

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660126

研究課題名(和文) 不定胚を由来するザイセンチュウ抵抗性マツのクローン増殖技術の開発

研究課題名(英文) Development of clonal propagation technology for nematode-resistant pines via somatic embryogenesis

研究代表者

丸山 毅 (Maruyama, Tsuyoshi)

国立研究開発法人 森林総合研究所・生物学研究領域・領域長

研究者番号：20353865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マツ属樹木について、ザイセンチュウ抵抗性個体の組織培養技術による大量増殖法確立を旨とし、成木クロマツ、アカマツ及びヤクタネゴヨウの栄養組織外植体より、各個体に共通する不定胚形成細胞、苗条原基や不定芽等の誘導条件及びプロトプラスト培養条件を検索し、植物体再生のための基盤技術開発を行った。各種の茎頂切片や針葉切片からカルス誘導及び増殖を効率的に行うことが可能となった。また、クロマツの茎頂切片を用いて、多芽体の誘導及び増殖が可能であることを確認できた。そして、多芽体の伸長や発根について、適切な培養条件を検討することで、成木マツ属の栄養組織外植体からの効率的な増殖法を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to develop basic techniques for the propagation of adult nematode-resistant pine trees from vegetative material using tissue culture techniques. The culture conditions for the induction of somatic embryogenic cells, shoot primordia and adventitious buds, and for the protoplast culture were investigated. It was possible to perform efficiently callus induction from shoot-tip and needle sections of adult Japanese pines. Also, it was confirmed that by using the shoot-tip sections of Japanese black pine, are possible induction and growth of adventitious buds. Further, the appropriate culture conditions for the elongation and rooting of shoots were examined.

研究分野：農学

キーワード：組織培養 クローン増殖 栄養組織外植体 カルス 多芽体 器官分化 プロトプラスト培養 ザイセンチュウ抵抗性マツ

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の対策として、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木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。

2. 研究の目的

本研究は、組織培養の技術を用いて、クロマツ、アカマツ及びヤクタネゴヨウの茎葉や芽などの栄養組織からのクローン増殖法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

野外に生育する成木のアカマツ、クロマツやヤクタネゴヨウの栄養組織外植体を用いて、各個体に共通する不定胚形成細胞、苗条原基や不定芽等の誘導条件を検索し、マツ属樹木の増殖法に関わる基盤技術を開発した。

4. 研究成果

(1) 初代培養条件の検索

成木マツの栄養組織外植体からの初代培養条件の検索では、多くのシュートチップや針葉を用いて、2.5%アンチホルミン 30 分の殺菌処理を行ったところ、無菌化の樹種間差は確認できなかったが、外植体の種類間差が認められた(表-1)。

表-1 成木マツ外植体の殺菌処理の結果

樹種	外植体	置床数	コンタミ数	コンタミ率
クロマツ	シュート	1,831	1,552	85%
	針葉	396	14	4%
アカマツ	シュート	2,816	2,269	81%
	針葉	388	12	3%
ヤクタネゴヨウ	シュート	1,500	1,077	72%
	針葉	374	13	3%

(2) 継代培養条件の検索

滅菌後の外植体(図-1)の培養については、3樹種の栄養組織外植体を用いて、成長調節物質を含めた培地条件等を検索し、組織・細胞の誘導や増殖効率について培養条件を検討した。成長調節物質の2,4-ジクロロフェノ

キシ酢酸(2,4-D)、1-ナフタレン酢酸(NAA)、6-ベンジルアミノプリン(BAP)、1-トリアコントロール(TRIA)やサリチル酸(SA)を含有したDCR培地(GUPTA & DURZAN 1985)あるいはMS培地(MURASHIGE & SKOOG 1962)が増殖に適していた。その結果、各種の茎頂切片や針葉切片からカルス誘導を効率的に行うことが可能となった(表-2、図-2、図-3)。



図-1 成木ヤクタネゴヨウのシュートチップ外植体

表-2 マツ属のシュートや針葉切片からのカルス誘導率

樹種	外植体	培地	置床数	カルス化	カルス化率
クロマツ	シュート	A	103	94	91%
		B	22	19	86%
		C	154	118	77%
アカマツ	針葉	A	72	40	56%
		B	72	24	33%
		C	80	36	45%
ヤクタネゴヨウ	シュート	A	249	241	97%
		B	116	109	94%
		C	182	170	93%
ヤク	シュート	A	66	8	12%
		B	77	7	9%
		C	65	5	8%
タネ	針葉	A	81	81	100%
		B	115	89	77%
		C	227	211	93%
ゴヨウ	針葉	A	105	89	85%
		B	116	100	86%
		C	32	28	88%

A: DCR+5mg 2,4-D+5mg NAA+2mg BAP

B: DCR+5mg 2,4-D+5mg NAA+2mg BAP+1mg SA

C: DCR+5mg 2,4-D+5mg NAA+2mg BAP+2mg TRIA

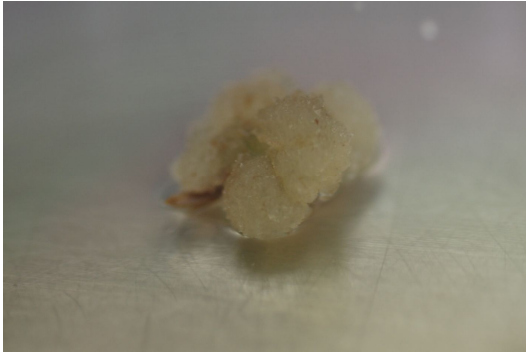


図-2 アカマツのシュートチップからのカルス誘導



図-3 クロマツの針葉からのカルス誘導

成木の由来、培養する器官や採取時期などによって外植体の反応は異なったが、培地への2,4-DまたはNAAと、BAPの添加が、カルスの維持・増殖に適していることがわかった。定期的に継代培養を行い、カルスからの器官分化を検討した。その結果、カルスからは散発的に子葉胚の様な組織の形成が見られたが(図-4)、不定胚や多芽体などの分化が見られなかった。

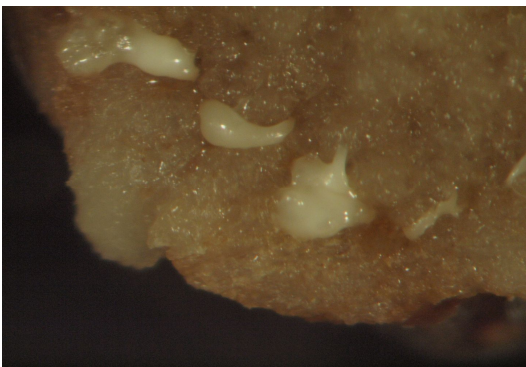


図-4 カルスからの子葉胚状組織の形成

(3) 多芽体誘導及び植物体再生条件の検索

野外に生育する成木マツの栄養組織外植体由来する苗条原基から、個体再生を目指した。その結果、クロマツの茎頂切片を、BAPやNAAを添加したMS培地またはWPM(LLOYD &

McCOWN 1980) 培地で培養すると、多芽体の誘導が可能であることを明らかにした(表-3)。得られた多芽体を分割して、誘導用培地と同様な組成を持つ新鮮培地で培養することによって、定期的に多芽体の増殖が可能であることが確認できた(図-5)。

表-3 クロマツのシュートや針葉切片からの多芽体誘導

外植体	培地	置床数	多芽体化率	外植体当たりの芽の形成数
シュート	A	100	74%	3.1
	B	100	94%	6.4
針葉	A	50	0%	0
	B	50	0%	0

A: MS+1.13mg BAP

B: MS+1.13mg BAP+0.09mg NAA



図-5 クロマツの多芽体

また、多芽体を伸長させるためには、活性炭を添加した植物ホルモンフリーの培地で培養することが有効であった(図-6)。伸長させた多芽体を発根させるため、インドール酪酸(IBA)やNAAを添加した培地で培養した(図-7)。



図-6 クロマツ多芽体の伸長

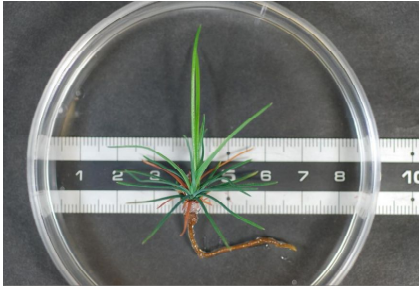


図-7 クロマツシュートの発根

形成した植物体を伸長させるためには、活性炭を添加した植物ホルモンフリーの培地で培養した(図-8)。



図-8 クロマツの植物体再生

(4) プロトプラスト培養の検討

通常の細胞から細胞壁を取り除いた状態にあるプロトプラストの培養は、細胞に対して大きなストレスがかかる。そのため、器官分化や不定胚形成などを引き起こす効果が通常の組織培養に比べて高まることを期待し、誘導したカルスについて、プロトプラスト培養が可能であるかを検討した。

細胞培養による個体再生系確立を旨とし、ヤクタネゴヨウの芽と、針葉から生じたカルスについてプロトプラストの単離条件を検討した。その結果、プロトプラスト単離には、浸透圧はマンニトール 0.6M 程度が適しており、酵素としてはセルラーゼ(オノズカ)RSとペクチナーゼ Y-23 の添加が有効であることがわかった(図-9)。単離したプロトプラストを 28 の暗黒下で、96 ウェルプレートを用いて、ウェルあたり 100 個のプロトプラストの培養密度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)。

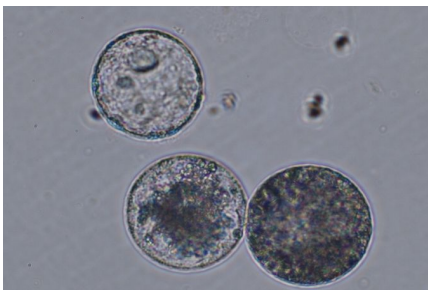


図-9 ヤクタネゴヨウの栄養組織外植体由来するカルスからのプロトプラスト単離

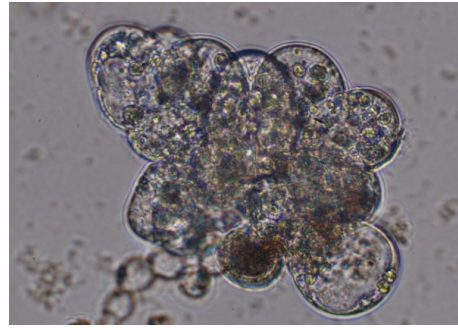


図-10 ヤクタネゴヨウのプロトプラストからのコロニー形成

植物成長調節物質 2,4-D と BAP の組合せを表-4 及び表-5 に示した。両プロトプラストともコロニー形成を確認し、2,4-D については 10 μ M の添加が最も効果的であった。

表-4 ヤクタネゴヨウシュートチップ由来のカルスより単離したプロトプラストからのコロニー形成数

BAP [μ M]	2,4-D[μ M]			
	1	3	10	30
0	1.25	1.75	4	3.5
1	2	0.5	2.5	1.75
10	0.5	0.25	4.25	1.75

表-5 ヤクタネゴヨウ針葉由来のカルスより単離したプロトプラストからのコロニー形成数

BAP [μ M]	2,4-D[μ M]			
	1	3	10	30
0	0	0	14.5	8.5
1	0	1	3.5	9
10	0	0	4	5.5

<引用文献>

GUPTA PK & DURZAN DJ, Shoot multiplication from mature Douglas fir and sugar pine, Plant Cell Rep., 1985, 4:177-179

MURASHIGE S & SKOOG F, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 1962, 15:473-497

LLOYD G & McCOWN B, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip, Comb. Proc. Intern. Plant Propag. Soc., 1980, 30:421-427

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

丸山 毅、大西 昇、細井 佳久、安野 紀子、今野 幸則、山野邊 太郎、織部 雄一郎、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、関東森林研究、査読有、66 巻、2016、73-76

MARUYAMA Tsuyoshi, HOSOI Yoshihisa, Germination and plant regeneration from somatic embryos of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) after maturation in a medium containing polyethylene glycol or a high concentration of gellan gum, Proceeding of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on "Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies", 査読有, 2015, 3:38-44

細井 佳久、丸山 毅、国産マツの不定胚形成による再分化と器官培養による分化の試み、関東森林研究、査読有、66 巻、2015、111-114

〔学会発表〕(計 11 件)

細井 佳久、丸山 毅、クロマツとヤクタネゴヨウの器官・細胞培養、第 127 回日本森林学会大会、2016 年 3 月 27 日-29 日、日本大学生物資源科学部 (藤沢市)

丸山 毅、大西 昇、細井 佳久、安野 紀子、今野 幸則、山野邊 太郎、織部 雄一郎、クロマツの不定胚による苗木大量増殖技術の開発-東日本大震災の復興に向けた貢献-、第 33 回日本植物細胞分子生物学会大会、2015 年 8 月 10 日、東京大学農学部弥生キャンパス (東京都、文京区)

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, IUFRO Tree Biotechnology 2015 Conference on "Forests: the importance to the planet and society", 2015 June 8-12, University of Florence (Florence, Italy)

MARUYAMA Tsuyoshi, HOSOI Yoshihisa, Progress in somatic embryogenesis of seven Japanese conifer species, Tree Biotechnology Symposium 2015 on "Current Biotechnology Strategies for Forest Productivity Improvement", 2015 May 12-14, Korea Forest Research Institute

(Suwon, Korea)

細井 佳久、丸山 毅、マツ属樹木の組織培養による植物体再生、第 126 回日本森林学会大会、2015 年 3 月 26 日-29 日、北海道大学 (札幌市)

丸山 毅、細井 佳久、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、第 3 回関東森林学会大会、2014 年 10 月 17 日、KKR 甲府 (甲府市)

〔図書〕(計 3 件)

MUJIB A (Ed), MARUYAMA Tsuyoshi, HOSOI Yoshihisa, Somatic Embryogenesis in Ornamentals and its Applications, Somatic embryogenesis in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.), 2016, 267 (27-39)

PARK YS, BONGA JM, MOON HK (Eds), MARUYAMA Tsuyoshi, HOSOI Yoshihisa, Vegetative Propagation of Forest Trees, Somatic embryogenesis and plant propagation in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) and Japanese red pine (*Pinus densiflora* Zieb. et Zucc.), 2016, 675 (623-638)

RAMAWAT KG, MERILLON JM, AHUJA MR, MARUYAMA Tsuyoshi, HOSOI Yoshihisa, Tree Biotechnology, Plant Production in Japanese pines via somatic embryogenesis, 2014, 645 (251-261)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 毅 (MARUYAMA, Tsuyoshi)

国立研究開発法人 森林総合研究所・生物工学研究領域・領域長

研究者番号：20353865

(2) 研究分担者

細井 佳久 (HOSOI, Yoshihisa)

国立研究開発法人 森林総合研究所・生物工学研究領域・チーム長

研究者番号：50353842