

ポリクロス由来のスギ未熟種子からの不定胚形成細胞誘導

丸山 E. 毅¹・金枝拓実²・上野真義¹・平山聡子³・伊藤由紀子⁴・番場由紀子⁴・森口喜成²

1 森林総合研究所

2 新潟大学

3 新潟県新潟地域振興局

4 新潟県森林研究所

要旨：不定胚形成は、組織培養による植物体の大量増殖技術の一つである。我々の研究グループでは、不定胚形成技術によるスギ苗木の大量生産法の確立を目指している。遺伝的に多様な苗木を組織培養で省力的に作出する方法の一つとして、ポリクロス（複数親の混合花粉を使用する人工交配）由来の未熟種子の利用が考えられる。ポリクロスに由来する成熟種子の花粉親寄与率は期待値から有意に歪むことが報告されているが、ポリクロスに由来する未熟種子を用いた不定胚形成の各工程における花粉親寄与率を研究した事例はない。そこで我々は、遺伝マーカーを用いてポリクロスで生産された未熟種子から増殖させた不定胚形成細胞の花粉親を調べ、ポリクロス由来の未熟種子利用の有効性を検証する。今回は、3親の混合花粉（3Mix）と10親の混合花粉（10Mix）を用いて人工交配を行い、それぞれのポリクロス由来の未熟種子から得られた不定胚形成細胞の誘導率について報告する。

キーワード： *Cryptomeria japonica*, ポリクロス, 混合花粉, 未熟種子, 不定胚形成

Embryonic cell induction from immature seeds derived from polycross of sugi (*Cryptomeria japonica*)

Tsuyoshi E. MARUYAMA¹, Takumi KANEEDA², Saneyoshi UENO¹,
Satoko HIRAYAMA³, Yukiko ITOH⁴, Yukiko BANBA⁴, Yoshinari MORIGUCHI²

1 Forestry and Forest Products Research Institute

2 Niigata University

3 Niigata Prefecture Regional Promotion Bureau

4 Niigata Prefecture Forestry Research Institute

Abstract: Somatic embryogenesis is one of the techniques for mass propagation of plants by tissue culture. Our research group aims to establish a mass propagation method for sugi seedlings using somatic embryogenesis technology. As one of the methods for labor-saving production of genetically diverse seedlings, it is conceivable to use immature seeds derived from polycross (artificial mating using mixed pollen of multiple parents). Although the pollen parent contribution rate of mature seeds derived from polycross has been reported to be significantly distorted from the expected value, there is no case study of pollen parent contribution rate in each process of somatic embryogenesis using immature seeds derived from polycross. Therefore, we investigate pollen parents of somatic embryonic cells grown from immature seeds produced by polycross using genetic markers and verify the effectiveness of using immature seeds derived from polycross. This time, we report the induction rate of somatic embryonic cells obtained from immature seeds derived from each polycross by artificial mating using 3 parents mixed pollen (3Mix) and 10 parents mixed pollen (10Mix).

Key-word: *Cryptomeria japonica*, polycross, mixed pollen, immature seeds, somatic embryogenesis

I はじめに

不定胚形成は、組織培養による植物体の大量増殖技術の一つである。我々の研究グループでは、不定胚形成技

術による遺伝的に多様なスギ苗木の大量生産法の確立を目指している。遺伝的に多様な苗木を組織培養で省力的に作出する方法の一つとして、ポリクロス（複数親の混

合花粉を使用する人工交配)由来の未熟種子の利用が考えられる。ポリクロスに由来する成熟種子の花粉親寄率は期待値から有意に歪むことが報告されている(5)が、ポリクロスに由来する未熟種子を用いた不定胚形成の各工程における花粉親寄率を研究した事例はない。そこで我々は、遺伝マーカーを用いてポリクロスで生産された未熟種子から増殖させた不定胚形成細胞の花粉親を調べ、ポリクロス由来の未熟種子利用の有効性を検証する。今回は、3親の混合花粉(3Mix)と10親の混合花粉(10Mix)を用いて人工交配を行い、それぞれのポリクロス由来の未熟種子からの不定胚形成細胞の誘導を行い、得られた誘導率の結果について報告する。

II 材料と方法

1. **人工交配** 2019年3月に2種類の混合花粉(3親の花粉を等量混合した3Mix, 10親の花粉を等量混合した10Mix)を用いた人工交配を行った。母樹と人工交配に用いた花粉親を表-1に示した。

2. **球果・種子の採取** 人工交配で得られたポリクロス由来の球果を2019年7月上旬から下旬にかけて(第1週、第3週と第5週に)採取し、取り出した種子を実験材料として用いた。

3. **種子の表面殺菌** 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3回洗浄して行った。

4. **不定胚形成細胞の誘導** 表面殺菌処理後、種皮を剥ぎ取り、種子胚を含む雌性配偶体(megagametophyte)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-2)。培養は暗黒下、25°Cで行った。

5. **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-3), 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. **親の混合花粉由来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、実体顕微鏡を用いて培養物の観察を行った。培養開始の約2週間後に、カル

スの形成開始が観察されたが、反応した多くの外植体における不定胚形成細胞の誘導は、4週間後に明らかとなった(図-1)。ポリクロスの由来の間に差が見られたが、3Mixと10Mix由来の種子からいずれも効率的に不定胚形成細胞を誘導させることができた(図-2)。

2. **種子の採取時期の不定胚形成細胞誘導効率への影響** 7月の第1週目から第5週目にかけて採取した種子から不定胚形成細胞を誘導できた。誘導効率に関しては第3週目に採取したものが最も良い結果を示し、62.1~71.2%の範囲で不定胚形成細胞の誘導が認められた(図-3)。7月の第1週目に採取した種子の場合は、38.9~41.8%の誘導率が得られ、7月の第3週目の結果に対して約4割減の誘導率となった。また、第5週目に採取した種子を試料にした場合は、44.6~56.0%の誘導率が得られ、7月上旬から下旬までの中間的誘導率の結果となった(図-3)。種子採取時間差の不定胚形成細胞誘導効率への影響については、すぎだけではなく、他の針葉樹においても報告されている(1, 2, 3, 4)。

3. **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-4)。

4. **不定胚形成細胞系統の初期と継代可能誘導率** 初代培養で得られた不定胚形成細胞系統を2~3週間ごとに継代培養し、安定的に維持増殖できる細胞系統を選抜した。その結果、初期誘導と継代可能誘導の割合が88.0%であった(表-4)。

IV おわりに

今回は、3親の混合花粉(3Mix)と10親の混合花粉(10Mix)を用いたポリクロス由来の未熟種子から、不定胚形成細胞の誘導が可能であることを確認できた。今後、得られた培養細胞系統を維持増殖し、成熟不定胚の誘導率、発芽率や個体再生率を評価し、ポリクロス由来の未熟種子利用の有効性を検証する。

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 radiate 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.

(5) MORIGUCHI, Y., ISHIDUKA, D., KANEKO, T., ITOO, S., TAIRA, H., TSUMURA, Y. (2009). The contribution of pollen germination rates to uneven paternity among polycrosses of *Cryptomeria japonica*. *Silva Genetica* **58**, **3**: 139-144.

表 - 1. ポリクロスに用いた母樹と花粉親

Table 1 Mother tree and pollen parents used for polycross

母樹	3Mix	10Mix	
	花粉親	花粉親	花粉親
新大 11 号	東蒲原 5 号	東蒲原 5 号	両津市 1 号
	岩船 9 号	岩船 9 号	岩船 2 号
	中頸城 2 号	中頸城 2 号	岩船 8 号
		中頸城 4 号	岩船 16 号
		南蒲原 3 号	岩船 17 号

表 - 2. 不定胚形成細胞の誘導用培地組成

Table 2 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		

表 - 3. 不定胚形成細胞の維持増殖用培地組成

Table 3 Composition of maintenance-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 - 2 と組成の違う部分を太字にした



図 - 1. 不定胚形成細胞の誘導 (バー : 1cm)

Fig. 1 Induction of embryogenic cells (Bar: 1cm)

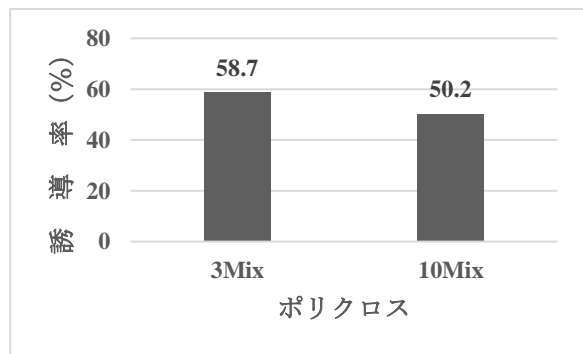


図 - 2. ポリクロス別の不定胚形成細胞の誘導率

Fig. 2 Embryogenic cell induction rate from polycross

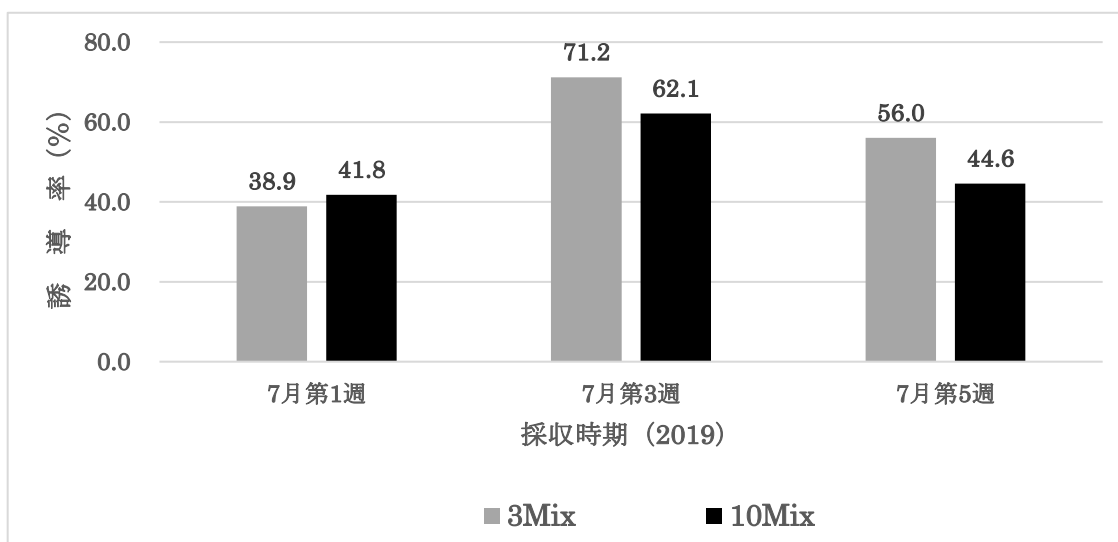


図- 3. ポリクロス由来の種子採取時期が不定胚形成細胞の誘導率に及ぼす影響

Fig. 3 Effects of polycross-derived seed collection time on the induction rate of somatic embryogenic cells

表 - 4. ポリクロス由来の不定胚形成細胞系統の初期と継代可能誘導率

Table 4 Initial and stable induction rates of polycross-derived embryogenic cell lines

ポリクロス	外植体 置床数 (A)	細胞系統 誘導数 (B)	初期誘導率 (%) (B / A)	継代可能 系統数 (C)	継代可能誘導率 (%) (C / A)	初期誘導と 継代可能誘導 の割合 (%)
3Mix	2,064	1,211	58.7	1,073	52.0	88.6
10Mix	2,013	1,011	50.2	882	43.8	87.2
合計	4,077	2,222	54.5	1,955	48.0	88.0

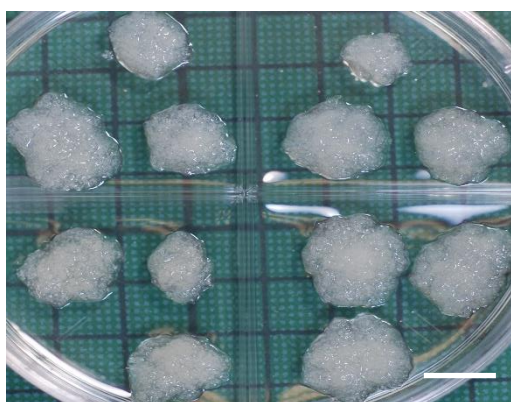


図- 4. 不定胚形成細胞の維持増殖 (バー: 1cm)

Fig. 4 Maintenance-proliferation of embryogenic cells (Bar: 1cm)

謝辞: 本研究は、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。