

ポリエチレングリコール又は高濃度ゲランガムを添加した培地上で 成熟したクロマツ不定胚からの植物再生

Plant regeneration from somatic embryos of Japanese black pine after maturation with polyethylene glycol or a high concentration of gellan gum

丸山 E. 肇^{*1}・細井佳久^{*1}

Tsuyoshi E. MARUYAMA^{*1} and Yoshihisa HOSOI^{*1}

* 1 森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, 305-8687 Japan

要旨：大量増殖技術として、不定胚利用による個体再生系は最も優れている系の一つであるが、種によって植物再生率が低いことが問題となっている。国産マツについても、不定胚は効率良く得られるが、その後の発芽率は極めて低い。そこで、不定胚を経由するクロマツ (*Pinus thunbergii*) の植物再生において、ポリエチレングリコール添加法および高濃度ゲランガム添加法の二つの不定胚誘導法の効果を調べた。形成した成熟不定胚は、植物生長調節物質を含まない 1/2EM 固形発芽用培地に移し、16 時間蛍光灯照明（約 4,000 lx）、25°C の環境下で培養した。結果としては、ポリエチレングリコールを添加した培地上で成熟した不定胚からの植物再生率は 10% 程度の低い値にとどまったのに対して、高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟した不定胚は 80% 程度の高い再生率を示した。

キーワード：クロマツ、不定胚形成、*Pinus thunbergii*、ポリエチレングリコール、ゲランガム

Abstract: Somatic embryogenesis is one of the most promising techniques for mass propagation. However, for many species, a low plant regeneration rate has been one of the problems for practical use. For Japanese pines, although high maturation rates of cotyledonary embryos were described, the subsequent germination rate was extremely low. Therefore, we examined the effect of two somatic embryo maturation methods (polyethylene glycol addition method, and high concentration of gellan gum addition method) on the plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). Matured somatic embryos were transferred to a 1/2EM solid germination medium without plant growth regulators and cultured under a 16 hours fluorescent lighting of about 4,000 lx at approximately 25°C. As a result, the plant regeneration rate from somatic embryos matured on medium containing polyethylene glycol remained low as around 10%, whereas somatic embryos matured on medium supplemented with a high concentration of gellan gum showed a high regeneration rate of about 80%.

Keywords: Japanese black pine, somatic embryogenesis, *Pinus thunbergii*, polyethylene glycol, gellan gum

I はじめに

クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) は、日本のもっとも重要な樹種の一つである。しかし、現在はマツノザイセンチュウによる枯損がクロマツ林において重大な問題となっている。対策として、選抜育種事業や遺伝子操作技術による抵抗性の付与などが考えられる。これらを可能にするため効率の良い安定的な植物体再生系の確立が期待される。大量増殖技術として、不定胚形成は最も優れている系の一つであるが、種によって植物再生率が低いことが問題となっている（1）。国産マツについても、不定胚は効率良く得られるが、その後の発芽率は極めて低い（4、5）。そこで、不定胚を経由するクロマツの植物再生において、針葉樹の不定胚形成誘導に最も使用されているポリエチレングリコール添加法および高濃度ゲ

ランガム添加法の二つの不定胚誘導法の効果を調べた。

II 実験方法

1. 球果の採取 球果の採取には、森林総合研究所及び茨城県林業技術センター内に生育するクロマツクローン（表-3）を用い、7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% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15-20 分浸漬・搅拌し、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 (バルマーク) を用い、培地には無機塩濃度を 1/2 に下げた EM 培地（6）に、ショ

糖 10 g/l, グルタミン 1 g/l, カゼイン 0.5 g/l, ゲランガム（ゲルライト[®], 和光純薬工業株式会社）3 g/l, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 10 μM, 6-ベンジルアミノプリン (BAP) 5 μM 添加した固形培地を用いた（表-1 : Induction）。培養は暗黒下, 25°Cで行った。誘導後の不定胚形成細胞は、維持・増殖用の培地（表-1 : Proliferation）に移植し、同一の培養環境で維持し、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、径 90, 高さ 20 mm のシャーレ（イワキ）を用い、培地は EM 培地にマルトース 50 g/l, 活性炭 2 g/l, グルタミン 7.3 g/l, アスパラギン 2.1 g/l, アルギニン 0.7 g/l, シトルリン 0.079 g/l, オルニチン 0.076 g/l, リシン 0.055 g/l, アラニン 0.040 g/l, プロリン 0.035 g/l, アブシジン酸 100 μM を添加し、ポリエチレンゴリコール用培地では、ポリエチレンゴリコール 4000（平均分子量 : 3000）を 100 g/l, ゲランガムを 3 g/l 添加した（表-2 : PEG）。一方、高濃度ゲランガム用培地では、ゲランガムを 10 g/l 添加し、ポリエチレンゴリコールは添加しなかった（表-2 : Gellan gum）。培地上には、生重量で約 500 mg の不定胚形成細胞を置床して培養した。培養は暗黒下, 25°Cで行った。

4. 不定胚の発芽と個体再生 発芽用培地には、無機塩濃度を 1/2 に下げた EM 培地にグルコース 30 g/l, 活性炭 2 g/l, グルタミン 0.4 g/l, アルギニン 0.25 g/l, プロリン 0.1 g/l, ゲランガム 6 g/l 添加した固形培地を用いた。形成した成熟不定胚は、発芽用培地に移し、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。

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。不定胚形成細胞の誘導は、系統間差がみられ、培養開始 8 週間後に用いた種子のうち、0～3 % の頻度で不定胚形成細胞の増殖が認められた。得られた不定胚形成細胞（図-1）は誘導時と同じ培養環境で 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。

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、培養開始 6 週間後に不定胚の形成・成熟が見られた（図-2, 3）。成熟不定胚の誘導率は、系統によって著しく異なったが、ポリエチレンゴリコール添加法および高濃度ゲランガム添加法の二つの不定胚誘導法において、シャーレ当たり 100 個以上の不定胚が形成された。

3. 不定胚の発芽と個体再生 ポリエチレンゴリコール添加した培地上で成熟した不定胚を直接発芽用培地で培養すると、不定胚全体の膨脹が促進されたが（図-4），不定胚の発芽率は 15%程度にとどまった（表-3）。それとは対照的に、高濃度ゲランガム添加した培地上で成熟した不定胚を発芽用培地に移すと、約 1-2 週間後に発芽の開始がみられ、4 週間目に 80%程度の発芽率を示した（図-5, 表-3）。また、発芽後に植物体の形成に至ったものが、PEG 培地では約 79% (288/364), ゲランガム培地では約 97% (3579/3683) で、殆どのものが植物体を形成した（表-3）。高濃度ゲランガムの培地への添加は、不定胚の乾燥処理と同じような効果をもたらし、不定胚の発芽促進に有効であることは、ストローブマツ、ヨーロッパアカマツやフランスカイガンショウにおいても報告されている（2, 3）。さらに植物体を生長させるため、発芽用培地に再度移植すると、図-6 に示すように健全な生長が見られた。その後、適切に順化させることで鉢出し可能であった（図-7）。

IV おわりに

不定胚の形成や成熟には、培地へのポリエチレンゴリコールの添加が効果的であったが、その後の植物体再生率は 10%程度で極めて低かった。一方、ポリエチレンゴリコールを含まない、高濃度のゲランガムを添加した培地上で成熟した不定胚の場合は、効率よく植物体形成させることができた。今後、ゲランガム法を用いて、他の国産マツの植物体再生への効果を検討する。

引用文献

- (1) HAY, E.I. and CHAREST, P.J. (1999) Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers. In: Jain, M., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (eds) Somatic embryogenesis in woody plants Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 61-69
- (2) KLIMASZEWSKA, K. and SMITH, D. (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum* **100**: 949-957
- (3) LELU, M-A., BASTIEN, C., DRUGEAULT, A., GOUEZ, M-L. and KLIMASZEWSKA, K. (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* **105**: 719-728
- (4) MARUYAMA, E., HOSOI, Y. and ISHII, K. (2005) Somatic embryo production and plant regeneration of

Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). J For Res 10: 403-407

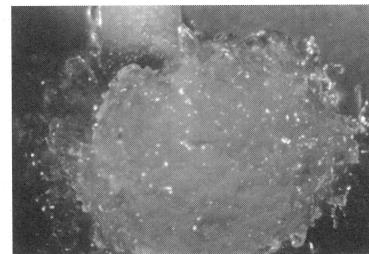
(5) MARUYAMA, E., HOSOI, Y. and ISHII, K. (2005) Propagation of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Zieb. et Zucc.) via somatic embryogenesis. Propagation of Ornamental Plants 4: 199-204

(6) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y. and ISHII, K. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese ceder (*Cryptomeria japonica* D. Don). Plant Biotechnology 17: 281-296

表一 1. 不定胚形成細胞の誘導と増殖用培地組成
Table 1 Composition of induction and proliferation medium

Compound	Induction	Proliferation
KNO ₃	500 [mg/l]	500 [mg/l]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	250
CaCl ₂ · 2H ₂ O	37.5	37.5
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	30	30
NaNO ₃	30	30
KH ₂ PO ₄	35	35
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	80	80
KCl	40	40
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	10
H ₃ BO ₃	20	20
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	12.5	12.5
KI	0.5	0.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.2	1.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	0.1
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15	15
NaEDTA	20	20
Thiamine HCl	2.5	2.5
Pyridoxine HCl	0.25	0.25
Nicotinic acid	2.5	2.5
Glycine	2.5	2.5
myo-Inositol	500	500
Casein Acid Hydrolysate	500	0
Glutamine	1000	1500
Sucrose	10000	30000
Gellan gum	3000	3000
2,4-D	10 [μM]	3 [μM]
BAP	5	1
pH5.6-5.8		

*添加量の異なる部分を太字にした



図一 1. 不定胚形成細胞の誘導

Fig.1 Induction of somatic embryogenic cells

表一 2. 不定胚の成熟用培地組成

Table 2 Composition of maturation medium

Compound	PEG	Gellan gum
KNO ₃	1000 [mg/l]	1000 [mg/l]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	500	500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	75	75
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	60	60
NaNO ₃	60	60
KH ₂ PO ₄	70	70
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	160	160
KCl	750	750
MnSO ₄ · 4H ₂ O	20	20
H ₃ BO ₃	40	40
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	25	25
KI	1	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.4	2.4
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.2	0.2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	30	30
NaEDTA	40	40
Thiamine HCl	5	5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Nicotinic acid	5	5
Glycine	5	5
myo-Inositol	1000	1000
Maltose	50000	50000
Polyethylene glycol	100000	0
Glutamine	7300	7300
Asparagine	2100	2100
Arginine	700	700
Citrulline	79	79
Ornithine	76	76
Lysine	55	55
Alanine	40	40
Proline	35	35
Gellan gum	3000	10000
Abscisic acid	100 [μM]	100 [μM]
pH5.6-5.8		

*添加量の異なる部分を太字にした



図二 2. ポリエチレングリコールを添加した培地上で成熟した不定胚

Fig.2 Maturation of somatic embryos on PEG-medium



図二 3. 高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟した不定胚

Fig.3 Maturation of somatic embryos on gellan gum-medium

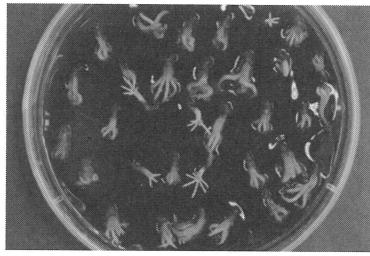


図-4. ポリエチレングリコールを添加した培地上で成熟した不定胚の発芽

Fig.4 Germination of somatic embryos after maturation with polyethylene glycol

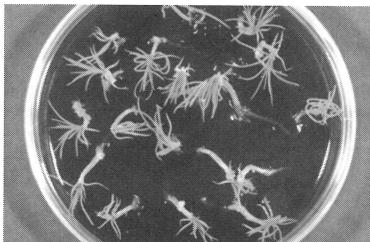


図-5. 高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟した不定胚の発芽

Fig.5 Germination of somatic embryos after maturation with a high concentration of gellan gum



図-6. フラスコ内で生長する植物体

Fig.6 In vitro growing of somatic plants



図-7. 不定胚由来の順化苗

Fig.7 Acclimatized somatic plants

表-3. ポリエチレングリコール又は高濃度ゲランガムを添加した培地上で成熟したクロマツ不定胚の発芽率及び植物体再生率

Table 3 Germination and plant regeneration frequencies from somatic embryos of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) after maturation with polyethylene glycol or a high concentration of gellan gum

Cell Line ^{*1}	Germination frequency (%)		Regeneration frequency (%)	
	Polyethylene glycol	Gellan gum	Polyethylene glycol	Gellan gum
T216-2-1	21 (109/530)* ²	68 (967/1422)	20 (104/530)	67 (946/1422)
T205-3-3	60 (150/250)	70 (171/245)	51 (128/250)	65 (159/245)
T205-3-6	47 (47/100)	83 (132/160)	38 (38/100)	80 (128/160)
T216-4-1	2 (4/200)	92 (194/210)	1 (2/200)	90 (190/210)
T205-4-1	0 (0/100)	94 (94/100)	0 (0/100)	93 (93/100)
T205-4-2	7 (7/100)	95 (295/310)	3 (3/100)	93 (288/310)
T205-4-3	9 (9/100)	91 (100/110)	5 (5/100)	91 (100/110)
Sm64-6-1	6 (12/200)	95 (572/600)	1 (2/200)	93 (555/600)
Tn54-8-5	0 (0/100)	66 (119/180)	0 (0/100)	64 (115/180)
Tn54-8-8	1 (1/102)	84 (84/100)	0 (0/102)	75 (75/100)
Tn54-8-17	2 (2/100)	80 (120/150)	0 (0/100)	79 (118/150)
Tn54-8-20	4 (10/245)	77 (154/200)	0 (3/245)	70 (140/200)
Ms90-9-1	5 (5/100)	90 (358/400)	1 (1/100)	89 (354/400)
Mn9037-9-1	8 (8/100)	81 (323/400)	2 (2/100)	80 (318/400)
Total	15.6 (364/2,327)	80.3 (3,683/4,587)	12.4 (288/2,327)	78.0 (3,579/4,587)

*¹ T216-2-1, T216-4-1 : クローン「216号」から誘導された系統

T205-3-3, T205-3-6, T205-4-1, T205-4-2, T205-4-3 : クローン「205号」から誘導された系統

Sm64-6-1 : クローン「志摩64号」から誘導された系統

Tn54-8-5, Tn54-8-8, Tn54-8-17, Tn54-8-20 : クローン「田辺54号」から誘導された系統

Ms90-9-1 : クローン「三崎90号」から誘導された系統

Mn9037-9-1 : クローン「三崎90号×波方37号」から誘導された系統

*²かっこ内の数字は、発芽または植物体再生された不定胚数／全不定胚数