ウルシの未成熟胚を用いた組織培養による 植物体再生に関する研究^{*1}

塚田健太郎^{*2,3}, 山岸祐介^{*4}, 鍋嶋絵里^{*5}, 保坂路人^{*2}, 岡田健汰^{*2},
Md Hasnat Rahman^{*2,6}, 半 智史^{*2}, 田端雅進^{*7}, 船田 良^{*2}

Study of Plant Regeneration by Tissue Culture from Immature Embryos of the Lacquer Tree, *Toxicodendron vernicifluum*^{*1}

Kentaro TSUKADA^{*2,3}, Yusuke YAMAGISHI^{*4}, Eri NABESHIMA^{*5},
Michito HOSAKA^{*2}, Kenta OKADA^{*2}, Md Hasnat RAHMAN^{*2,6},
Satoshi NAKABA^{*2}, Masanobu TABATA^{*7} and Ryo FUNADA^{*2}

Resin and sap of lacquer trees (*Toxicodendron vernicifluum*) are called “Urushi”. Urushi has been used for paints or adhesives since the Jomon period in Japan. Since it is prospective that demand for domestic Urushi for preservation of cultural property will increase, the mass production of seedlings of *T. vernicifluum* of high quality is important. We initially cultured immature zygotic embryos from immature fruits on Woody Plant Medium (WPM) containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α -naphthaleneacetic acid (NAA) or indole-3-acetic acid (IAA) as an auxin supplemented with polyvinylpyrrolidone (PVP). Somatic embryos were induced directly from immature zygotic embryos and secondary somatic embryos were induced from somatic embryos. Some secondary somatic embryos formed roots and hypocotyls. Finally, we transferred the secondary somatic embryo-derived plantlets to soil in pots and the plantlets continued to grow. Thus, we developed a tissue culture system for plant regeneration for the propagation of *T. vernicifluum*.

Keywords : immature zygotic embryos, polyvinylpyrrolidone, somatic embryogenesis, *Toxicodendron vernicifluum*, Urushi

^{*1} Received November 28, 2018; accepted March 4, 2019. 本研究の一部は第66回日本木材学会大会（2016年3月，名古屋），第67回日本木材学会大会（2017年3月，福岡）および第68回日本木材学会大会（2018年3月，京都）で発表した。

^{*2} 東京農工大学大学院農学研究院 Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu 183-8509, Japan

^{*3} 山梨県富士・東部林務環境事務所 Fuji-Tobu Branch Office for Forestry and Environment, Tsuru 402-0054, Japan

^{*4} 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

^{*5} 愛媛大学大学院農学研究科 Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790-8566, Japan

^{*6} 東京農工大学大学院グローバルイノベーション研究院 Institute of Global Innovation Research, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu 183-8538, Japan

^{*7} 森林総合研究所東北支所 Forestry and Forest Products Research Institute, Tohoku Research Center, Morioka 020-0123, Japan

Corresponding author: R. Funada (funada@cc.tuat.ac.jp)

ウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) の樹脂を含む樹液は「漆」と呼ばれ、縄文時代から塗料・接着用途に利用されている。現在、文化財修復用途として国産漆の需要の増加が見込まれているため、良質な苗木の大量生産が重要である。そこで本研究では、ウルシの植物体再生系の確立を目標として、ウルシの未成熟胚をオーキシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、 α -ナフタレン酢酸 (NAA) またはインドール-3-酢酸 (IAA) とポリビニルピロリドン (PVP) を添加した Woody Plant Medium (WPM) 培地に植えた。その結果、不定胚の形成が認められ、さらに不定胚から二次不定胚の形成が認められた。形成された二次不定胚の一部は、明条件下において植物体に成長し、組織培養を用いたウルシの未成熟胚からの植物体再生に成功した。

1. 緒 言

ウルシ (*Toxicodendron vernicifluum*) は、ウルシ科ウルシ属の樹種であり、樹脂を含む樹液は「漆」と呼ばれ、縄文時代から塗料や接着剤などに利用されてきた¹⁾。しかしながら、現在漆の国内自給率は約3%となっている²⁾。この状況に対し、文化庁は平成30年度より、国宝や重要文化財の修理には原則として100%国産漆を使う方針を示しており³⁾、今後、国産漆の需要の増加が見込まれている。しかしながら、ウルシは個体によって漆生産量に差があることが知られており^{4,5)}、漆を大量に生成できる苗木の生産が重要である。

ウルシの従来の増殖法には、主に実生苗と分根苗による2つの育成法がある⁶⁾。実生苗による育成法は一度に大量の苗を生産可能だが、同一形質の苗を生産することはできない。また、発芽には種子のロウ成分を除去するための脱ロウ処理を行う必要がある。一方、分根苗による育成法は、母樹と同じ形質をもった苗を生産可能であるが、一本の母樹から大量の苗木を生産することは困難である⁶⁾。

植物組織培養技術を用いた植物体再生系は、同一形質をもった苗木を大量に生産可能である。ウルシの組織培養に関しては、成熟胚を Murashige and Skoog (MS) 培地にオーキシンの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を添加した条件で培養し、さらに2,4-D 無添加の MS 液体培地に移植した結果、不定根が誘導され、不定根からウルシオールが検出された報告⁷⁾がある。また、ウルシと同じウルシ属のハゼノキ (*Toxicodendron succedaneum*) においては、無菌発芽苗の胚軸からシュートを形成し、植物体を得た報告⁸⁾がある。しかしながら、植物組織培養技術によるウルシの植物体再生に成功した報告はない。そこで本研究では、植物組織培養技術を用いたウルシの未成熟胚からの植物体再生系の確立を目的として実験を行った。

2. 実験方法

2.1. 材料

茨城県常陸大宮市に生育するウルシから果実を採取した (Fig. 1A, B)。果実の採取は、2016年においては、5年生で樹高4.3 m、胸高直径8.5 cmの母樹1個体から6月21日、7月6日、7月19日、8月2日に行い、2017年においては、7年生で樹高6.3 m、胸高直径8.6 cmの母樹1個体から6月23日、7月10日、7月25日、8月8日に行った。ウルシの開花日は、2016年が5月29日頃で、2017年が6月6日頃であった。

2.2. 滅菌

毎年、採取2回目までの果実はそのまま、採取3回目以降の果実は外果皮および中果皮を取り除いた後、中性洗剤を用いて洗浄した (Fig. 1C)。30分間流水で洗浄し、70%エタノールに3分間浸漬した後、界面活性剤のTWEEN20を2、3滴添加した3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液中に20分間浸漬し滅菌を行った。滅菌後、クリーンベンチ内で果実または種子をメスで切断して未成熟胚を取り出し、90 mm シャーレに入った誘導培地に植えた。

2.3. 不定胚の誘導

誘導培地は、ウルシ属であるハゼノキの組織培養の報告⁸⁾を基に、基本培地として Woody Plant Medium (WPM) 培地⁹⁾を用い、スクロース20 g/L、グルタミンを500 mg/L、カゼインを1 g/Lの割合で添加した。pHは5.8に調整し、固化剤としてゲランガム3 g/Lを用いた。グルタミン、カゼインおよび後述するインドール-3-酢酸 (IAA) はフィルター滅菌し、オートクレーブ後の培地に添加した。

2016年は、オーキシンとして2,4-Dを1 μ M、 α -ナフタレン酢酸 (NAA) または IAA を1または5 μ M 添加するという5条件と、植物ホルモン無添加 (HF) の1条件を合わせた6条件を設定した。また、ポリビニルピロリドン (PVP) 1 g/Lを添加または無添加とする2条件を設定した。

2017年は、2016年の実験結果を参考にして、オーキシンとして NAA を1 μ M または IAA を5 μ M 添

Fig. 1. Plant regeneration from immature zygotic embryos of *Toxicodendron vernicifluum*.

Legend: A: A tree (an arrowhead) from which we collected fruits on 23 June 2017.
 B: Fruits collected on 23 June 2017. Scale bar = 4 cm.
 C: An immature embryo (arrowheads) from a fruit collected on 23 June 2017. Scale bar = 1 cm.
 D: Somatic embryos (arrowheads) induced on WPM medium containing 1 g/L PVP and 1 μ M IAA. Scale bar = 2 mm.
 E: Secondary somatic embryos (arrowheads) induced from a somatic embryo (an arrow). Scale bar = 2 mm.
 F: Somatic embryos developed on liquid WPM medium. Scale bar = 2 cm.
 G: Secondary somatic embryos separated from a somatic embryo. Scale bar = 1 cm.
 H: Plantlets with roots and cotyledons derived from secondary somatic embryos. Scale bar = 2 cm.
 I: A plantlet 17 days after the transfer to soil in the pot. Scale bar = 2 cm.

加するという2条件と、HFの1条件を合わせた3条件を設定した。また、PVPをそれぞれ0.5, 1.0, 3.0 g/L添加または無添加とする4条件を設定した。培養は25℃暗条件下で行い、約1ヶ月ごとに同組成の培地で継代を行った。

誘導開始から2016年の実験では9ヶ月後、2017年の実験で7ヶ月後の時点において、植え付けを行った未成熟胚のうち、不定胚の形成が認められた未成熟胚の数をカウントした。

2.4. 不定胚の増殖

固体培地上で増殖が認められない不定胚については、不定胚の増殖のため液体培地に移した。液体培

地は、誘導培地と同組成で、植物ホルモン、PVPおよびゲランガムを無添加とした培地とした。約3週間、70 rpmで回旋培養（MMS-3010、東京理化学器械）を行った。

2.5. 不定胚の成熟

形成された不定胚は、発芽および発根を促すため、不定胚成熟培地（植物ホルモンを無添加としたWPM培地）に移した。発芽が認められた不定胚は、25℃、18時間日長で培養を行った。本葉が発生した植物体は、植物組織培養用プラントポット（三商）に入った土壌（パーミキュライト：パーライト：ピートモス = 1 : 1 : 1または2 : 2 : 1）に移植し、ハイ

ポネックスを滅菌水で約2000倍に薄めた溶液を与えた。その後、土壌の表面が乾くごとに滅菌水を与えた。

2.6. 二次不定胚の形成

2016年の実験において誘導された不定胚の内、二次不定胚の形成が活発な1系統を用いて、PVPの濃度が不定胚の増殖に与える影響を観察した。誘導培地と同組成でPVPをそれぞれ0, 1, 3 g/Lの濃度で添加した植物ホルモン無添加の培地に初期の子葉胚を移し、35日間培養を行った後、形成された二次不定胚の数を記録した。

2.7. 統計解析

二次不定胚形成に対する培地条件の影響について、二次不定胚形成を被説明変数とし、培地条件を説明変数とする線形モデルを組み立て、統計解析を行った。培地条件間の比較は、モデル選択によって行い、当てはまりの良さの基準として赤池情報量基準(AIC)を用いた。確率分布としてポアソン分布を仮定し、PVP濃度を連続変数とした。すべての統計解析はR (version 3.2.3)¹⁰⁾を用いて行った。

3. 結果および考察

3.1. 不定胚の誘導における果実の採取時期の影響

2016年の実験では、植えつけた未成熟胚900個体中、50個体から不定胚が誘導された。不定胚は、1個体から複数の誘導が多くみられた(Fig. 1D)。2017年の実験では、植えつけた未成熟胚825個体中、33個体から不定胚が誘導された。なお、2016年7月19日と2017年8月8日採取の果実から摘出した未成熟胚は、植え付け後に全て雑菌汚染により枯死した。

2016年における、果実の採取日ごとの未成熟胚からの不定胚誘導数および誘導率をTable 1に示した。果実の採取時期の違いの有意な影響が認められ、7月6日採取の果実の未成熟胚は、異なる2度の時期に採取された果実の未成熟胚と比べ不定胚の誘導率が高く、12%と最大になった。2016年のウルシの開花日は5月29日ごろであったため、7月6日は開花後5-6週にあたる。

2017年における、果実の採取日ごとの、未成熟胚からの不定胚誘導数および誘導率をTable 2に示した。2017年においては、果実の採取時期に未成熟胚からの不定胚誘導率への有意な影響は認められなかった。不定胚誘導率は、2回目の採取である7月10日で4%と最大になった。2017年のウルシの開花日は6月6日ごろであったため、7月10日は開花後4-5週にあたる。

2016年の結果から、ウルシの不定胚誘導には、開

Table 1. Induction of somatic embryos from immature zygotic embryos from fruits sampled on different dates in 2016.

Sampling date.	No. of explant	No. of somatic embryo	Induction ratio (%)
21 June	300	9	3
6 July	300	35	12
2 August	300	6	2

Notes: Induction ratios were calculated by no. of explants forming somatic embryos / no. of explants $\times 100$.

Table 2. Induction of somatic embryos from immature zygotic embryos from fruits sampled on different dates in 2017.

Sampling date.	No. of explant	No. of somatic embryo	Induction ratio (%)
23 June	300	10	3
10 July	300	16	5
25 July	225	7	3

Notes: Induction ratios were calculated by no. of explants forming somatic embryos / no. of explants $\times 100$.

花後5-6週頃の胚の発達段階が適している可能性が示唆された。植え付け年の違いによって、開花後の期間がほぼ等しい未成熟胚からの不定胚の誘導数が大きく異なった要因として、採取した母樹が異なることによる胚の遺伝的性質の違いや、積算温度などの違いによって胚の発達速度に差が生じていた可能性が考えられる。

3.2. 不定胚の誘導における植物ホルモンおよび添加物質の影響

2016年の実験における、培地条件ごとの不定胚誘導数および誘導率をFig. 2に示した。PVP 1 g/LとNAA 1 μ Mを添加した条件から誘導された不定胚の内2系統とPVP 1 g/LとIAA 5 μ Mを添加した条件から誘導された不定胚の内1系統は、植物ホルモンを無添加とした培地において、活発な二次不定胚形成を繰り返した(Fig. 1E)。不定胚の増殖性という観点から、2016年の実験では、この2条件がウルシの不定胚誘導に適していたと考えられる。

2017年の実験における、培地条件ごとの不定胚誘導数および誘導率をFig. 3に示した。HF条件、IAA 5 μ M添加条件、NAA 1 μ M添加条件の順に不定胚誘導率が高い値を示した。また、PVPの添加濃度が高いほど、不定胚誘導率が高くなった。

以上の結果から、誘導培地へのPVPおよび植物ホルモンの添加にウルシの不定胚誘導への影響が認められたものの、植え付け年や両者の条件の組み合

Fig. 2. Induction of somatic embryos from immature zygotic embryos in 2016.

Notes: Induction ratios were calculated by no. of explants forming somatic embryos / no. of explants $\times 100$, PVP: polyvinylpyrrolidone, HF: hormone free, 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, NAA: α -naphthaleneacetic acid, IAA: indole-3-acetic acid

わせによって影響が異なっており、一定した効果は認められなかった。

3.3. 二次不定胚の誘導における PVP の影響

異なる PVP 濃度における供試数、二次不定胚の形成数、および 1 供試体当たりの二次不定胚形成数を Table 3 に示した。培地の PVP 濃度の違いにより、二次不定胚の形成数への有意な影響が認められた。PVP を無添加及び 1 g/L 添加の培地に対し、PVP を 3 g/L 添加した培地では有意に二次不定胚の形成数が多く、1 つの不定胚から 35 日間で平均 4.2 個の二次不定胚が形成された。この結果から、PVP の添加は、ウルシの二次不定胚形成を促進すると考えられる。

PVP は、フェノール類を吸着するため、褐変を減らす目的に用いられる高分子化合物である¹¹⁾。ウルシ科のカシュー (*Anacardium occidentale*) においても、培地中に 0.1% の PVP を添加することによ

Table 3. Effects of PVP concentration on the number of secondary somatic embryos induced from somatic embryos.

PVP (g/L)	No. of SE	No. of SSE	SSE / SE
0	33	94	2.8 ^b
1	34	109	3.2 ^b
3	34	144	4.2 ^a

Notes: Different letters indicate significant differences among means at $p < 0.01$, PVP: polyvinylpyrrolidone; SE: somatic embryo; SSE: secondary somatic embryo.

Fig. 3. Induction of somatic embryos from immature zygotic embryos using PVP and auxins in 2017.

Notes: Induction ratios were calculated by no. of explants forming somatic embryos / no. of explants $\times 100$, PVP: polyvinylpyrrolidone, HF: hormone free, NAA: α -naphthaleneacetic acid, IAA: indole-3-acetic acid

ってフェノール類の滲出が減少したという報告がある¹²⁾。本研究においては、PVP によって不定胚の形成を阻害するフェノール類が吸着されたことで、ウルシの二次不定胚形成が促進された可能性がある。

3.4. 不定胚の増殖

固体培地上で二次不定胚形成や成長が認められない不定胚について、同組成の液体培地に移し回旋培養を行ったところ、不定胚の発達が認められた (Fig. 1F)。これは、液体培養によって不定胚全体に培地が接していたためであると考えられる。液体培地には著しい褐変が観察されたが、不定胚が枯死することはなかった。液体培養で発達した不定胚を同組成の固体培地に移したところ、胚軸の伸長や展葉といった発達が進むことはなかったが、活発な二次不定胚形成が認められた。液体培地による培養は、不定胚の増殖に有効である可能性が示唆された。

3.5. 不定胚の成熟

2016年の実験において、1 g/L の PVP および 1 μM の IAA を添加した培地でウルシ未成熟胚から誘導された不定胚を不定胚成熟培地に移したが、胚軸の伸長や展葉といった発達が進む不定胚は認められなかった。一方、3.1において活発な二次不定胚形成を繰り返した系統において、形成された二次不定胚を不定胚から取り外し、不定胚成熟培地に移したところ (Fig. 1G)、一部の二次不定胚は植物体にまで成長した (Fig. 1H)。本葉が 2 から 3 枚展開した段階で植物体を土壌に移植したところ、25 本中 20 本の植物体が土壌においてさらに成長した (Fig. 1I)。本研究において、組織培養技術を用いたウルシの未成熟胚からの植物体再生に成功した。

4. 結 論

本研究において、ウルシの未成熟胚を WPM 培地に植えた結果、植えた胚から直接不定胚が誘導された。誘導された不定胚の一部では、活発な二次不定胚形成が認められたため、ウルシの大量増殖には二次不定胚を用いることが有効であると考えられる。ウルシ科のマンゴー (*Mangifera indica*) においては、未成熟胚の子葉部分から不定胚形成細胞 (PEMs) のような細胞の形成が認められており、細胞からの不定胚形成と植物体再生に成功している¹³⁾。また、成熟した不定胚の胚軸から二次不定胚の形成が報告されている。一方、カシュー (*A. occidentale*) においては、種皮から直接不定胚が誘導され、不定胚 1 つから 10 個以上の二次不定胚が形成し、植物体再生に成功している¹⁴⁾。このように、ウルシ科の組織培養を用いた植物体再生の中でも、マンゴーのように PEMs を用いた大量増殖が有効である場合と、カシューのように二次不定胚形成を用いた大量増殖が有効である場合がある。本研究のウルシでは、PEMs の形成が認められなかったが、活発な二次不定胚形成が認められたため、ウルシ科の中ではカシューの組織培養に類似しているといえる。

本研究の成果により、ウルシの未成熟胚からの組織培養技術を用いた植物体再生に成功した。同じ遺伝的形質を持つ苗木の大量生産が可能になったことで、さらに得られた苗木の系統ごとの漆生産性の検定と選抜の実施により、高い漆生産性をもつウルシの効率的な苗木生産が可能になる。

謝 辞

本研究は、平成 26～29 年度科学研究費補助金（基盤研究 A）「漆生成メカニズムに基づく高品質漆の開発；研究代表者：田端 雅進」によって行われた。ウルシ果実の試料採取にあたり、奥久慈漆生産組合長の神長正則氏にご協力を戴き、御礼申し上げます。

文 献

- 1) Noshiro, S., Suzuki, M., Sasaki, Y.: Importance of *Rhus verniciflua* Stokes (lacquer tree) in prehistoric periods in Japan, deduced from identification of its fossil woods. *Veg. Hist. Archaeobot.* **16**(5), 405-411 (2007).
- 2) 林野庁：平成 28 年度 森林・林業白書, 日本林業協会, 東京, 2016, p.117.
- 3) 文化庁「国宝・重要文化財（建造物）保存修理における漆の使用方針について」平成 27 年 2 月 24 日付け 26 庁財第 510 号 (2015).
- 4) 原田盛重：漆液収量に関する樹幹組織の定量的研究. 日本林学会誌 **24**(4), 207-214 (1942).
- 5) Zhao, M., Liu, C., Zheng, G., Wei, S., Hu, Z.: Comparative studies of bark structure, lacquer yield and urushiol content of cultivated *Toxicodendron vernicifluum* varieties. *New Zeal. J. Bot.* **51**, 13-21 (2013).
- 6) 田端雅進：植物としてのウルシ. “地域資源をいかす 生活工夫双書 漆 1 漆掻きと漆工 ウルシ利用”, 室瀬和美, 田端雅進監修, 農山漁村文化協会, 東京, 2018, pp. 14-15.
- 7) 橋本 修, 南 享二：ウルシノキの組織培養とウルシオール形成 (第 3 報) ウルシノキ不定根によるウルシオールの形成. 木材学会誌 **26**(1), 49-53 (1980).
- 8) 戸田忠雄, 西村慶二, 山手廣太：ハゼノキの組織培養. 林木育種センター研究報告 **13**, 53-64 (1995).
- 9) Lloyd, G., McCown, B.: Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators' Soc.* **30**, 421-427 (1980).
- 10) R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. 2016 年 1 月 4 日参照.
- 11) Loomis, W.D., Battaile, J.: Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* **5**, 423-438 (1966).
- 12) Thimmappaiah, Shirley R.A., Sadhana, P.H.: *In vitro* propagation of cashew from young trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* **38**, 152-156 (2002).
- 13) Xiao, J.N., Huang, X.L., Wu, Y.J., Li, X.J., Zhou, M.D., Engelmann, F.: Direct somatic embryogenesis induced from cotyledons of mango immature zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* **40**, 196-199 (2004).
- 14) Martin, K.P.: Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Sci. Hortic.* **98**, 299-304 (2003).