

不定胚形成によるヤツガタケトウヒの個体再生

丸山 E. 毅・細井佳久・勝木俊雄 (森林総合研究所)

要旨: ヤツガタケトウヒ (*Picea koyamae* Shirasawa) は、本州中部の八ヶ岳南部から南アルプスのみに自生している。現在、生存する個体数はきわめて少ないため、環境庁のレッドデータブックで絶滅危惧種 II 類 (VU: 絶滅の危機が増大している種) としてリストされている。そのため、ヤツガタケトウヒの現地 (*in situ*) ならびに現地外 (*ex situ*) 保護・保全が望まれている。現地外におけるヤツガタケトウヒの遺伝資源保全のため、一つの手段として組織培養による増殖の研究を進めている。今回は、未熟種子を用いて、不定胚を経由するヤツガタケトウヒの個体再生条件の検討を行った。種子胚を用いた場合は、不定胚形成細胞の誘導頻度は 9-17%であった。誘導された不定胚形成細胞について、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を 10 μ M、6-ベンジルアミノプリンを 5 μ M 添加した固体 EM 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、マルトース、アブシジン酸、ポリエチレングリコール及び活性炭を含む培地上で培養すると、培養開始約 6 週間後に、直径 90mm のシャーレ当たり、1,000 個以上の不定胚が形成された。成熟した不定胚を、植物成長調節物質を含まない培地に移すと、約 1-2 週間後に発芽を開始した。

キーワード: ヤツガタケトウヒ, 絶滅危惧種, 不定胚形成, マイクロプロパゲーション, 胚培養, EM 培地

I はじめに

ヤツガタケトウヒ (*Picea koyamae* Shirasawa) は、本州中部にのみ自生し、現存する株数の少なさから、絶滅が危惧されている (1)。そのため、本種の現地ならびに現地外保護・保全が望まれている。しかし、天然更新の促進や実生苗の補植についての育成技術は、まったく確立されていない。現地外において、ヤツガタケトウヒの遺伝資源を保全する一つの手段として、組織培養による増殖の研究を進めている。以前、4℃で貯蔵した成熟種子を用いて、不定胚形成による個体再生を試みたところ、不定胚の形成と発芽に成功したが、植物体までには至らなかった (2)。今回は、未熟な種子胚から誘導した胚形成能力を持つ培養細胞 (不定胚形成細胞) を用いて、不定胚を経由したヤツガタケトウヒの個体再生方法を検討した。

II 実験方法

1. 球果の採取 2009年8月上旬に、長野県八ヶ岳の西岳国有林に生育している2個体 (母樹) から球果を採取し (図-1)、不定胚形成細胞の誘導実験に供した。

2. 不定胚形成細胞の誘導と継代培養 球果から取り出した種子 (図-2) の表面殺菌は、次の手順で行った。99.5%エタノールに3分間浸し、次に2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20-30分間浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄した。その後、種子から取り出した胚、または種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体 (Megagametophyte) を、次に示す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 (3) に、1%ショ糖、1.5g グルタミン、0.3%ゲルライト、10 μ M 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、5 μ M 6-ベンジルアミノプリンをそれぞれ添加した固体培地を用いた。培養は、暗黒下、25℃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、培養環境で維持・増殖させた。

3. 不定胚の誘導 増殖した不定胚形成細胞は、不定胚の成熟用培地に移植した。培地としては、EM培地に5%マルトース、10%ポリエチレングリコール、0.2%活性炭、100 μ M アブシジン酸、0.3%ゲルライトを添加した培地を用いた。培地上には、約500mgFWの不定胚形成細胞を置床して培養した。培養は暗黒下、25℃で行った。

4. 不定胚の発芽と個体再生 培地上で成熟した不定胚は、植物成長調節物質を含まないEM培地に移し、16時間蛍光灯照明 (約4,000 lx)、25℃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 (0.1% Hyponex) を含むフロリアライト培養土に移植し、幼植物体に成長させた。

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。種子胚を含む雌性配偶体を用いた場合は、殆どの外植体について、組織全体の膨張が観察されたが、不定胚形成細胞の誘導は見られなかった。種子胚を用いた場合は、不定胚形成細胞の誘導頻度は9-17%であった (表-1)。誘導された不定胚形成細胞 (図-3, 4) を、2~3週間毎に維持・増殖させ (図-5)、不定胚誘導の実験に用いた。

2. 不定胚の誘導と不定胚の成熟化 各母樹から3系統ずつ(計6系統)の不定胚形成細胞を用いて、不定胚の誘導実験を行った。いずれも4回の繰り返し実験で、成熟不定胚の誘導率の調査を行った。不定胚形成細胞を成熟用培地に移植し、培養開始約6週間後に、最もよい結果の場合、直径90mmのシャーレ当たり1,000個以上の不定胚が形成された(図-6, 7, 8)。しかし、表-2に示したように、系統による成熟不定胚の形成数が著しく異なった。このような結果は、他の多数の針葉樹でも報告されている(4, 5, 6)。

3. 不定胚の発芽と個体再生 成熟させた不定胚を、植物成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-9, 10)、4週間目に5割以上の発芽率を示した。発芽した不定胚(図-11)を、さらに幼植物体に成長させるため、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た(図-12, 13)。

IV. おわりに

今回は、未熟種子由来の不定胚形成細胞を用いて、不定胚を経由するヤツガタケトウヒの個体再生(図-14)に初めて成功した。現在、発芽率を向上させるため、さらに種々の培養条件などを再検討している。

引用文献

- (1) 勝木俊雄(2003)日本の絶滅危惧樹木シリーズ(7)-ヤツガタケトウヒ-。林木の育種 207: 17-19.
- (2) 丸山エミリオ毅, 細井佳久, 石井克明, 勝木俊雄(2007)絶滅危惧種ヤツガタケトウヒの不定胚形成。日林講 118: 520.
- (3) MARUYAMA E., TANAKA T., HOSOI Y., ISHII K., MOROHOSHI N. (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.
- (4) MARUYAMA E., ISHII K., HOSOI Y. (2005) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *J. For. Res.* 10: 73-77.
- (5) MARUYAMA E., HOSOI Y., ISHII K. (2007) Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *J. For. Res.* 10: 403-407
- (6) MARUYAMA E., HOSOI Y., ISHII K. (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43: 28-34.

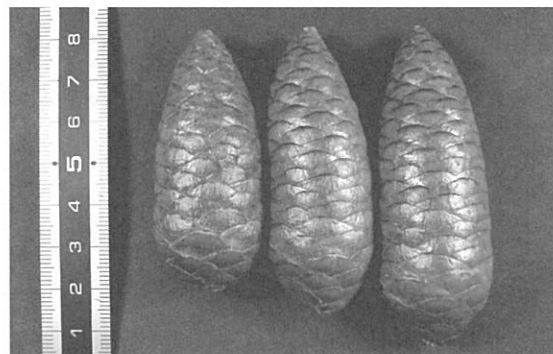


図-1. 2009年8月上旬に採集した球果

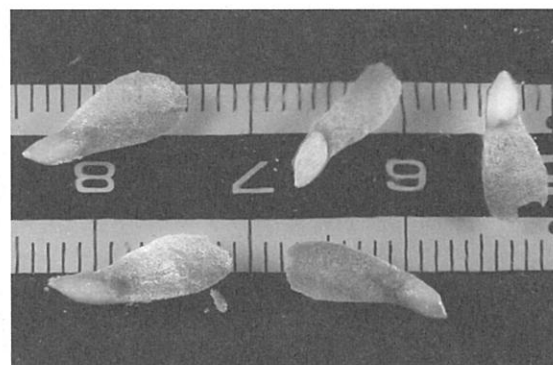


図-2. 球果から取り出した種子



図-3. 誘導された不定胚形成細胞塊(母樹RB-012, 横:1cm)

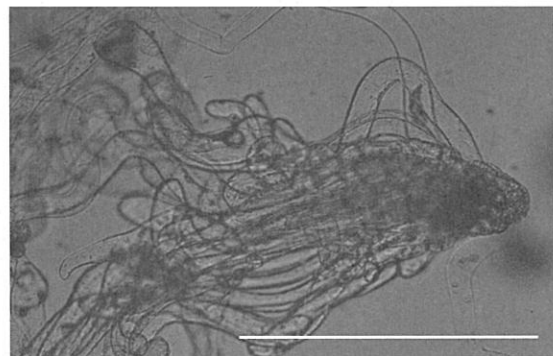


図-4. 不定胚形成細胞(系統ヤ012-9-2, 横:1mm)

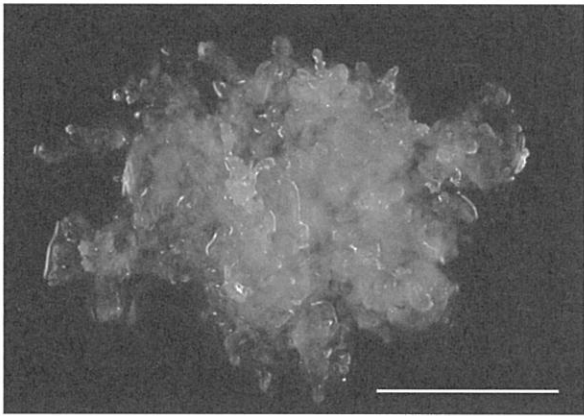


図-5. 不定胚形成細胞の増殖 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)

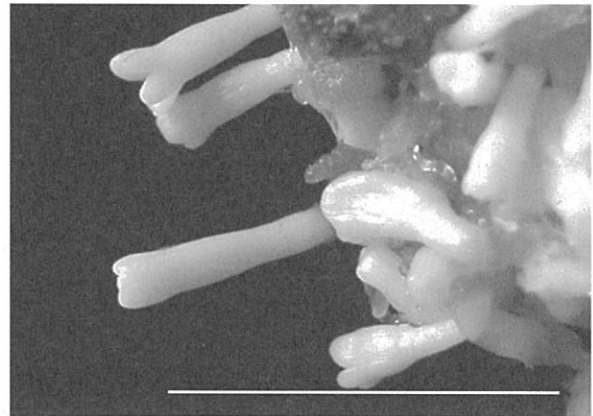


図-8. 成熟不定胚 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)

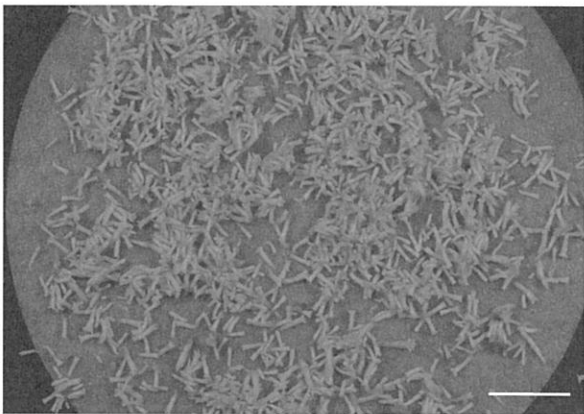


図-6. 誘導された不定胚 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)



図-9. 不定胚の発芽試験 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)

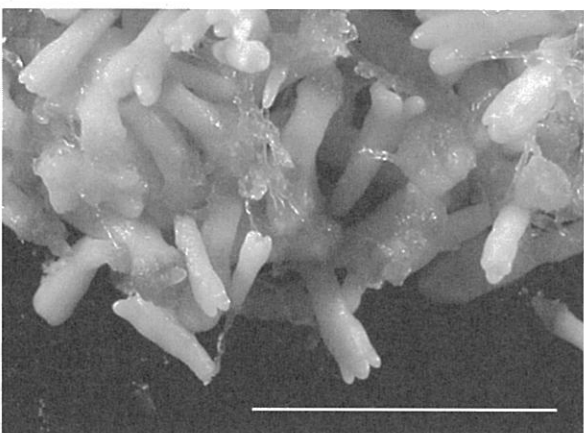


図-7. 成熟不定胚の形成 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)

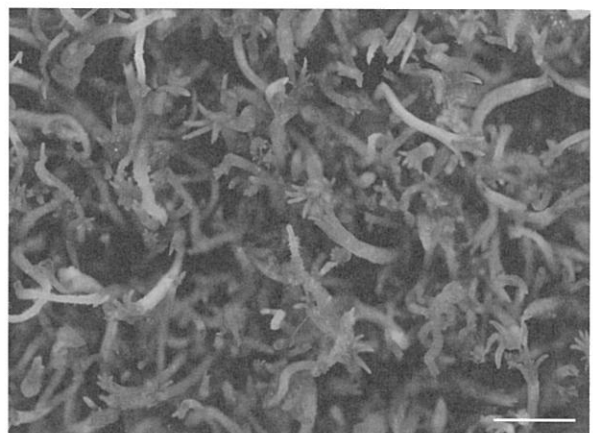


図-10. 発芽の様子 (系統ヤ012-9-2, 1 cm)

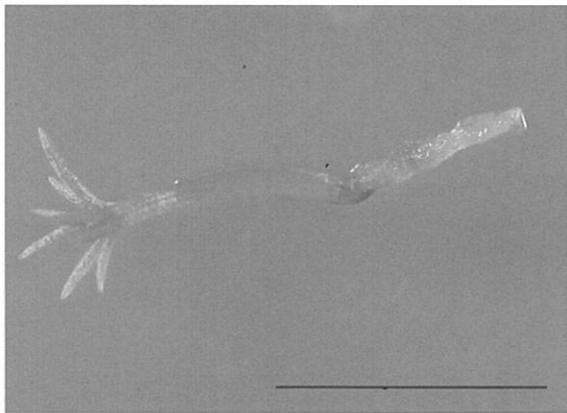


図-11. 発芽した不定胚 (系統ヤ 012-9-2, 横: 1 cm)

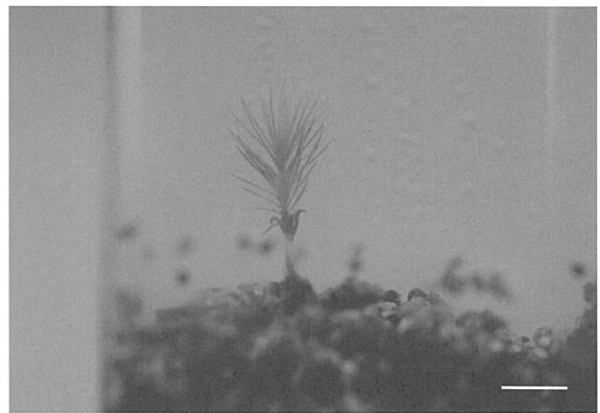


図-14. 幼植物体 (系統ヤ 012-9-2, 横: 1 cm)



図-12. EM培地で成長させた個体 (系統ヤ 012-9-2, 横: 1 cm)

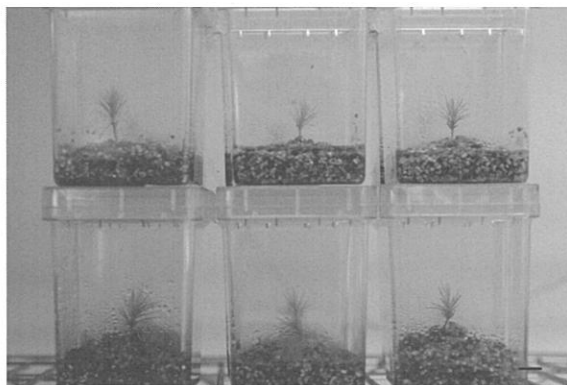


図-13. 培養土で成長させた個体 (系統ヤ 012-9-2, 横: 1 cm)

表-1. 異なる球果採取源 (母樹) と外植体からの不定胚形成細胞の誘導頻度

母 樹	種子胚	種子胚を含む 雌性配偶体
RB-012	8.9% (16/180) *	0.0% (0/240)
PC-533	16.7% (16/96)	0.0% (0/96)

* (不定胚形成細胞を誘導した外植体数/全外植体数)

表-2. 誘導された不定胚形成細胞系統からの成熟不定胚の形成数

母 樹	細胞系統	成熟不定胚の形成数*
RB-012	ヤ 012-9-1	0 (0)
	ヤ 012-9-2	1,206 (308)
	ヤ 012-9-16	212 (67)
PC-533	ヤ 533-9-2	530 (95)
	ヤ 533-9-5	318 (166)
	ヤ 533-9-7	116 (64)

*不定胚数は、直径 90mm のシャーレ当たり、4回繰り返し実験の平均値。() 内は、標準偏差