

## ヒノキ亜科3種の葉条切片からの形態形成とサワラ単一細胞の誘導と培養の試み

細井佳久<sup>1</sup>・丸山 E. 毅<sup>1</sup>

1 森林総合研究所

**要旨**：ヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロについて、葉条切片から多芽体を誘導した。誘導には、オーキシシンとして 2,4-D、サイトカイニンとして BAP または Zeatin を添加した LP、DCR、改変 MS 培地を用いた。得られた多芽体を、植物生長調節物質無添加の改変 MS 培地に移植し、シュート伸長させた。シュート切片を IBA や NAA 添加の改変 MS 培地で培養し発根させた。7 月上旬に採取したサワラの球果から未熟種子を取り出し、2,4-D と BAP を添加した EM 固形培地で培養した。その結果、約 2 ヶ月後に不定胚形成能力を持つ細胞を誘導することができた。誘導した細胞は、同一組成の EM 液体培地で 2 週間ごとに継代培養し、増殖させた。増殖中に遊離する単一細胞について、マイクロマニピュレーターで 96 ウェル培養プレートに移し培養すると、約 2 週間後に不定胚形成細胞が再分化した。

**キーワード**：ヒノキ、サワラ、ヒノキアスナロ、単一細胞、マイクロマニピュレーター

**Organogenesis from leaflets of *Chamaecyparis obtusa*, *Chamaecyparis pisifera* and *Thujopsis dolabrata* var. *Hondae* and attempts at single cell culture derived from embryogenic cells of *Chamaecyparis pisifera***

Yoshihisa HOSOI<sup>1</sup>, Tsuyoshi MARUYAMA<sup>1</sup>

Forestry and Forest Products Research Institute

**Abstract**: Multiple bud formation has been achieved from Hinoki, Sawara and Hinokiasunaro cypress planted at the Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI). For induction of multiple buds, LP, DCR and modified MS solid media containing 2,4-D as auxin and BAP or Zeatin as cytokinin were employed. Proliferated buds were elongated on plant growth regulator free-MS medium. Elongated shoots were transferred to modified MS solid medium supplemented with IBA alone or in combination with NAA for rooting. Immature seeds were collected from Sawara cones in early July. The seeds were cultured on EM solid medium supplemented with 2,4-D and BAP. Embryogenic cell induction was observed after about 2 months of culture. For proliferation, the cells were subcultured in EM liquid medium every 2 weeks. The single cells released during subcultures were transferred to 96-well culture plates using a micromanipulator and cultured in EM liquid medium. After about two weeks of culture, embryogenic cells were formed.

**Key-word**: *Chamaecyparis obtusa* Sieb. & Zucc., *Chamaecyparis pisifera* (Sieb. & Zucc.) Endl., *Thujopsis dolabrata* (L.f.) Sieb. et Zucc. var. *hondae* Makino, Single cell, Micromanipulator

## I はじめに

ヒノキ属のヒノキやサワラについて、選抜個体のクローン増殖を目的とした実験を行い、ヒノキでは葉条切片から植物体を再生させることに成功している(3)。今回は、新たな樹種としてヒノキアスナロを加え、ヒノキ、サワラについても再度別個体から多芽体を誘導し、植物体再生の可否や効率について比較した。また、ゲノム編集などによる遺伝子改変を行う場合、増殖細胞やカルス、組織・器官などの多細胞集団を対象に遺伝子導入処理を行うと、処理後には様々な細胞が混在することになり、

植物体再生時にキメラ個体を形成してしまうことが予想される。ところで、不定胚形成細胞の培養では、増殖中に単一細胞が遊離することが顕微鏡下で確認できている。そこで、マイクロマニピュレーターを用いて不定胚形成細胞由来の単一細胞を顕微鏡下で選別・培養し、キメラ化を回避した植物体再生系確立が可能であるかを検証した。

## 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ヒノキ成木3個体と、サワラ成木3個体、ヒノキアスナロ成木1個体について、2016年5月に採取した葉条を約3cmに切り出して培養材料とした。殺菌は、3%次亜塩素酸ナトリウムで30分間ビーカー内で攪拌殺菌した後、滅菌水で30分間攪拌洗浄した。

**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、ヒノキとサワラについては、硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMS(6)の1種類、ヒノキアスナロについては、それに加え、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。ヒノキアスナロでは、DCR培地について、さらに2,4-Dを0.6 $\mu$ MとZeatinを6 $\mu$ M添加した培地も用意した。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. 多芽体からのシュート伸長培養** 材料には、硝酸アンモニウム濃度を1/2に下げたMSに、2,4-Dを0.6 $\mu$ M、BAPを6 $\mu$ M添加した寒天培地で誘導した多芽体を用いた。多芽体を約5mm角に切り出してシュート伸長用培地に置床した。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に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、発根用にはIBA単独で3 $\mu$ M(A培地)、12 $\mu$ M(B培地)、また、IBA 12 $\mu$ MとNAA 1 $\mu$ M(C培地)の2種のオーキシンを添加した3つの培地を用意した。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。

**5. 不定胚形成細胞の誘導と増殖** 7月初旬に採取したサワラの球果から未熟種子を取り出し、培養材料とした。殺菌はビーカー内で1%アンチホルミン20分攪拌して行った。滅菌水で洗浄後、3 $\mu$ M 2,4-D、1 $\mu$ M BAP添加したEM固形培地(5)で培養した。得られた不定胚形成細胞は、誘導時と同一組成の液体培地で継代培養し、増殖させた。培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒下、90mmプラスチックシャーレで行った。

**6. マニピュレーターによる単一細胞の選別・培養** 不定胚形成細胞から遊離した細胞のうち、健全な単一細胞のみを倒立顕微鏡下、マイクロマニピュレーターを用いてピックアップし、ゲルライト無添加のEM液体培地(100 $\mu$ l)を分注した96ウェル培養プレートに、1ウェル

あたり1細胞ずつ移して培養した。培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒下で行った。

**7. 再分化不定胚形成細胞の成熟化・不定胚の発芽** 単一細胞から分化した不定胚形成細胞をEM固形培地に移植し、増殖させたのち、不定胚成熟用培地(4)へ移植した。培養は25 $^{\circ}$ C、暗黒下、90mmプラスチックシャーレで行った。得られた不定胚は、100ml 広口培養フラスコに移し、無機塩濃度を1/2に下げたMS固形培地で培養した。培養は、25 $^{\circ}$ C、16時間3,000lx蛍光灯照明下で行った。

### III 結果と考察

**1. 実験材料の殺菌と多芽体の形成効率** それぞれの葉条切片について、置床40日後の殺菌効果を表-1に示した。個体ごとのバラツキは見られたが、ヒノキの場合に生存率が高く、最高で82%であり、ヒノキアスナロ個体の生存率が35%と低かった。葉条の形態上の違いが影響しているのかもしれない。次に置床3ヵ月後の多芽体形成率を表-2に示した。ヒノキの場合に形成率が高く、サワラの場合、10%台と最も低かった。ヒノキアスナロの場合、DCR培地にサイトカイニンとしてZeatinを添加した場合に61%と高い形成率であった。他の樹種や、他の培地についてもBAPに代えてZeatinを用いた方が形成率が高くなる可能性がある。また、実際に得られた多芽体の形状については、サワラについては多芽の形成が不完全で不明瞭な場合も多く見られた(図-1)。

**2. 多芽体からのシュート伸長と発根** シュート伸長用培地に移植すると、3樹種とも4ヵ月後には1~2cm程度のシュートを形成した(図-2)。発根培地へ移植3ヵ月後の各樹種の発根効率を表-3に示した。発根効率は、ヒノキアスナロの場合に3 $\mu$ M IBAを添加した培地で培養すると56%となり最高値を示した。ヒノキ、ヒノキアスナロともIBA濃度を上げたり、1 $\mu$ M NAAを加えたりした場合には効率が下がった。サワラについてはどの条件でも発根は見られず、全ての条件でカルス化した(図-3)。サワラの場合、添加するオーキシンの種類を変更した方がよいかもわからない。また、今回、1%ショ糖を添加したが、カルス化を防ぐためにはさらに低濃度か、無添加にした方がよいと思われる。得られたヒノキ、ヒノキアスナロの発根個体の一部については、人工気象機内で順化・育成中である。

**3. 不定胚形成細胞の誘導と増殖** 培養50日後、培地に置床した種子の幼根部付近の細胞が分裂し、不定胚形成細胞が生じた。不定胚形成細胞は、胚形成能力を持つ分裂活性の高い細胞塊と、サスペンサー細胞で構成され

ていた (図-4)。構造としては他の針葉樹と同様であったが、サスペンダー細胞はスギやヒノキと比べ短い傾向にあった。液体培地に移植して継代培養し、増殖させると不定胚形成細胞から遊離する単一細胞が観察された (図-5)。

**4. マイクロマニピュレーターによる単一細胞の選別と個別培養** 遊離した単一細胞の選別・移動は、倒立顕微鏡に取り付けたマイクロマニピュレーターを介して行った。先端径を 150 $\mu$ m 程度に加工したガラスキャピラリーを使用し、96 ウェル培養プレートに 1 ウェルに 1 細胞ずつ移植した (図-6)。その結果、置床した 192 細胞のうち、46 細胞が不定胚形成細胞に再分化した (図-7)。再分化した不定胚形成細胞について、1 ウェルから増殖させた不定胚形成細胞を、不定胚成熟用培地に移植した。その結果、不定胚が形成され、一部を発芽用培地に移植すると植物体を形成した (図-8)。

**IV 最後に** ヒノキ属以外のヒノキアスナロについても葉条切片から植物体再生が可能であることがわかった。この培養技術は、種子胚由来の不定胚形成細胞からの植物体再生系とは違い、選抜木そのものの遺伝子改変や遺伝資源保存に有効である。また、単一細胞からの安定した植物体再生系が確立できれば、従来の遺伝子組換えや、ゲノム編集などによる遺伝子改変の際にも、キメラの形成を回避できる有効な培養方法と考えられる。

表-1. 葉条切片の殺菌後の生存率

Table 1 The survival rate after sterilization of each leaf sections

樹種	個体	
ヒノキ	H-1	44/50 (80)
	H-2	41/50 (82)
	H-3	35/50 (70)
サワラ	S-1	33/50 (66)
	S-2	29/50 (58)
	S-3	27/50 (54)
ヒノキアスナロ	HA-1	138/400 (35)

\*数値は (生存切片数/全置床切片数) 括弧内は生存率[%]

表-2. 各樹種の多芽体形成率

Table 2 The rate of multiple bud formation in each tree species

個体	培地			
	改変 MS(+BAP)	LP(+BAP)	DCR(+BAP)	DCR(+Zeatin)
H-1	30/44 (68)			
H-2	19/41 (46)			
H-3	24/35 (69)			
S-1	6/33 (18)			
S-2	4/29 (14)			
S-3	3/27 (11)			
HA-1	17/38 (45)	8/27 (30)	12/39 (31)	17/28 (61)

\*数値は (多芽体形成切片数/全置床切片数) 括弧内は形成率[%]

表-3. 各樹種の発根効率

Table 3 Rooting efficiency in each tree species

樹種	個体	培地		
		A	B	C
ヒノキ	H-1	5/18 (28)	3/18 (17)	0/18 (0)
	H-2	2/18 (11)	2/18 (11)	0/18 (0)
	H-3	3/18 (17)	0/18 (0)	0/18 (0)
サワラ	S-1	0/18 (0)	0/18 (0)	0/18 (0)
	S-2	0/18 (0)	0/18 (0)	0/18 (0)
	S-3	0/18 (0)	0/18 (0)	0/18 (0)
ヒノキアスナロ	HA-1	10/18(56)	6/18 (33)	4/18 (22)

\*数値は (発根シュート数/置床全シュート数)、括弧内は発根率[%]

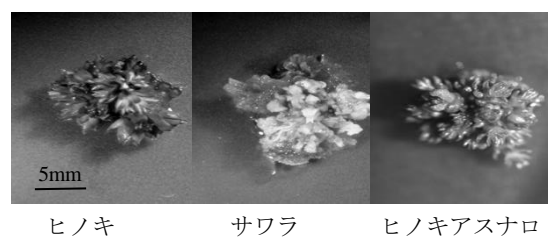


図-1. 誘導された多芽体 (継代培養開始3ヵ月後)

Fig.1 Induced multiple buds (3 months of subculture)



図-2. 多芽体からのシュート伸長

Fig.2 Shoot elongation from the multiple buds



ヒノキ                      サワラ                      ヒノキアスナロ

図-3. 発根培地での各樹種の比較

Fig.3 Comparison of each tree species on the rooting medium

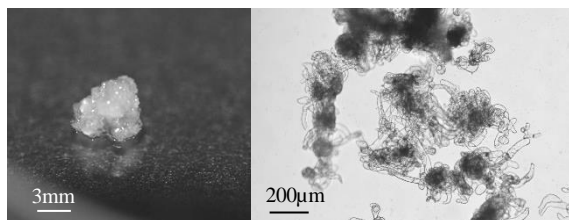


図-4. 未熟種子から誘導したサワラ不定胚形成細胞

Fig.4 Sawara embryogenic cells derived from immature seeds (After 50 days of culture)



図-5. 不定胚形成細胞から遊離した単一細胞 (矢印)

Fig.5 A single cell released from the embryogenic cells

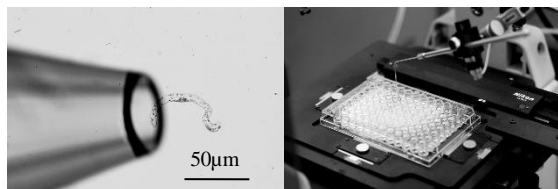


図-6. マイクロマニピュレーターで単一細胞を選別後、96 ウェル培養プレートで培養

Fig.6 After sorting single cells with a micromanipulator, cultured in 96-well culture plates

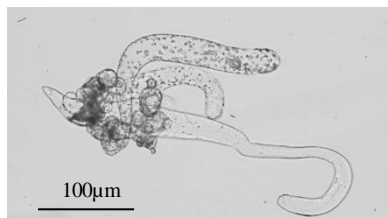


図-7. 単一細胞から分化した不定胚形成細胞 (培養開始 2 週間後)

Fig.7 Differentiated embryogenic cells from a single cell (After 2 weeks of culture in 96-well culture plates)

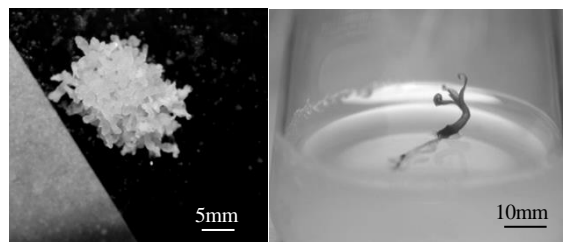


図-8. 不定胚の形成、その発芽による植物体再生

Fig.8 Somatic embryogenesis, plant regeneration by germination of a somatic embryo

謝辞：本研究の一部は、JSPS 科研費 JP17K07867「ヒノキ栄養組織由来シングルセルからの効率的なクローン増殖技術の開発」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) 細井佳久・丸山 E. 毅 (2018) 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. 関東森林研究. 69: 7-10
- (4) 丸山 E. 毅・細井佳久・勝木俊雄 (2012) ヒメバラモミ未熟種子からの不定胚誘導. 関東森林研究. 63: 67-71
- (5) 丸山 E. 毅・細井佳久・二村典宏・斎藤真己 (2014) 無花粉スギ未熟種子からの不定胚形成細胞の誘導. 関東森林研究. 65: 107-110
- (6) Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.