

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

細井佳久・丸山エミリオ毅 (森林総合研究所)

要旨:クロマツ (*Pinus thunbergii*) は、我が国において林業上重要な樹種であるが、マツ材線虫病による被害が著しい。そこで、線虫抵抗性個体作出の基盤技術の一つとして、プロトプラスト培養による植物体再生実験を試みた。プロトプラスト単離の材料には、未熟な種子胚から誘導した胚形成能力を持つ培養細胞 (不定胚形成細胞) を用いた。誘導した細胞の維持・増殖用には、無機塩を 1/2 濃度に下げた EM 培地 (5) に、1% ショ糖、10mM グルタミン、0.3% ゲランガム、10 μ M 2,4-D、5 μ M BAP をそれぞれ添加した固形培地を用いた。プロトプラストの単離には、0.5M マンニトール、1.5% セルラーゼオノズカ RS (Yakult)、0.15% ペクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman) を添加した酵素液を用いた。その結果、直径約 10 μ m から 60 μ m のサイズのプロトプラストが単離され、その生存率は 80-90% であった。単離したプロトプラストは、96 ウエルプレートを用いて 25 $^{\circ}$ C、暗黒下で静置培養した。培養には、マンニトールと植物成長調節物質を組み合わせた 2 種の液体培地を用いた。その結果、培養開始 2、3 日目から細胞壁を再生し、約 10 日目には、無機塩を 1/2 濃度にし、硝酸アンモニウム無添加の MS 培地に 0.05% カゼイン加水分解物を添加した培地で培養した場合のみ、分裂増殖がみられた。分裂した細胞は、その後、不定胚形成細胞に再分化した。得られた細胞を増殖させ、分子量の異なるポリエチレングリコールを添加した 2 種の不定胚成熟用の固形培地に移植した。その結果、両培地で不定胚の成熟がみられた。成熟した不定胚は、発芽用の固形培地に移植すると子葉部が緑色を呈して伸長し、いくつかの不定胚では幼根部も伸長した。

キーワード:クロマツ、プロトプラスト、不定胚、マツ材線虫病

I はじめに

クロマツ (*Pinus thunbergii*) は、日本において主要な針葉樹の一つであるが、マツ材線虫病による被害が甚大であり、線虫抵抗性を持つ優良個体の作出が期待されている。我々は、木本植物において、生物工学的手法を用いた組換え個体や優良個体等の作出・選抜・増殖を目指している。本樹種についても、エレクトロポレーション法などによる遺伝子組換えや、変異細胞の選抜による優良個体作出を行うことは意義のあることだと考えられる。そこで今回は、クロマツについて、その基盤技術の一つとなる細胞培養系の確立を目指し、不定胚形成細胞からのプロトプラストの単離と、その培養を行った。

II 実験方法

1. 不定胚形成能力を持つ細胞塊の誘導と継代培養
種子の採取には、茨城県林業技術センター内に生育するクロマツを用いた。種子表面の殺菌は、2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 分浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄して行った。その後、種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体を不定胚形成細胞誘導用の培地に置床した。直径 90mm のプラスチックペトリディッシュを用い、培地には、無機塩を 1/2 濃度に下げた EM 培地に、1% ショ糖、10mM グルタミン、0.3% ゲランガム (MP Biomedicals,

Inc.)、10 μ M 2,4-D、5 μ M BAP をそれぞれ添加した固形培地を用いた。培養は暗黒下、25 $^{\circ}$ C で行った。誘導後の不定胚形成能力を持つ細胞塊は、誘導時の培地と同一の培地、培養環境で維持・増殖させた。

2. プロトプラストの単離
プロトプラストの単離には、継代培養後、約 10 日目の細胞塊を用いた。単離のための酵素液としては、浸透圧調節剤として 0.5M マンニトール、1.5% セルラーゼオノズカ RS (Yakult)、0.15% ペクトリアーゼ Y-23 (Kikkoman) を添加したものをを用いた。酵素処理は、酵素液 40ml が入った 100ml フラスコを用い、約 500lx 蛍光灯照明下、25 $^{\circ}$ C で静置して行った。酵素処理後のプロトプラストの回収方法としては、まず 30 μ m ナイロンメッシュで濾して組織片を除去したものを、0.5M マンニトールで 2 回遠心・洗浄し、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 (1) を用いた。

3. プロトプラストの培養
単離したプロトプラストは、96 ウエルプレートを用いて、25 $^{\circ}$ C、暗黒下で静置培養した。培地として、1 ウエルあたり 50 μ l の液体培地を分注して用いた。培地には、無機塩濃度を 1/2 にした EM

Yoshihisa Hosoi and Tsuyoshi Emilio Maruyama (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Somatic embryogenesis and germination through protoplast culture in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*).

培地と、無機塩を1/2濃度にし、硝酸アンモニウム無添加のMS(6)培地に0.05%カゼイン加水分解物を添加した培地を用いた。浸透圧調節剤としてマンニトールを用い、0.2Mから0.5Mまで0.1Mずつ変化させて培地に加えた。植物生長調節物質として、2,4-Dを0.1 μ Mから30 μ M、BAPを1 μ Mから10 μ Mまで変化させて組み合わせ、培地に添加した。培養密度は、 2×10^3 プロトプラスト/mlに調整した。

4. 不定胚の成熟・発芽 増殖した分裂細胞は、不定胚の成熟用培地に移植した。培地としては、無機塩濃度を1/2としたEM培地に、10mMグルタミン、100 μ M ABA、6%マルトース、0.2%活性炭、0.3%ゲランガム、10%ポリエチレングリコールを添加した培地を用いた。培地上には、約500mgFWの不定胚形成細胞を置床して培養した。培養は暗黒下、25 $^{\circ}$ Cで行った。培地上に形成された不定胚は、その後、発芽用に、硝酸アンモニウム無添加で、他の無機塩濃度を1/2にしたMS培地に、2%ショ糖、0.6%寒天を加えた培地上に移植した。培養は16時間蛍光灯照明下、25 $^{\circ}$ Cで行った。

III 結果と考察

1. プロトプラストの単離について 酵素処理約5時間後にプロトプラストを精製し、回収した。直径は10 μ mから60 μ mとばらつきがあった(図-1)。これは、不定胚形成能を持つ分裂活性の高い緻密な細胞と、サスペンサーに分化する長大な細胞のプロトプラストが混在するためと思われる。収量は、約 2.5×10^4 プロトプラスト/gFWであった。分裂活性の高い緻密な不定胚細胞は、細胞同士の結びつきが強く、なかなかプロトプラスト化しなかった。今後、用いる酵素の種類や濃度を変えて、さらに単離効率のよい酵素条件を調べる必要がある。生存率については、80-90%であった。

2. プロトプラスト培養について 使用した2種の培地とも、プロトプラストは、培養開始後2,3日で細胞壁を再生し、変形・肥大成長した。しかし、その後分裂が見られたのは、無機塩を1/2濃度にし、硝酸アンモニウム無添加のMS培地に0.05%カゼイン加水分解物を添加した培地のみであった(図-2)。培養開始3週間目には、分裂細胞のうち、いくつかサスペンサー細胞と、不定胚形成能を持つ細胞塊から成る不定胚形成細胞に再分化した(図-3)。

3. マンニトール濃度が不定胚形成細胞の再分化に与える影響 マンニトール濃度については、0.2Mまで下げた場合、0.3 μ Mの2,4-D、1 μ MのBAPを組み合わせで添加した培地で最高7個の不定胚形成細胞を得ることができた(表-1)。筆者らは、スギ、ヒノキ、サワラなど

の針葉樹でもプロトプラスト培養を行ってきたが、浸透圧調節剤としては、マンニトールを0.6M程度の濃度で実験している(2, 3, 4)。0.2Mという浸透圧は、プロトプラスト培養としては、かなり低い浸透圧であり、細胞が破裂してしまう場合も多く、今回のクロマツ不定胚形成細胞は、特徴的な反応を示した。

4. 不定胚形成細胞の増殖・継代培養 得られた不定胚形成細胞は、増殖・継代培養のため、直径90mmペトリディッシュ内に分注した。不定胚形成細胞誘導用の培地と同一組成の培地を用いて、25 $^{\circ}$ C、暗黒下で培養し、次の不定胚成熟実験のための材料とした。

5. 不定胚の成熟・発芽

不定胚形成細胞を成熟用培地に移植し、約6週間後に形成した成熟不定胚数を表-2に示した。ポリエチレングリコールは、平均分子量3,000と7,500のものを使用した。不定胚形成数はペトリディッシュあたり60個程度と、大きな違いはみられなかった。次に成熟させた不定胚を発芽用培地に移すと、子葉部は緑色を呈して伸長した。しかし、幼根部は正常に伸長するものが少なく、培養法をさらに改善する必要がある。

引用文献

- (1) 平井篤志・内宮博文・杉浦昌弘(1982) 生物化学実験法 16 植物細胞培養育種入門 学会出版センター(東京)38p.
- (2) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明(2005) ヒノキのプロトプラスト培養による不定胚の再分化 日本植物細胞分子生物学会大会 講要 23: 91
- (3) HOSOI Y, MARUYAMA E, ISHII K (2005) Recovery of somatic embryos and plants from protoplast cultures of SAWARA cypress (*Chamaecyparis pisifera*) IUFRO Tree Biotechnology S7.15p
- (4) 細井佳久(2006) プロトプラスト培養によるヒノキ、サワラ培養細胞の反応の比較 日林関東支論 57: 167-168
- (5) MARUYAMA E, HOSOI Y, ISHII K, MOROHOSHI N (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) Plant Biotechnology 17: 281-296
- (6) MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures Physiol. Plant. 15: 473-497

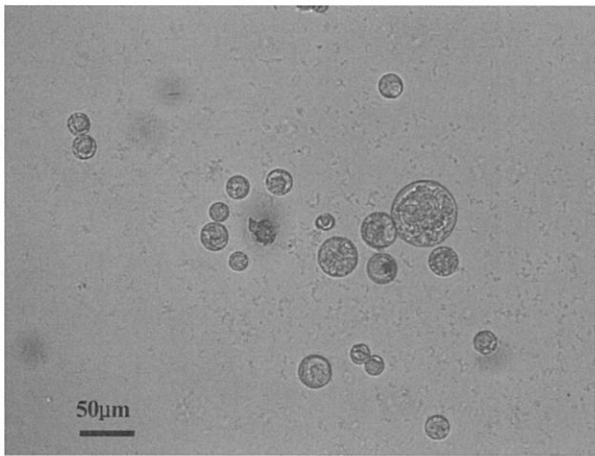


図-1. 単離したクロマツプロトプラスト

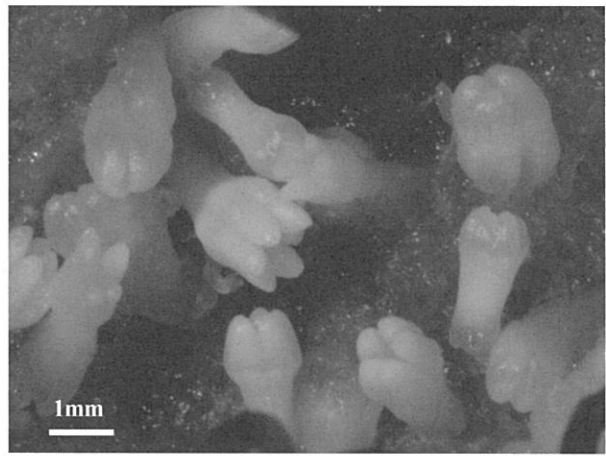


図-4. 成熟培地上で得られた不定胚

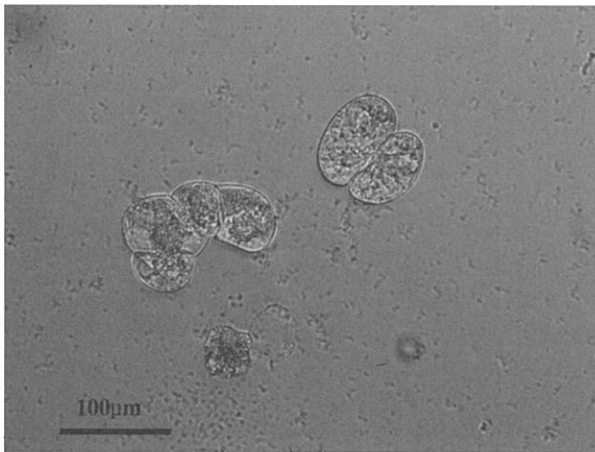


図-2. 培養開始10日目の分裂細胞

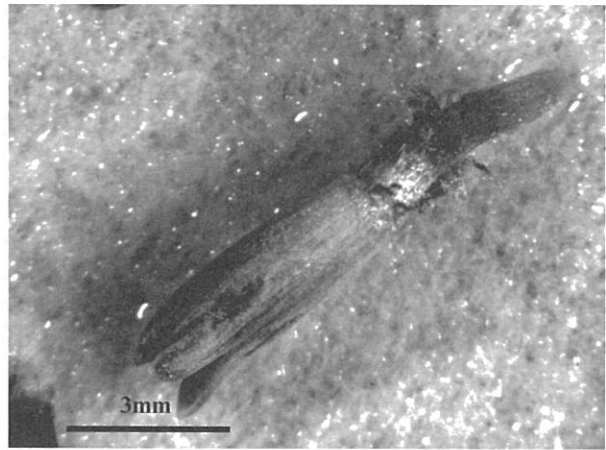


図-5. 発芽培地上で伸長成長する不定胚

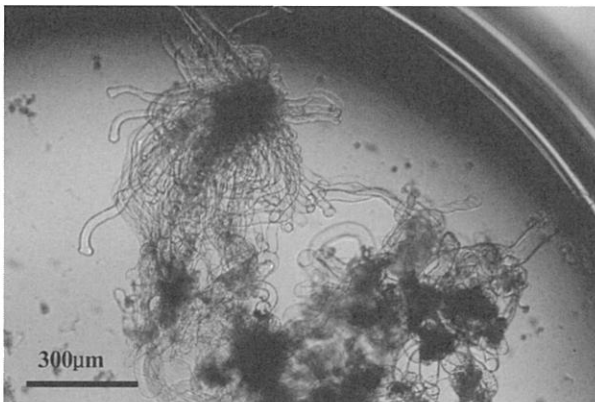


図-3. 分裂増殖するプロトプラスト由来不定胚形成細胞

表-1. 異なるマンニトール濃度と植物生長調節物質を用いた場合の不定胚形成細胞数

0.2M Mannitol		2,4-D [μ M]					
BAP [μ M]	0.1	0.3	1	3	10	30	
0	1	2	2	3	3	3	
1	1	7	3	5	6	3	
3	0	5	1	3	6	2	
10	1	2	2	6	2	1	

0.3M Mannitol		2,4-D [μ M]					
BAP [μ M]	0.1	0.3	1	3	10	30	
0	0	0	2	0	1	1	
1	0	2	3	2	3	4	
3	3	1	2	1	4	2	
10	1	2	2	1	1	1	

0.4M Mannitol		2,4-D [μ M]					
BAP [μ M]	0.1	0.3	1	3	10	30	
0	0	1	0	1	0	2	
1	1	2	3	2	4	1	
3	0	1	1	1	1	0	
10	0	0	1	2	4	3	

0.5M Mannitol		2,4-D [μ M]					
BAP [μ M]	0.1	0.3	1	3	10	30	
0	0	0	0	1	0	1	
1	2	0	0	1	0	1	
3	0	0	1	3	0	0	
10	0	1	0	0	0	1	

表中の数値：分化した不定胚形成細胞数/4well（培養開始3週間後に測定）

基本培地：1/2MS(-NH₄NO₃) + 0.05%カゼイン加水分解物

表-2. 不定胚成熟用に平均分子量の異なるポリエチレングリコール(PEG)を添加した場合の不定胚形成数

	培地 A	培地 B
添加物	グルタミン	10mM
	アブジジン酸 (ABA)	100 μ M
	マルトース	6%
	活性炭	2%
	ゲランガム	3%
	10% PEG MW = 3,000	10% PEG MW = 7,500
不定胚数	60.3 (16.7)	62.8 (15.0)

* 基本培地は無機塩濃度を 1/2 にした EM 培地

* 不定胚数は 4 回繰り返し測定の平均値、括弧内は標準偏差