

## ポリクロス由来のスギ未熟種子のインビトロ発芽の試み

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

1 新潟大学

2 森林総合研究所

3 新潟県新潟市地域振興局

4 新潟県森林研究所

**要旨：** 遺伝的に多様な実生苗を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、成熟する前の種子発達過程（未熟段階）で調べた事例はない。しかし、未熟種子から種子胚を取り出し、DNA 抽出を行うのは困難である。そこで、本研究ではインビトロでのスギ未熟種子の発芽を試みた。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実施し、2019年7月下旬に球果を採取した。球果から未熟種子を取り出し、滅菌後に種子胚を含む雌性配偶体を3種類の培地に置床した。その結果、スギ未熟種子はインビトロ条件で発芽することが確認できた。

**キーワード：** *Cryptomeria japonica*, ポリクロス, 未熟種子, インビトロ, 発芽

***In vitro* germination of immature seeds derived from polycross of sugi (*Cryptomeria japonica*)**Takumi KANEEDA<sup>1</sup>, Tsuyoshi E. MARUYAMA<sup>2</sup>, Saneyoshi UENO<sup>2</sup>, Satoko HIRAYAMA<sup>3</sup>, Yukiko ITOH<sup>4</sup>, Yukiko BANBA<sup>4</sup>, Yoshinari MORIGUCHI<sup>1</sup>

1 Niigata University,

2 Forestry and Forest Products Research Institute

3 Niigata Prefecture Niigata Regional Promotion Bureau

4 Niigata Prefecture Forestry Research Institute

**Abstract:** As one of the methods for labor-saving production of genetically diverse seedlings, it is conceivable to use immature seeds derived from polycross (artificial crossing 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 examined in the seed developmental stage (immature stage). However, it is difficult to extract seed embryos from immature seeds and extract DNA. In this study, we considered germination method of immature seeds of the Japanese cedar *in vitro*. In March 2019, artificial crossing was conducted using two type of pollen mixture (3Mix with equal amounts of 3 parental pollen and 10Mix with equal amounts of 10 parental pollen), and cones were collected in late July 2019. We extracted immature seeds from cones and sterilized immature seeds and placed megagametophytes containing seed embryos on three types of media. As a result, it was confirmed that immature seeds of cedar germinated under *in vitro* condition.

**Key-word:** *Cryptomeria japonica*, polycross, immature seed, *in vitro*, germination

**I はじめに**

ポリクロスとは複数親の混合花粉を使用する人工交配である。ポリクロスを行うことで遺伝的に多様な苗を省力的に作出することが可能である。

ポリクロス由来の成熟種子における花粉親寄与率は、*Chamaecyparis obtusa* (6, 7) のように均等であるこ

とが報告されている種もあるが、*Cryptomeria japonica* (3), *Pseudotsuga menziesii* (1, 4), *Picea mariana* (5) などいくつかの樹種で期待値から有意に歪むことが報告されている。一方で、成熟前の種子発達段階（未熟段階）で花粉親の寄与率を調べた事例はない。未熟段階で花粉親を解析するためには、未熟種子から

の DNA 抽出が必要である。種子発達過程（未熟段階）では種子胚の発達が不十分であり、さらにスギの種子胚（2n）は、雌性配偶体（母親由来の n）に囲まれていることから、DNA 抽出・解析を行うためには、種子胚の抽出をしなければならない。種子胚のみを抽出するのは労力のかかる作業である。種子胚を未熟段階でも発芽させることができれば、DNA 抽出・解析は省力的に行うことが可能となる。

そこで本研究では、インビトロ条件でポリクロス由来のスギ未熟種子における発芽方法の検討を目的とした。

## II 材料と方法

**1. 人工交配・球果の採取** 2019年3月上旬に2種類の混合花粉（3親の花粉を等量混合させた3Mix、10親の花粉を等量混合させた10Mix）を用いた人工交配を行った（表-1）。2019年7月下旬に球果を採取し、球果から取り出した種子を実験に供試した。

**2. 使用培地・培地への置床** 種子の滅菌は、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分攪拌し、滅菌水で洗浄して行った。滅菌後、種子胚を含む雌性配偶体を次の3種類の培地へ置床した。A：無機塩を1/2濃度にしたEM培地（2）に、ショ糖10g/L、カゼイン0.5g/L、グルタミン1g/L、バクト寒天8g/L、活性炭2g/Lを添加した固形培地（表-2）。B：無機塩を1/2濃度にしたEM培地に、ショ糖20g/L、寒天10g/L、活性炭2g/Lを添加した固形培地（表-3）。C：無機塩を1/2濃度にしたEM培地に、ショ糖10g/L、カゼイン0.5g/L、グルタミン1g/L、ゲランガム3g/L、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）10 $\mu$ M、6-ベンジルアミノプリン（BAP）5 $\mu$ Mを添加した固形培地（表-4）。培地への置床数は培地Aに320種子（3Mix 110種子、10Mix 210種子）、培地Bに607種子（3Mix 192種子、10Mix 415種子）、培地Cに1614種子（3Mix 841種子、10Mix 773種子）とした。培養は暗黒下、25 $^{\circ}$ Cで行った。根の伸長が確認されたものを発芽とし、培養開始から8週間後に発芽の有無を調査した。

### 3. 統計解析

発芽の有無は一般化線形モデル（GLM）で解析を行った。応答変数は、未熟種子の発芽の有無（発芽ありを1、発芽なしを0）、説明変数は培地の種類、混合花粉に使用した花粉親数として、AIC（赤池情報量基準）によるモデル選択を行った。応答変数は二項分布に従うと仮定し、リンク関数はlogitとした。統計解析は、R ver. 3.5.2を使用し、glmmML package, glm 関数によりパラメータを推定した。

表-1. ポリクロスに使用した母樹と花粉親  
Table-1. Maternal tree and Paternal used for polycross

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

## III 結果と考察

### 1. 未熟種子における発芽率への影響

培養開始から1週間後には培地Aと培地Bで未熟種子の発芽が確認され、培養開始から8週目の発芽率は培地Aで約43%、培地Bで約10%、培地Cで0%となった（表-5、図-1）。AICによるモデル選択の結果、説明変数において培地の種類と混合花粉に使用した花粉親数の両方が選択された。GLMの解析結果から、未熟種子の発芽には、培地の組成と混合花粉に使用した花粉親数の影響が示唆された（表-6）。発芽が確認された培地Aと培地Bは植物ホルモンを含まない培地であり、発芽がみられなかった培地Cは植物ホルモンを含んだ培地であった（表-2, 3, 4）。従って、未熟種子の発芽における培地条件に植物ホルモンの有無が影響していると考えられる。培地Bは一般にスギ不定胚の発芽用培地として用いられている。しかし、今回、培地Bより培地Aの方が未熟種子の発芽においては適していることが確認された。培地Aと培地Bでは、ショ糖濃度など培地の組成がいくつか異なっている。より効率的なスギ未熟種子の発芽方法と培地の組成や交配家系の影響についてはさらに検討する必要があるだろう。

### 2. 培地の組成による不定胚形成細胞の誘導率の違い

本研究では、不定胚形成細胞の誘導も確認された。培養開始から2週間後には、すべての培地において不定胚形成細胞の誘導が観察され、培養開始8週目における不定胚形成細胞誘導率は培地Aで約66%、培地Bで約29%、培地Cで約51%となった（表-5、図-2）。今後、培地

の組成が誘導率に与える影響も検討する必要があると考えられる。

**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された。

**引用文献**

- (1) Apsit J, Nakamura R, Wheeler N (1989) Differential male reproductive success in Douglas-fir. Theor Appl Genet 77: 681-684
- (2) Maruyama E, Tanaka T, Hosoi Y, Ishi 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.
- (3) Moriguchi Y, Ishiduka D, Kneko T, Ito S, Taira H, Tsumura Y (2009) The contribution of pollen germination rates to uneven paternity among polycrosses of *Cryptomeria japonica*. Silvae Genet 58: 139
- (4) Nakamura R, Wheeler N (1992) Pollen competition and paternal success in Douglas-fir. Evolution 46: 846-851
- (5) Roger L, Boyle T (1991) Unequal paternal contributions in black spruce polycross seedlots. Heredity 67: 373-379
- (6) 清藤城宏 (2000) 葉緑体 DNA マーカーを用いたヒノキにおける選択受粉の影響. 日林誌 82: 380-383
- (7) 若尾みか・小林沙希・幸由利香・遠藤良太・松本麻子・森口喜成 (2017) DNA マーカーを用いた少花粉ヒノキの種子生産方法の評価. 日林誌 99: 165-171



図-1. 未熟種子の発芽  
Fig.1 Germination of immature seed



図-2. 不定胚形成細胞の誘導  
Fig.2 Embryogenic cell induction

Compound	Amounts	[mg/L]
KNO <sub>3</sub>	500	
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	
Bacto agar	8000	
Activated Charcoal	2000	
pH5.6-5.8		

表-3. 培地 B の組成

Table 3. Composition of medium B

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	
Sucrose	20000	
Agar	10000	
Activated Charcoal	2000	
pH5.6-5.8		

表-4. 培地 C の組成

Table 4. Composition of medium C

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	
Gellan Gum	3000	
2,4-D	10	[μM]
BAP	5	
pH5.6-5.8		

表-5. 培地・ポリクロス別の発芽率と不定胚形成細胞の誘導率

Table 5. Germination and embryogenic cell induction rate from media and polycross

		発芽率	誘導率
培地A	3Mix	34.545	73.636
	10Mix	48.095	61.905
	合計	43.438	65.938
培地B	3Mix	4.688	28.646
	10Mix	12.530	29.157
	合計	10.049	28.995
培地C	3Mix	0.000	56.005
	10Mix	0.000	44.631
	合計	0.000	50.558

表-6. スギ未熟種子におけるインビトロ発芽の有無を応答変数とした GLM 解析結果

Table 6. Result of the generalized linear model for *in vitro* germination of the immature seeds of cedar as a response variable

	切片	培地 (基準：培地B)		花粉親数 (基準：10Mix)
		培地A	培地C	
推定値	-2.005	+1.981*	-18.232	-0.727*
±SD	0.141	0.179	437.808	0.199

\*は結果が有意であることを示す (P<0.01)