

抵抗性クロマツの交雑育種 - 胚培養による増殖技術の開発 -

藤原 直哉・丹原 哲夫

Crossbreeding of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) as resistance variety
- Multiplication technology development by embryo culture -

Naoya FUJIWARA, Tetsuo TANBARA

要 旨

藤原直哉・丹原哲夫：抵抗性クロマツの交雑育種 岡山県林試研報21：83 - 85 2005 マツの材線虫病抵抗性クロマツの増殖を目的として成熟胚の培養を行った。予備試験として、抵抗性クロマツ種子を胚培養したところ、発根率は平均20%前後と低い値を示し、充実した根が形成されなかった。また、順化後の活着も不良であった。そこで、新たに抵抗性クロマツ4クローン（自殖を除く両面交配）を行い、平均8.8gの種子を得た。この胚を活性炭を含むGD培地で培養したところ、平均40.5%の胚培養に成功したが、系統により形成率は大きく異なった。

キーワード：抵抗性クロマツ，交雑育種，胚培養，増殖

はじめに

岡山県におけるマツの材線虫病（以下松くい虫）によるマツの集団枯損は、1960年代後半から戦後第二期の拡大期を迎え、1980年代以降、被害は瀬戸内沿岸地域からほぼ県下全域に拡大し、被害は現在もなお継続している。抜本的な被害対策として、1978年から林木育種センター - と西南日本の14県はマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業（林野庁 1978, 藤本ら 1989, 戸田 1997）に取り組み、現在すでに一部の県では採種園産種苗による造林が実施されている（林木育種推進関西地区協議会 2003など）。

しかし、抵抗性マツも母樹家系によって抵抗性が異なったことから（丹原ら 1998等）、岡山県ではアカマツについては上位家系の種苗のみを普及対象とし、漸次採種園の改良（1.5世代の育種）に取り組んでいる。しかしクロマツについては、アカマツに比べて抵抗性レベルが著しく低かったため（丹原ら 1996・1997）、普及上の障害となっている。抵抗性を向上させるために、九州地域では養苗段階でマツノザイセンチュウを接種し、接種済みの苗を造林に利用している（鳥羽瀬 2003）。しかし、大量の苗木への接種には困難性をともなうとともに、気象条件等との関係で接種結果が大きく異なる場合がある（戸田 1997, 丹原ら 1998）。一方、採種園の抵抗性を高めるためには採種園の改良が即効性が高いが、抵抗性クロマツについては採種園構成クローンに限られていることから遺伝的多様性の上から問題がある。遺伝的多様性を保持しながら抵抗性を向上させるためには、激害林から新たな選抜を実施するか、抵抗性個体間の交配苗から新たな抵抗性個体を選抜する（第2世代の育

種）必要がある。激害林からの選抜は、候補木としてきわめて多くの個体を選抜する必要があるため（藤本ら 1989）、第2世代の育種の展開が有効と考えられる。

そこで、採種園等に保存している4クローンを使用した人工交配をおこない、胚培養によってこの種子を増殖・育成し、接種検定により選抜を行うこととした。本報告は人工交配の結果および胚培養による増殖方法について報告する。

材料と方法

1.人工交配

自然交配家系苗を使用した接種試験において比較的抵抗性が高いとみられた波方37, 志摩64, 三崎90（丹原等 1996・1997）、および元（独）森林総合研究所関西支所大山浪雄博士から譲渡を受けた松島の4クローンを使用した両面交配（自殖を除く12交配種）をおこなった。袋かけ（交配種あたり15袋）は2002年4月18日、第1回交配は4月25日、第2回交配は5月2日におこない、2003年10月に交配種ごとに球果を採取・精選した。なお、花粉は当年産花粉を使用した。

2.胚培養

クロマツの成熟胚培養については、多くの報告がある（石井 1993, 余吾 1997など）。これらの報告を参考にして、人工交配によって得られた種子を、軟化处理として予め12時間程度水道水に浸水した。次に表面殺菌処理として、70%エタノールに3分間、次亜塩素酸カルシウム飽和液に10分間浸水し、濾紙上で風乾した。次に実体顕微鏡下で、ピンセットと解剖刀で種子を半割にした後、胚（長さ2～3mm）を摘出した。胚は、個々に1000

倍に希釈した HYPONEX (N:P:K=6.5:6:19) 寒天培地 (表 - 1) と GD 寒天培地 (Sommer 1975) に置床した。培養条件は、気温24℃, 4000Lux, 16時間日長とした。なお、培地に活性炭を混合するとシュートの伸長に効果があることが認められているため (近藤・岡村 1995), 1N NaOH を添加して pH を5.5~5.9に調整後、粉状活性炭と寒天を既定量加えた。培養中に糸状菌等のコンタミネーションが発生した場合は、速やかに試料を培地ごと廃棄した。

表 - 1 HYPONEX 寒天培地の組成 (/ L)

| | |
|----------|------|
| HYPONEX | 1 g |
| サッカロース | 20 g |
| 活性炭 (粉状) | 5 g |
| 寒天 | 9 g |

なお初代培養時には、分化促進植物ホルモンとして、BAP (ベンジルアミノプリン) 5μM を培地に添加した。以降1か月おきにホルモンフリーの培地で継代培養し、不定芽と不定根の形成状況を調査した。

3. 順化

予備試験として前年度培養した不定芽の植物体を供試した (写真 - 1)。順化处理は、サクラの順化方法に従って (藤原 2002) 4月下旬から行い、まず市販の培地支持体 (フロリアライト222 日清紡) または水苔とパーミキュライト (体積比 5:5) の混合物を入れたジフィーポット (丸形 径5.5cm) にサッカロースを含まない GD 液体培地を15ml ずつ分注した (写真 - 2)。その後ポットを植物培養容器に納めて滅菌 (121℃, 15分間) し、冷却後、無菌条件下で発根した培養苗を植え付けた。

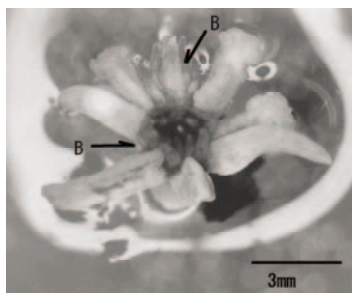


写真 - 1 展開した抵抗性クロマツの胚
B: 不定胚



写真 - 2 順化中の培養苗

結果と考察

1. 人工交配

交配種あたりの種子採取量は0.9~19.8g, 全体平均では8.8gであった。母樹クロ-ン間, 花粉親クロ-ン間を比較すると、松島は雌親のとき種子量が多く (8.8~19.8g), 花粉親のときは少ない傾向であった (0.9~4.0g)。雌親クロ-ンと雄親クロ-ンによって種子採取量は大きく異なったが、各袋によって雌花数が異なり、種子を交配種ごとに一括採取したため (反復無し), 交配組み合わせ間の親和性等についての検討はできなかった。

表 - 2 交配種ごとの種子生産量

| × | | 種子量 (g) |
|------|------|---------|
| 波方37 | 三崎90 | 3.3 |
| " | 志摩64 | 10.3 |
| " | 松島 | 0.9 |
| 志摩64 | 波方37 | 12.4 |
| " | 三崎90 | 19.5 |
| " | 松島 | 4.0 |
| 三崎90 | 波方37 | 2.4 |
| " | 志摩64 | 8.9 |
| " | 松島 | 3.6 |
| 松島 | 三崎90 | 8.8 |
| " | 波方37 | 11.5 |
| " | 志摩64 | 19.8 |
| 平均 | | 8.8 |

交配種ごと得られた種子量では、(松島×志摩64) の組み合わせが19.8gと最大であり、(波方37×松島) は最小の0.9gと大差があった。平均種子量は、8.8gであった (表 - 2)。

2. 胚培養

表面殺菌の成功率は97%と高率で、コンタミネーションは3%程度と僅かであった。試料の褐変や損傷の発生も確認されず、本手法は実用性の高い殺菌方法であることが示唆された。なお、種子の浸水時間が12時間を超えると胚乳が水溶化し、無菌的な胚の抽出が困難になった。

培養個体の発根率は、HYPONEX 培地でやや高い数値を示した (表 - 3) が、差は僅かであった。

表 - 3 発根率の調査結果

| 培地 | 反復1 | 反復2 | 平均 (%) |
|---------|-------------|--------------|--------|
| GD | 16.7 (4/24) | 20.0 (5/54) | 18.4 |
| HYPONEX | 20.0 (6/30) | 30.3 (10/33) | 25.2 |

() は 発根個体数 / 培養個体数を示す

人工交配種子の不定芽形成数は、表 - 4 のとおりであった（2004年3月下旬現在）。

表 - 4 人工交配種子の不定芽継代数

| × | | 初代（個） | 継代（個） | （％） |
|------|------|-------|-------|------|
| 波方37 | 三崎90 | 107 | 47 | 43.9 |
| " | 志摩64 | 207 | 64 | 30.9 |
| " | 松島 | 219 | 28 | 12.8 |
| 志摩64 | 波方37 | 263 | 135 | 51.3 |
| " | 三崎90 | 224 | 119 | 53.1 |
| " | 松島 | 217 | 92 | 42.4 |
| 三崎90 | 波方37 | 93 | 22 | 23.7 |
| " | 志摩64 | 215 | 68 | 31.6 |
| " | 松島 | 279 | 115 | 41.2 |
| 松島 | 三崎90 | 116 | 74 | 63.8 |
| " | 波方37 | 47 | 18 | 38.3 |
| " | 志摩64 | 115 | 69 | 60.0 |
| 平均 | | 175.2 | 70.9 | 40.5 |

交配種あたりの不定胚形成率は12.8～63.8％，全体平均では40.5％であった。母樹クロン間を比較したら志摩64（42.4～53.1％），松島（38.3～63.8％）は波方37（12.8～43.9％），三崎90（23.7～41.2％）に比較しやや高い傾向であった。花粉親クロン間では一定の傾向はみられなかった。すなわち，母樹クロンによって不定胚形成率がやや異なる傾向がみられた。このことに関連し，近藤・岡村（1995）は系統によって不定芽の形成数が大きく異なることを報告している。なお，種子生産量と同様に当試験においても反復がないため，交配組み合わせ間の違いについての検討はできなかった。

3. 順化

予備試験として行った A～G の順化試験結果は表 - 5 のとおりであった。

表 - 5 順化試験結果

| | 供試数 | 順化 | ％ |
|----|-----|----|------|
| A | 10 | 7 | 70.0 |
| B | 10 | 3 | 30.0 |
| C | 10 | 1 | 10.0 |
| D | 10 | 0 | 0.0 |
| E | 5 | 2 | 40.0 |
| F | 5 | 1 | 20.0 |
| G | 5 | 1 | 20.0 |
| 平均 | 55 | 15 | 27.1 |

A～G の試験では，順化の成功率は最小の0.0％から

最大の70.0％まで大きなバラツキがあった。順化の条件は同一に設定したことから，供試した培養苗の状態が不均一であったと推定される。特に根の発達状況については，大きな個体差があり，発達が未熟な個体が環境変化に耐えられなかったものと考えられる。抵抗性クロマツの発根や順化条件については，既報があり（後藤・宮原1997），発根培地のサッカロース含有量の大幅な減量と植物ホルモン剤の組み合わせと濃度について改良が行われている。一般的に抵抗性クロマツの胚培養では，不定根の形成不良が知られており，培養手法の改良が必要と思われる。

おわりに

抵抗性クロマツの人工交配を行い，平均8.8gの種子を得た。種子の形成率は，交配種によって大きく異なった。この種子を胚培養したところ，平均40.5％の不定芽を形成した。しかしこの場合でも，交配種によって形成率が大きく異なった。

予備試験として，冷蔵保存した既存の抵抗性クロマツ種子を胚培養し，発根処理と順化を行ったが，平均発根率は20％前後と低率であった。また，順化の成功率も平均27.3％と低く，同じ環境条件下でも成功率がばらついた。今後胚培養苗の実用化に向けて，発根と順化割合の向上が不可欠である。

引用文献

- 藤本吉幸・戸田忠雄・西村慶二・山手廣太・冬野劭一（1989）マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業 - 技術開発と事業実施10か年の成果 - . 林木育種場研報7 : 1-84 .
- 藤原直哉（2002）組織培養による樹木の保存技術の確立 . 岡山県林業試験場研究報告 No. 18:26pp
- 後藤晋・宮原文彦（1997）抵抗性クロマツの組織培養（ ） . 日本林学会九州支部論文集 No. 50:pp57-58
- 石井克明（1993）ヒノキとクロマツの組織培養条件の検索 . 森林総合研究所研究報告 No. 365:pp140-149
- 近藤禎二・岡村政則（1995）クロマツの組織培養 . 林木育種センター研究報告 No. 13:pp103-115
- 林木育種推進関西地区協議会（2004）林木育種推進関西地区協議会資料
- 林野庁（1978）マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業実施要領 .
- 田端勝洋（1998）林業用樹木の虫害とその防除 . 林業技術ハンドブック .（林業技術ハンドブック . 全国林業改良普及協会発行，技秀堂，東京） . pp1008-1009
- 丹原哲夫・中島嘉彦（1996）マツノザイセンチュウ抵抗性マツ特性調査 . 岡山林試年報37 : 15 .
- 丹原哲夫・中島嘉彦・岡本安順（1998）マツノザイセン

チュウ抵抗性アカマツの特性．森林応用研究第7号:pp
91-96

丹原哲夫・中島嘉彦・岡本安順（1997）マツノザイセン
チュウ抵抗性マツ特性調査．岡山林試年報38：14．

鳥羽瀬正志（2003）ス - パ - 松で松林の再生を - マツノ
ザイセンチュウ抵抗性マツの育苗・生産 - ．林木の育
種208：3-5．

戸田忠雄（1997）マツノザイセンチュウ抵抗性マツの育
成，松くい虫（マツ材線虫病） - 沿革と最近の研究
- （全国森林病虫獣害防除協会編），pp168-274，協
文社，東京．

余吾初徳（1997）ケヤキ・アカマツ・クロマツ・ヒノキ
の組織培養による増殖の試み．愛媛県林業試験場研究
報告第18号:pp75-80