

## 新潟県産無花粉スギ種子からの不定胚形成細胞の誘導

Somatic embryogenic cell induction from seeds of pollen-free sugi (*Cryptomeria japonica*) produced at the Niigata prefecture

丸山 E. 毅<sup>\*1</sup>・細井佳久<sup>\*1</sup>・上野真義<sup>\*1</sup>・大西昇<sup>\*2</sup>・戸塚聡子<sup>\*3</sup>・岩井淳治<sup>\*3</sup>・森口喜成<sup>\*4</sup>  
 Tsuyoshi E. MARUYAMA<sup>\*1</sup>, Yoshihisa HOSOI<sup>\*1</sup>, Sancyoshi UENO<sup>\*1</sup>, Noboru ONISHI<sup>\*2</sup>,  
 Satoko TOTSUKA<sup>\*3</sup>, Junji IWAI<sup>\*3</sup>, Yoshinari MORIGUCHI<sup>\*4</sup>

\* 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 新潟県森林研究所

Niigata Prefectural Forest Research Institute, Unotoro 2249-5, Murakami, 958-0264 Japan

\* 4 新潟大学

Niigata University, Ikarashi 2-no-cho 8050, Nishi-ku, Niigata, 950-2181 Japan

**要旨:** スギ花粉症の対策として、花粉を飛散させない無花粉スギの活用が進められている。現在、無花粉スギの苗木の生産現場では、室内ミニチュア採種園で得られた種子から苗木を育成し、ジベレリン処理によって雄花の開花を誘導したうえで無花粉個体を選抜後、出荷する方法が主に採用されている。育種母材が少ないことや無花粉個体の選抜までに2年以上の時間と手間がかかるため、苗木の生産効率が問題となっている。そこで、不定胚形成技術による大量増殖法にDNAマーカーを用いた無花粉スギ個体の早期選抜技術を組み合わせた革新的な無花粉苗木の大量生産方法の確立を目指している。今回は、新潟県産無花粉個体を母樹とした交配より得られた種子からの不定胚形成細胞の誘導効率について検討を行った。不定胚形成細胞は、7月上旬から8月上旬にかけて採取した種子を、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) と6-ベンジルアミノプリン (BAP) を添加した1/2 EM培地上で誘導した。誘導効率に関しては、7月上旬に採取した種子を試料にした場合に最もよい結果が得られた。

**キーワード:** *Cryptomeria japonica*・花粉症・雄性不稔・未熟種子・EM培地・胚培養

**Abstract:** As a measure against sugi-pollen allergy, the use of pollen-free sugi has been promoted. Actually, for the production of pollen-free sugi, plants derived from seeds obtained in an indoor miniature seed orchard were selected as pollen-free individuals after confirmation of the absence of pollen in male strobili induced by gibberellin treatment. In this way, due to the shortage of breeding parent material and that more than 2 years of time and effort is needed to select pollen-free individuals, the production efficiency of the seedling becomes a problem. Therefore, we aim to establish a mass production method of pollen-free seedling by innovative combination of early selection by DNA marker and mass propagation method based on somatic embryogenesis technology. This time, we investigated the induction efficiency of somatic embryogenic cells from seeds produced at the Niigata prefecture. Somatic embryogenesis cells were induced in seeds collected from early July to early August on 1/2 EM medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Regarding induction efficiency, the best result was achieved when seeds were collected in early July.

**Keywords:** Japanese cedar, pollinosis, male sterility, immature seeds, EM medium, embryo culture

## I はじめに

スギ花粉症の対策として、花粉を飛散させない無花粉個体の活用が進められている。現在、無花粉スギ苗木の生

産現場では、室内ミニチュア採種園で得られた種子から苗木を育成し、ジベレリン処理によって雄花の開花を誘導したうえで無花粉個体を選抜後、出荷する方法が主に

採用されている。育種母材が少ないことや無花粉個体の選抜までに2年以上の時間と手間がかかるため、苗木の生産効率が問題となっている。そこで、不定胚形成技術による大量増殖法にDNAマーカーを用いた無花粉個体の早期選抜技術を組み合わせた革新的な無花粉苗木の大量生産方法の確立を目指している。今回は、新潟県産無花粉個体を母樹とした交配より得られた種子からの不定胚形成細胞の種子採取時期による誘導効率の差異について検討を行った。

## II 実験方法

**1. 種子の採取** 新潟県森林研究所にて、2016年3月に人工交配を行い作出した「新大不稔3号（無花粉個体を母樹として：図-1）×珠洲2号」家系の球果（図-2）を2016年7月上旬から8月上旬にかけて採取し、取り出した種子（図-3）を実験材料として用いた。各採取時期に300～516個の種子を使用した。

**2. 不定胚形成細胞の誘導** 種子表面の殺菌は、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分浸漬・攪拌し、滅菌水で洗浄して行った。殺菌処理後、種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体（megagametophyte）（図-4）を不定胚形成細胞誘導用の培地に置床した。容器として、直径90mmの4分割シャーレを用い、培地には無機塩を1/2濃度に下げたEM培地（3）に、シヨ糖10g/l、グルタミン1g/l、カゼイン0.5g/l、ゲルライト3g/l、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）10μM、6-ベンジルアミノプリン（BAP）5μMを添加した固形培地を用いた（表-1）。培養は暗黒下、25℃で行った。

**3. 不定胚形成細胞の継代培養** 誘導後の不定胚形成細胞は、誘導時の同一の1/2EM培地にシヨ糖30g/l、グルタミン1.5g/l、ゲルライト3g/l、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸3μM、6-ベンジルアミノプリン1μMを添加し（表-2）、暗黒下、25℃の培養環境で維持し、増殖させた。

## III 結果と考察

**1. 種子の採取時期の不定胚形成細胞誘導効率への影響** 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2週間後に、組織全体の膨張あるいはカルス形成の開始が観察されたが、多くの外植体における不定胚形成細胞の誘導は、3～4週間後に明らかとなった（図-5）。7月上旬から8月上旬にかけて採取した種子からの不定胚形成細胞を誘導できたが、誘導効率に関しては7月上旬に採取したものが最もよい結果を示し、36%の頻度で不定胚形成細胞の増殖が認めら

れた（表-3）。7月中旬に採取した種子の場合は、14%の誘導率が得られ、7月上旬の結果に対して半分以下の誘導率となった。また、8月上旬に採取した種子を試料にした場合は、約9%程度の誘導率が得られ、7月上旬の結果と比較して4分の1の誘導率となり、最も低い数値を示した。表-3に示すように、種子採取時期差の不定胚形成細胞誘導効率への影響については、スギや他の針葉樹においても報告されている（1, 2, 3, 4）。しかしながら、新潟県産無花粉スギを母樹とした交配より得られた種子においては、はじめての実験報告でもあり、採取時期や家系間差の影響については、複数の家系で確かめる必要がある。

**2. 不定胚形成細胞の維持・増殖** 得られた不定胚形成細胞は誘導時と同じ培養条件で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-6）。

## IV おわりに

今回は、新潟県産無花粉スギを母樹とした交配より得られた種子を用いて不定胚形成細胞の誘導に必要な条件を調べた。今後、得られた培養細胞系統を維持・増殖し、無花粉スギの植物体再生やDNAマーカー解析による個体選抜条件を検討する。

## 謝辞

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援によって実施した。関係各位の多大なご協力に感謝いたします。

## 引用文献

- (1) FIND, J.I., HARGREAVES, C.L., REEVES, C.B. (2014) Progress towards initiation of somatic embryogenesis from differentiated tissues of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) using cotyledonary embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **50**: 190-198.
- (2) FINER, J.J., KRIEBEL, H.B., BECWAR, M.R. (1989) Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* **8**: 203-206.
- (3) MARUYAMA, E., TANAKA, T., HOSOI, Y., ISHII, K., MOROHOSHI, N. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Plant Biotechnology* **17**: 281-296.
- (4) MIGUEL, C., GONCALVES, S., TERESO, S., MARUM, L., MAROCO, J., OLIVEIRA, M. (2004). Somatic

embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell, Tissue and Organ*

Culture **76**: 121-130.



図-1. 交配に用いた無花粉スギ「新大不稔3号」の台木 (新潟県森林研究所内)

Fig. 1 Pollen-free sugi rootstock used in the crossing (Niigata Prefecture Forest Research Institute)



図-3. 採取した球果から取り出した種子 (バー: 1 cm)

Fig. 3 Removed seeds from the collected cones (bar: 1 cm)

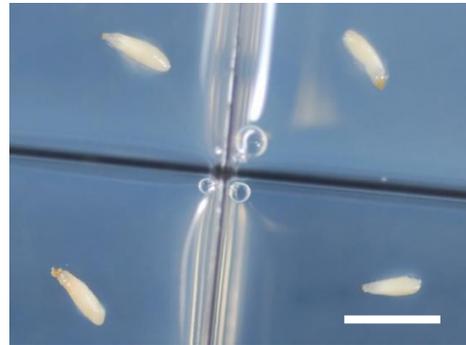


図-4. 種子胚を含む雌性配偶体 (バー: 1 cm)

Fig. 4 Megagametophyte containing zygotic embryo (bar: 1 cm)

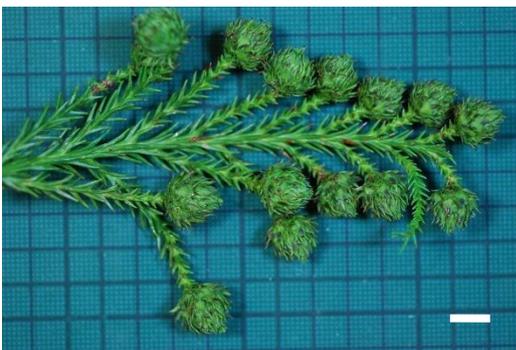


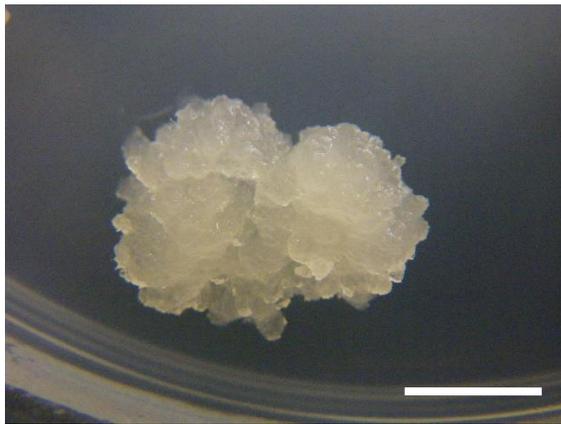
図-2. 人工交配によって得られた無花粉スギ家系の球果 (バー: 1 cm)

Fig. 2 Cones of pollen-free sugi obtained by artificial crossing (bar: 1 cm)



図-5. 不定胚形成細胞の誘導 (バー: 1 cm)

Fig. 5 Induction of embryogenic cells (bar: 1 cm)



図－ 6. 不定胚形成細胞の維持・増殖 (バー: 1 cm)

Fig. 6 Proliferation of embryogenic cells (bar: 1 cm)

表－ 1. 不定胚形成細胞の誘導用培地組成

Table 1 Composition of induction medium

Compound	Amounts	
KNO <sub>3</sub>	500	[mg/l]
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	37.5	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	30	
NaNO <sub>3</sub>	30	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	80	
KCl	40	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	12.5	
KI	0.5	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.2	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	
NaEDTA	20	
Thiamine HCl	2.5	
Pyridoxine HCl	0.25	
Nicotinic acid	2.5	
Glycine	2.5	
myo-Inositol	500	
Casein Acid Hydrolysate	500	
L-glutamine	1000	
Sucrose	10000	
Gelrite	3000	
2,4-D	10	[μM]
BAP	5	
pH5.6-5.8		

表－ 2. 不定胚形成細胞の増殖用培地組成

Table 2 Composition of proliferation medium

Compound	Amounts	
KNO <sub>3</sub>	500	[mg/l]
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	37.5	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	30	
NaNO <sub>3</sub>	30	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	80	
KCl	40	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	10	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	20	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	12.5	
KI	0.5	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.2	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	
NaEDTA	20	
Thiamine HCl	2.5	
Pyridoxine HCl	0.25	
Nicotinic acid	2.5	
Glycine	2.5	
myo-Inositol	500	
Casein Acid Hydrolysate	0	
L-glutamine	1500	
Sucrose	30000	
Gelrite	3000	
2,4-D	3	[μM]
BAP	1	
pH5.6-5.8		

\* 表－ 1 と組成の違う部分を太字にした

表－ 3. 種子採取時期が与える不定胚形成細胞誘導効率への影響

Table 3 Effect of seed collection time on the embryogenic cell induction frequency

	採取時期		
	7月上旬	7月中旬	8月上旬
	(7/4)	(7/19)	(8/1)
	36.0%	14.0%	8.7%
	(108/300)	(59/420)	(45/516)

\* (不定胚形成細胞を誘導した外植体数/全外植体数)