

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14949

研究課題名(和文) 胚性万能細胞に由来するマツノザイセンチュウ抵抗性苗の効率的な生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of efficient production technique for pine wood nematode-resistant seedlings derived from embryogenic cells

研究代表者

丸山 毅 (Maruyama, Tsuyoshi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：20353865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ3家系から14系統の胚性万能細胞を誘導し、胚分化能力の高い系統を選抜した。成熟不定胚の誘導率は、細胞系統によって著しく異なったが、誘導率の高かった上位5系統では、シャーレあたり180個以上の不定胚が形成された。得られた成熟不定胚を、10～20日間程度脱水処理させた後に発芽用培地で培養すると、68～93%程度の発芽率を示した。その後、発芽した不定胚のうち、約8～9割が植物体を形成した。インビトロ苗の外気環境への段階的な順化を行うことにより、90%以上の活着率が得られた。また、胚性万能細胞のプロトプラスト培養により、不定胚誘導が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツノザイセンチュウによる松枯れ被害対策の一環として、抵抗性個体の大量増殖が望まれている。これまで、実生や挿し木による苗生産が主に行われているが、これらの方法では増殖に時間と手間がかかり、大規模植林への実用的な対応が難しいという問題がある。そこで、組織培養により、不定胚形成能力を持つ胚性万能細胞から苗の大量生産技術を開発することで、マツノザイセンチュウ抵抗性苗を安定的かつ効率的に作出するための条件を明らかにし、大きな問題となっている松枯れ被害の対策として、実用化に向けた基盤技術の開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Fourteen lines of embryogenic cells were induced from 3 pine wood nematode-resistant black pine families, and lines with high somatic embryo differentiation ability were selected. The induction rate of mature somatic embryos was significantly different depending on the cell line, but in the top five lines with high induction rates, more than 180 somatic embryos were formed per plate. When the resulting mature somatic embryos were desiccated for about 10 to 20 days and then cultured in a germination medium, they exhibited a germination rate of 68 to 93%. Thereafter, about 80 to 90% of the germinated somatic embryos formed plants. By carrying out stepwise acclimatization of the in vitro seedlings to the external air environment, 90% or more survival rates were obtained. In addition, protoplast culture of embryogenic cells revealed that somatic embryo induction is possible.

研究分野：農学

キーワード：胚性万能細胞 マツノザイセンチュウ抵抗性苗 不定胚形成 クロマツ 胚培養 体細胞分化 外気順化 プロトプラスト培養

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウによる松枯れ被害対策の一環として、抵抗性個体の大量増殖が望まれている。これまで、実生や挿し木による苗生産が主に行われているが、これらの方法では増殖に時間と手間がかかり、大規模植林への実用的な対応が難しいという問題がある。そこで、効率的な抵抗性個体の大量増殖技術を開発する必要がある。針葉樹などの大量増殖には、培養細胞から誘導した大量の不定胚から個体再生させることが最も効率の良い手法として知られている。本課題では、不定胚形成技術を用いて、胚性万能細胞から苗の大量生産技術を開発することを目的としている。

2. 研究の目的

組織培養により、不定胚形成能力を持つ胚性万能細胞から苗の大量生産技術を開発することを目的とする。この手法により、マツノザイセンチュウ抵抗性苗を安定的かつ効率的に作出するための条件を明らかにし、大きな問題となっている松枯れ被害対策の一環として、実用化に向けた基盤技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 胚性万能細胞の誘導と成熟不定胚の形成

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの種子を、外植体として用いた。外植体を無菌化するため、99.5%エタノールに30秒、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄処理した。その後、種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体を胚性万能細胞誘導用培地に置床した。培地には、EM培地 (Maruyama et al. 2000) あるいはLP培地 (Pullman et al. 2002) に、成長調節物質の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) や6-ベンジルアミノプリン (BAP) を添加した固形培地を用いた。誘導したクロマツ胚性万能細胞を2~3週間ごとに継代培養し、不定胚の誘導培養実験に試料として用いた。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培地を用い、培養は暗黒下、25℃で行った。また、胚性万能細胞系統を成熟不定胚誘導用培地で培養し、胚分化能力の高い系統を選抜して、固形や液体培地で効率的に不定胚を誘導するための培養条件を検討した。

(2) 植物体再生とインビトロ苗の外気順化

誘導した不定胚を用いて、効率的に発芽および個体再生するための培養条件を検索した。また、不定胚由来の再生個体を用いて効率的に順化苗を作出するために植物体の外気順化条件を検討した。ポリエチレングリコールを含んだEM培地で成熟させたクロマツ不定胚を2週間程度脱水処理させた後に発芽用のホルモンフリー1/2EM培地で4~6週間培養した。その後、発芽した不定胚をさらに成長させるため、発芽時と同一組成の培地を含む培養フラスコやプラントボックスに移植し、16~20週間培養を行った。得られた植物体を培地からピンセットを用いて引き抜き、根に付着した寒天を水洗で除去した後に、水で十分に湿らせた鹿沼土又はバーミキュライト培養土を含むプラスチックポットに植付け、透明蓋付きの水切りカゴの中で外気順化を行った。

(3) プロトプラスト培養

胚性万能細胞のプロトプラスト培養により、効率的な不定胚誘導が可能であるかを検証した。プロトプラスト単離、プロトプラスト培養やプロトプラストから不定胚を形成させるための培養条件を検討した。

4. 研究成果

(1) 胚性万能細胞の誘導と成熟不定胚の形成

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ3家系から遺伝的に異なる14系統の胚性万能細胞を誘導することができた (図-1)。得られた各細胞系統は、誘導時とほぼ同じ培養条件で約2~3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)。

増殖させた胚性万能細胞を不定胚成熟用の培地に移すと、培養開始約6週間後に成熟不定胚の形成が見られた (図-3)。誘導したクロマツ胚性万能細胞の中から分化能力の高い系統を選抜した。その結果、成熟不定胚の誘導率は、細胞系統によって著しく異なったが、誘導率の高かった上位5系統では、シャーレあたり180個以上の不定胚が形成された (表-1)。

液体培養について、固形培地で検討した培養条件をもとに、300mlの培養フラスコ内で、液体培地を用いて胚性万能細胞からの不定胚の誘導実験を行った (図-4)。液体培養条件の検討はまだ途中段階であるが、細胞の培養密度が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。

表-1 系統による不定胚の誘導率

系統	不定胚本数
N6-1	233
N72-1	185
N72-2	261
Y82-2	250
Y84-3	358



図-1 細胞の誘導



図-2 細胞の維持増殖

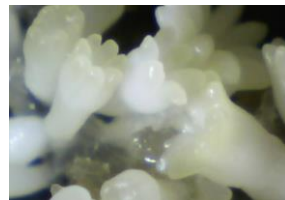


図-3 不定胚形成



図-4 不定胚形成(液体培地)

(2) 植物体再生とインビトロ苗の外気順化

得られた成熟不定胚を用いて、効率的に発芽および個体再生するための培養条件の検索を行った。その結果、成熟不定胚を直接、発芽培地上で培養すると、不定胚全体の膨脹は促進されたものの、不定胚の発芽はほとんど見られなかった。これに対して、10~20日間程度脱水処理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(図-5)、4週間目に68~93%程度の発芽率を示した(表-2)。その後、発芽した不定胚のうち、約8~9割が植物体を形成した(表-2)。脱水処理がクロマツ不定胚の発芽促進に有効であることが明らかとなった。さらに植物体を成長させるため、発芽時と同一組成の培地に移植すると、図-6に示すように健全な成長が見られた。

表-2 系統による不定胚の発芽率と個体再生率

系統	発芽率 (%)	個体再生率 (%)
N6-1	89	78
N72-1	85	78
N72-2	93	88
Y82-2	68	53
Y84-3	90	73

得られた植物体を水で十分に湿らせた培養土を含むポットに植付け、透明蓋付きの水切りカゴ(図-7)の中で外気順化を行った結果は、移植後最初の2週間は蓋を閉じたままにし、その後、順化を開始して4週間後に蓋が完全に開くまで徐々に少しずつ開くと、結果的に90%以上のインビトロ苗を順化させることができた(図-8)。フラスコ内の高湿度環境条件から外気の低湿度環境条件までの段階的な湿度管理がインビトロ苗の順化に多大な影響を及ぼすことが明らかとなった。



図-5 不定胚の発芽



図-6 植物体の再生



図-7 順化用水切りカゴ



図-8 順化苗

(3) プロトプラスト培養

胚性万能細胞のプロトプラスト培養により、効率的な不定胚誘導が可能であるかを検証した。その結果、プロトプラスト単離には、マンニトール、セルラーゼオノズカRSとペクトリアーゼY-23の組合せが有効であることがわかった。収量は、 $10 \sim 35 \times 10^4$ プロトプラスト/g FW、生存率は、52~78%であった(表-3、図-9)。プロトプラスト培養については、浸透圧調節剤としてマンニトールを用い、植物ホルモンとして2,4-DとBAPの組合せ、培養密度は $5 \times 10^2 \sim 2 \times 10^3$ に調整し、96ウエルプレートで培養することにより、コロニーを形成させることに成功した(図-10)。得られた不定胚形成細胞(図-11)を不定胚誘導培地で培養すると、約6週間後に成熟不定胚を形成させることが確認できた(図-12)。

表-3 細胞系統によるプロトプラスト単離効率の比較

系統	収量 [$\times 10^4$ プロトプラスト]	生存率 [%]
N-39-101	25	52
Y-84-3K	35	76
Y-84-16-1	15	76
Y-84-101	10	78
W-56-101	35	73

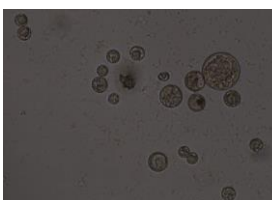


図-9 プロトプラスト単離

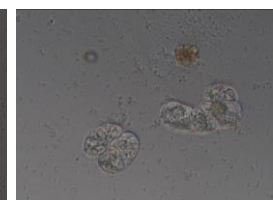


図-10 細胞分裂



図-11 不定胚形成細胞



図-12 成熟不定胚の形成

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Progress in somatic embryogenesis of Japanese pines、Frontiers in Plant Science、査読有、Vol. 10、No. 31、2019、DOI: 10.3389/fpls.2019.00031)
- ② 織部雄一郎、田中功二、宮本尚子、山野邊太郎、今野幸則、大西昇、丸山毅、川上鉄也、小澤創、太田清藏、海岸防災林再生現場への抵抗性クロマツ苗木の安定供給に向けた技術開発と普及、水利科学、査読有、Vol. 62、No. 3、2018、pp. 97-107
- ③ 細井佳久、丸山毅、ヤクタネゴヨウ、クロマツの針葉・芽切片からのカルス誘導と細胞培養、関東森林研究、査読有、Vol. 68、No. 1、2017、pp. 1-4

[学会発表] (計 14 件)

- ① MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese pines、Abstracts of International Conference on Plant、Cellular & Molecular Biology、Valencia、Spain、2019、p. 41
- ② MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Propagation of Ryukyu pine (*Pinus luchuensis* Mayr.) through somatic embryogenesis、In Vitro Cellular & Developmental Biology、Abstracts of the 14th Quadrennial Congress of the IAPB、Dublin、Ireland、2018、p. S41 P-44
- ③ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Progress in somatic embryogenesis of Japanese conifers、Abstracts of 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2. 09. 02 Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies、Coimbra、Portugal、2018、p. 38-PL8
- ④ 丸山毅、細井佳久、倉本哲嗣、今野幸則、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ不定胚形成細胞からの成熟不定胚誘導、第 129 回日本森林学会学術講演要旨集、2018、p. P2-064
- ⑤ 細井佳久、丸山毅、材線虫抵抗性クロマツの種子胚由来細胞の培養と分化、第 81 回日本植物学会大会研究発表記録、2017、p. 224
- ⑥ 大西昇、安野紀子、丸山毅、今野幸則、山野邊太郎、織部雄一郎、植物組織培養技術によるクロマツ林の再生への取組、第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会講演要旨集、2017、pp. 14-15
- ⑦ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese pines and cypresses、Proceedings of the 4th International Conference of the IUFRO Unit 2. 09. 02 on “Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a changing climate and environment”、September 19-23、2016、La Plata、Argentina、2017、p. 340
- ⑧ 大西昇、安野紀子、丸山毅、今野幸則、山野邊太郎、織部雄一郎、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、第 6 回森林遺伝育種学会講演要旨集、2017、pp. 64-68
- ⑨ 丸山毅、細井佳久、今野幸則、倉本哲嗣、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細胞の誘導、第 128 回日本森林学会大会学術講演集、2017、p. P2-099
- ⑩ 細井佳久、丸山毅、リュウキュウマツ、ヤクタネゴヨウ組織から誘導したカルスからのプロトプラストの単利・培養、第 128 回日本森林学会大会学術講演集、2017、p. P1-236
- ⑪ 細井佳久、丸山毅、マツ材線虫病により減少するヤクタネゴヨウの無菌培養による増殖の試み、第 80 回日本植物学会大会講演要旨集、2016、p. 205
- ⑫ 細井佳久、丸山毅、ヤクタネゴヨウ、クロマツの針葉・芽切片からのカルス誘導と細胞培養、第 6 回関東森林学会大会講演要旨集、2016、p. 47
- ⑬ 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、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大会講演要旨集、2016、p. 148
- ⑭ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese pines and cypresses、Book of Abstracts 4th International Conference of the IUFRO Working Party 2. 09. 02 Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies、2016、p. 67

[図書] (計 5 件)

- ① HOSOI Yoshihisa、MARUYAMA Tsuyoshi、Propagation of Ryukyumatsu (*Pinus luchuensis* Mayr.) via somatic embryogenesis、Taoufik Bettaieb (Ed) Micropropagation of Ornamental Plants、Nova Science Publishers Inc.、New York、USA、pp. 214、ISBN: 978-1-53614-541-0)、2018、pp. 115-136
- ② MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Protocol for somatic embryogenesis in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) and Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb.

et Zucc.)、Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants(Shri Mohan Jain、Pramod K. Gupta (Eds)、Forestry Sciences 84、Springer International Publishing AG、Cham、Switzerland、pp.323、ISBN 978-3-319-89482-9、<https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6>、2018、pp.229-241

- ③ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryo maturation using a high concentration of gellan gum promotes germination of somatic embryos of *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima、an endemic and endangered species in Japan、Proceedings of the IUFRO Tree Biotechnology 2015 Conference: "Forest: the importance to the planet and society"、Cristina Vettori、Giovanni Giuseppe Vendramin、Donatella Paffetti、Davide Travaglini (Eds)、Florence、Italy、pp.529、DOI: 10.13140/RG.2.1.4603.6882)、2016、pp.473-475
- ④ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryogenesis and plant propagation in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) and Japanese red pine (*Pinus densiflora* Zieb. *et Zucc.*)、Yill-Sung Park、Jan M. Bonga、Heung-Kyu Moon (Eds)、Vegetative Propagation of Forest Trees、National Institute of Forest Science (NIFOS)、Seoul、Korea、pp.675、(ISBN 978-89-8176-064-9)、2016、pp.623-638
- ⑤ MARUYAMA Tsuyoshi、HOSOI Yoshihisa、Somatic embryogenesis in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.)、Abdul Mujib (Ed)、Somatic Embryogenesis in Ornamental and Its Applications、Springer、New Delhi、India、pp.267、ISBN 978-81-322-2681-9、DOI: 10.1007/978-81-322-2683-3、2016、pp.27-39

[その他]

ホームページ等

- ① 織部雄一郎、宮本尚子、山野邊太郎、丸山毅、田中功二、今野幸則、川上鉄也、小澤創、大西昇、太田清蔵、抵抗性クロマツで海岸防災林を再生する、森林総合研究所、平成28年版研究成果選集、pp.77、ISSN 1348-9828、URL <http://www.ffpri.affrc.go.jp/>、2016、pp.66-67

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：細井 佳久

ローマ字氏名：(HOSOI, Yoshihisa)

所属研究機関名：国立研究開発法人 森林総合研究所

部局名：樹木分子遺伝研究領域

職名：チーム長

研究者番号 (8桁)：50353842