

無花粉スギ未熟種子からの不定胚形成細胞の誘導

丸山 E. 毅・細井佳久・二村典宏 (森林総研)・斎藤真己 (富山県森林研)

要旨：スギ花粉症の対策として、無花粉スギの活用が進められている。無花粉スギ苗生産は、室内ミニチュア採種園で得られた種子から苗を育成し、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。この方法では、無花粉個体の選抜に膨大な労力と時間がかかるため、その分の育苗コストもかさむ。そこで、不定胚形成技術による大量増殖法に DNA マーカーによる早期選抜を組み合わせた革新的な無花粉苗の大量生産方法の確立を目指す。今回は、未熟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月上旬から下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と 6-ベンジルアミノプリンを添加した 1/2 EM 培地上で誘導した。誘導効率に関しては、7月中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。また、表面殺菌法や低温処理が与える不定胚形成細胞誘導効率への影響も調べた。得られた培養細胞系統を維持・増殖させ、植物体再生用の培養物と DNA マーカー解析用の実験材料の準備を進めている。

キーワード：無花粉スギ、不定胚形成、*Cryptomeria japonica*、未熟種子、不定胚形成細胞誘導効率

Abstract: As a measure against sugi-pollen allergy, the use of pollen-free sugi has been promoted. 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, the time and enormous effort required to select pollen-free individuals increases the cost of seedling production. 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 immature seeds. Somatic embryogenesis cells were induced in seeds collected from early to late July on 1/2 EM medium supplemented with 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Regarding induction efficiency, the best result was achieved when seeds were collected in mid-July. In addition, we examined the effect of different sterilization methods of explants and the effect of low-temperature treatment in the somatic embryogenic cell induction efficiency. Captured embryogenic cell lines were transferred to maintenance and proliferation medium in order to obtain experimental material for plant regeneration and DNA marker analysis.

Keywords: pollen-free sugi, somatic embryogenesis, *Cryptomeria japonica*, immature seeds, somatic embryogenic cell induction efficiency

I はじめに

スギ花粉症患者は国民の 20%を超え、大きな社会問題となっている。対策として、無花粉スギの育成が緊急かつ最重要課題とされ、花粉を飛散しないスギの活用が進められている。無花粉スギ苗生産は、室内ミニチュア採種園で得られた種子から苗を育成し、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の選抜後、出荷する方法が主に採用されている。現在、富山県や神奈川県等では、年間で 3～5 万本程度の無花粉スギ苗木を生産し、さらに増産する体制づくりを進めている。

しかし、この方法では、無花粉個体の選抜に膨大な労力と時間がかかるため、その分の育苗コストもかさむ。そこで、不定胚形成技術による大量増殖法に DNA マーカーによる早期選抜を組み合わせた革新的な無花粉スギ苗の大量生産法の確立を目指す。今回は、未熟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。

II 実験方法

1. 種子の採取 富山県農林水産総合技術センター森林研究所に生育する TO-S 家系「F1 (富山不稔 1号×小

Tsuyoshi E. MARUYAMA, Yoshihisa HOSOI, Norihiro FUTAMURA (For. and Forest Prod. Res. Inst., Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687, Japan), and Maki SAITO (Toyama Pre. For. Res. Inst., Toyama, 930-1362) Initiation of embryogenic cultures from immature seeds of pollen-free sugi (*Cryptomeria japonica*)

原2号)×珠洲2号」で人工交配を行い(図-1), 2013年7月上旬から7月下旬にかけて採取した球果から取り出した種子を実験材料として用いた。

2. 不定胚形成細胞の誘導 種子表面の殺菌は, 次の方法で行った。A: 70%エタノールに10分浸漬・攪拌し, 滅菌水で洗浄した。B: 99.5%エタノールに3分浸漬・攪拌し, 次に1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に30分浸漬・攪拌し, 滅菌水で洗浄して行った。C: 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分浸漬・攪拌し, 滅菌水で洗浄した。殺菌処理後, 種皮を剥ぎ取り, 種子胚を含む雌性配偶体(図-2)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(1)に, ショ糖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°Cで行った。

3. 低温処理の不定胚形成細胞誘導効率への影響 低温処理実験は7月上旬に採取した種子のみを使った。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, 滅菌水で洗浄した。3日間の4°C処理後, 種皮を剥ぎ取り, 不定胚形成細胞誘導用の培地に置床した。

4. 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培地にショ糖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°C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-3)。用いた種子のうち, 7月中旬に採取したものが最もよい結果を示し, 約20%の頻度で不定胚形成細胞の増殖が認められた(表-3)。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-4, 図-5)。

2. 表面殺菌法の不定胚形成細胞誘導効率への影響 表面殺菌法については, いずれも殺菌効果の違いはみられなかったが, 不定胚形成細胞の誘導効率に大きな差が

認められた。C処理で表面殺菌した場合は, 21.6%の誘導効率を得られ, 最も高い数値を示した。一方, A処理した場合, 誘導効率は2.9%となり, 最も低い結果となった。また, A処理を受けたほとんどの外植体について組織全体の膨張が見られず, 殺菌法による組織や細胞へのダメージが考えられる(表-4)。

3. 種子低温処理の不定胚形成細胞誘導効率への影響 表-5に示すように, 不定胚形成細胞の誘導効率は, 低温処理が施された種子の場合は27.2%となり, 処理なしのものに対して約2倍の数値が得られた。しかしながら, スギにおいては, はじめての実験報告でもあり, 低温処理の有効性については, 複数の系統で確かめる必要がある。低温処理が不定胚形成誘導に有効であることは, 他の針葉樹においても報告されている(2)。

IV おわりに

今回は, 無花粉スギ未熟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。

引用文献

- (1) MARUYAMA E., TANAKA T., HOSOI Y., ISHII K. (2000) Embryogenic cell culture, protoplast regeneration, cryopreservation, biolistic gene transfer and plant regeneration in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Plant Biotechnology*: 17, pp. 281-296
- (2) MALABADI RB., van STADEN J. (2006) Cold-enhanced somatic embryogenesis in *Pinus patula* is mediated by calcium. *South African Journal of Botany*: 72, pp. 613-618



図-1. 人工交配によって得られた無花粉スギ家系の球果

Fig. 1 Cones of pollen-free sugi obtained by artificial crossing

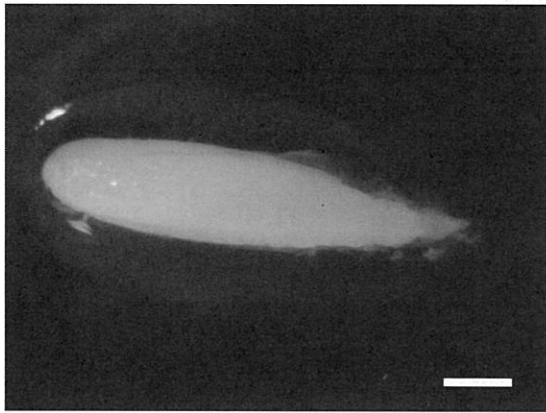


図-2. 種子胚を含む雌性配偶体 (バー: 1 mm)

Fig. 2 Megagametophyte containing zygotic embryo (bar: 1 mm)

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 ₃	500	[mg/l]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	37.5	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	30	
NaNO ₃	30	
KH ₂ PO ₄	35	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	80	
KCl	40	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	
H ₃ BO ₃	20	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	12.5	
KI	0.5	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.2	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	
FeSO ₄ · 7H ₂ 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		



図-3. 不定胚形成細胞の誘導 (バー: 1 cm)

Fig. 3 Induction of embryogenic cells (bar: 1 cm)

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 ₃	500	[mg/l]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	37.5	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	30	
NaNO ₃	30	
KH ₂ PO ₄	35	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	80	
KCl	40	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	
H ₃ BO ₃	20	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	12.5	
KI	0.5	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.2	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.1	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.1	
FeSO ₄ · 7H ₂ 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

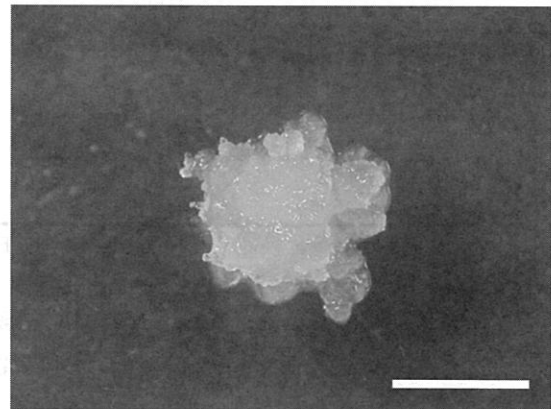


図-4. 不定胚形成細胞の維持・増殖 (バー: 1 cm)

Fig. 4 Proliferation of embryogenic cells (bar: 1 cm)

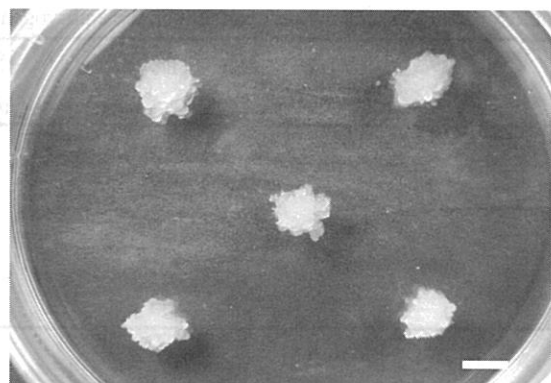


図-5. 不定胚形成細胞の維持・増殖 (バー: 1 cm)

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

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	全外植体数	不定胚形成細胞を誘導した外植体数	誘導効率 (%)
7月上旬 (7/3)	1,461	167	11.4
7月中旬 (7/16)	1,228	244	19.9
7月下旬 (7/29)	804	62	7.7

*種子表面殺菌法：1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間

表－4. 表面殺菌法が与える不定胚形成細胞誘導効率への影響

Table 4 Effect of surface sterilization methods on the embryogenic cell induction frequency

表面殺菌法*	全外植体数	不定胚形成細胞を誘導した外植体数	誘導効率 (%)
A	104	3	2.9
B	482	41	8.5
C	624	135	21.6

* 7月中旬 (7/16) に採取した種子を用い、以下の方法で表面殺菌を行った

A: 70% エタノールに 10 分間

B: 99.5% エタノールに 3 分間、次に 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 30 分間

C: 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 分間

表－5. 種子低温処理が与える不定胚形成細胞誘導効率への影響

Table 5 Effect of seed cooling treatment on the embryogenic cell induction frequency

低温処理*	全外植体数	不定胚形成細胞を誘導した外植体数	誘導効率 (%)
なし	396	55	13.9
あり	276	75	27.2

*低温処理：4℃に 3 日間