

【話 題】

海岸林再生に向けた不定胚形成によるマツノザイセンチュウ抵抗性 クロマツ家系の苗木増殖

大西 昇^{*,1}・安野 紀子¹・丸山 毅²・今野 幸則³・

山野 邊 太郎⁴・織部 雄一郎⁵

はじめに

2011年に発生した東日本大震災によって、東北地方太平洋側の海岸防災林は壊滅的な被害を受けた。海岸防災林は高潮、潮風、塩、飛砂などの害から海岸部周辺における人々の生活や農業を守る重要な役割を果たしており、震災からの復興に向けてはその再生も危急の課題の1つとなっている。クロマツは海岸防災林の主要な樹種であるが、マツ材線虫病が蔓延しつつある東北地方における海岸防災林の再生に向けては、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園産の種子から育成した苗木の使用が求められている。また、採種母樹としては、東北地方で育成された抵抗性系統が望ましい。上記の海岸防災林の再生に必要な苗木数量は500万本以上と膨大であり(織部 2013)、現状ではその供給量は限られている。筆者らは2013年度～2015年度に農林水産業・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木生産の飛躍的向上」を受託し、各種の苗木生産技術の開発と実用化に取り組んだ(織部 2016)。今回は、その中で行った不定胚形成による増殖について紹介させて頂く。長年、森林総合研究所では針葉樹他の不定胚形成法の基本培養技術の開発(Maruyama and Hosoi 2016)を、キリン株式会社では不定胚形成法を含む種々の組織培養による植物大量増殖技術の開発と実用利用(大西ら 2015a)を進めてきており、今回の取組みにおいて

これまでに蓄積してきた技術や知見がベースとなった。培養条件等の詳細は、同プロジェクトの成果の1つである「寒冷地におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ苗木の安定供給—採種園管理者と苗木生産者のためのマニュアル—」(森林総合研究所林木育種センター 東北育種場 2016)に纏められている。

不定胚による苗木増殖プロセス

同プロジェクトで開発した不定胚形成によるクロマツ苗木の増殖プロセスを図-1に示す。未熟種子からの不定胚形成細胞(不定胚を形成する能力を有する細胞)の誘導を起点とし、固体培地より大量培養に適した液

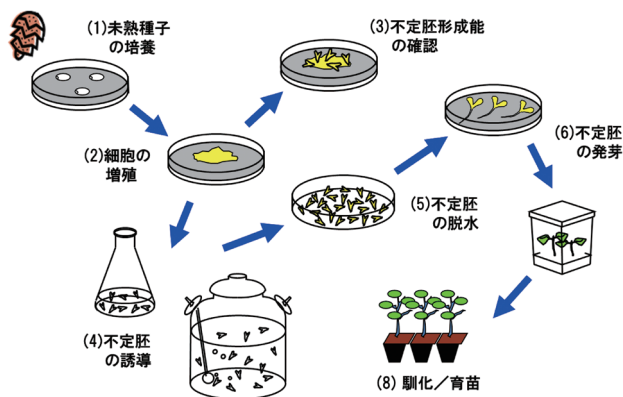


図-1 クロマツ不定胚の培養プロセス

* E-mail: n-onishi@kirin.co.jp

¹ おおにし のぼる、やすの のりこ キリン株式会社 R&D 本部基盤技術研究所

² まるやまつよし 森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域

³ こんの ゆきのり 宮城県林業技術総合センター

⁴ やまの べたろう 森林総合研究所林木育種センター

⁵ おりべ ゆういちろう 森林総合研究所林木育種センター東北育種場

体培地での不定胚誘導を必要条件とした。液体培地から得られた不定胚はそのままでは殆ど生育せず、良好な発芽には脱水工程が不可欠である。この脱水工程は不定胚の一定期間の保存を可能とするため、培養作業を平準化する観点からも重要となる。不定胚を発芽させた後、温室に馴化してコンテナ苗用の毛苗を育成する。クロマツ林の保全も念頭におくと、多様性確保にも配慮する必要があるため、多くの系統に適用できる技術であることを示す必要がある。同プロジェクトにおいては、東北で育成されたマツノザイセンチュウ抵抗性7家系を含め計10家系を用いて適用に成功し、本プロセスが多様性確保の観点からも有効であることを確認した。

不定胚形成細胞の誘導

針葉樹においては通常、未熟種子が不定胚形成細胞の誘導材料として用いられる。今回の開発では、主に宮城県林業技術総合センターに造成されたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園産の種子(母樹:山元82号、山元84号、山元90号、鳴瀬6号、鳴瀬72号、鳴瀬39号、亘理56号)を用いた。2014年より、毎年7月上旬～8月上旬に受精当年の球果を採取し、未熟種子を植物ホルモンを含む細胞増殖用培地に置床した。置床後1～2週間後にまず、種子から細胞の初期増殖(図-2左)が認められる。但しこの段階で生育を停止する細胞も多い。細胞塊(カルス)にまで増殖した細胞(図-2中)を、2週間後に新たな培地に継代培養して維持/増殖する。それらカルスを、植物ホルモンを含まない不定胚形成用培地に置床して、不定胚形成能を認めたカルスを不定胚形成細胞とする(図-2右)。

これまでの試験から得られた知見は次の通りである(大西ら2015b、2016)。(1)置床種子あたりの細胞の初期増殖の発生率はおおよそ10～40%、不定胚形成細胞の獲得率は同1～20%であった。(2)初期増殖段階で生育を停止せずカルスにまで至った細胞ラインの殆どは、能力の差は大きいものの基本的に不定胚形成能を有していた。(3)細胞の初期増殖の発生率、不定胚形成細胞の獲得率とも系統間差は顕著であったが、前者の方がその程度は小さかった。(4)両効率とも、系統間差に比して年次間差は小さい傾向があった。(5)試験を実施した全ての年で、7月中旬～下旬に採取した球果から、比較的安定した不定胚形成細胞が獲得できた。(6)複数年で供試した全系統において、不定胚形成細胞誘導の再現性が確認できた(図-3)。

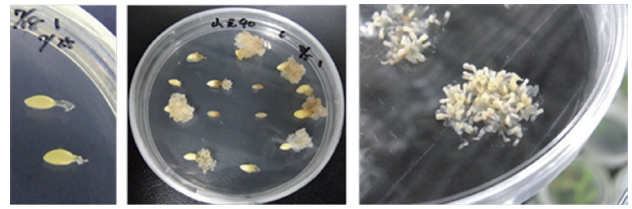


図-2 クロマツ未熟種子からの細胞の初期増殖(左)、増殖を継続した細胞塊(中)、細胞塊から誘導された不定胚(右)

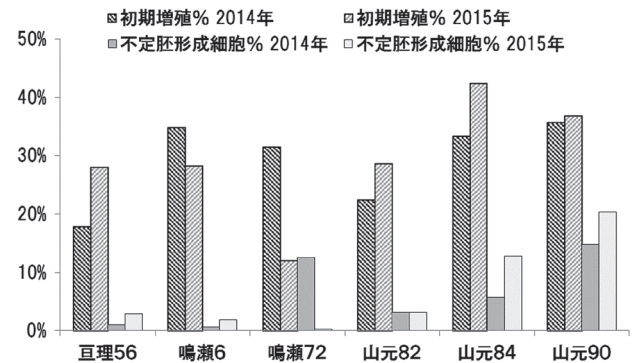


図-3 クロマツ未熟種子からの細胞の初期増殖率及び不定胚形成細胞の誘導率

得られた不定胚形成細胞は、その維持や増殖中に種々の要因によって不定胚形成能が変動するが、条件によっては数年に渡り不定胚形成能力を維持できることを確認している。また、不定胚形成細胞の維持/増殖は基本的に固体培地で行うが、必要量によっては液体培地で大量増殖することも可能である。

液体培地での不定胚の誘導

不定胚の誘導自体は、固体培地、液体培地の何れでも可能であるが、大量培養に向けては液体培養の方が望ましい。増殖細胞を、適切な条件で液体の不定胚誘導培地に置床することで不定胚が得られる。基本的に、固体培地と液体培地の組成は同じであるが、液体培地の場合には、エチレン作用阻害剤(商品名クリザール)を添加することで、不定胚の誘導効率が顕著に改善される(大西ら2015c)。条件によっては、対象に比べ数倍の不定胚誘導効率が得られる(図-4)。また、同剤には不定胚の成熟化を促進する傾向も認められている(図-5)。細胞を不定胚誘導培地に置床後、1週間程度で不定胚への分化が始まり、4～6週間で回収に適した分化段階となる。得られる不定胚は種子胚に類似した形態である。不定胚の誘導効率や品質は、置床する細胞の状態、置床

密度、系統などによって異なる。最適な細胞を選抜/選定し、置床条件を調整することで、フラスコあたり数百の発芽能力のある不定胚が得られる。培養槽（攪拌型）を用いた試験でも、不定胚の誘導が可能であること、フラスコ由来の不定胚と同様の高い発芽率を再現し得ることが確認できている。

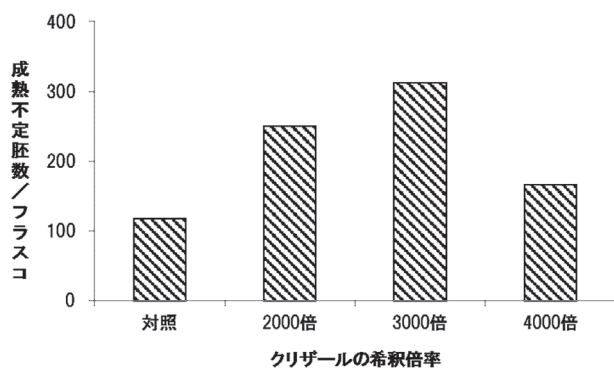


図-4 エチレン作用阻害剤（クリザール）が液体培地でのクロマツ（系統：田山）の不定胚誘導に及ぼす影響

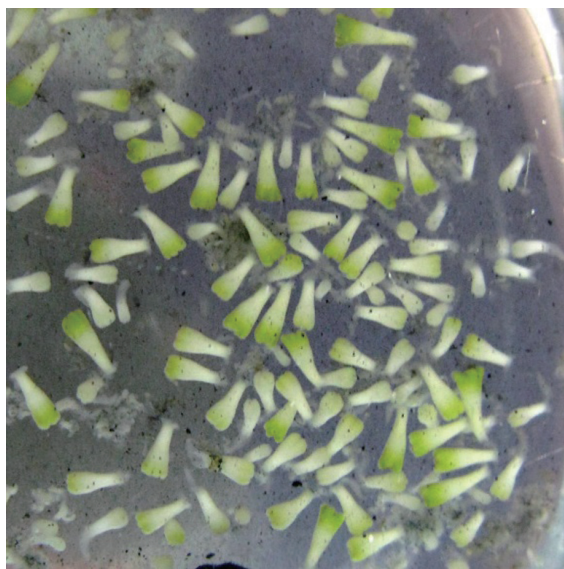


図-5 エチレン作用阻害剤含有の液体培地で誘導されたクロマツ不定胚

不定胚の脱水

特に液体培地で形成された不定胚はそのままでは発芽率が低く、脱水工程を経ることで発芽能力を獲得することが種々の植物種で明らかになっている。クロマツの不定胚も同様の特性を有し、脱水工程前

の不定胚は特に発根が著しく阻害される。液体培地から回収した不定胚を、余分な水分を除いた後、ろ紙を敷いたシャーレ等の容器に置床し、25℃、暗所、7～10日程度の条件で脱水を行う。適切に脱水された不定胚は良好な発根及び発芽を示すようになる。過度に脱水（乾燥）を行うと、不定胚は容易に枯死するので注意が必要である。発根及び発芽には不定胚の分化段階も大きな影響を及ぼすため、不定胚の回収時期については、系統毎に回収後の発芽能力を検証して確定する。脱水された不定胚は、その品質や系統によっても異なるが、通常は1～3ヶ月程度は発芽能力を失うことなく冷蔵庫で保存可能である。培養作業の平準化、効率化の観点からも重要な工程となる。大量の不定胚の脱水には、我々は専用の容器を開発し用いている。

不定胚の発芽

適切な状態で回収（脱水）された不定胚を発芽用培地に置床すると、種子胚と同様に数日で発根が認められ（図-6上）、1～2週間で出芽が始まる。置床当初は暗



図-6 クロマツ不定胚の発根初期（上）と発芽（下）

条件で培養し、出芽の後に明条件に移動することで完全な植物体が得られる (図-6 下)。本工程においては特に発根がポイントとなる。クロマツの不定胚は数日で発根しない場合は、その後地上部の生育が進んだ段階になっても新たな発根が認められることは殆どなく、利用できる苗とはならない。発根の有無が一義的に不定胚の品質を確定することになる。本葉の展開を認めた以降は、温室への移植 (馴化) が可能となる。馴化可能期間は数ヶ月になるため、脱水工程と共に本工程で作業の平準化の調整を行うことができる。馴化する際の発芽苗のサイズが小さい場合は、数日間、CO₂ を富化した環境 (2% 程度等) で培養することにより、温室での生存率が明確に高まる。

不定胚発芽体の馴化、コンテナでの育苗

発芽した不定胚苗を温室に馴化し、コンテナへの移植に向けて毛苗を育成する。今回の検討では、主に馴化用のトレイには 300 穴のペーパーポットを、用土にはココピートを用いた。一般的に不定胚発芽苗を含め培養植物の馴化には、一定の期間、湿度と光の調整が必要となる。クロマツの不定胚発芽体の場合、十分に湿らせたココピートに根をできるだけ傷つけない様にして移植した後、ミストまたはトレイを覆う透明キャップ等で保湿するとともに、50% 程度の遮光を行う。この条件を 2～3 週間保った後、通常の温室条件とする。適切な条件では 8～9 割程度の不定胚苗が生存 / 成長する (図-7)。4～5 週程度でコンテナに移植できる状態となるが、この段階で 2～3 ヶ月保持することもできる。コンテナへの移植は常法に沿って行う。



図-7 クロマツ不定胚苗の馴化状況 (馴化後約 3 週間)

今後に向けて

組織培養による増殖、特に不定胚培養については、品種 / 系統間差が大きな課題となることが多い。今回の一連の開発の中で、系統間差が最も顕著に現れたのは不定胚形成細胞の誘導と同細胞からの液体培地での不定胚誘導の工程であった。両工程の条件を特定系統における最適化ではなく、多系統に適用し得る汎用化の方向で開発を進めることにより、効率に差はあるものの供試した全 10 系統にて不定胚の誘導、発芽を確認することができた。今後新たに開発される抵抗性系統にも、今回のプロセスは適用可能と思われ、多様性確保に向けて培養段階での基本的要因はクリアできたと判断している。

現在、不定胚より育成した毛苗について、コンテナでの育苗試験を進めている。キリン社ではこれまでに様々な植物種で培養苗の実用利用を進めて来ているが、それらの例においては、培養苗は通常の栽培法で生産される苗 (実生苗、さし木苗、他) とはやや異なった生育性を示すことが多い。実用の場においては、その特性に応じて栽培技術の調整や改善を行うことで生育の再現性を確保し、場合によっては更に付加価値を高めることが可能となる。培養技術と栽培技術は常に培養苗生産の両輪である。今回のクロマツの不定胚苗についても同様のアプローチで進めて行く予定である。不定胚苗の育苗 / 評価には宮城県農林種苗農業協同組合、また、不定胚の誘導、発芽、苗化のプロセスの検証には、宮城県柴田農林高等学校 (園芸工学科) にも協力を頂いて実施している。今回は、採種園にてオープン条件で得られた種子を供試材料として用いたが、人工交配種子を用いた試験も検討する予定である。本技術の開発を通じて、被災した海岸防災林の再生に少しでも貢献できることを願っている。

引用文献

- 大西昇・間宮幹士・近藤恵二 (2015a) 高い汎用性、増殖効率を特長とする植物大量増殖システムとその実用利用. 第 33 日本植物細胞分子生物学会講演要旨集 : A-03
- 大西 昇・安野紀子・丸山 毅 (2015b) 抵抗性クロマツ採種園産種子からの不定胚によるクローン苗木の大量増殖技術の開発. 第 20 回東北森林科学会講演要旨集 : テーマ別セッション 03
- 大西 昇・縄田由紀子・安野紀子 (2015c) エチレン阻

害剤を用いた不定胚の誘導法. 特開 2015-123014
大西 昇・安野紀子・飯田綾加・丸山 毅・今野幸則・
山野邊太郎・織部雄一郎 (2016) マツノザイセンチュ
ウ抵抗性クロマツ採種園産種子からの不定胚形成細
胞誘導の系統間差. 第 34 回日本植物細胞分子生物
学会講演要旨集 : P-053
織部雄一郎 (2013) 【平成 25 年度 農林水産業・食品
産業科学技術研究推進事業 実用技術開発ステージ】
25084C 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.
<http://www.affrc.maff.go.jp/docs/gaiyou/pdf/25084c.pdf>
(2017 年 2 月 10 日アクセス)

織部雄一郎 (2016) 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. 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業
研究紹介. 2016: 149-150

森林総合研究所林木育種センター東北育種場 (2016)
寒冷地におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマ
ツ苗木の安定供給—採種園管理者と苗木生産者のた
めのマニュアル—. 滝沢, 岩手

Maruyama TE, Hosoi Y (2016) Somatic embryogenesis in
Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) In: Mujib
A (ed), Somatic embryogenesis in ornamentals and its
applications, 27-39. Springer, Sunderland, Massachusetts