

ヤツガタケトウヒのプロトプラスト培養による不定胚の形成と発芽

細井佳久・丸山 E. 毅・勝木俊雄 (森林総合研究所)

要旨：ヤツガタケトウヒについて、プロトプラストの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。単離したプロトプラストは、96ウェ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。培養により細胞壁を再生し、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、培地組成の異なる2種的不定胚成熟用の固形培地に移植した。その結果、両培地で90mmペトリディッシュあたり1,000個以上の成熟した不定胚が形成された。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、幼根部の伸長も観察された。

キーワード：ヤツガタケトウヒ、絶滅危惧種、プロトプラスト、不定胚

Abstract : Plantlet regeneration from protoplasts of *Picea koyamae* has been tested. Embryogenic cells for protoplast isolation were obtained from an immature zygotic embryo. Embryogenic cells were subcultured on 1/2EM medium containing 1% sucrose, 10mM glutamine, 0.3% gellan gum, 10 μ M 2,4-D, 5 μ M BAP. Protoplasts were isolated in an enzymatic solution containing 0.5M mannitol, 1.5% Cellulase Onozuka RS, 0.15% Pectolyase Y-23. Isolated protoplasts were cultured in 2 liquid media containing 0.5M mannitol, 3% sucrose and various combinations of 2,4-D and BAP in 96 well-plates. After 2 weeks of culture cell division and colony formation was observed. Regeneration of embryogenic cells from colonies was observed after culture of 4 weeks. After transfer to maturation media more than 1,000 somatic embryos regenerated on 90mm plastic petri dishes. Obtained somatic embryos were transferred on germination medium without plant growth regulators. After transfer to the medium germination of somatic embryos was observed within one week.

Keywords : *Picea koyamae*, endangered species, protoplast, somatic embryo

I はじめに

ヤツガタケトウヒ (*Picea koyamae*) はマツ科の常緑針葉樹で、八ヶ岳や南ア北部のごく限られた地域にしか分布しておらず、絶滅が危惧されている。我々は、現在まで種子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）を使って現地外での遺伝資源保存を目指し、ヤクタネゴヨウ (*Pinus armandii* var. *amamiana*) などのマツ科樹種について植物体再生系の開発を行ってきている (5)。同様に、ヤツガタケトウヒについても不定胚を経由した個体再生について実験を進めている (6)。また、本樹種はトウヒ属に分類され、利用面において建築材を含め、潜在的な利用価値を有している。そのため将来、生物工学的手法を用いた遺伝子組換えを行い、選抜した優良個体を大量増殖させることも意味があると考えられる。今までに、外国産のトウヒ属樹木では不定胚形成細胞

からの植物体再生についていくつかの報告 (2) があり、プロトプラストからの植物体再生についての報告 (1) もなされているが、国産のトウヒ属についてプロトプラスト培養による植物体再生の報告はない。今回は、ヤツガタケトウヒについての基礎的な細胞培養方法の開発を目的とし、種子胚から誘導した不定胚形成細胞を用いてプロトプラスト培養による植物体再分化系の確立を目指して実験を行った。

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 実験に用いた種子は、2009年8月上旬に長野県八ヶ岳の西岳国有林に生育している個体から採取した。種子表面の殺菌は、99.5%エタノールに3分間浸し、次に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

Yoshihisa Hosoi, Tsuyoshi E. Maruyama, and Toshio Katsuki (Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan) Somatic embryogenesis and germination through protoplast culture in Yatsugataketouhi (*Picea koyamae*).

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(4)に、1%ショ糖、10mMグルタミン、0.3%ゲランガム(MP Biomedicals, Inc.)、 $10\mu\text{M}$ 2,4-D、 $5\mu\text{M}$ 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°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、15日目の細胞塊約10gFW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%セルラーゼオゾブカ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°C で静置して行った。処理後、プロトプラストを含む酵素液を、まず $95\mu\text{m}$ ナイロンメッシュで濾して未消化組織を除去し、さらに $62\mu\text{m}$ ナイロンメッシュで濾して遠心機にかけた。遠心後に沈殿物として残ったプロトプラストは、0.5M マンニトールで2回遠心・洗浄し、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。遠心用の容器には50ml遠心チューブを用いた。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(3)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ウェルプレートを用いて、 25°C 、暗黒下で静置培養した。培地として、1ウェルあたり $50\mu\text{l}$ 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培地を用いた。また、浸透圧調節剤として0.5M マンニトールを添加した。植物生長調節物質として、2,4-Dを $0.1\mu\text{M}$ から $30\mu\text{M}$ 、BAPを $1\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ まで変化させて組み合わせ、培地に添加した。培養密度は、 10^3 プロトプラスト/mlに調整した。

4. 不定胚形成細胞の増殖・継代培養 プロトプラスト培養で得られた分裂細胞は、増殖・継代培養のため、直径90mmのペトリディッシュで培養した。培地には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°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 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、10mMグルタミンを添加し、無機塩を1/2濃度に下げたEM培地(A)と、硝酸アンモニウム濃度を1/4、他の無機塩濃度を1/2としたMS(7)培地(B)の2種の培地に、それぞれ

μM のABA、3%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(和光:平均分子量3,000)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、葉さじで薄く延ばしながら置床して培養した。培養は暗黒下、 25°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、硝酸アンモニウム濃度を1/4、他の無機塩濃度を1/2とした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°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 $20\mu\text{m}$ から $60\mu\text{m}$ 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。収量は非常に少量で、約 10^3 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。プロトプラスト収量が少ないのは、針葉樹の不定胚形成細胞では一般的な傾向ではあるが、今回材料に用いたヤツガタケトウヒの不定胚形成細胞では、よりその傾向が強かった。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 プロトプラストは、培養開始後1週間ほどで細胞壁を再生し、変形・肥大成長した(図-2)。培養開始4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)。ただし、得られた細胞数は少なく、培養条件の検討が必要である(表-1)。また、植物生長調節物質の組み合わせや濃度による分裂効率の違いは、はっきりしなかった。プロトプラスト培養の場合、それぞれ分裂に適した培養密度があるのが一般的であるが、今回は単離で得られたプロトプラスト数が少なく、培養密度については検討できなかった。そのためにもプロトプラスト収量を上げる酵素組成の検討が必要である。得られた不定胚形成細胞のうち、2,4-D $30\mu\text{M}$ とBAP $3\mu\text{M}$ の組み合わせで得られた分裂細胞をその後の実験に用いた。

3. 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。2種の培地を比較すると、無機塩を1/2濃度に下げたEM培地(A)を用いた場合の方が多くの不定胚を得ることができ、その平均は1,404個であった。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、幼根部の伸長が見られた。ただし、根部の伸長は1 cm程度で止まる場合が多く、培地組成を含め、培養法をさらに改善する必要がある。

IV 参考文献

- (1) Attree, S. M., Dunstan, D. I., Fowke, L. C., (1989) Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*) Nature biotechnology 7: 1060-1062
- (2) Gupta, P. K., Grob, J. A., (1995) Somatic embryogenesis in conifers. In: Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (Eds.), Somatic embryogenesis in woody plants Vol.1., Kluwer academic publishers, Netherlands., pp. 81-98
- (3) 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.
- (4) MARUYAMA E, HOSOI Y, ISHII K, MOROHOSHIN (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
- (5) MARUYAMA E, HOSOI Y, ISHII K (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43: 28-34
- (6) 丸山 E. 毅・細井佳久・勝木俊雄 (2011) 不定胚形成によるヤツガタケトウヒの個体再生 関東森林研究 62: 127-130
- (7) MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures Physiol. Plant. 15: 473-497

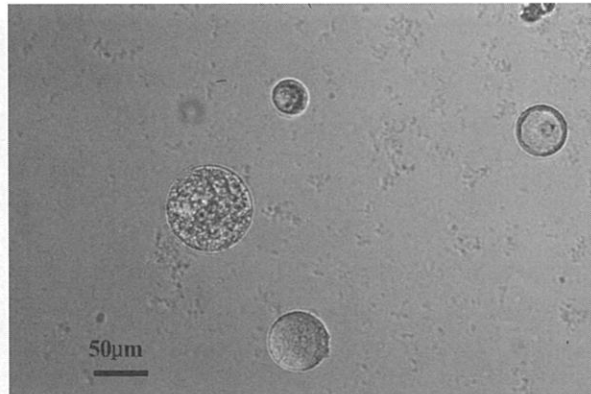


図-1. 単離したプロトプラスト

Fig 1 Freshly isolated protoplasts

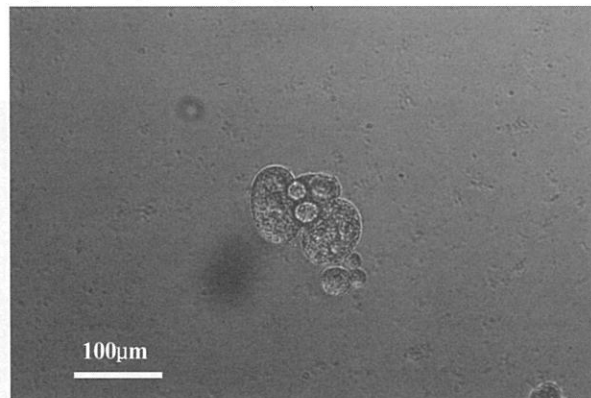


図-2. 培養開始2週間目の分裂細胞

Fig 2 Dividing cells after 2weeks of culture

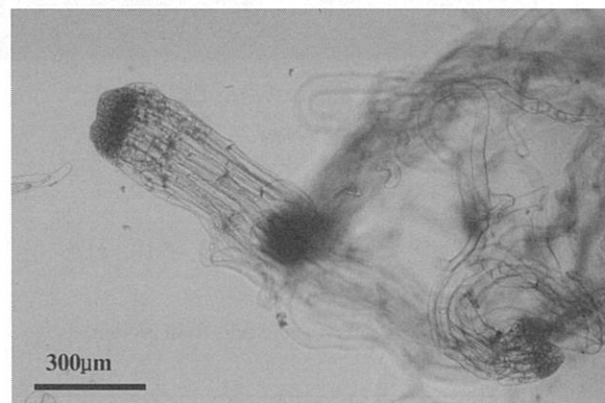


図-3. 分裂増殖するプロトプラスト由来不定胚形成細胞

Fig 3 Regenerated embryogenic cells via protoplast culture

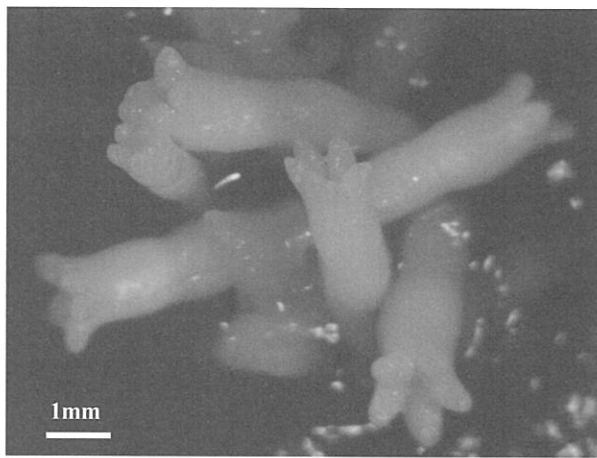


図-4. 成熟培地上で得られた不定胚

Fig 4 Induction of somatic embryos

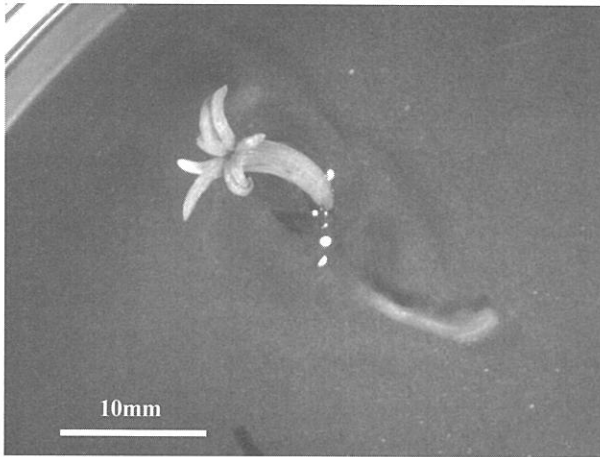


図-5. 発芽培地上で伸長成長する不定胚

Fig 5 Germinated somatic embryo

表-2. 2種の成熟用培地で得られた不定胚数

Table 2 Obtained somatic embryos on 2 media for maturation

培地	成熟不定胚の形成数
A	1,404 (209)
B	990 (36)

*各数値は3ペトリディッシュの平均値, 括弧内は標準偏差

表-1. プロトプラストから分裂増殖し、形成された不定胚形成細胞数

Table 1 Regenerated embryogenic cells from protoplasts

BAP [μ M]	2,4-D [μ M]					
	0.1	0.3	1	3	10	30
0	0.8	0	0.2	0.4	0.4	0.2
1	0.4	0.6	0.4	1.2	0.6	0.4
3	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	1.0
10	0.2	1.2	0.6	0.6	0.8	0.6

*各数値は5ウェルの平均値