

ヒメバラモミ未熟種子からの不定胚誘導

丸山 E. 毅・細井佳久・勝木俊雄 (森林総合研究所)

要旨: ヒメバラモミ (*Picea maximowiczii* Regel ex Mast.) は日本固有種であり、ハヶ岳と南アルプスのみに分布している。現在、自生母樹総数、数百個体程度と推定されていることから、2000年環境省作成の植物版のレッドリストでは絶滅の恐れの高い絶滅危惧種 IB 類 (EN) に指定されている。絶滅危惧種保護の観点から、現地ならびに現地外の増殖・保存が望まれている。そのための手段の一つとして、組織培養手法の利用が有効である。今回は、不定胚形成による苗木の生産を目指して、未熟種子から得られた細胞を材料とし、ヒメバラモミの不定胚誘導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 16%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 添加した固形 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、ポリエチレングリコール、アブシジン酸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、数百個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、1-3 週間後に発芽の開始が見られた。

キーワード: ヒメバラモミ, 絶滅危惧種, 不定胚形成, *Picea maximowiczii*, 胚培養

Abstract: Himebaramomi (*Picea maximowiczii* Regel ex Mast.) is an endemic species in Japan, distributed only in the Southern Alps and the Yatsugatake Mountains. Due to the total number of remaining mother trees estimated in about several hundred individuals, this species has been designated in the Red List Plant version by the Ministry of the Environment (year 2000) as an endangered species class IB with very high risk of extinction (EN). From point of view of endangered species protection, the *in situ* and *ex situ* propagation and conservation are desirable. One of the effective methods for this purpose is the use of tissue culture techniques. This time, aiming to produce seedlings through somatic embryogenesis, cells obtained from immature seeds were used as experimental material to investigate the conditions for somatic embryo induction in Himebaramomi. When using the seed embryo as explant, the induction frequency of somatic embryogenic cells was 16%. Induced embryogenic cells were maintained and proliferated by subculturing at 2 to 3 weeks intervals on EM medium supplemented with 10 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and 5 μ M 6-benzylaminopurine. Proliferated embryogenic cells were transferred to maturation medium containing maltose, polyethylene glycol, abscisic acid, and activated charcoal, and about six weeks after culture several hundred somatic embryos per Petri dish (90 x 20 mm) were observed. Mature somatic embryos were transferred to medium with no plant growth regulators, and after 1 to 3 weeks of culture the start of germination was observed.

Keywords: Himebaramomi, endangered species, somatic embryogenesis, *Picea maximowiczii*, embryo culture

I はじめに

マツ科トウヒ属に分類されるヒメバラモミ (*Picea maximowiczii* Regel ex Mast.) は、本州中部の長野県と山梨県だけに分布するが、現存する株数が少ないため、絶滅が危惧されている (2)。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、ヒメバラモミについては天然更新の促進や実生苗の補植等の育成技術は、まったく確立されていない。そこで、現地外におけるヒメバラモミ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 $^{\circ}$ C で貯蔵した成熟種子を用いて、不定胚形成細胞 (胚形成能力を持つ培養細胞) の誘導を試みたが、成功には

至らなかった。今回は、未熟な種子胚から誘導した不定胚形成細胞を用いて、ヒメバラモミの不定胚誘導条件を検討した。

II 実験方法

1. 球果の採取 2009年8月上旬に、長野県川上村梓山に生育している2個体(母樹)から球果を採取し(図-1, 2)、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-3)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 (6) に、1% ショ糖、1.5g/L 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、25°C、暗黒下で行った。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 (4000)、100 μ M アブジン酸、0.2% 活性炭、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 25°C、暗黒下で行った。

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 3000-4000 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 (Megagametophyte) を用いた場合は、ほとん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。取り出した種子胚を用いた場合は (図-4)、不定胚形成細胞の誘導頻度は 0~32% であった (表-1)。誘導された不定胚形成細胞 (図-5) を、2~3 週間毎に維持・増殖させ (図-6)、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 7 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は (HM680-9-3 細胞系統)、直径 90mm のシャーレ当たり約 900 個の不定胚が形成された (表-2)。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、ヤツガタケトウヒや外国トウヒなどでも報告されている (1, 3, 4, 5, 7, 8)。

3. 不定胚の発芽と個体再生 成熟させた不定胚 (図-7, 8) を、植物成長調節物質を含まない EM 培地に移す

と、1-3 週間後に発芽の開始がみられ (図-9, 10, 11)、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-12) を、さらに幼植物体に成長させるため、同一の培地 (図-13, 14) 又はフロリアライト培養土に移植した (図-15)。

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、ヒメバラモミ不定胚の誘導に必要な条件をほぼ確定した。今後、個体再生の効率を向上させるため、再検討する必要がある。

引用文献

- (1) BOZHKO V.P.T., von ARNOLD S. (1998) Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* **104**: 211-224.
- (2) 勝木俊雄 (2003) 日本の絶滅危惧樹木シリーズ (21) -ヒメバラモミ-. 林木の育種 **221**: 21-24.
- (3) 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.
- (4) 丸山 E. 毅, 細井佳久, 勝木俊雄 (2011) 不定胚形成によるヤツガタケトウヒの個体再生. 関東森林研究 **62**: 127-130.
- (5) MARUYAMA E., ISHII K., HOSOI Y. (2005) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *J. For. Res.* **10**: 73-77.
- (6) 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.
- (7) PARK Y.S., POND S.E., BONGA J.M. (1994) Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 742-750.
- (8) ROBERTS D.R., FLINN B.S., WEBB D.T., WEBSTER F.B., SUTTON B.C.S. (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and

accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* **78**: 355-360.



図-1. ヒメバラモミの母樹 (バー: 1m)
Fig. 1. Himebaramomi mother tree (bar: 1m)



図-2. 採集前の球果 (バー: 5cm)
Fig. 2. Cones before collection (bar: 5cm)



図-3. 球果から取り出した種子
Fig. 3. Seeds extracted from cones

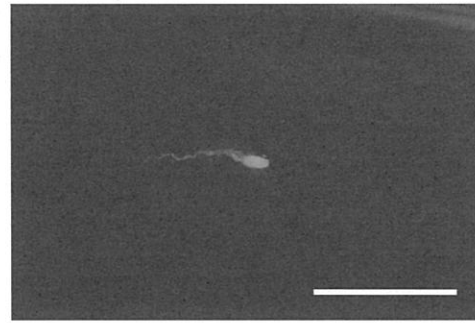


図-4. 種子から摘出した胚 (バー: 1cm)
Fig. 4. Excised embryo from seed (1cm)

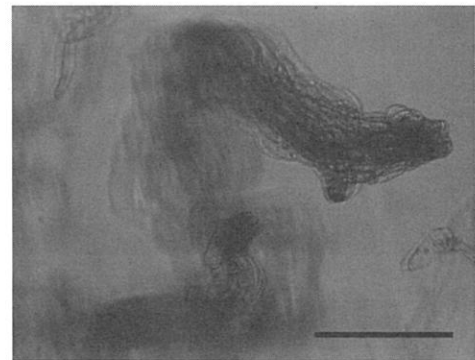


図-5. 誘導された不定胚形成細胞 (バー: 1mm)
Fig. 5. Induced somatic embryogenic cells (bar: 1mm)

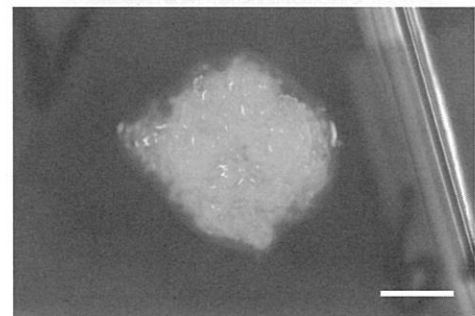


図-6. 不定胚形成細胞の増殖 (バー: 1cm)
Fig. 6. Proliferation of embryogenic cells (bar: 1cm)



図-7. 誘導された不定胚 (バー: 1cm)
Fig. 7. Induction of somatic embryos (bar: 1cm)

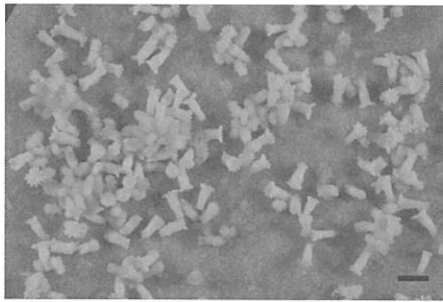


図-8. 誘導された不定胚 (バー:1cm)
Fig. 8. Induction of somatic embryos (bar: 1cm)

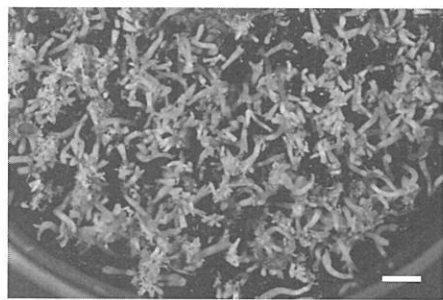


図-9. 不定胚の発芽 (バー:1cm)
Fig. 9. Germination of somatic embryos (bar: 1cm)

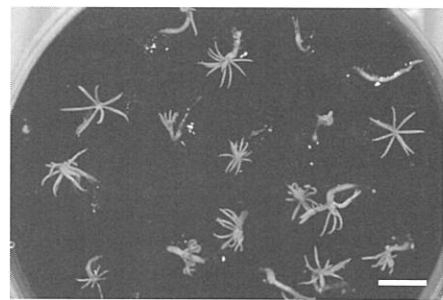


図-10. 不定胚の発芽 (バー:1cm)
Fig. 10. Germination of somatic embryos (bar: 1cm)

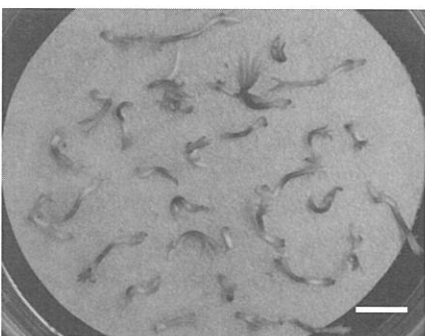


図-11. 不定胚の発芽 (バー:1cm)
Fig. 11. Germination of somatic embryos (bar: 1cm)

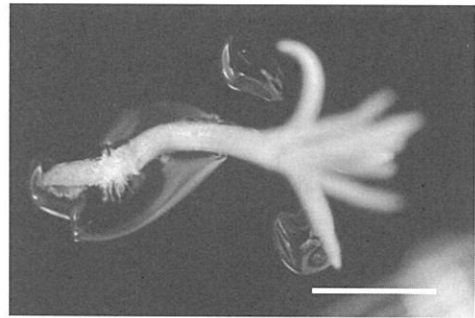


図-12. 発芽した不定胚 (バー:1cm)
Fig. 12. Germinated somatic embryo (bar: 1cm)

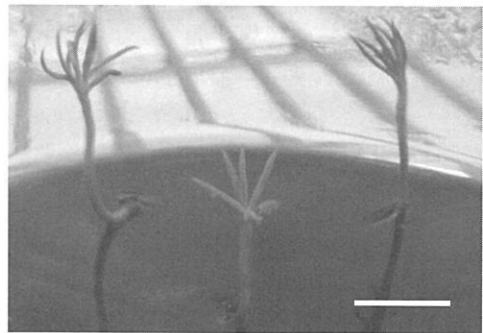


図-13. 新鮮な培地に移植した不定胚 (バー:1cm)
Fig. 13. Embryos transfer to fresh medium (bar: 1cm)

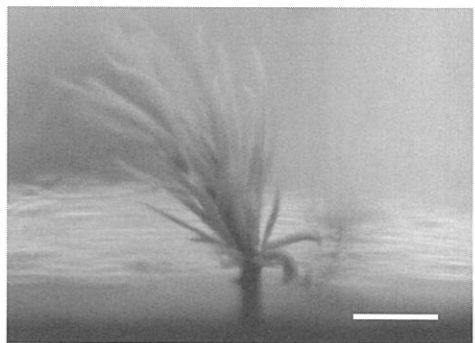


図-14. EM 培地で成長する個体 (バー:1cm)
Fig. 14. Plantlet growing on EM medium (bar: 1cm)



図-15. 培養土で成長する個体 (バー:1cm)
Fig. 15. Plantlet growing on floralite (bar: 1cm)

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

Table 1. Embryogenic cell induction frequency from 2 different mother trees

母 樹	種子胚	種子胚を含む 雌性配偶体
PE-680	32 % (16/50) *	0.0% (0/132)
PE-681	0 % (0/ 52)	0.0% (0/ 144)

* (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

Table 2. Somatic embryo maturation from different embryogenic cell lines

細胞系統	成熟不定胚の形成数*
HM680-9-1	0 (0)
HM680-9-2	276 (33)
HM680-9-3	891 (58)
HM680-9-4	718 (80)
HM680-9-6	566 (23)
HM680-9-7	82 (11)
HM680-9-8	209 (31)

*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、平均の標準誤差

