

# 不定胚を経由するリュウキュウマツの植物体再生

森林総合研究所 丸山 E. 毅・細井 佳久

Plant regeneration of *Pinus luchuensis* through somatic embryogenesis

Tsuyoshi E. MARUYAMA, Yoshihisa HOSOI

(Forestry and Forest Products Research Institute)

## 1. はじめに

南西諸島に広く分布するリュウキュウマツは、アカマツやクロマツ同様マツノザイセンチュウによる松枯れの被害が大きな問題となっている。その対策として、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所で進められている。一般的には、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、ザイセンチュウに強いものを選び、その後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。

## 2. 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90mmのシャーレを用い、培地には無機塩を1/2濃度に下げたEM培地 (Embryo Maturation Medium) <sup>1)</sup> にシヨ糖 10g/l、グルタミン 1g/l、カゼイン 0.5g/l、ゲルライト 3g/l、2,4-D 10 $\mu$ M、BAP 5 $\mu$ M 添加した固形培地を用いた。培養は暗黒下、25 $^{\circ}$ 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

不定胚形成には、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。培地にはEM培地にマルトース 30g/l、ポリエチレングリコール (0, 100, 150, 200g/l)、活性炭 2g/l、グルタミン 0.75g/l、アスパラギン 0.5g/l、アルギニン 0.25g/l、シトルリン 0.04g/l、オルニチン 0.04g/l、リシン 0.03g/l、アラニン 0.02g/l、プロリン 0.02g/l、ゲルライト 3g/l、

アブシジン酸 100  $\mu$ M 添加した固形培地を用いた。培地上には、約 1,000mg FW の不定胚形成細胞 (200mg FW  $\times$  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、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。次に、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。

### 3. 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)。

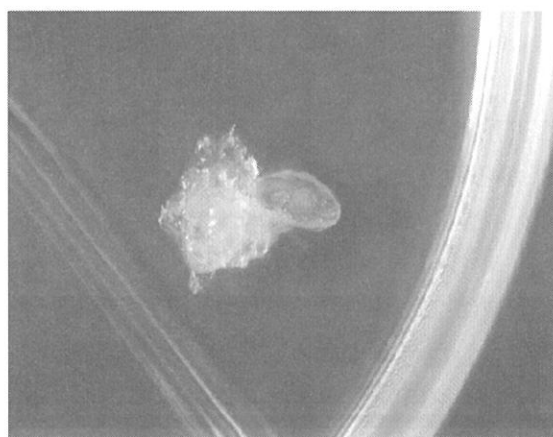


図 1 誘導された不定胚形成細胞塊

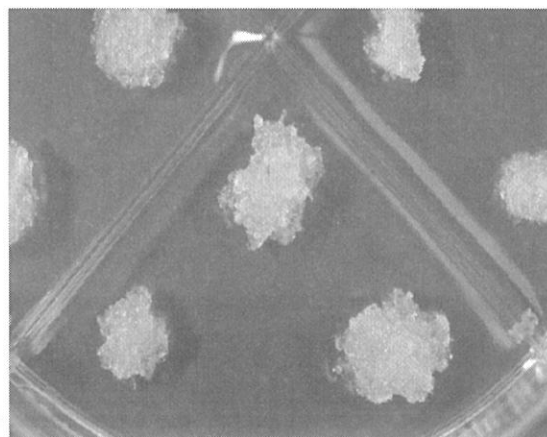


図 2 不定胚形成細胞の増殖

#### 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 B)。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、直径 90mm のシャーレ当たり約 300 個の不定胚が形成された。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 3 A)。ポリエチレングリコールの添加が不定胚の形成・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<sup>2, 3, 4, 5)</sup>。

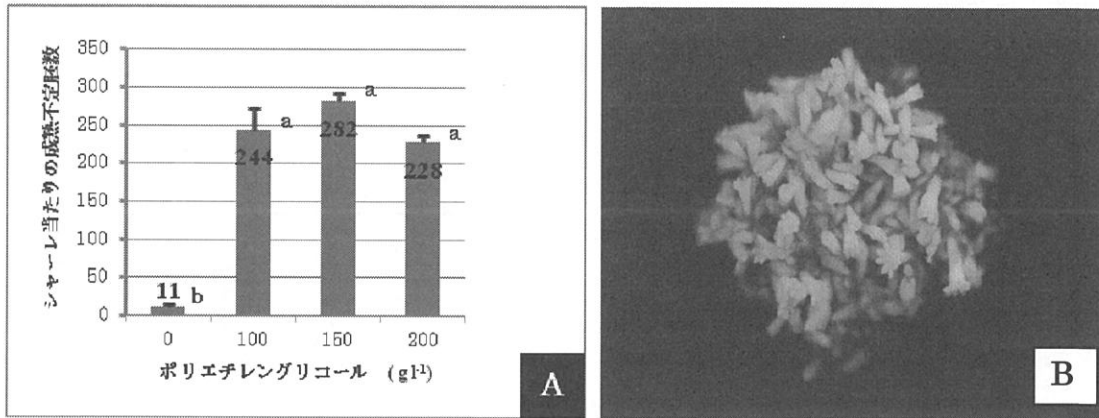


図3 A：成熟不定胚形成におけるポリエチレングリコールの効果。B：培養開始6週間後の成熟不定胚形成の様子

### 3) 不定胚の発芽と個体再生

乾燥処理した成熟不定胚（図4）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5）、4週間目に85%以上の発芽率を示した。発芽した不定胚を、さらに幼植物体に生長させるため、同一の培地または肥料を含むフロリアライト

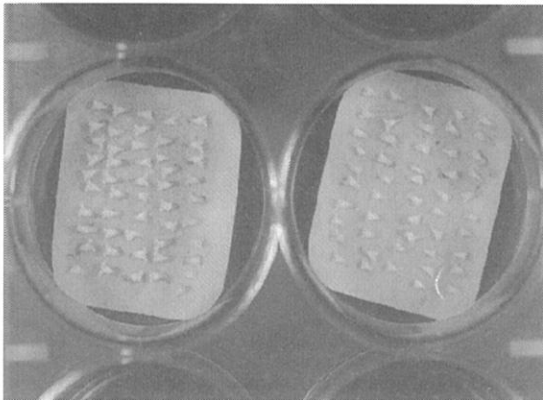


図4 不定胚乾燥処理の様子



図5 不定胚の発芽

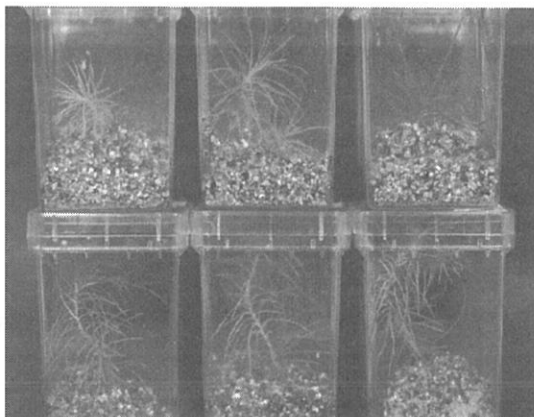
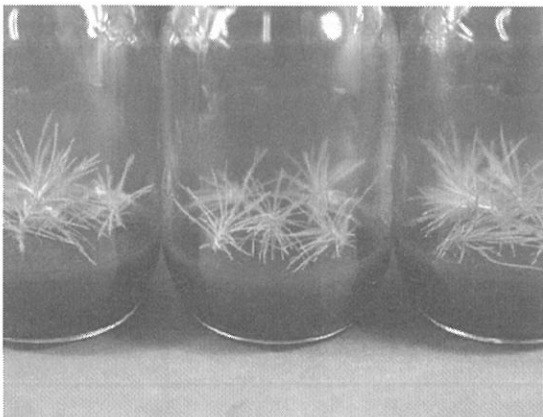


図6 培地（A）と培養土（B）で生長する不定胚由来の個体

培養土に移植し、図6に示すように健全な生長が見られた。また、フラスコ内で生長した個体を適切に順化し（図7）、野外での生長状況をモニタリングしている（図8）。



図7 順化させた個体



図8 野外で生長する個体

#### 4. おわりに

今回は、リュウキュウマツの種子の中から取り出した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、その後の培養で、クローン胚から確実に植物に生長させることもできた。シャーレの数はいくらかでも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. 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, 2000
- 2) Maruyama, E., Hosoi, Y., Ishii, K. 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, 2002
- 3) Maruyama, E., Hosoi, Y., Ishii, K. Propagation of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Zieb et Zucc.) via somatic embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* 5(4): 199-204, 2005
- 4) Maruyama, E., Hosoi, Y. Polyethylene glycol enhance somatic embryo production in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Propagation of Ornamental Plants* 7(2): 57-61, 2007
- 5) 丸山毅. 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, 2008