

研究ノート

クロマツ胚培養におけるアミノ酸類の効果

富田正徳*

クロマツ (*Pinus thunbergii* parl.) は日本の代表的な針葉樹であるが、近年マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) による甚大な被害を受けている。その跡地対策として、激害地より選抜された抵抗性個体由来の種苗による造林が有効と一般に考えられている。しかし、マツ類は受粉から結実までに2年間を要することなどから種苗の大量安定供給に問題があり、種苗生産者からは効率的な増殖技術の開発が望まれている。このことから、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの大量増殖を目的とした胚培養が近年試みられている¹⁻³⁾。しかし、大量増殖のための安定した培養条件は未だ確立されていない。

Gresshoff & Doy (GD) 培地⁴⁾の無機塩組成はマツ属の組織培養に広く用いられており⁵⁻⁷⁾、クロマツの胚培養においても Fukuda *et al.*¹⁾が用いている。近藤と九島³⁾は、*Pinus contorta* の胚培養培地として開発された改変 Arnold & Eriksson (AE) 培地⁸⁾を用いると、GDを基本とした培地と比較して生鮮重はおおよそ3倍、不定芽(シュート)形成数もほぼ2倍に増加したと報告している。ただし、近藤と九島³⁾は、クロマツ胚培養培地としては、AE培地はGD培地と比較して、芽の色と生存率にやや難点があったとも報告している。

近藤と九島³⁾が用いたAE培地には、GD培地にはない多量のアミノ酸類が含まれている。そこで、AE培地のアミノ酸類を、GDないしはAEの無機塩組成と組合せた培地でクロマツ成熟胚の培養をおこない、その効果について検討した。

クロマツ精英樹 (plus tree) 鹿島1号の種子を実験に供試した。種子は7%過酸化水素水で殺菌の後、胚を無

菌条件下で取り出し、培地40 mlを分注した200 ml容ガラス培養ビンに5個ずつ(1区5ビン、計25個)置床した。培地にはGD、またはAEの無機多量要素にMS⁹⁾処方¹⁰⁾の無機微量要素およびGlycineを除いた有機物、ショ糖3%、寒天0.8%を加え、さらにそれぞれTable 1に示したようにAE培地のアミノ酸類を、原報告の組成(L-Glutamine 0.4 mg/l⁻¹, L-Alanine 0.05 mg/l⁻¹, L-Cysteine-HCl 0.02 mg/l⁻¹, L-Arginine 0.01 mg/l⁻¹, Leucine 0.01 mg/l⁻¹, L-Phenylalanine 0.01 mg/l⁻¹, L-Tyrosine 0.01 mg/l⁻¹, Glycine 2.0 mg/l⁻¹)を1として、濃度を変えて添加した(pH 5.7)。近藤・九島³⁾に従い、初代培養培地にはBAP 5×10^{-6} Mを添加、5週毎にホルモンフリーの新鮮な培地に継代培養をおこなった。15週目に調査をおこない、20 mm以上に伸長していたシュートを各供試区より20ずつ切り取って1/2に希釈したホルモンフリーのGD培地で培養をおこない、発根を試みた。

結果をTable 1に要約した。アミノ酸類無添加区と比較して、低濃度(1~3倍)のアミノ酸類添加区では外植体の生鮮重、シュート形成数が増加した。高濃度(5~25倍)のアミノ酸類添加区では生育が抑制される傾向があり、外植体生存率、生鮮重、シュート形成数は低濃度区よりも減少した。生育の抑制は、GD培地では5~10倍濃度区で発現したのに対し、AE培地では3倍濃度区から外植体生存率が減少するなど、より低濃度で発現した。シュートの色は、添加するアミノ酸類濃度の上昇にともないGD培地上では深緑色から緑色に、AE培地上ではGD培地と比較して色がやや薄く、緑色から黄緑色となった。AE培地のアミノ酸類高濃度添加区ではすべてのシュートが緑黄色から黄色であり、一部のシュートの先端は褐変していた。各供試区由来のシュートの発根を試みたところ、GD培地由来のシュートの発根率がAE培地由来のものを上回った。

以上の結果より、クロマツ成熟胚培養において、1) AE培地で得られる外植体の生育量の増大は、AE処方

Masanori TOMITA*

Effect of Amino Acids on Embryo Culture of Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii* Parl.).

* 弘前大学農学部

(〒036 弘前市文京町3)

Faculty of Agriculture, Hirosaki University, Bunkyo-cho, Hirosaki, 036 Japan

Table 1. Effect of concentratin of amino acids on embryo culture of *P. thunbergii*.

Medium	Concentration of amino acids	No. of inoculate seeds	Survival rate(%)	Mean fresh weight(mg)	Mean number of shoots	Color of Shoots*2	Rooting rate (%) *3
GD	0	25	100	180 ^{bc*1}	24 ^{abc*1}	DG	45
	1×	25	100	236 ^{ab}	26 ^{abc}	DG	65
	3×	25	100	333 ^a	33 ^a	DG	60
	5×	25	100	242 ^{ab}	23 ^{abc}	DG	15
	10×	25	76	96 ^{cde}	18 ^{bcd}	G	0
	25×	25	56	52 ^{de}	17 ^{cd}	G	0
AE	0	25	100	173 ^{bcd}	22 ^{abcd}	G	35
	1×	25	100	317 ^a	29 ^a	G	50
	3×	25	84	254 ^{ab}	28 ^{ab}	Y	15
	5×	25	68	132 ^{bcdde}	24 ^{abc}	Y	0
	10×	25	52	77 ^{cde}	17 ^{cd}	Y	0
	25×	25	32	44 ^e	12 ^d	Y	0

*1 Mean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

*2 DG : deep green, G : green, Y : yellowish green,

*3 Twenty shoots examined.

の amino 酸類の添加効果であること、2) AE 培地上で外植体（シュート）の生育が GD 培地と比較してやや不健全であるのはその無機多量要素の影響と推測されること、3) シュート分化培地の培地無機多量要素の組成がシュートからの発根率に影響することが明らかとなった。クロマツ胚培養のシュート分化培地には、GD 培地の無機多量要素に MS 処方の無機微量元素ならびに L-Glycine を除いた有機物、および AE 培地処方の amino 酸類を原報告の 1~3 倍程度の濃度で添加した培地を用いるのが適当であると考えられる。

(1992 年 5 月 18 日受理)

文 献

1) Fukuda, T., Y. Fujii, K. Kanamitsu, 1989. Mokuzaigakkaishi, **35**: 1139-1143.
2) Ishii, K., 1988. J. Jpn. For. Soc., **70**: 278-282.
3) 近藤禎二, 九島宏道, 1988. 99 回日林論, p. 453-454.
4) Greshoff, P. M., C.H. Doy, 1972. Planta, **107**: 161-170.
5) 朴 龍求, 金 佑龍, 1983. 韓国林学会誌, **59**: 51-56.
6) Patel, K. R., T. A. Thorpe, 1984. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **3**: 131-142.
7) 金 在憲, 朴 在仁, 1987. 林育研報, **23**: 123-127.
8) Arnold, S., T. Eriksson, 1981. Can. J. Bot., **59**: 870-874.
9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.