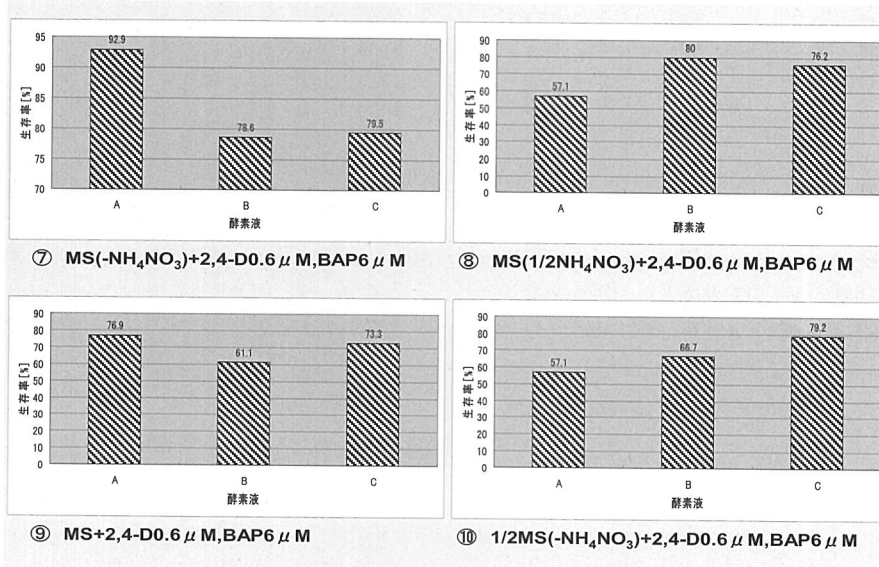


図-6. 単離されたプロトプラストの生存率の例 (久慈7号)