

国産マツの不定胚形成による再分化と器官培養による分化の試み Plantlet regeneration via somatic embryogenesis and an attempt of organogenesis from shoot tissues in *Pinus* species

細井佳久^{*1}・丸山 E. 豪^{*1}
Yoshihisa HOSOI^{*1} and Tsuyoshi E. MARUYAMA^{*1}

^{*1} 森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687

要旨：マツ類の材線虫病や花粉症対策のため、組織培養を利用した育種を目的とし、未熟種子胚から誘導した不定胚形成能を持つ細胞（不定胚形成細胞）の培養と、新芽の培養による器官分化や不定胚の誘導を試みた。アカマツ、クロマツ、リュウキュウマツ、ヤクタネゴヨウについて、 $3 \mu\text{M}$ 2,4-D, $1 \mu\text{M}$ BAP, 10%ショ糖, 0.3%ゲランガムを加えた1/2EM培地で未熟種子胚を培養した。その結果、各樹種とも不定胚形成細胞が得られた。この細胞を、 $100 \mu\text{M}$ ABA, 15%ポリエチレングリコール(平均分子量約3,000), 0.2%活性炭, 6%マルトースを添加した1/2EM培地に移植し、暗黒下で培養すると、全ての樹種で不定胚の形成が見られた。得られた不定胚を、植物生長調節物質を含まない1/2EM培地に移し、蛍光灯照明下で培養すると、発芽して植物体を形成した。また、アカマツ、クロマツ、ヤクタネゴヨウについて6月に採取した新芽を殺菌して培養を試みた。3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で40分殺菌して培養したが、コントラミ率が約50~100%と高かった。生残した組織では、カルス形成したが、器官分化や不定胚形成はみられなかつた。

キーワード：アカマツ、クロマツ、リュウキュウマツ、ヤクタネゴヨウ、不定胚

Abstract : For measures against wilt disease and hay fever in pine experiments of plantlet regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis were performed as one of basal techniques of breeding methods. Immature seeds excised from cones of *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii*, *Pinus luchuensis* and *Pinus armandii* var. *amamiana* grown in fields were sterilized. Embryos excised from seeds were cultured in the dark. 1/2EM medium containing $3 \mu\text{M}$ of 2,4-D, $1 \mu\text{M}$ of BAP, 10% of sucrose and 0.3% of gellan gum was used for induction of embryogenic cells. Embryogenic cells were observed after about one month of culture. Subcultured cells were transferred onto 1/2EM medium with $100 \mu\text{M}$ of ABA, 15% of polyethylene glycol (M.W.: 3,000), 0.2% of activated charcoal and 6% of maltose instead of sucrose. Culture was performed in the dark. After one or two months of culture somatic embryos formed in all species tested. Somatic embryos were transferred onto 1/2EM medium without plant growth regulators and cultured in fluorescent light(2,000lx, 16h photoperiods, 25°C). Within two weeks somatic embryos germinated and formed plants. Shoots of *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus armandii* var. *amamiana* picked in June were sterilized in 3% sodium hypochlorite for 40 min. But many shoots were contaminated with fungi and the rate ranged from 50 to 100%. After sterilization survived shoot tips formed calli. But neither organogenesis nor somatic embryogenesis could be observed.

Keywords : *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii*, *Pinus luchuensis*, *Pinus armandii* var. *amamiana*, somatic embryo

I はじめに

我が国に生育するマツ属樹木の中には、アカマツ、クロマツをはじめスギ、ヒノキと並んで林業上重要な種が数種類存在する。しかし、近年ではマツ材線虫病の被害が各地で激化しており、線虫抵抗性のあるマツの開発・増殖が急務となっている。また、スギ、ヒノキと同様に花粉症患者の発生が社会問題化しており、対策が急がれている。こうした背景の中、筆者らは組織培養技術を利用して有用個体の作出や増殖を目指しており、アカマツ、

クロマツ、リュウキュウマツ、ヤクタネゴヨウなどの種について個体再生系の開発を進めている。現在までのところ、樹種や個体により効率に差はあるものの、種子から取り出した胚を培養することで不定胚経由による個体再生が可能となってきた。しかし、この個体再生系にはいくつかの問題が存在する。まずは未熟な種子胚を利用する必要があり、材料とする種子の採取時期が限られ、保存種子の利用が困難なこと、全ての種子胚において不定胚形成細胞の誘導が可能であるわけではないこと、誘

導した細胞の不定胚形成能力が継代培養とともに失われていくこと、などが挙げられる。そして最も大きな問題は、培養材料として種子胚を用いているため、得られる分化個体の遺伝子組成は親木とは異なる点にある。そのため親木のクローン個体作出には至っていないのが現状であり、育種上は不十分な個体再生系である。そこで今回はまず、2葉松であるアカマツ、クロマツ、リュウキュウマツと、5葉松であるヤクタネゴヨウについて、現在までに我々が開発した種子胚由来の植物体再生系についての概要を説明するとともに、アカマツ、クロマツ、ヤクタネゴヨウについて種子胚以外の組織による個体再生系確立を目指し、新芽を用いて行った、培養のごく初期段階の報告を行う。

II 実験方法

1. 種子を用いた方法

① 各種マツの未熟種子の採取・殺菌 アカマツ、クロマツについて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成木個体の球果を2001年から2003年にかけて7月上旬に採取し、実験に用いた。リュウキュウマツについては、2007年8月初旬に沖縄県西表島の西表熱帯林育種技術園内に生育する個体の球果を採取して用いた。ヤクタネゴヨウについては2003年7月下旬に鹿児島県屋久島の西部地域の山中で採取した球果を用いた。いずれの樹種についても球果から取り出した種子を100%エタノールで1分間表面殺菌した後、2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で30分間浸漬・攪拌し、殺菌した。殺菌後は滅菌水で30分間浸漬・攪拌して洗浄した。殺菌した種子は、クリーンベンチ内で種皮を剥ぎ取り、メスとピンセットで取り出した胚を含む雌性配偶体ごと培養した。それぞれ、アカマツ198個、クロマツ193個、リュウキュウマツ103個、ヤクタネゴヨウ230個の種子から切り出したものを用いた。

② 種子胚の培養方法 不定胚形成能力を持つ細胞(不定胚形成細胞)を誘導するため、基本培地として1/2に無機塩濃度を下げたEM(3) 固形培地を用いた。培地には他に、ショ糖10g/l、グルタミン1g/l、カゼイン0.5g/l、ゲランガム3g/l、2,4ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)3μM、ベンジルアミノブリン(BAP)1μMを加えた。培養容器には90mmプラスチックシャーレを用い、25°C、暗黒下で静置培養した。

③ 不定胚の成熟化 不定胚を形成させるため、不定胚誘導用の1/2EM培地から2,4-DとBAPを除き、100μMのアブシシン酸(ABA)、0.2%活性炭、15%のポリエチレングリコール(平均分子量約3,000)、ショ糖の代わりに

6%マルトースを加えた固形培地に移して培養した。各樹種とも1つの種子胚由来の不定胚形成細胞について実験を行った。培養容器には90mmプラスチックシャーレを用い、25°C、暗黒下で静置培養した。

④ 不定胚の発芽・伸長 成熟した不定胚を、不定胚形成細胞誘導用培地から2,4-D、BAPとカゼインを除いた固形培地に移し、培養した。培養には90mmプラスチックシャーレを用い、25°C、16時間蛍光灯照明下(約2,000lx)で培養した。

⑤ 植物体の形成・順化 シャーレ内で針葉と根を正常に形成した幼植物体を、発芽・伸長用培地と同一組成の培地の入った300ml培養フラスコに移植して培養した。培養環境も発芽・伸長用の場合と同一とした。フラスコ内で成長した植物体は、ポットに移し、蓋をしたプラスチックバット内で栽培した。栽培は、自然光下、25°Cで行い、バットの蓋を徐々に開けながら栽培し、順化した。

2. 新芽を用いた方法

① 新芽の採取と殺菌 アカマツ、クロマツ、ヤクタネゴヨウについて、茨城県かすみがうら市の森林総合研究所千代田試験地内に生育する約10年生の成木から5月に採取した伸長中の新芽を培養に使用した(図-1(a, b))。これらの成木は、不定胚の培養により得られた個体である。採取した新芽は、先端部から約3cm、あるいは約5mmの2種類の切片を作成し、各樹種とも2種類の切片を60個ずつ培養した。組織片の殺菌は、褐色の鱗片を除去した後、3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で40分間殺菌したものと、あらかじめ100%エタノールで2分間攪拌・殺菌した後に次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理したものとの2種類の場合を比較した(図-2(a, b))。

② 新芽切片の培養 殺菌した切片は、不定胚形成細胞誘導用と同一組成の培地、培養環境で培養した。また、多芽形成用として1/2LP基本培地(1)に0.6μM2,4-D、6μM BAP、2%ショ糖、0.7%寒天を添加した固形培地でも培養を試みた。この場合、16時間蛍光灯照明下(約2,000lx)で培養した。

III 結果と考察

1. 種子を用いた方法

① マツ属4種の不定胚形成細胞の誘導 培養開始後、2週間から2ヶ月ほどで分裂活性の高い緻密な細胞塊とサスペンサー細胞から形成される不定胚形成細胞の誘導が認められた(図-3(a, b))。誘導効率は、アカマツ2%,クロマツ3.1%,リュウキュウマツ1%,ヤクタネゴヨウ1.3%であった。これらの細胞は、培地に置床した胚の全

域から生じるのではなく、幼根部に近い部位で形成され、遊離しながら分裂増殖した。この傾向は、他の針葉樹とも類似している(2)。培養した種子間で誘導期間の幅がかなり広く、培養条件を改善する必要性が認められた。4種とも誘導効率に違いはみられるものの、全ての種で誘導可能であった。得られた不定胚形成細胞のうち、いくつかの不定胚形成細胞のストレインについて培養したところ、同一培地上で増殖し、継代培養可能であったが、ほぼ全ての増殖細胞は、2週間から1ヶ月ごとに新しい培地へ移植しないと、生存・増殖には問題ないものの、不定胚を形成する能力が失われた。この傾向は、他の針葉樹の不定胚形成細胞でも同様であり(5)、不定胚形成細胞の維持に大きな障害となっている。また、継代培養の期間が長くなるほど胚への分化能力が低下する場合が多い。このため、例えば、不定胚経由での植物体再生系を利用し、遺伝子組換え植物を作る場合、毎年のように不定胚形成細胞を新たに誘導し直す必要がある。これを回避するための一つの手段として、信頼性の高い凍結保存法の開発も重要であると思われる。

(2) 成熟した不定胚からの植物体再生 継代培養により増殖させた不定胚形成細胞は、成熟用の培地上で4樹種とも不定胚を形成した。この中には幼根部が未発達のものも多く見られた。その中で、正常な形態と思われるものを選び、それぞれ40個ずつ発芽用培地に移して培養したところ、発芽がみられ、発芽率は、アカマツ10%、クロマツ12.5%、リュウキュウマツ35%、ヤクタネゴヨウ20%であった。培地へのポリエチレングリコールの添加は、不定胚形成細胞を成熟化へ向かわせる重要な要因となっているが、一方で胚の発芽を阻害する要因ともなっている(4)。このため、ポリエチレングリコールの濃度や添加時期・期間など詳細に検討する必要がある。個体再生し、順化した個体の一部については温室内や屋外で育成している(図-4)。

2. 針葉を用いた方法

殺菌方法は2種類を比較したが、はじめにエタノール処理を行った場合、コンタミネーションは抑えられたものの、その後切片は褐変枯死した。エタノール処理を行わなかった場合、コンタミネーションによる損失は大きかったものの、生残切片は褐変枯死することなくカルスを形成した(図-5(a, b))。ただし、使用した2種類の培地で、不定胚形成細胞や多芽の形成は見られなかつた。さらなる条件の検討が必要である。今回、供試材料の約50%~100%がカビに汚染されたが、梅雨の時期に近く多雨であったためと思われる。培養する場合には、細胞の分裂活性の高い、伸長時期の新芽を実験材料に使用する

のが理想的であるが、このように梅雨時期と重なるような場合には、材料採取木を覆うなどして降雨の影響を回避するような処置が必要かもしれない。

謝辞

本研究はJSPS科研費25660126の助成を受けたものです。

引用文献

- (1) ATTKEN-CHRISTIE J., and THORPE T.A. (1984) Clonal propagation : Gymnosperms. In Cell culture and somatic cell genetics of plants(1). Academic Press Inc., London :82-95
- (2) 細井佳久・丸山エミリオ・石井克明(2003) サワラ不定胚形成細胞から単離したプロトプラストからの植物体再生. 日本森林学会大会講演集 **114** : 50
- (3) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y. and 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
- (4) SUSANA, T., KURT, Z., ANA, M., CELIA, M. and MARGARIDA, O., (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. Tree Physiology **27**:661-669
- (5) 谷口亨・小長谷賢一・栗田学(2013)スギの不定胚形成細胞の超低温保存. 日本森林学会大会講演集 **124** : 173

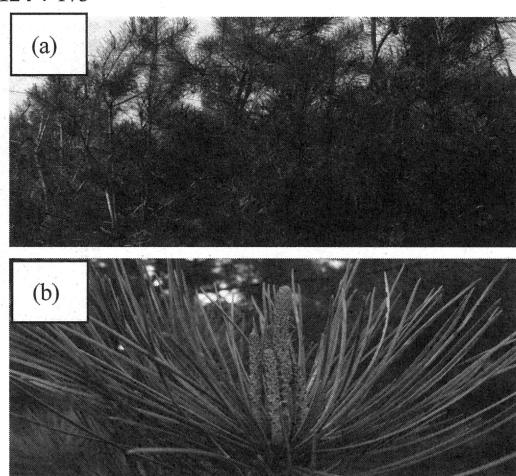


図-1 (a). 実験材料として使用した不定胚由来のアカマツ成木 (b). 実験材料として使用したヤクタネゴヨウの新芽

Fig.1 (a) Adult trees (*Pinus densiflora*) derived from somatic embryos (b) Growing buds (*Pinus armandii* var. *amamiana*) used for culture

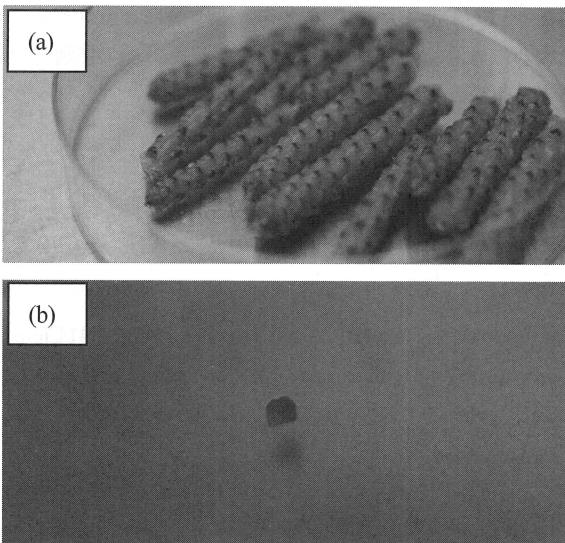


図-2(a). 鱗片を取り除いたクロマツの新芽 (b). 培養に用いたクロマツ新芽の先端

Fig.2 (a) 3cm-long buds removed scales (*Pinus thunbergii*)
(b) A shoot tip used for culture (*Pinus thunbergii*)

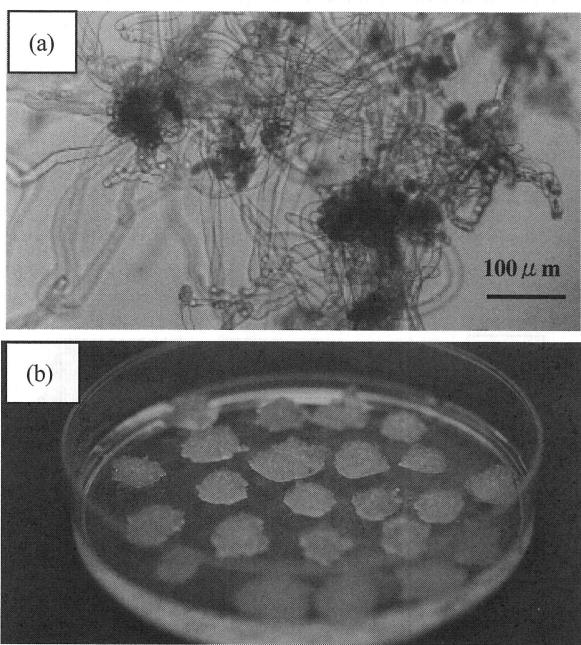


図-3(a). 種子胚から誘導されたヤクタネゴヨウの不定胚形成細胞 (b). 継代培養中のクロマツの不定胚形成細胞 (1/2EM 培地)

Fig.3 (a) Embryogenic cells derived from zygotic embryo (*Pinus armandii* var. *amamiana*) (b) Embryogenic cells subcultured on 1/2EM medium (*Pinus thunbergii*)



図-4. 順化中のリュウキュウマツ

Fig.4 Growing plantlets in phytotron for acclimation (*Pinus luchuensi*)

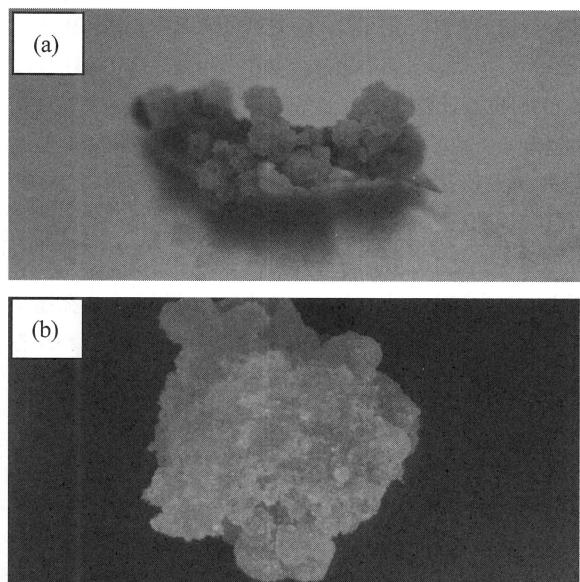


図-5(a). ヤクタネゴヨウのシート上に形成されたカルス (1/2EM 培地) (b). ヤクタネゴヨウのシート先端に形成されたカルス (1/2LP 培地)

Fig.5 (a) Calli formed on 3cm-long shoot on 1/2EM medium (*Pinus armandii* var. *amamiana*) (b) Callus formed on a shoot tip on 1/2LP medium (*Pinus armandii* var. *amamiana*)