

オオシマザクラ生葉からの最適なシート再生条件の検討

An optimum culturing condition for shoot regeneration from leaves of *Prunus speciosa*

横田智^{*1}

Satoru YOKOTA^{*1}

* 1 森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, 305-8687

要旨：シート再生は遺伝子組換えの重要なステップである。本論文では、オオシマザクラ生葉からの最適なシート再生条件について検討した。シート再生培地には、さまざまな濃度のベンジルアデニン(BA)と 0.5 μM ナフタレン酢酸(NAA)を添加した。生葉は、中肋に 5 カ所の傷を付け、さらに先端と両端を切除して培養した。その結果、培養開始の 8 週間後から、シート再生が見られるようになった。最も高い再生率は 40% で、20 μM BA と 0.5 μM NAA を添加した培地で得られた。また、2 つのクローン間で著しいシート再生率の違いが見られた。

キーワード：シート再生、生葉、遺伝子型、オオシマザクラ

Abstract: Shoot regeneration is a key step in the application of genetic engineering techniques for improvement of trees. In the present work, an optimum culturing condition of shoot regeneration from leaves was studied for *Prunus speciosa* Nakai. Regeneration media were supplemented with various concentrations of benzyladenine (BA) and α-naphthaleneacetic acid (NAA). Each leaf was cut five times perpendicular to the midrib, and the apex and both edges of leaf were excised before culture. Eight weeks after the initiation of culture, adventitious shoots developed from callus which formed on the leaf explants. The highest regeneration percentage was 40%, which was obtained on the medium with 20 μM BA and 0.5 μM NA. Furthermore, shoot regeneration from leaf explants varied significantly between two clones.

Keywords: shoot regeneration, leaf, genotype, *Prunus speciosa*

I はじめに

いわゆるサクラとは、バラ科サクラ属の植物のうち、ウメ、モモ、アンズなどを除いた総称であり、サクラ亜属に属するものを指す。園芸上、サクラは重要な位置を占め、伝統的な育種法によって、花の色、大きさ、花弁の数などに変異がある園芸品種が生み出されてきた。

しかしながら、樹木の1世代の長さは、人工交配などの伝統的な育種法にとって大きな障害になっている。これに対して遺伝子組換え技術は、目的の遺伝子を樹木のゲノム中に素早く導入することが可能で、育種年限の短縮につながる。この技術によって、サクラにも新たな形質を付与することが期待できる。実際に、アンズやスマモでは遺伝子組換えによってウイルス耐性のものが作られている（3, 8）。

シート再生は遺伝子組換えの重要なステップである。モモ、アンズなどのサクラ属樹木では、この技術は確立している。しかし、多くのサクラ亜属の樹木では、セイヨウミザクラを除いていまだに確立されていない（2）。

オオシマザクラは、伊豆大島をはじめとする伊豆諸島

に分布し、大きめの白い花を着け、開花と同時に緑色の若葉を展開する。また、ソメイヨシノはオオシマザクラとエドヒガンの自然交配種であるとされている（9, 10）。さらに、オオシマザクラからは変異型である園芸品種が多く生み出されており（4），オオシマザクラの遺伝子組換え技術は、変異の原因遺伝子の解明やさらなる形質の改良に寄与すると思われる。

この研究の目的は、オオシマザ克拉生葉からのシート再生の効率を高めるため、最適な条件を明らかにすることであり、この後の遺伝子組換え研究につなげることである。

II 材料と方法

1. 植物材料と生葉の調製

オオシマザ克拉の生葉は、人工気象室（面積 2.4 × 3.4 m²、高さ 2.4 m、光量子束密度 200 μM m⁻² s⁻¹、日長 14 時間、温度 25/20°C（明期/暗期）相対湿度 75±7%）で栽培している 2 クローン（PS-YS05, PS-YS08 個別の実生苗に由来）から採取した。ただし、PS-YS05 は遺伝子型の影

響を比較した実験にのみ使用した。実験には、展開が終わった比較的若い葉を用いた。

生葉は 0.2% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウムで 1 分間滅菌し、滅菌水で 4 回ゆすいだ。その後、葉の中肋に 5 カ所、医療用メスで傷を付け、さらに先端と左右両端を切除した（図-1a）。調製済みの葉は、シート再生用培地を入れたシャーレ（直径 90 mm、深さ 20 mm）に、おもて面を下にして並べた。

2. シートの再生実験

シートの再生には木本植物用培地（6）を用い、2% (v/v) スクロース、0.5% (w/v) アガーゲルTM（シグマ・アルドリッヂ、セントルイス、ミズーリ）に加え、5～30 μM に濃度を変えたベンジルアデニン(BA)，あるいは 20 μM チジアズロン (TDZ) を 0.5 μM ナフタレン酢酸 (NAA) と組合せて添加し、pH を 5.8 に調製した。個々の処理にはシャーレ 10 枚を用意し、1 枚のシャーレに 2 つの外植体（生葉）を入れた（図-1a）。合計 20 個の外植体をひと組として、上記実験を 3 回繰り返した。

培養は、25°C、16 時間日長、光量子束密度 20 μM m⁻² s⁻¹（培養開始後 2 週間は 0.5 μM m⁻² s⁻¹）で行った。2 週間に同じ組成の培地で継代培養し、10 週間経過後に再生したシート数を調べた。シート再生率は、供試外植体に対するシート再生した外植体の割合とした。

III 結果

1. 生葉からのシート再生

培養開始から 2 週間後に葉の両端の切断部と中肋上の傷害部にカルスの形成が見られ、8～10 週間後に生葉からのシート再生が認められた（図-1b, 矢印）。シート再生の部位は、大部分が葉の両端の切断部に形成したカルスから生じているように見えたが（図-1c, 矢印）、まれに中肋上の傷害部に形成したカルスから生じたと見られるものもあった（図-1d, 矢印）。

2. シート再生の BA 濃度依存性

シート再生に最適な BA 濃度を決めるため、BA 濃度依存性を調べた（図-2）。その結果、20 μM BA と 0.5 μM NAA の組合せでシートの再生率が 40% で最も高く、有意であることが示された。しかし、30 μM BA ではシートの再生は生じなかった。

次に、再生したシート数を比較した。シート再生した外植体上には 1～3 本の再生シートが見られ、総数としては 20 μM BA と 0.5 μM NAA の組合せで最も多くなり平均 12.7 本であった。

3. BA と TDZ の比較

BA と TDZ はともに合成サイトカインであるが、サクラ属樹木でのシート再生実験では、BA よりも TDZ の効果が高いとしているものが多い（1, 5, 7, 12）。そこで、オオシマザクラのシート再生においても BA と TDZ の効果を比較した（図-3）。

20 μM BA、あるいは 20 μM TDZ を 0.5 μM NAA と組合せてシート再生に及ぼす影響を比較した。しかし、シート再生率、再生シート数とともに BA と TDZ の効果に有意差は認められなかった。

4. クローン間の比較

セイヨウミザクラの栽培品種では、遺伝子型によってシートの再生率が異なることが報告されている（1）。オオシマザクラの 2 つのクローン（PS-YS05, PS-YS08）で、遺伝子型によるシート再生を比較した（図-4）。

20 μM BA と 0.5 μM NAA の組合せで PS-YS05 のシート再生率は 1.7% であったが、PS-YS08 では 40% であり、クローン間で有意な差が認められた。また、再生シート数でも有意差が認められた。

IV 考察

オオシマザクラのシート再生には、8～10 週間を要した。4 週間程度でシートが再生すると報告されているセイヨウミザクラ（1）と比べると 2 倍以上の時間を要することになる。また、セイヨウミザクラでは、葉の中肋に形成したカルスからシートが再生する（1）とされているが、オオシマザクラでは中肋から再生するシートはわずかであり、生葉の両端を切除する調製が重要であると考えられた。

オオシマザクラのシート再生に適した植物ホルモン濃度は、20 μM BA と 0.5 μM NAA の組合せであることが示された。セイヨウミザクラでは、4.54 μM BA と 0.54 μM NAA の組合せがもっとも再生効率が高い（1）とされており、オオシマザクラは高濃度の BA を必要とすることがわかった。ただし、BA 濃度が 20 μM を超えると高濃度障害を生じるようである（図-2）。

サクラ属では BA よりも TDZ の方が、シートの再生効率が高いとしている報告が多い。しかし、セイヨウミザクラやスミノミザクラの栽培種では、TDZ よりも BA の方が有効であるとしている報告もある（11）。オオシマザクラでは、BA と TDZ の効果を比較した結果に有意差がなく（図-3），どちらを使用しても違ひはないと判断された。

MATT and JEHLE (7) は、セイヨウミザクラの栽培種のシート再生は遺伝子型に依存するとしている。オオシマザクラの2つのクローンでシート再生率を比較した結果も、クローン間に有意差があることが示された(図-4)。したがって、シートの再生率を高めるには、シート再生率の高いクローンを選抜することが重要であると考えられた。

この研究によって、オオシマザクラのシート再生に必要な外植体の調製法、培地の組成、培養条件、培養期間が明らかになった。さらに、シート再生は遺伝子型への依存が大きく、クローン選択の重要性が示された。

引用文献

- (1) BHAGWAT, B. and LANE, W.D. (2004) *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **78** : 173-181
- (2) CHEONG, E.J. (2012) Biotechnological approaches for improvement and conservation of *Prunus* species. *Plant Biotechnol Rep* **6** : 17-28
- (3) da CÂMARA MACHADO, M.L., da CÂMARA MACHADO, A., HANZER, V., WEISS, H., REGNER, F., STEINKELLNER, H., MATTANOVICH, D., PLAIL, R., KNAPP, E., KALTHOFF, B. and KATINGER, H. (1992) Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of plum pox virus. *Plant Cell Rep* **11** : 25-29
- (4) 本田正次 (1980) 栽培のサクラ (世界の植物 5).
- (5) LIU, X. and PIJUT, P.M. (2008) Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **94** : 113-123
- (6) LLOYD, G. and McCOWN, L.B. (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* **30** : 421-427
- (7) MATT, A. and JEHLE, J.A. (2005) *In vitro* plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Rep* **24** : 468-476
- (8) SCORZA, R., RAVELONANDRO, M., CALLAHAN, A.M., CORDTS, J.M., FUCHS, M., DUNEZ, J. and GONSALVES, D. (1994) Transgenic plums (*Prunus persica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep* **14** : 18-22
- (9) 竹中要 (1962) サクラの研究 (第1報) ソメイヨシノの起源. *植物学雑誌* **75** : 278-287
- (10) 竹中要 (1965) サクラの研究 (第2報) 続ソメイヨシノの起源. *植物学雑誌* **78** : 319-331
- (11) TANG, H., REN, Z., REUSTLE, G. and KRCZAL, G. (2002) Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Scientia Hort* **93** : 235-244
- (12) ZHOU, H., LI, M., ZHAO, X., FAN, X. and GUO, A. (2010) Plant regeneration from *in vitro* leaves of the peach rootstock 'Nemaguard' (*Prunus persica* × *P. davidiana*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **101** : 79-87

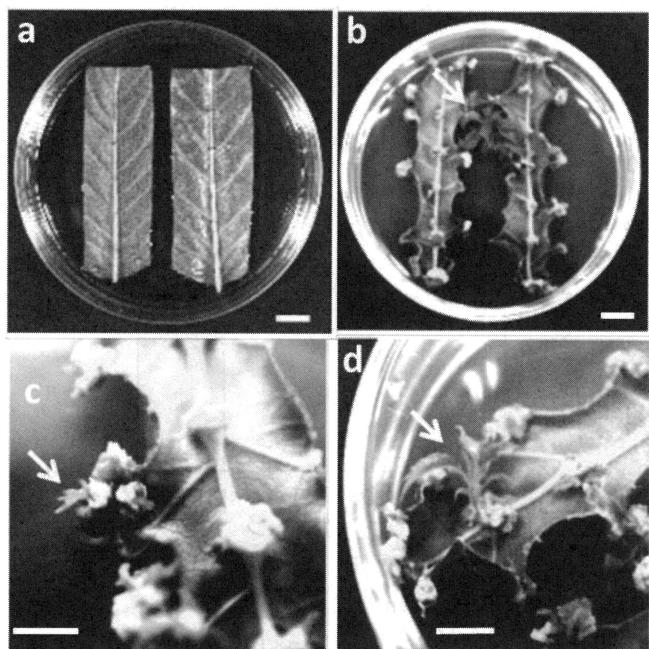


図-1. オオシマザクラ生葉からのシート再生

Fig. 1 Shoot regeneration from leaf explants of *Prunus speciosa*

(a) 中肋に5カ所キズをつけ先端と両端を切除了した生葉、(b, c) 切断された両端部付近から再生したシート、(d) キズをつけた中肋付近から再生したシート (スケール・バー=1 cm)

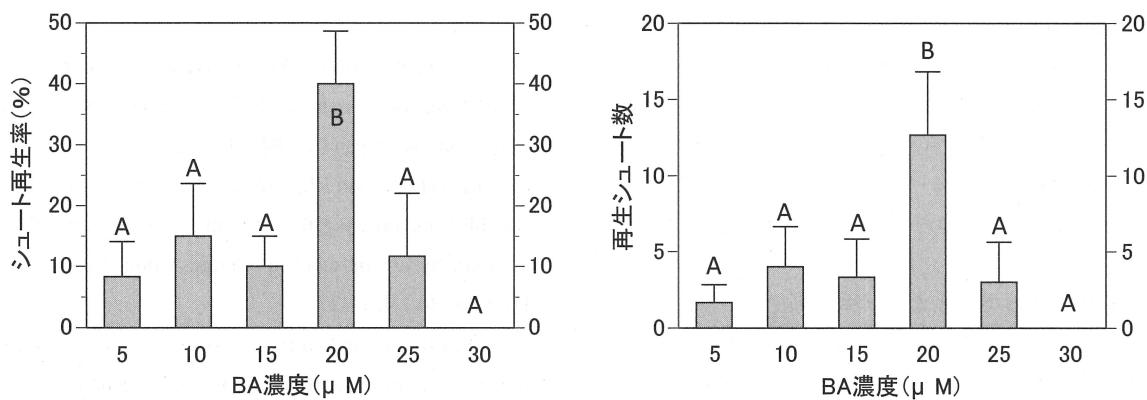


図-2. シュート再生の BA 濃度依存性

Fig. 2 Effects of different concentrations of BA on shoot regeneration

NAA: 0.5 μM, 平均値土標準偏差 (n=3), 異なる文字は処理間の有意差を表す (Tukey, p < 0.05)

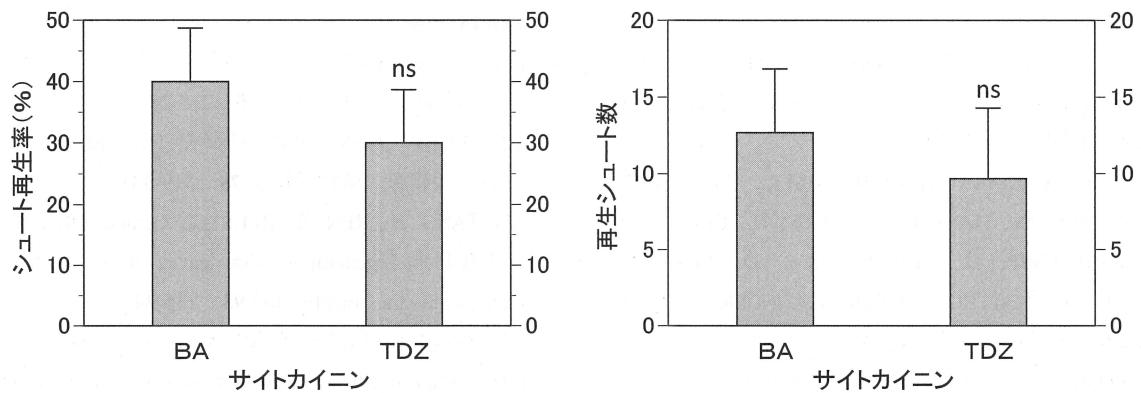


図-3. シュート再生に及ぼす BA と TDZ の影響

Fig. 3 Effects of BA and TDZ on shoot regeneration

BA: 20 μM, TDZ: 20 μM, NAA: 0.5 μM, 平均値土標準偏差 (n=3), ns (t検定, p > 0.05)

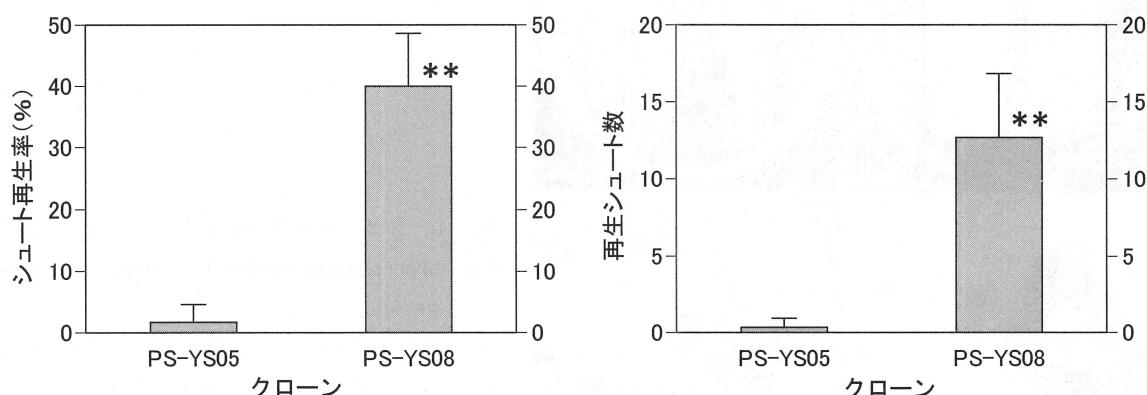


図-4. シュート再生に及ぼす遺伝子型の影響

Fig. 4 Effect of genotype on shoot regeneration

BA: 20 μM, NAA: 0.5 μM, 平均値土標準偏差 (n=3), ** (t検定, p < 0.01)