

スギ・クロマツの胚培養に用いる培地の探索

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者	佐藤, 亨
巻/号	60巻3号
掲載ページ	p. 81-86
発行年月	1978年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

スギ・クロマツの胚培養に用いる培地の探索

佐 藤 亨*

佐藤 亨: スギ・クロマツの胚培養に用いる培地の探索 日林誌 60: 81~86, 1978
 成熟直前のスギ・クロマツの胚の培養に用いることのできる培地の探索をおこない、あわせて α -ナフタリン酢酸 (NAA) の効果も検討した。既製の合成基礎培地を修正またはうすめた 20 種類の寒天培地は、スギとクロマツの胚に対して多少異なる反応を示した。スギの胚は WOLTER & SKOOG (WS), 1/3 濃度の WS, および 1/3 濃度の HARVEY & GRASHAM (HG) の 3 培地上で正常な生育を示すものが多い。NAA を加えない培地の上でも、根もとにカルスを形成する個体が多くみとめられる。これに対し、クロマツの胚の培養には NAA を加えた WS と HG 培地がややすぐれ、次いで NAA を加えない SLANKIS と HG 培地がよいが、一般にスギに比べてクロマツの胚の発育、とくに根の生育が妨げられ、正常な生長を示した個体数は少ない。

SATÔ, Tôru: Search for the synthetic media suitable for embryo culture of cryptomeria and Japanese black pine J. Jap. For. Soc. 60: 81~86, 1978

Five synthetic media already reported, in two concentration levels and with or without α -naphthaleneacetic acid (NAA), were used for culture of premature embryos of *Cryptomeria japonica* D. DON and *Pinus thunbergii* PARL. The cultures were placed in a room kept at 25°C, under fluorescent light of 1,200 lux, and 14 hours illumination a day. cryptomeria embryos were easier to grow normally than pine embryos in various media. WOLTER & SKOOG's (WS), 1/3 concentration of WS's and 1/3 concentration of HARVEY & GRASHAM's (HG) media were most suitable for culture of cryptomeria embryos. The NAA drastically reduced the mortality of cryptomeria embryos, but it significantly stimulated the development of calluses; in some cases the whole embryo became callus. On the other hand, no media was sufficiently favorable for culture of pine embryos, but WS+NAA, HG+NAA, HG, and SLANKIS' media were better for culture than others.

I はじめに

種間・属間などの遠縁植物間の交配では、受精はおこるが、雑種胚は発育のいろいろな段階で発育停止あるいは退化致死する現象がある。これらの雑種胚を救う手だてとして胚培養が始められた。合成培地上でのタネや胚の無菌培養は、活力の低いタネの発芽あるいは胚の発育生長をうながすごく一般的な手段であり、育種に利用された成功例も多い。ことに農作物において顕著である。

林木における胚培養はマツ属を中心におこなわれている(1~6)が、交雑胚の退化致死前の胚を培養して雑種植物をえた例は、*Pinus lambertiana* × *P. koraiensis*, および × *P. armandii* があるにすぎない(6)。

多くの研究者によって報告された合成培地の組成は多様で、対象とする種や器官・組織の種類に応じて培養に適した培地組成の検討がおこなわれてきた。ある培地は

炭素源と無機要素のみであり、ある培地ではこのほかにビタミン、アミノ酸類などが加えられ、さらに生長調節物質も加えられることがある。

スギ・マツなどの胚培養によく適合する合成培地を調製するためには、無機・有機成分の一つ一つについて検討しなければならない。これにはばく大な手間と時間が必要である。そこではじめに既製の5種類の合成基礎培地をとりあげて、その濃度を変え、また生長調節物質のオーキシンの添加も含めて、スギとクロマツの胚培養を試みた。

II 材料と方法

スギの胚は当年、クロマツの胚は前年自然交配して発育途中にある 1976 年 8 月 4~14 日採取の球果からとり出した。雑種胚を救うためにはもっと早い時期の胚を使う必要があるが、予備実験の結果、胚の摘出が容易な

* 農林省林業試験場 For. & For. Prod. Res. Inst., P.O. box 2 Ushiku, Ibaraki 300-12

表-1. 胚培養に用いた修正基礎培地組成
Composition of various modified basal media used for embryo culture

Constituents	HARVEY & GRASHAM (HG-medium) (mg/l)	SLANKIS (S-medium) (mg/l)	STEINHALT, STANDIFER & SKOOG (SSS-medium) (mg/l)	MURASHIGE & SKOOG (MS-medium) (mg/l)	WOLTER & SKOOG (WS-medium) (mg/l)
NH ₄ NO ₃				1,650	50
KNO ₃			125	1,900	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	25				
KCl					140
MgSO ₄ ·7H ₂ O	140	10	125	370	764
Na ₂ SO ₄					425
KH ₂ PO ₄			125	170	
K ₂ HPO ₄	140	10			
NaH ₂ PO ₄ ·6H ₂ O					35
FeCl ₃ ·6H ₂ O		1			
Fe ₂ (SO ₄) ₃	14				
Na-Fe-EDTA			6.6		5.5
Na ₂ -EDTA				37.25	
FeSO ₄ ·7H ₂ O				27.85	
CaCl ₂ ·2H ₂ O				440	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	500	50	500		425
MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.5		1.0	22.3	9
MnCl ₂		0.1			
ZnSO ₄ ·4H ₂ O			0.05	8.6	3.2
ZnCl ₂		0.1			
NiCl ₂ ·6H ₂ O			0.025		
H ₃ BO ₃			0.025	6.2	3.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O				0.025	
KI			0.25	0.83	1.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O				0.025	
Na ₂ B ₄ O ₇		0.1			
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0.025		
TiO ₂			0.1		
L-arginine			400		
L-cysteine-HCl			10		
Glycine				2.0	
Thiamine-HCl		0.05		0.1	
Pyridoxine-HCl				0.5	0.1
Nicotinic acid				0.5	
myo-inositol			100	100	10
Choline chloride		0.5			
β-biotin		50(m ^r)			
H ₂ SO ₄ (66%)			0.0005(ml)		
Sucrose	30,000	30,000	30,000	30,000	20,000
Agar	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000

この時期の胚を供試することにした。

採取した生球果は 70% エタノール液に 3 分間浸漬して表面殺菌したのち、まだ種皮が白色の幼種子を無菌的にとり出した。幼種子からの胚の摘出は、実体顕微鏡のもとで、殺菌したピンセットを用い無菌寒天上でおこなった。

この試験に用いた合成基礎培地は、それぞれ一部修正した HARVEY & GRASHAM (HG), SLANKIS (S), STEINHALT, STANDIFER & SKOOG (SSS), MURASHIGE & SKOOG (MS) および WOLTER & SKOOG (WS) の 5 種類とし、組成は表-1 に示した。これら 5 種類の培地と各組成濃度を 1/3 に減らした培地を調製して計 10

種類とした。また上記 10 種類の培地に α-ナフタリン酢酸 (NAA) を $3.16 \times 10^{-7} M$ 加えた区を設けたので、合計 20 種類の培地を用いたことになる。以下基礎培地は培地略記号で示し、1/3 濃度培地には 1/3-を、NAA 添加培地には +NAA をつけてあらわす。

培養には径 18 mm の試験管を用い、約 10 ml の培地を分注して常法によりオートクレーブして殺菌した。培地の pH 値は寒天を加える前に 5.8~6.0 に調整した。

培養は 1 試験管につき 1 個の胚を移植し、胚長の約 1/3 を培地にさし込んで直立させた。1 培地あたり 15 個の胚 (15 本の試験管) を培養し、25°C 内外 (湿度調節

表-2. 異なる培地上におけるスギ移植胚の生育状態別出現頻度 (%)

Frequency of growth aspect in cryptomeria embryo cultured on various media (%)

オーキシシン Auxin	NAA 無添加 non-NAA					3.16×10 ⁻⁷ M NAA 加用 3.16×10 ⁻⁷ M NAA added					
	正常 Normal	異常 Abnormal	枯死 Dead	正常 Normal	異常 Abnormal	枯死 Dead					
	正常に生長	根もとにカルス形成	根もとにカルス形成し、根伸びない	地上部がカルス化し、根だけ伸長	全体がカルス化	正常に生長	根もとにカルス形成	根もとにカルス形成し、根伸びない	地上部がカルス化し、根だけ伸長	全体がカルス化	枯死 Dead
移植胚の生育状態 Growth aspect of embryo cultured	正常生長 Normal growth	Callus formation on root collar, and normal growth of shoot and roots	Callus formation on root collar, and inhibition of shoot elongation and no root initiation	Callus formation on hypocotyl and root elongation	Callus formation on whole embryo	正常生長 Normal growth	Callus formation on root collar, and normal growth of shoot and roots	Callus formation on root collar, and inhibition of shoot growth and no root initiation	Callus formation on hypocotyl and root elongation	Callus formation on whole embryo	枯死 Dead
培地 Medium	HG	23.0		7.7	23.1	46.2	14.3		2.4	64.3	
	1/3-HG	92.3				7.7		16.4	7.7	30.8	46.1
	S	71.4				28.6		6.7		6.7	86.6
	1/3-S	42.9		7.1		42.9	20.0	13.3			66.7
	SSS	50.0			14.3	14.3	21.4	26.7	6.7	18.3	53.3
	1/3-SSS	64.3				7.1	28.6	26.7		46.6	26.7
	MS	13.3	4.7	26.7	6.7	6.7	39.9			7.1	92.9
	1/3-MS	14.2	7.1	14.2		7.1	57.4		26.7	6.7	66.6
WS	85.8				7.1	7.1		33.3	6.7	40.0	20.0
1/3-WS	78.6		7.1			14.3		60.0	6.7	26.6	6.7

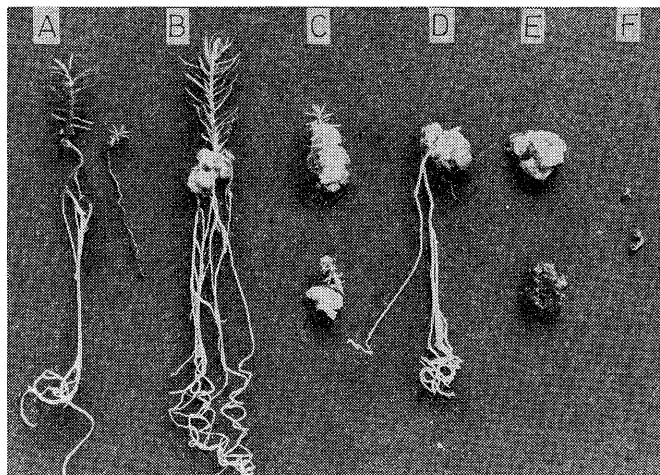


写真-1. スギ移植胚の生長状態

Growth patterns of cultured cryptomeria embryo

- A: 正常 Cultured embryos showing normal growth
- B: 根もとにカルス形成をするが、正常に生長
Callus formation on root collar, and normal growth of shoot and roots
- C: 根もとにカルス形成し、根はまったく伸びない
Callus formation on root collar, and inhibition of shoot growth and no root initiation
- D: 地上部がカルス化し、根だけ伸長 Callus formation on hypocotyl and root elongation
- E: 胚全体がカルス化 Callus formation on whole embryo
- F: 枯死 Dead embryos

なし)で、試験管上部が約 1,200 lux の明期 14 時間の培養室で育成した。

III 結果と考察

置床された健全な胚は、スギでは置床後 5~7 日目、

クロマツでは 3~5 日目ごろから着色し、徐々に生長しはじめる。培養中の汚染は、スギはまったくなかったが、クロマツでは 3 本 (全体の 1%) みとめられた。また、胚摘出のさいに胚が損傷を受けたとみられるものがスギで 15 本 (全体の 5%, 培地別では 0~2 本) みら

表-3. 異なる培地上におけるクロマツ移植胚の生育状態別出現頻度 (%)
Frequency of growth aspect in Japanese black pine embryo cultured on various media (%)

オーキシン Auxin	NAA 無添加 non-NAA				3.16×10 ⁻⁷ M NAA 加用 3.16×10 ⁻⁷ M NAA added				移植胚の生育状態 Growth aspect of embryo cultured		
	正常 Normal		根が伸びない No root initiation		枯死 Dead	正常 Normal		根が伸びない No root initiation			
	正常に生長 Normal growth	地上部伸びない Inhibition of epicotyl elongation	地上部だけ伸長 Normal growth of shoot	地上部も伸びない Inhibition of epicotyl elongation and root initiation		正常に生長 Normal growth	地上部伸びない Inhibition of epicotyl elongation	地上部だけ伸長 Normal growth of shoot		地上部も伸びない Inhibition of epicotyl elongation and root initiation	
培地 Medium	HG		33.3	26.7	40.0	6.7	33.3	6.7	13.3	40.0	
	1/3-HG	13.3	20.0	60.0	20.0		6.7		73.3	20.0	
	S		26.7	6.7	13.3	40.0		13.3		46.7	
	1/3-S		26.7		60.0	13.3				40.0	
	SSS			6.7	13.3	80.0			28.6	14.3	57.1
	1/3-SSS		6.7		40.0	53.3	6.7		20.0	20.0	53.3
	MS					100.0			6.7		93.3
	1/3-MS					100.0			6.7		93.3
	WS		20.0	6.7	13.3	60.0	15.4	30.8		15.4	38.4
	1/3-WS				78.6	21.4			26.7	46.6	26.7

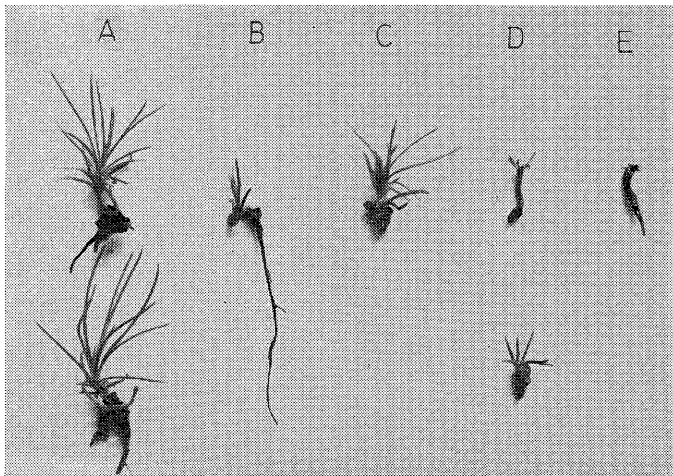


写真-2. クロマツ移植胚の生長状態

Growth patterns of cultured Japanese black pine embryo

- A: 正常 Cultured embryos showing normal growth
- B: 地上部が伸びない Inhibition of epicotyl elongation
- C: 地上部は伸びるが、根が伸びない
Normal growth of shoot, and inhibition of root initiation
- D: 地上部も地下部も伸びない
Inhibition of epicotyl elongation and root initiation
- E: 枯死 Dead embryo

れたが、クロマツではまったくみられなかった。

胚置床後100日目の調査結果は、表-2, 3 および写真-1, 2 のとおりである。スギ・クロマツともに培地の種類による生育状態のちがいは多様であるが、写真に示したようなタイプに分けて、それぞれの出現頻度であらわした。なお汚染と損傷をみとめたものは除外した。

1. スギ

培地の種類によって生育状態のちがいがみられるが、大きなちがいは $3.16 \times 10^{-7}M$ NAA の有無による影響である。NAA を加えないそれぞれの培地では正常な生育をした個体が多いが、NAA 添加の各培地上では根もとにカルスを形成する個体がきわめて多くみとめられる。根もとにカルスを形成した胚はその後正常に地上部と根を伸長させたものは少なく、その多くはカルスと根、あるいは生育の悪い地上部とカルス、あるいは胚全体がカルスになる。これらのなかでは全体がカルス化したものが高率にあらわれた。

このようなカルス形成を誘導した NAA の効果は、さらに移植胚の枯死率にも影響をあたえた。すなわち、NAA を加えたそれぞれの培地では、カルスになりながらも枯死したものはまったくなかったが、NAA を加えない培地上での枯死率は 7.1% (WS 培地) から 57.4% (1/3-MS 培地) までみとめられた。

NAA を加えない各培地上でもカルスを形成する個体があり、とくに MS, 1/3-MS 両培地では高い率であらわれた。しかし、これ以外の培地では正常な生育を示す個体が多かった。地上・地下部とも正常に生育した個体が多くみられる培地は WS, 1/3-WS, および 1/3-HG の3培地である。このほかに正常な形をしているが、地上部の生長不良の個体のみみられる培地として、S, 1/3-S, SSS, 1/3-SSS の4培地があげられる。カルスを形成した個体が多い MS, 1/3-MS 培地上で正常な生長を示した個体はきわめて少なく、それぞれ 13.3% および 14.2% であり、枯損率も高かった。

NAA を加えた培地のなかで、1/3-S+NAA 培地においては、カルスを形成しないで正常な生育を示すものが 20.0% みられた。また、1/3-WS+NAA 培地では、根もとにカルスを形成しながらも地上・地下部ともにさかんな生育を示した個体が 60.0% もあった。これらは正常な生育をした個体よりもやや太い根を発達させることが特徴的である。

2. クロマツ

クロマツ移植胚は、NAA の有無にかかわらず、どの培地上でも枯死するものが多く、ことに MS, MS+NAA, 1/3-MS および 1/3-MS+NAA 培地上では 90%

以上の高率を示した。

低率ではあるが、正常な生育を示す培地は WS+NAA, HG, HG+NAA および S 培地であった。しかし、これらの培地上でも地上部の伸びの悪い個体(写真-2, B)が多い。使用した培地のなかで、一応クロマツの胚培養に使えるような培地は、WS+NAA と S の2培地といえる。

肉眼的な観察ではカルス形成はまったくみられないが、根もとに褐色ないし黒褐色の肥大のみみられるのがクロマツ移植胚の特徴である。

以上 20 種の培地を用いておこなったスギ・クロマツの胚培養の結果について 2, 3 考察を加える。

スギの胚培養には、移植胚の生育状態からみて WS, 1/3-WS および 1/3-HG 培地が適していると思われる。S, SSS およびこの両者の 1/3 濃度の培地は、地上部の生育不良のために適当とはいえない。この生育不良の原因は成分間のアンバランスか、過不足あるいはほかの要因によるのかはわからない。MS および 1/3-MS 培地がスギ・クロマツ両種の胚培養に不適当であったことは、表-1 の培地組成からみて、ほかの培地に比べて N 成分が非常に過多であることに一つの原因があるものと思われる。とくに、過去に報告されたマツ類の胚培養の培地組成と比べた場合、MS 培地のイオン濃度は非常に高く、クロマツの胚の枯死率を高めたものと考えられる。

NAA を加えた培地すべてにおいて、スギの移植胚は根もとにカルス形成がおこり、培地によってはいわゆる奇形を多く生ずる傾向があり、スギの胚培養用培地に対する NAA の添加は無効である。しかし、将来研究が進み、スギカルスから植物再生ができるようになれば、有用な胚を枯死させることなく、NAA 添加培地で一度カルスに誘導し、それから植物体を得ることができよう。

本試験で用いた培地のなかで、クロマツの胚培養に適した培地はみあたらなかったが、強いてあげれば WS+NAA, HG+NAA, S および HG 培地などである。これらの培地組成は、*Pinus lambertiana* の胚に対して HADDOCK(3) や SACHER(5) が用いた培地組成に類似して N 成分が割合少なく、K, Mg, Ca 成分が多い。このことから、クロマツの胚培養用培地の構成塩類のバランスが重要ではないかと考えられる。また、*Pinus lambertiana* を母親にして雑種植物を育成した STONE(6) は、栄養のない 1.5% 寒天培地を用いた。この場合、種皮と珠皮を除いて、胚と胚乳をいっしょに置床していることが注目される。

クロマツの移植胚は、移植後 10 日目ぐらいで根の部分に糊状の物質が固まり、時間がたつにつれてだいに

褐色になり、根が肥大したように見える。これが根の伸長を妨げる物質かどうかは明らかでないが、移植胚を置床5～7日後にとり出してこの物質を取り除き、再度培地に移せば根が伸び出すことが多い。本試験ではこの操作をしなかったために、クロマツ移植胚の根部の肥大と根の伸長停止がおこったとも考えられる。

クロマツの胚培養に適した培地の検討は、栄養のない寒天または胚乳組織や蔗糖のみを加えた単純な培地組成から出発することが必要であろう。

胚培養において本質的な問題は、胚をとり出す時期とそれに対応した培地組成の探索であるといえよう。本試験では8月上・中旬にとった胚を用いたが、現実の遠縁交雑の胚はすでに退化致死している時期とみるのが妥当である。今後は受精後なるべく早い時期の胚の摘出技術の確立と、それらを培養する培地組成と培養方法を検討

しなければならぬ。

引用文献

- (1) BANERJII, S. N. & RADFORTH, N. W.: *In vitro* studies on the developing embryos of *Pinus resinosa*. Bot. Mag. (Tokyo) 82: 329~340, 1969
- (2) BROWN, C. L. & SOMMER, H. E.: An atlas of gymnosperms cultured *in vitro*: 1924-1974. 271 pp, Georgia For. Res. Council, Macon, Georgia, 1975
- (3) HADDOCK, P. G.: Sapling sugar pines grown from excised mature embryos. J. For. 52: 434~437, 1954
- (4) NARAYANASWAMY, S.: Plant embryos culture. Bot. Rev. 30: 587~628, 1964
- (5) SACHER, J. A.: Observation on pine embryos grown *in vitro*. Bot. Gaz. 117: 206~214, 1956
- (6) STONE, E. C. & DUFFIELD, J. W.: Hybrids of sugar pine by embryo culture. J. For. 48: 200~201, 1950

(1977年7月1日受理)