

## 乾燥処理によるリュウキュウマツ不定胚の発芽促進効果

丸山 E. 毅・細井佳久 (森林総合研究所)

**要旨:** リュウキュウマツの不定胚を, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸と6-ベンジルアミノプリンを添加した1/2 EM培地上で種子胚から誘導した。得られた不定胚形成細胞を, 誘導時の培地と同一の培地を用いて, 2~3週間ごとに維持・増殖させた。増殖した不定胚形成細胞を, 30 g/l マルトース, 2 g/l 活性炭, 100  $\mu$ M アブシジン酸及びポリエチレングリコール (100-200 g/l) を含む培地上で培養すると, 成熟不定胚が形成された。最もよい結果は, 150 g/l ポリエチレングリコールを添加した培地上で得られ, 90  $\times$  20 mm のシャーレ当たり 282 個の不定胚が形成された。しかし, 誘導した成熟不定胚を, 直接発芽用培地へ移植した場合, 発芽はみられなかった。これとは対照的に, 乾燥処理が施された不定胚の場合は, 発芽率が高く, その後約9割のものが植物体を形成した。現在, 不定胚由来植物体の生育状況を, フィールドでモニタリングしている。

**キーワード:** リュウキュウマツ, マツノザイセンチュウ, 不定胚形成, *Pinus luchuensis*, 乾燥処理

**Abstract:** Somatic embryogenesis in Ryukyumatsu (*Pinus luchuensis* Mayr.) was initiated from megagametophytes containing zygotic embryos on 1/2 EM medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine. Embryogenic cultures were maintained and proliferated by subcultures at 2- to 3- week-intervals on the same fresh medium. The maturation of somatic embryos occurred on media containing 30 g/l maltose, 2 g/l activated charcoal, 100  $\mu$ M abscisic acid and different concentrations of polyethylene glycol (100-200 g/l). The highest embryo maturation frequency was obtained on medium supplemented with 150 g/l, with an average of 282 cotyledonary embryos collected per plate (90  $\times$  20 mm). However, collected matured embryos failed to germinate after direct transfer to germination medium. In contrast, high frequencies of germination were obtained after the desiccation treatment of somatic embryos, and around 90% of them were converted into plants. Growth of the somatic embryo-derived regenerated plants has been monitored in the field.

**Keywords:** Ryukyumatsu, pinewood nematode, somatic embryogenesis, *Pinus luchuensis*, desiccation treatment

## I はじめに

南西諸島に広く分布するリュウキュウマツ (*Pinus luchuensis* Mayr.) は, アカマツやクロマツ同様マツノザイセンチュウによる被害が大きな問題となっている(3)。その対策として, マツノザイセンチュウ抵抗性個体の作出や育成の試験研究が各地域で進められている。一般には, 屋外に生育する個体の中から松枯れに強い個体を選び, 何代かにわたって交配と選抜を繰り返して, マツノザイセンチュウに強いものを選び, その後にその個体を増やして植える, といった手法がとられている。こうした従来の育種方法では, どうしても広い植栽面積と, 長い試験期間を要することになる。これに対し, 我々は, 生物工学的な手法を用いて研究室という狭い空間で, できるだけ短い時間で松枯れに強い個体を一度に大量に作り出す方法を開発することである。それにはまず, 松枯れに強い組織や細胞から, フラスコ内で大量のクローン個体を作成するための培養条件を見つけて出すことが大切である。今回は,

組換え個体作出のための基盤技術の一つとして, リュウキュウマツの種子胚を用いて, 大量の不定胚誘導とその後の個体再生方法を検討した。

## II 実験方法

1. **球果の採取** 球果の採取には, 西表島の林木育種センター西表熱帯林育種技術園内に生育するリュウキュウマツを用い, 2007年8月上旬に採取した球果から取り出した種子を使用した。

2. **不定胚形成細胞の誘導と継代培養** 種子表面の殺菌は, 2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20-30分浸漬・攪拌し, 滅菌水で洗浄して行った。その後, 種皮を剥ぎ取り, 種子胚を含む雌性配偶体 (megagametophyte) を不定胚形成細胞誘導用の培地に置床した。容器として, 直径90 mmの4分割シャーレを用い, 培地には無機塩を1/2濃度に下げたEM培地(1)に, ショ糖10 g/l, グルタミン1 g/l, カゼイン0.5 g/l, ゲルライト3 g/l, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸10  $\mu$ M, 6-ベンジルアミノプリ

ン 5  $\mu$ M 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細胞は、誘導時の培地と同一の培地や培養環境で維持し、増殖させた。

**3. 不定胚の誘導** 不定胚の誘導には、2～3週間ごとに継代培養して増殖させた不定胚形成細胞を用いた。容器として、90 × 20 mm のシャーレを用い、培地には EM 培地にマルトース 30 g/l、活性炭 2 g/l、ポリエチレングリコール (0, 100, 150, 200 g/l)、グルタミン 0.75 g/l、アスパラギン 0.5 g/l、アルギニン 0.25 g/l、シトルリン 0.04 g/l、オルニチン 0.04 g/l、リシン 0.03 g/l、アラニン 0.02 g/l、プロリン 0.02 g/l、アブシジン酸 100  $\mu$ M、ゲルライト 3 g/l 添加した固形培地を用いた。培地上には、約 1,000 mg FW の不定胚形成細胞 (200 mg FW × 5 塊) を置床して培養した。培養は暗黒下、25°Cで行った。培養開始 6 週間後に形成された成熟不定胚の数を調べた。

**4. 不定胚の発芽と個体再生** 形成した成熟不定胚は、無処理または 3 週間の乾燥処理を施してから、発芽用培地へ移植した。不定胚の乾燥処理には、6 ウェルプレートを用いて、濾紙上に乗せた不定胚を中央の 2 ウェルに置き、他の 4 ウェルに約 5 ml の滅菌水を分注し、プレートをパラフィルムでシールして、暗黒下、25°Cで行った。乾燥させた不定胚は、植物生長調節物質を含まない 1/2EM 固形培地に移し、16 時間蛍光灯照明 (約 4,000 lx)、25°Cの環境下で培養を行った。発芽した不定胚を、同一の培地または肥料液 (0.1% Hyponex) を含むフロリアライト培養土に移植し、幼植物体に生長させた。

### III 結果と考察

**1. 不定胚形成細胞の誘導と維持・増殖** 培養開始から 1 週間ごとに、実体顕微鏡下で培養物の観察を行った。培養開始 8 週間後に、ほとんどの外植体については、組織全体の膨張あるいはカルス形成が観察されたが、不定胚形成細胞の誘導では、用いた種子のうち、約 1% の頻度で不定胚形成細胞の増殖が認められた (図-1)。得られた不定胚形成細胞は誘導時と同じ培養条件で 2～3 週間ごとに継代培養することで維持・増殖が可能であった (図-2)。

**2. 不定胚の誘導と不定胚の成熟化** 増殖させた細胞を不定胚誘導用の培地に移すと、不定胚の形成・成熟が見られた (図-3)。培養開始 6 週間後に、成熟不定胚の誘導率の調査を行ったところ、最もよい結果の場合は、シャーレ当たり 282 個の不定胚が形成され、ポリエチレングリコールの効果に関しては、100～200

g/l を添加した場合に無添加の場合の 20 倍以上の不定胚が得られた (図-4)。ポリエチレングリコールの添加が不定胚の形成や成熟に有効であることは、他の針葉樹においても報告されている (2, 3, 4, 5)。

**3. 不定胚の発芽と個体再生** 無処理の成熟不定胚を直接に発芽用培地上で培養すると、不定胚全体の膨脹が促進されたが、不定胚の発芽は見られなかった (図-5)。これとは対照的に、3 週間乾燥処理が施された不定胚 (図-6) は植物生長調節物質を含まない培地に移すと、約 1-2 週間後に発芽の開始がみられ (図-7)、4 週間目に 85%以上の発芽率を示した。発芽後に、約 9 割のものが植物体を形成した (表-1)。乾燥処理が不定胚の発芽促進に有効であることは、アカマツ、クロマツなどにおいても報告されている (6, 7)。さらに植物体を生長させるため、同一の培地または肥料を含むフロリアライト培養土に移植し、図-8に示すように健全な生長が見られた。また、プラスチック内で生長した個体を適切に順化し (図-9)、フィールドでの生育状況をモニタリングしている (図-10)。

### IV おわりに

今回は、リュウキュウマツの種子から取り出した 1 つの胚をシャーレ内で培養することで、一度に大量のクローン胚を作り出すことに成功した。その後不定胚の乾燥処理を行うことによって、クローン胚から効率よく植物に生長させることもできた。シャーレの数は任意に増やして培養できるため、ほぼ無限にクローン個体を作り出せることになる。今回の研究により、目的とするリュウキュウマツ個体を限られた狭い空間で、大量に作り上げることが可能となった。

### 引用文献

- (1) 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: 281-296.
- (2) 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. *J For Res* 7: 23-34.
- (3) MARUYAMA E., HOSOI Y., ISHII K. (2005) Propagation of Japanese red pine (*Pinus densiflora*

Zieb et Zucc.) via somatic embryogenesis. Propagation of Ornamental Plants 5: 199-204.

- (4) MARUYAMA E., HOSOI Y. (2007) Polyethylene glycol enhances somatic embryo production in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Propagation of Ornamental Plants 7: 57-61.
- (5) 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.
- (6) MARUYAMA E., HOSOI Y. (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. Plant Cell Tiss Organ Cult 110: 45-52.
- (7) ROBERTS D.R., SUTTON B.C.S., FLINN B.S. (1990) Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can J Bot 68: 1086-1090.

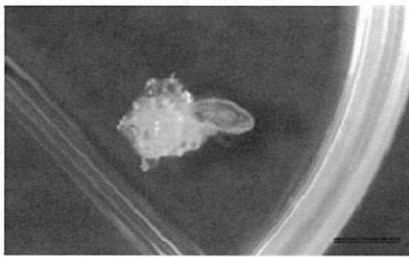


図-1. 不定胚形成細胞の誘導 (バー: 1 cm)

Fig.1. Induction of somatic embryogenic cells (bar: 1 cm)

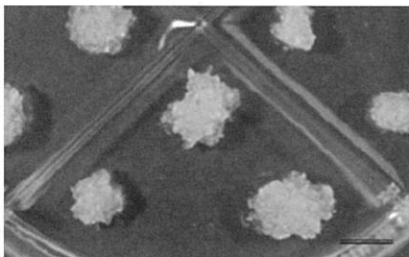


図-2. 不定胚形成細胞の維持・増殖 (バー: 1 cm)

Fig.2. Maintenance and proliferation of somatic embryogenic cells (bar: 1 cm)

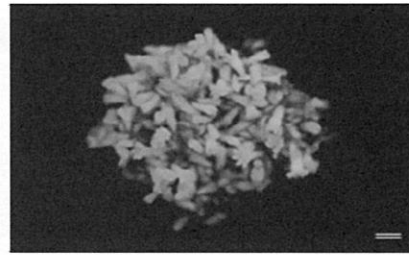


図-3. 不定胚の形成・成熟化 (バー: 1 cm)

Fig.3. Maturation of somatic embryos (bar: 1 cm)

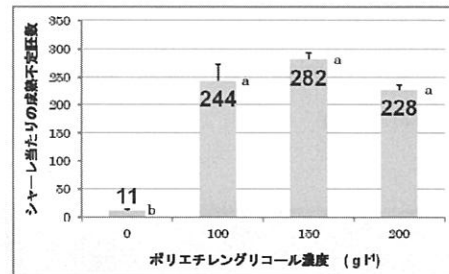


図-4. 成熟不定胚形成におけるPEGの効果。異なるアルファベット間で有意差があることを示す (Tukey HSD 検定,  $p < 0.05$ )。

Fig.4. Effect of polyethylene glycol (PEG) concentration on maturation of somatic embryos. Means followed by different letter are significantly different at  $p < 0.05$  (Tukey HSD)

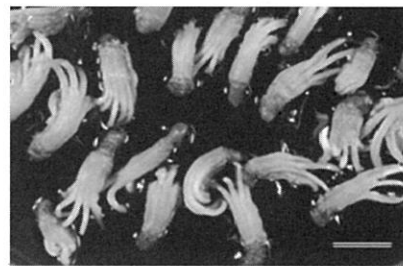


図-5. 発芽しない無処理の不定胚 (バー: 1 cm)

Fig.5. Non-treated embryos failed to germinate (bar: 1 cm)

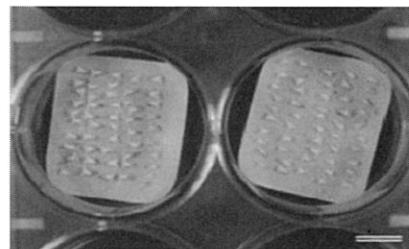


図-6. 不定胚の乾燥処理 (バー: 1 cm)

Fig.6. Desiccation of somatic embryos (bar: 1 cm)

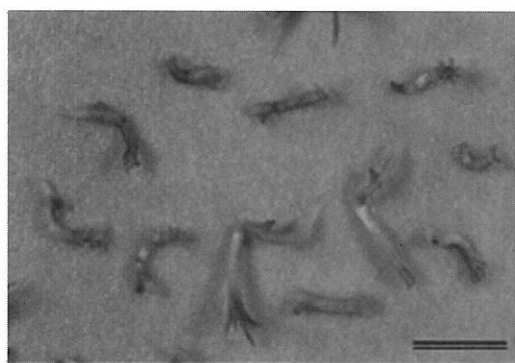


図- 7. 乾燥処理後に発芽開始する不定胚の様子 (バー : 1 cm)

Fig.7. Somatic embryos germinating after desiccation treatment (bar: 1 cm)



図- 9. 不定胚由来の順化苗 (バー : 1 cm)

Fig.9. Acclimatized plants (bar: 1 cm)

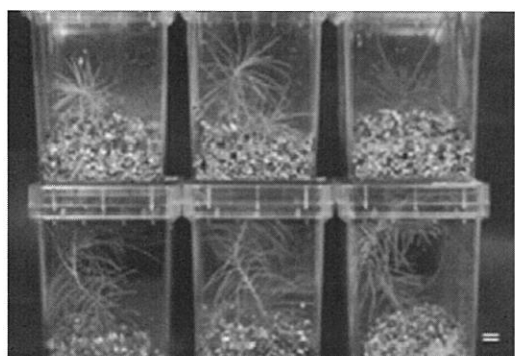


図- 8. 培養土で生長する不定胚由来の個体 (バー : 1 cm)

Fig.8. Plantlets growing in vitro (bar: 1 cm)



図-10. 野外で生長する不定胚由来の個体 (バー : 1 m)

Fig.10. Somatic embryo-derived plants growing in the field (bar: 1 m)

表- 1. ポリエチレングリコール (PEG) の異なる濃度を含む培地で成熟したリュウキュウマツ不定胚の乾燥処理後の発芽率及び個体再生率

Table 1. Germination and conversion frequencies after desiccation treatment in somatic embryos of *Pinus luchuensis* matured on media containing different concentrations of polyethylene glycol (PEG)

不定胚成熟化用培地に 添加した PEG の濃度 (g/l)	発芽率 (% ± 標準誤差)		個体再生率 (% ± 標準誤差)	
	無処理	乾燥処理	無処理	乾燥処理
100	0	90 ± 1.2	0	88 ± 2.1
150	0	90 ± 4.1	0	87 ± 6.0
200	0	85 ± 2.4	0	82 ± 1.8

n = 5 シャーレ (シャーレ当たり 30~50 不定胚)