

東北産マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ種子からの不定胚形成とクローン増殖

Somatic embryogenesis and propagation in Japanese black pine from seeds of nematode-resistant clones of the Tohoku-region

丸山 E. 毅^{*1**}・大西昇^{*2**}・細井佳久^{*1}・安野紀子^{*2}・今野幸則^{*3}・山野邊太郎^{*4}・織部雄一朗^{*5}

Tsuyoshi E. MARUYAMA^{*1**}, Noboru ONISHI^{*2**}, Yoshihisa HOSOI^{*1}, Noriko YASUNO^{*2},
Yukinori KONNO^{*3}, Taro YAMANOE^{*4} and Yuichiro ORIBE^{*5}

* 1 森林総合研究所

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

* 2 キリン株式会社

Kirin Company Limited, Fukuura 1-13-5, Kanazawa-ku, Yokohama, 236-0004 Japan

* 3 宮城県林業技術総合センター

Miyagi Prefectural Forestry Technology Institute, Hanuki 14, Ohira-mura, Kurokawa-gun, Miyagi, 981-3602 Japan

* 4 森林総合研究所林木育種センター

FFPRI, Forest Tree Breeding Center, Ishi 3809-1, Juo, Hitachi, Ibaraki, 319-1301 Japan

* 5 森林総合研究所林木育種センター東北育種場

FFPRI, Forest Tree Breeding Center, Tohoku Regional Breeding Office, Osaki 95, Takizawa, Iwate, 020-0621 Japan

** Co-first authors contributed equally to this work

要旨: 2014年7月中旬～8月中旬にかけて、宮城県林業技術総合センターのマツノザイセンチュウ抵抗性系統採種園から球果を採取した。これらの球果から摘出した種子を滅菌し、種皮を取り除いた後に雌性配偶体 (megagametophyte) を不定胚形成細胞の誘導用培地に置床した。得られた培養細胞は維持・増殖させた後、不定胚誘導用培地上で培養した。誘導した不定胚は発芽用培地上で個体再生させた。さらに、増殖率を向上させるため、液体培養条件 (エチレン作用阻害剤や細胞密度の影響) について検討を行った。

キーワード: マツノザイセンチュウ抵抗性系統, 不定胚形成, *Pinus thunbergii*, 液体培養, クローン増殖

Abstract: Cones of pine wood nematode-resistant trees were collected from seed orchard of Miyagi Prefectural Forestry Technology Center in July-August 2014. Excised seeds from the cones were surface-sterilized and after removing their seed coat, the megagametophytes containing zygotic embryos were cultured onto somatic embryogenesis initiation medium. Initiated embryogenic cells were propagated and then transferred to somatic embryo induction medium. Induced somatic embryos were regenerated into plantlets after transfer to germination medium. Furthermore, liquid culture conditions (effect of ethylene biosynthesis suppressor and cell density in culture) were examined in order to improve the propagation rate.

Keywords: nematode-resistant clones, somatic embryogenesis, *Pinus thunbergii*, liquid culture, clonal propagation

I はじめに

2011年の東日本大震災によって、東北地方太平洋側のクロマツ海岸防災林は壊滅的な被害を受けた。さらに、マツ材線虫病が東北地方にも蔓延していることから、クロマツ海岸防災林の再生には膨大な数のマツノザイセンチュウ抵抗性系統苗木が必要となる。現在は、その供給量はごく限られているため、東北地方の海岸防災林の再生には長期間を要する。そこで2013年

に農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「東北地方海岸林再生に向けたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ種苗生産の飛躍的向上」が立ち上げられ、各種の苗木生産技術の開発が行われている。その中、不定胚形成技術も対象となっており、今回は実用に向けたその開発状況を紹介する。

II 実験方法

1. **球果の採取** 球果の採取には、宮城県林業技術総合センターのマツノザイセンチュウ抵抗性系統採種園内に生育するクロマツを用い、7月中旬～8月中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、70%エタノールに30秒、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分浸漬・攪拌し、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、90×20mmのシャーレを用い、培地にはLP培地(1)に、ミオイノシトール20g/l、マルトース15g/l、グルタミン0.45g/l、カゼイン0.5g/l、ビオチン0.05mg/l、葉酸0.5mg/l、寒天8g/l、1-ナフタレン酢酸2mg/l、6-ベンジルアミノプリン0.63mg/l、カイネチン0.61mg/lを添加した固形培地を用いた。培養は暗黒下、25℃で行った。誘導後の不定胚形成細胞は、維持・増殖用EM培地(3)と同一の培養環境で維持し、増殖させた。

3. **不定胚の誘導** 不定胚の誘導は、固形培地で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90×20mmのシャーレを、培地として不定胚成熟用EM-PEG培地(2)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。培養は暗黒下、25℃で行った。

4. **不定胚の発芽と個体再生** 形成した成熟不定胚は、植物生長調節物質を含まない発芽用EM培地(2)に移し、16時間蛍光灯照明(約4,000lx)、25℃の環境下で培養を行った。発芽した不定胚を、同一組成の培地に移植し、培養した。

5. **液体培養条件の検討** 不定胚形成による増殖率を向上させるため、液体培養条件について検討を行った。固形培地で検討した培養条件をもとに、培養フラスコ(300ml)を用いて、山元84#3の細胞系統を液体培地(100ml)で不定胚の誘導における、エチレン作用阻害剤や細胞の培養密度の影響を調べた。得られた不定胚を発芽培地に移し、培養した。

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。培養開始1～2週間後に初期細胞誘導がみられ、約18%～36%の外植体が反応を示した。そして、不定胚形成細胞の誘導(図-1)については、培養開始8週間後に用いた種子のうち、約1～15%の頻度で不定胚形成細胞の増殖が認められた(表-1)。著しい系統間差がみられたが、

全ての系統において不定胚形成細胞を誘導できた。得られた不定胚形成細胞は、約2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(図-2)。

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-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、山元90#1を除けば、シャーレあたり180個以上の不定胚が形成され、山元84#3の場合は350以上の最も高い値を示した(図-4)。

3. **不定胚の発芽と個体再生** 成熟した不定胚を1～2週間程度脱水させた後に発芽用培地で培養すると、約1～2週間後に発芽を開始し、4週間目に不定胚全体の68～93%程度の発芽率がみられた(図-5、6)。発芽した不定胚は植物体を形成し(図-7)、53～88%程度の個体再生率を示した(図-8)。

4. **液体培養による不定胚誘導** 固形培地で検討した培養条件に加え、液体培地を用いて、エチレン作用阻害剤(クリザール・ジャパン)の添加、及び細胞の培養密度が不定胚誘導に与える効果について調べた。その結果、クリザールを添加することにより不定胚の誘導率が著しく向上することがわかった。クリザールを3000倍希釈で添加した培地を用いると、無添加培地に比べて3倍量の不定胚が得られた(図-9)。また、細胞の培養密度を変えると、不定胚の誘導率や成熟化に多大な影響を及ぼすことが明らかとなった(図-10)。得られた不定胚は、脱水させた後に発芽用培地で培養すると、固形培地で誘導した不定胚と同様な発芽を示した(図-11)。成長した植物体を温室で順化したところ(図-12)、80～90%程度の順化率を示した。

IV おわりに

液体培養条件の検討はまだ途中段階であるが、現在宮城県にて、液体培養によって得られた約4500本の試作苗を使用して生育試験を行っている。苗化の達成度、生育特性や実生苗との違いなどの結果を踏まえて、一刻も早く実用に向けた技術開発に貢献したいと考えている。

引用文献

- (1) AITKEN-CHRISTIE J, THORPE TA. (1984) Clonal Propagation: Gymnosperms. In Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 1. Vasil IK (ed.), 480 pp, Academic Press Inc., San Diego, 82-95
- (2) 丸山E. 穀・細井佳久 (2015) 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. 関東森林研究 66: 69-72

(3) 丸山E, 穀・細井佳久・二村典宏・斉藤真己 (2014) 無花粉スギ未成熟種子からの不定胚形成細胞の誘導. 関東

森林研究 65: 107-110

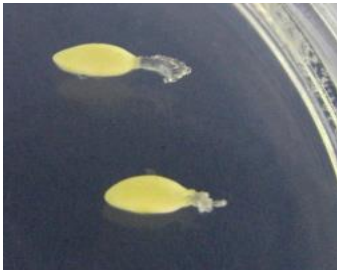


図-1. 不定胚形成細胞の誘導
Fig. 1 Induction of embryogenic cells

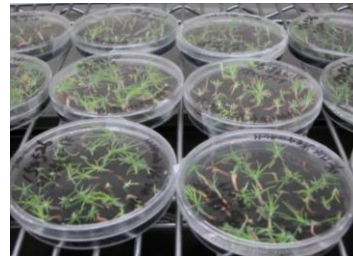


図-5. 不定胚の発芽
Fig. 5 Germination of somatic embryos



図-2. 不定胚形成細胞の増殖
Fig. 2 Proliferation of embryogenic cells

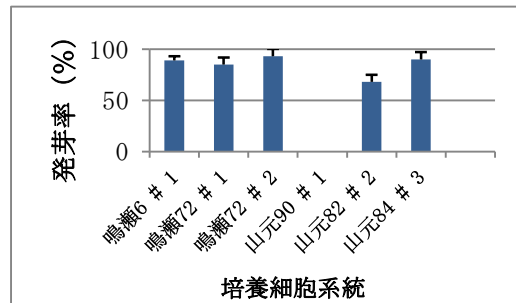


図-6. 細胞系統による不定胚の発芽率
Fig. 6 Somatic embryo germination from different cell lines
平均値±標準偏差 (n=4)



図-3. 成熟した不定胚
Fig. 3 Maturation of somatic embryos

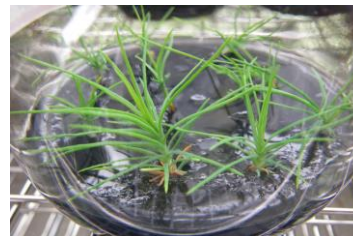


図-7. フラスコ内で生長する植物体
Fig. 7 In vitro growing of somatic plants

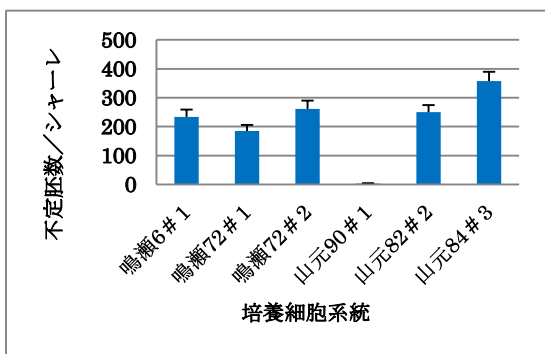


図-4. 細胞系統による不定胚の誘導率
Fig. 4 Somatic embryo induction from different cell lines
平均値±標準偏差 (n=5)

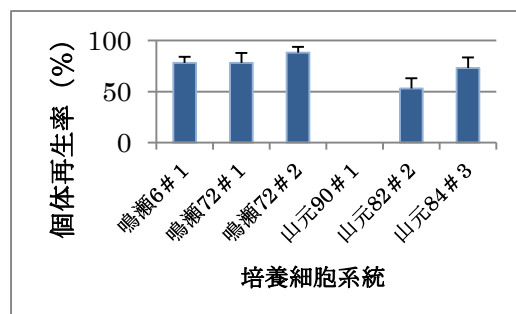


図-8. 細胞系統による不定胚の個体再生率
Fig. 8 Somatic embryo conversion from different cell lines
平均値±標準偏差 (n=4)

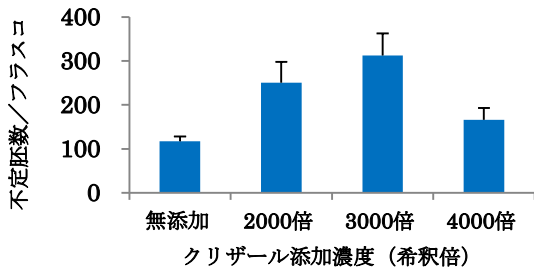


図-9. エチレン作用阻害剤 (クリザール) が液体培地での不定胚誘導に及ぼす影響

Fig. 9 Effect of Chrysal on somatic embryo induction in liquid medium

細胞の培養密度 (6.5 ml) , 平均値±標準偏差 (n=3)

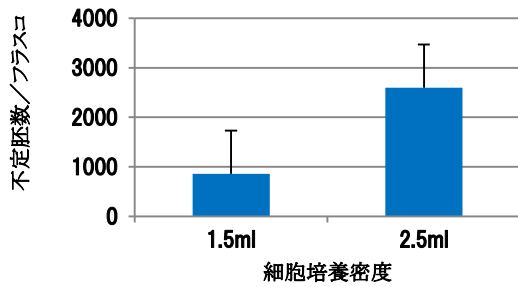


図-10. 細胞の培養密度が液体培地での不定胚誘導に及ぼす影響

Fig. 10 Effect of cell culture density on somatic embryo induction in liquid medium

平均値±標準偏差 (n=3)

表-1. 系統による不定胚形成細胞の誘導率

Table 1 Embryogenic cell induction from different seed families

系統	未熟種子 培養数 (a)	初期細胞誘導		不定胚形成細胞誘導		継代可能不定胚形成細胞	
		数 (b)	% (b/a)	数 (c)	% (c/a)	数 (d)	% (d/a)
亘理 5 6	403	72	17.9%	4	1.0%	4	1.0%
鳴瀬 6	293	102	34.8%	3	1.0%	2	0.7%
鳴瀬 7 2	495	156	31.5%	69	13.9%	62	12.5%
山元 8 2	228	51	22.4%	8	3.5%	7	3.1%
山元 8 4	384	128	33.3%	22	5.7%	22	5.7%
山元 9 0	426	152	35.7%	80	18.8%	63	14.8%



図-11. 液体培地で誘導した不定胚の発芽

Fig. 11 Germination of somatic embryos induced in liquid medium



図-12. 液体培地で誘導した不定胚由来の順化苗

Fig. 12 Acclimatized somatic plants derived from embryos cultured in liquid medium