

新潟県産スギ由来の不定胚形成細胞からの無花粉個体の再生

丸山 E. 毅¹・細井佳久¹・宮澤真一¹・上野真義¹・大西昇²・戸塚聡子³・岩井淳治³・森口喜成⁴

- 1 森林総合研究所
- 2 キリン株式会社
- 3 新潟県森林研究所
- 4 新潟大学

要旨：深刻な社会問題となっているスギ花粉症対策の一環として、花粉を飛散させない無花粉スギの活用が期待されている。我々は、不定胚形成技術による大量増殖法と、遺伝マーカーによる早期選抜技術を組み合わせた無花粉苗の大量生産方法の確立を目指している。昨年は、新潟県の無花粉スギを母樹とする種子から不定胚形成細胞を誘導し、誘導効率について報告を行った。今回は、雄性不稔遺伝子を持つスギ不定胚形成細胞からの無花粉個体の再生について検討を行った結果、無花粉個体を再生するための培養条件を明らかにした。

キーワード：*Cryptomeria japonica*, 花粉症, 雄性不稔, 不定胚形成, 無花粉スギ

Pollen-free plant regeneration from embryogenic cells derived from sugi (*Cryptomeria japonica*) of Niigata prefecture

Tsuyoshi E. MARUYAMA¹, Yoshihisa HOSOI¹, Shinichi MIYAZAWA¹, Saneyoshi UENO¹,
Noboru ONISHI², Satoko TOTSUKA³, Junji IWAI³, Yoshinari MORIGUCHI⁴

- 1 Forestry and Forest Products Research Institute
- 2 Kirin Company Limited
- 3 Niigata Prefecture Forestry Research Institute
- 4 Niigata University

Abstract: As part of countermeasures against sugi pollinosis, which has become a serious social problem, the utilization of pollen-free plants is expected. We are aiming to establish a mass production method for pollen-free seedlings combining mass propagation method by somatic embryogenesis technology and early selection technique by genetic markers. Last year, somatic embryogenic cells were induced from seeds of pollen-free mother trees in Niigata prefecture, and the induction efficiency was reported. In this study, regeneration of pollen-free sugi plantlets from somatic embryogenic cells with male-sterile gene is reported.

Key-word: *Cryptomeria japonica*, pollinosis, male sterility, somatic embryogenesis, pollen-free sugi

I はじめに

日本におけるスギ花粉症患者は 2500 万人を超え、その治療などにかかる費用は毎年 5000 億円を下らないものと考えられ (10), 大きな社会問題となっている。その対策の一環として、無花粉スギの普及・拡大が急務となっている。現在、無花粉スギの実生苗は、雄花の着花を誘導したうえで無花粉個体を選抜し、供給されている。この方法では、かなりの時間と手間がかかる上に、分離の法則により無花粉にならない約半数の苗を除去しなければならないため、生産効率が極めて悪く、その分の育

苗コストもかさんでいる。これらの問題を解決するために、我々は遺伝マーカーによる無花粉個体の未分化細胞の段階で早期選抜と、不定胚形成技術による大量増殖を組み合わせることによって、判別に必要な時間を短縮し、無花粉スギ苗の効率的な増殖技術の確立を目指している。昨年は、新潟県の無花粉スギを母樹とする種子から不定胚形成細胞を誘導し、誘導効率について報告を行った。今回は、雄性不稔遺伝子を持つスギ不定胚形成細胞からの無花粉個体の再生について検討を行った。

II 材料と方法

不定胚形成細胞の誘導と増殖 不定胚形成細胞の誘導と増殖については丸山ら (8) が報告した方法に従って行った。不定胚の誘導には、固形培地で2～3週間ごとに継代培養して増殖させた不定胚形成細胞を用いた。

不定胚の誘導と成熟化 種子胚から誘導した不定胚形成細胞を増殖させた後、成熟用培地に移植した。培養には、EM基本培地(9)に3%マルトース、17.5%ポリエチレングリコール、0.2%活性炭、100 μ Mアブシジン酸、2g/lグルタミン、1g/lアスパラギン、0.5g/lアルギニン、0.079g/lシトルリン、0.076g/lオルニチン、0.055g/lリシン、0.040g/lアラニン、0.035g/lプロリン、0.3%ゲランガムを添加した培地を用いた。培養は暗黒下、25 $^{\circ}$ Cで行った。

不定胚の発芽と個体再生 培地上で成熟した不定胚は、植物成長調節物質を含まないEM培地に移し、16時間蛍光灯照明(約4,000lx)、25 $^{\circ}$ Cの環境下で培養した。次に、発芽した不定胚を、培養フラスコに移植し、同一組成の培地で培養して幼植物体に成長させた。

III 結果と考察

不定胚形成細胞の誘導と増殖 無花粉スギ(母)と雄性不稔遺伝子をヘテロ接合体で保有する個体(父)を交配した4家系の種子から不定胚形成細胞を誘導した(図-1)。得られた不定胚形成細胞は、誘導時と同一の培養条件下で2～3週間ごとに継代培養することで細胞の維持・増殖が可能であった(図-2)。

不定胚の誘導と成熟化 4家系から誘導した不定胚形成細胞系統を用いて、不定胚の誘導実験を行った。不定胚形成細胞を成熟用培地に移植すると、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)。そのうち、各家系からの最もよい結果を示した3細胞系統ずつを選抜した。成熟不定胚の平均形成数について、「新大不稔3号×珠洲2号」の家系は直径90mmのシャーレ当たり900個以上の不定胚が形成され、最も高い形成率を示した。一方、「福島不稔1号×大井7号」の家系は最も低い値を示した。全ての家系において不定胚を誘導できることは確認できたが、図-4に示したように、家系による成熟不定胚の平均形成数が異なった。このような結果は、通常の可稔スギ系統(2, 9)、ヒノキ(7)、ヤツガタケトウヒ(6)、クロマツ(4)、ヤクタネゴヨウ(5)や他の海外マツ(1, 3)でも報告されている。

不定胚の発芽と個体再生 成熟させた不定胚を、植物成長調節物質を含まない培地に移すと、約1-2週間後に発芽し始め(図-5)、4週間後には9割以上が発芽した。

その後、ほとんどの発芽不定胚は幼植物体を形成した。得られた幼植物体を発芽用と同一組成の培地に移植し、さらに培養すると、図-6に示すように健全に成長した。

IV おわりに

不定胚誘導に関しては、家系間差や系統間差がみられたが、全ての家系において不定胚を誘導し、植物体を形成させることができた。今回の結果により、雄性不稔遺伝子を持つスギ不定胚形成細胞から無花粉個体を再生するための培養条件を明らかにすることができた(図-7)。今後、再生した植物体の初期成長をモニタリングする予定である。

引用文献

- (1) Garin E, Isabel N, Plourde A (1998) Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Rep* **18**: 37-43
- (2) Igasaki T, Sato T, Akashi N, Mohri T, Maruyama E, Kinoshita I, Walter C, Shinohara K (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Plant Cell Rep* **22**: 239-243
- (3) Klimaszevska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter MA (2007) Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree For Sci Biotech* **1**: 11-25
- (4) Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2007) Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *J. For. Res.* **10**: 403-407
- (5) Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **43**: 28-34
- (6) 丸山 E. 毅・細井佳久・勝木俊雄 (2011) 不定胚形成によるヤツガタケトウヒの個体再生. *関東森林研究* **62**: 127-130
- (7) Maruyama E, Ishii K, Hosoi Y (2005) Efficient plant regeneration of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) via somatic embryogenesis. *J. For. Res.* **10**: 73-77
- (8) 丸山 E. 毅・宮澤真一・上野真義・大西昇・戸塚聡子・岩井淳治・森口喜成 (2018) 新潟県産無花粉スギ種子からの不定胚形成細胞誘導の家系間差. *関東森林研究* **69**: 1-2
- (9) 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**: 281-296

(10) 椎名大介 (2011) 都市周辺のスギ人工林とスギ花粉症に関する経済分析. 政策研究大学院大学まちづくりプログラム MJU10053: 1-4

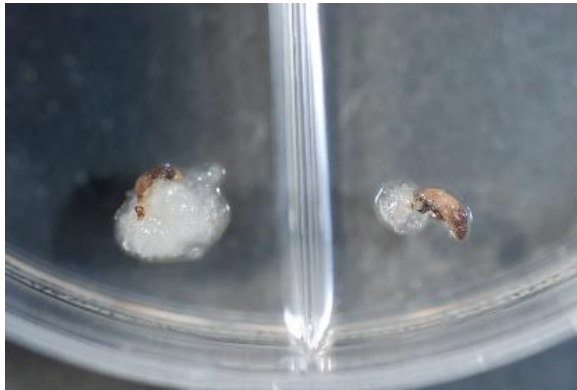


図 - 1. 不定胚形成細胞の誘導
Fig. 1 Embryogenic cell induction

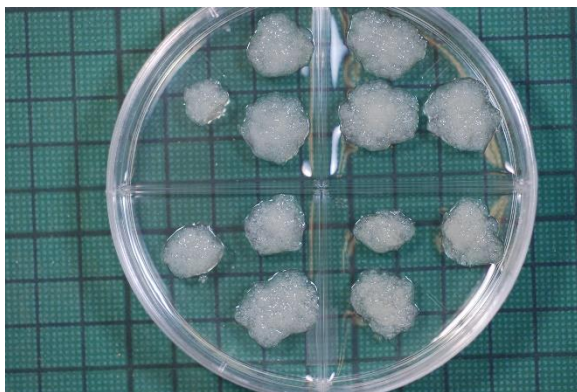
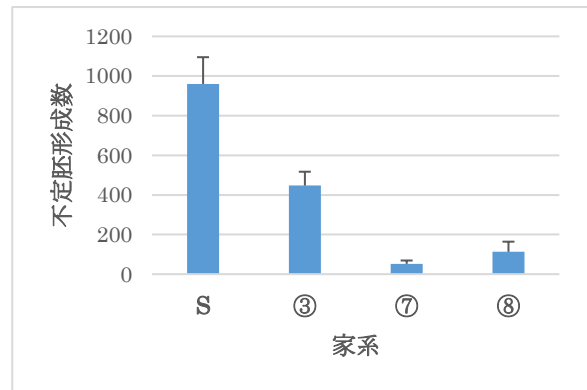


図 - 2. 不定胚形成細胞の増殖
Fig. 2 Embryogenic cell proliferation



図 - 3. 成熟不定胚の形成
Fig. 3 Mature somatic embryo formation



S : 新大不稔3号×珠洲2号, ③ : 福島不稔1号×S3-37(1),
⑦ : 福島不稔1号×大井7号, ⑧ : 福島不稔1号×S3-118(2)

※S3-37(1) : 新大不稔3×カミキリ2, S3-118(2) : 新大不稔3×柏崎市3
図 - 4. 無花粉スギ4家系細胞系統からの不定胚形成
Fig. 4 Somatic embryogenesis from 4 families of pollen-free sugi



図 - 5. 不定胚の発芽
Fig. 5 Somatic embryo germination



図 - 6. 不定胚から植物体の再生

Fig. 6 Plant regeneration from somatic embryos

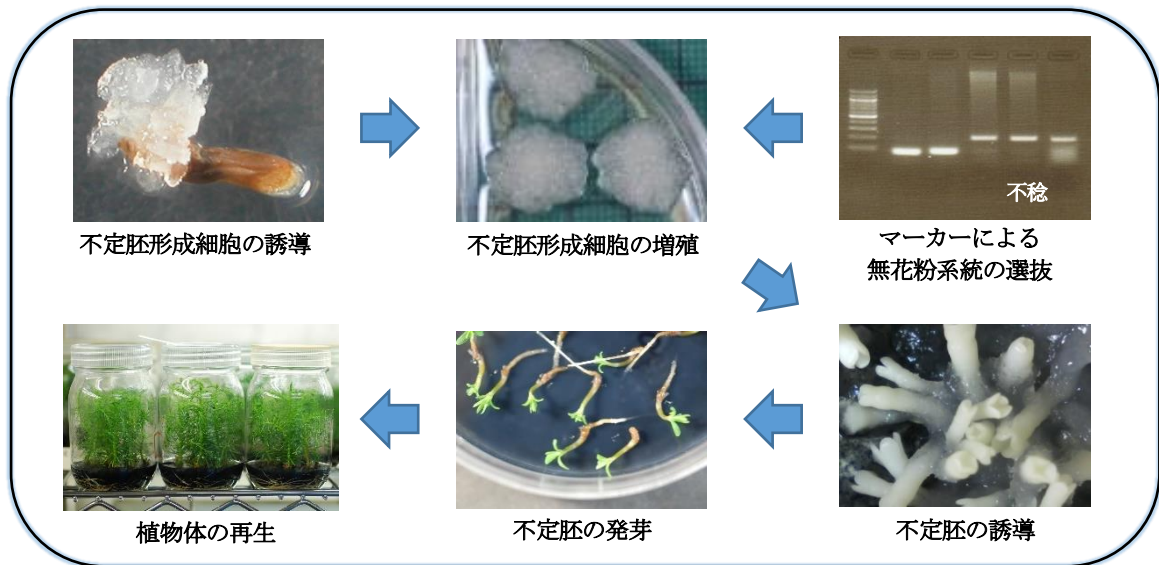


図 - 7. 不定胚形成細胞からの無花粉スギ植物体再生のプロセス

Fig. 7 Regeneration process of pollen-free sugi plantlets derived from embryogenic cells

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および農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援によって実施した。