

## ヒノキ葉条からの多芽体・植物体再分化とサワラ葉条からの多芽体誘導

Multiple buds formation and plant regeneration from leaflets of *Chamaecyparis obtusa* and Multiple buds formation from leaflets of *Chamaecyparis pisifera*

細井佳久\*1・丸山 E. 毅\*1

Yoshihisa HOSOI\*1, Tsuyoshi E. MARUYAMA\*1

\* 1 森林総合研究所

\*1 Forestry and Forest Products research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8687

**要旨:** ヒノキ, サワラについてはスギやマツ同様, 種子胚から誘導した培養細胞を増殖させ, 不定胚を形成させることで植物体再生が可能となってきた。しかし, 種子胚ごとや親木により可否が大きく左右されるのが現状である。また, 再生個体は, 種子由来であるため, 遺伝的に親木とは異なる。今回は, ヒノキ, サワラについて硝酸アンモニウムを 1/2 濃度に下げた MS, LP, DCR の 3 種の基本培地にオーキシンとして 2,4-D 0.6  $\mu$  M, サイトカイニンとして BAP を 6  $\mu$  M 添加した寒天培地を用いて葉条切片からの多芽体の誘導効率を調べた。その結果, 個体による多芽体の形成効率に差が見られた。次に, 2,4-D 0.6  $\mu$  M, BAP を 6  $\mu$  M 添加し, 硝酸アンモニウムを 1/2 濃度に下げた MS 寒天培地で 10 年間継代培養により維持しているヒノキ多芽体について, 植物体再生の条件を調べた。まず, 多芽体を, 無機塩濃度を 1/2 濃度に下げ, ショ糖を 1% 添加した MS 寒天培地で 3 ヶ月間培養し, シュートを伸長させた。次に 1.5cm 程度のシュートを切り出し, シュート伸長用培地にオーキシンとして 3  $\mu$  M IBA を添加した発根用寒天培地に移植すると植物体を得ることができた。

**キーワード:** ヒノキ, サワラ, 多芽体, 組織培養, 不定胚

**Abstract:** Plant regeneration about Hinoki and Sawara cypress has been enabled by tissue culture through somatic embryogenesis using immature or mature zygotic embryos as well as Japanese red cedar and pines. However, the ability of regeneration greatly depends on every seed and tree. In addition, it is different from the parent tree hereditarily because the reproduction individual is of seed origin. We checked the formation efficiency of the multiple buds from leaf tips cultured on the agar nutrient medium which including 0.6 $\mu$ M of 2,4-D and 6 $\mu$ M of BAP about Hinoki and Sawara cypress. Three media, namely, MS which reduced ammonium nitrate to 1/2 concentration, LP and DCR employed for multiple buds formation. As a result, a difference was observed in the formation efficiency of the buds by the individual. Then, Culture condition of plant regeneration was checked using multiple buds of Hinoki cypress maintained by subculture on the MS medium which reduced ammonium nitrate to 1/2 concentration supplemented with 0.6 $\mu$ M of 2,4-D and 6 $\mu$ M of BAP for ten years. Shoot elongation was observed on MS medium reduced inorganic salt to 1/2 concentration which added 1% of sucrose after three months of culture. Elongated shoots were cut to approximately 1.5cm long and transplanted on a shoot elongation medium added 3 $\mu$ M of IBA for rooting. After rooting from the shoot tips, regenerated plants were acclimatized.

**Key-word:** *Chamaecyparis obtusa* Sieb. & Zucc., *Chamaecyparis pisifera* (Sieb. & Zucc.) Endl., Multiple buds, Tissue culture, Somatic embryo

## I はじめに

組織培養による針葉樹の植物体再生系の開発手段としては, 種子胚を培養することにより得られた細胞を利用して不定胚を形成させ, その不定胚を発芽させることで植物体を形成させる方法が一般的である。我々も国産針葉樹では, スギをはじめヒノキやマツ, トウヒなどにつ

いていくつかの樹種で再生系の開発研究を行っている(3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)。この場合, 増殖細胞の質にもよるが, 培養条件により 90mm シャーレあたり均質な不定胚が 1,000 から 2,000 個程度得られることもあり, 不定胚利用による植物体再生手法は, 優れた大量増殖方法であるといえる。しかし, 種子胚を利

用するため、遺伝子組成は種子ごとに異なり、もちろん親木そのもののクローンを増殖させることはできない。さらに、種子ごと、親木ごとに不定胚形成能力を持つ増殖細胞(不定胚形成細胞)を誘導できる効率が異なる。また、細胞の持つ不定胚形成能力は、数ヶ月から数年の後に低下するか消失してしまう場合がほとんどである。さらに、成熟した種子胚からは不定胚形成細胞を誘導することが困難な場合が多く、ある一定時期の未熟な種子を採取して材料とすることが多い。そのため、貯蔵種子を利用することが難しく、毎年のように未熟種子を採取し、増殖細胞の誘導を行う必要がある。スギやマツなどでは種子や実生以外の組織・器官から培養により植物体の大量増殖を行うことは非常に困難であるが、ヒノキでは葉条切片の培養により、多芽の形成が可能であることを以前報告した(4)。今回は、ヒノキに加え、サワラについて多芽体の形成条件について比較した。また、約10年間継代培養により維持しているヒノキの多芽体について、植物体再生条件を調べた。

## II 方法

**1. 多芽体誘導用葉条切片の調整と殺菌** 茨城県つくば市の森林総合研究所構内に植栽されている樹高約11m、胸高直径約30cmのヒノキ成木5個体と、樹高約13m、胸高直径約30cmのサワラ成木5個体について、葉条を約2cmに切り出して培養材料とした。採取は6月上旬に行った。殺菌は、まず100%エタノールで1分間浸漬して表面のワックスを取り除いた後、3%次亜塩素酸ナトリウムで40分間、ビーカー内で攪拌殺菌した。その後、滅菌水で30分間攪拌洗浄した後、固形培地に置床した。

**2. 多芽体誘導に使用した培地と培養方法** 培養には基本培地として、硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMS(16)と、LP(2)、DCR(1)の3種類の培地を用いた。0.7%寒天を加え、ショ糖は2%とし、植物生長調節物質として2,4-Dを0.6 $\mu$ M、BAPを6 $\mu$ M添加した。培養は、90mmプラスチックシャーレを用い、25 $^{\circ}$ C、16時間3,000lx蛍光灯照明下で行った。

**3. 10年間継代培養したヒノキ多芽体からのシュート伸長培養** 材料には、10年間、25 $^{\circ}$ C、16時間3,000lx蛍光灯照明下、90mmプラスチックシャーレ内で、2,4-Dを0.6 $\mu$ M、BAPを6 $\mu$ M添加し、硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMS寒天培地で、2ヵ月から3ヵ月ごとに継代培養した精英樹由来の多芽体を用いた。多芽体を約5mm角に切り出して培地に置床した。培地には1%ショ糖、0.7%寒天を添加し、無機塩濃度を1/2に下

げたMS固形培地を用いた。培養は、90mmプラスチックシャーレを用い、25 $^{\circ}$ C、16時間3,000lx蛍光灯照明下で行った。

**4. シュートの発根と植物体培養** 多芽体から得られたシュートについて、約1.5cmの長さで切り出して培養した。培地には1%ショ糖、0.7%寒天を添加し、無機塩濃度を1/2に下げたMS固形培地を用い、発根用にIBAを3 $\mu$ M添加した。培養は、90mmプラスチックシャーレを用い、25 $^{\circ}$ C、16時間3,000lx蛍光灯照明下で行った。発根が見られたシュートについては、100ml広口培養フラスコに移して培養した。培養には、発根用培地からIBAを除いた培地を用いた。

## III 結果と考察

**1. 実験材料の殺菌** それぞれの葉条切片についての殺菌効果を表-1に示した。個体ごとにかかなりのバラツキが見られたが、ヒノキのC個体においてコンタミネーション率が10%と低く、最も殺菌効率が高かった。今回試した次亜塩素酸ナトリウムの濃度を上げたり、処理時間を延ばしたりすると、葉条が褐変し、枯死するが増加した。この場合、次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性はヒノキ、サワラで大きな差はなかった。

**2. 多芽体の形成効率** コンタミネーション率を比較した個体のうち、ヒノキのA、C、D個体とサワラのc、d個体について形成効率を比較した(表-2)。多芽は、置床した葉条切片の先端部や鱗片葉の一部が肥大し、芽を形成しながら分裂増殖し、4ヶ月程度で形成された。それぞれ4個以上の多芽を形成した場合に多芽体として計数した。培地別に効率を比較すると、ヒノキのA個体についてDCR培地で培養した場合に形成効率が87%となり、最高値を示した。しかし、C個体をはじめ、培地による違いがはっきりしない場合も多かった。今回、多芽の形成数についての比較は行わなかったが、ヒノキに比べ、サワラでは明確な芽の形成が見られない場合があった。(図-1)。今回は、筆者らが以前から広葉樹や針葉樹の多芽の形成に利用している2,4-DとBAPの組み合わせと濃度で培養したが、濃度の組合せを変化させたり、異なるオーキシシン、サイトカイニンを使用することで、さらに分化効率を上げることが可能かもしれない。

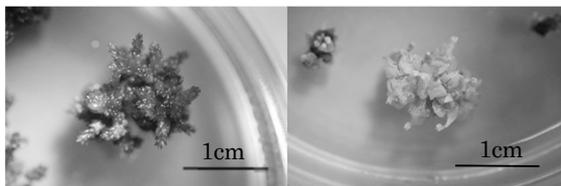
**3. 10年間継代培養後のヒノキ多芽体からのシュート伸長** シュート伸長用培地に置床すると、多芽は伸長し始め、約3ヶ月後には2cm程度に伸長した(図-2)。材料として精英樹5個体の多芽体を培養したが、すべての多芽体で伸長した。

**4. シュートの発根と植物体の再生・順化** 得られたシ

シュートは、約 1.5cm の長さで切り出し、発根用培地に移植した。培地へ移植後、2 ヶ月程度で発根が観察された。精英樹ごとのシュート発根効率について表-3 に示した。野尻 7 号で 74% が発根し、最高効率を示した。発根がみられたシュートは、100ml 培養広口フラスコに移植し、培養 5 ヶ月後にフラスコから出し、鹿沼土の入ったビニールポットで栽培した。はじめの 10 日間はラップをかけて栽培し、その後はラップをはずして栽培することで順化した(図-4)。

一般に不定胚を利用した培養では、誘導した不定胚形成細胞の分化能力の低下が大きな問題となっており、能力を保持した細胞の長期培養法や凍結保存技術の開発が行われている(17,18)。しかし、研究は途上であり、ヒノキやサワラでの研究報告はない。不定胚形成細胞の継代培養の間隔も 2 週間程度と短く、複数の系統を維持する場合、培地作成や継代作業にかなりの労力を必要とする。これに対し、多芽体の場合、継代培養間隔は 2 ヶ月程度で十分であり、10 年以上の植物体分化能力の維持が可能であることがわかった。

**IV 最後に** 今回行わなかったサワラ多芽体の植物体分化実験について、ヒノキの培養条件を比較参考として、いずれ行いたい。また、ヒノキ属だけでなく、他のヒノキ科の樹種にも林業上重要な種が多い。これら他の樹種についても機会があれば多芽体誘導の可否を調べたい。



ヒノキ (C)                      サワラ (d)

図-1. ヒノキとサワラの多芽の形態の違い

Fig.1 Difference of the multiple buds in the form of Hinoki and Sawara cypress

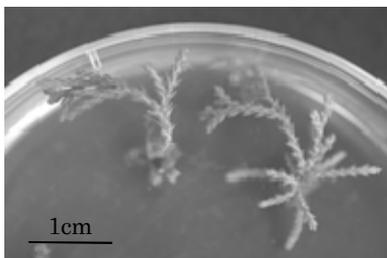


図-2. 多芽体から伸長したシュート(野尻 7 号)

Fig.2 Shoots extending from the multiple buds

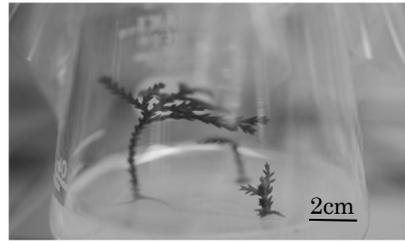


図-3. 切り出したシュートからの発根(野尻 7 号)

Fig.3 Rooting from the shoot tips



図-4. 順化中の植物体(久慈 7 号)

Fig.4 Plants in acclimatization

表-1. 個体によるコンタミネーション率の違い  
Table 1 Difference of the contamination rate due to the individual

ヒノキ	コンタミネーション率[%]	サワラ	コンタミネーション率[%]
A	50	a	78
B	67	b	95
C	10	c	62
D	85	d	43
E	68	e	68

\*各 60 葉条切片あたりの数値

表-2. 個体による多芽体形成率の違い  
Table 2 Difference of the multiple bud formation rate due to the individual

個体	改変 MS	LP	DCR
A	44/55(80)	27/43(63)	68/78(87)
C	31/40(78)	30/38(79)	33/42(79)
D	3/37(8)	10/40(25)	6/29(21)
c	8/16(50)	29/48(60)	30/52(58)
d	1/15(7)	18/32(56)	37/59(63)

\*数値は(多芽体形成切片 / 置床全切片), 括弧内は形成効率[%]

表-3. 個別発根効率

Table 3 Individual rooting efficiency

用いた個体	発根効率
久慈7号	18/27(67)
宇治1号	11/27(41)
大田原2号	13/26(50)
鬼冨7号	10/27(37)
野尻7号	20/27(74)

\*数値は(発根したシュート / 置床全シュート), 括弧内は発根効率[%]

謝辞: 本研究は JSPS 科研費 JP17K07867 の助成を受けて行った。

#### 引用文献

- (1) GUPTA, P. K., DURZAN, D. J. (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4 : 177-179
- (2) HORGAN, K. (1987) *Pinus radiata*. In *Tissue culture in forestry*. Vol. 3. Edited by J.M. Bonga and D.J. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 128-145.
- (3) HOSOI, Y., ISHII, K. (2001) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Pinus armandii* var. *amamiana*. In: Morohoshi, N., Komamine, A. (eds.) *Molecular Breeding of Woody Plants*, Elsevier Science : 313-318
- (4) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明 (2009) 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. *関東森林研究* 60 : 93-96
- (5) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y., ISHII, K. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Plant Biotechnology* 17(4) : 281-296
- (6) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2002) Somatic embryogenesis in Sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. et Zucc.) for stable and efficient plant regeneration, propagation and protoplast culture. *Journal of Forest Research* 7 : 23-34
- (7) MARUYAMA, E., ISHII, K., HOSOI, Y. (2005) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *Journal of Forest Research* 10 : 73-77
- (8) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2005) Somatic embryogenesis and plant regeneration of Japanese Black pine. *Journal of Forest Research* 10(5) : 403-407
- (9) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2005) Propagation of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) via somatic embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* 5(4) : 199-204
- (10) MARUYAMA, E., HOSOI, Y., ISHII, K. (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endangered species in Japan. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 43(1) : 23-34
- (11) 丸山毅 (2008) 不定胚形成による針葉樹の大量増殖技術の開発. *大日本山林会* 1492 : 57-65
- (12) 丸山 E.毅・細井佳久 (2013) 乾燥処理によるリュウキウマツ不定胚の発芽促進効果. *関東森林研究* 64(1) : 49-52
- (13) 丸山 E.毅・細井佳久・二村典宏・斎藤真己 (2014) 無花粉スギ未成熟種子からの不定胚形成細胞の誘導. *関東森林研究* 65(1) : 107-110
- (14) 丸山 E.毅・細井佳久 (2015) ポリエチレングリコール又は高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟したクロマツ不定胚からの植物体再生. *関東森林研究* 66(1) : 69-72
- (15) 丸山 E. 毅・細井佳久・上野真義・大西昇・戸塚聡子・岩井淳治・森口善成 (2017) 新潟県産無花粉スギ種子からの不定胚形成細胞の誘導. *関東森林研究* 68(1) : 41-44
- (16) MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- (17) OGAWA, Y. (2015) Long-term maintenance of high regeneration ability of switchgrass embryogenic callus. *Plant Biotechnology* 32(3): 239-242
- (18) TEREZIA, S., RADOSLAVA, M., RONY, S., BART, P., JAN, S. (2016) Tissue regeneration of *Abies* embryogenic cell lines after 1 year storage in liquid nitrogen. *Biologia* 71(1): 1-7