

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380088

研究課題名（和文） 無花粉スギの胚性万能細胞の誘導によるマイクロプロパゲーション手法の開発

研究課題名（英文） Development of micropropagation method by inducing embryogenic totipotent cells from non-pollen Cryptomeria

研究代表者

石井 克明（ISHII KATSUAKI）

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・センター長

研究者番号：80353572

研究成果の概要（和文）：無花粉スギより胚性万能細胞等を誘導する手法を開発し、各個体に共通する誘導特性を検索し、個体再生、発根、順化の効率化をはかることにより、各クローンに普遍的な増殖技術の開発を目指した。無花粉スギからの培養条件の検索では、多くの無花粉スギ個体を用いて、針葉の無菌化を行い、培養に適した培地や、培養環境を検索して、雄性不稔スギ福島不稔2号、5号、田原1号、青森1号等で最適条件を確立した。そして、発根や順化での適切な処理手法を開発することで、効率的増殖条件を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed the micropropagation technique using in vitro culture of non-pollen Cryptomeria (sugi) clones. Among the cytokinin tested, zeatin was relatively effective for bud induction. More buds were induced in the medium containing zeatin than that containing BAP with male sterile clone Fukushima 5. Shoots were developed from buds on the medium 1/2 LP containing 5 g/l activated charcoal. Shoots were rooted on the RIM medium containing 23.8  $\mu$ M (5 mg/l) Cl-IAA and 0.044  $\mu$ M (0.01 mg/l) BAP. These materials will be used for micropropagation of male sterile sugi cedar in order to reduce its pollen in the air.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	8,100,000	2,430,000	10,530,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生産・育種・組織培養

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症の根本対策として、無花粉スギの増殖が望まれているが、遺伝的多様性を考えた場合、多くの個体の苗木生産や生産の効率化の為に技術革新が望まれている。そこで、多くの系統の無花粉スギより胚性万能細胞等を誘導する手法を開発し、各個体に共通する誘導特性を検索し、個体再生、発根、順化の

効率化をはかることが必要である。

## 2. 研究の目的

多くの系統の無花粉スギより胚性万能細胞等を誘導する手法を開発し、各個体に共通する誘導特性を検索し、個体再生、発根、順化の効率化をはかることにより、各クローンに普遍的な増殖技術の開発を目指し、無花粉

スギの効率的な育種に資する。

### 3. 研究の方法

無菌培養での、各個体に共通する不定胚、苗条原基、不定芽の誘導特性を検索し、個体の再生、発根、順化の効率化をはかることにより、各クローンに普遍的な増殖技術を開発した。

### 4. 研究成果

#### (1) 初代培養条件の検索

無花粉スギからの初代培養条件の検索では、多くの無花粉スギ個体を用いて、針葉の無菌化を行い、初代培養に適した培地や、培養環境を検索して、雄性不稔スギ福島不稔 2号、5号、田原 1号、青森 1号等で最適条件を確立した。また、福島 5号や三重 1号については、カルス培養に成功し、胚性万能細胞の誘導を行った。初代培養には、植物ホルモンのゼアチンや BAP を含有した 1/2LP 培地が適していた(表-1)。

表-1 無花粉スギ青森 1号の初代培養での基本培地とサイトカイニンの影響

基本培地	サイトカイニン (10 $\mu$ M)	不定芽誘導植物片 (%)	不定芽数
1/2LP	BAP	4 (40)	3.75
1/2LP	Zeatin	2 (20)	5
1/2LP	Kinetin	5 (50)	1.4
1/2LP	Thidiazuron	0 (0)	0
CD	BAP	5 (50)	2.4
CD	Zeatin	3 (30)	1.33
CD	Kinetin	5(50)	2.2
CD	Thidiazuron	0(0)	0 c

#### (2) 継代培養条件の検索

無花粉スギの継代培養と幼若化条件の検索では、無花粉スギの継代培養を行い、例えば、無花粉スギの福島 5号ではアエアチンが BAP よりもシュート数で勝っていたが、シュート長では差が無かった(表-2)。また、得られた組織に低温処理や植物ホルモン処理、さらに連続試験管内挿し木処理等を施して、幼若化を進め、胚性万能細胞や苗条原基を誘導する条件を検索した。成熟組織からの不定胚や苗条原基の誘導条件を解明した。無花粉形質のみでなく、生長形質についても優れている事が期待される、精英樹同士を掛け合わせて作出した無花粉スギについても、培養条件を開発した。

表-2 無花粉スギ福島 5号の継代培養でのサイトカイニンの種類の影響

サイトカイニン (10 $\mu$ M)	シュート数 / 外植片	平均シュート長 (mm)
Zeatin	10.4 a	12.2 $\pm$ 1.7 a
BAP	1.6 b	8.3 $\pm$ 2.8 a

#### (3) 発根及び順化条件の検索

また、発根や順化での適切な処理手法を開発することで、効率的増殖条件を明らかにした。例えば、無花粉スギ福島 5号のシュートからの発根では Cl-IAA と BAP を少量添加した培地が優れていた(表-3)。雄性不稔スギ再生増殖個体群を、ビートモズ主体のジフィー 9 を培地とするプラントボックスに移植し(図-1)、しばらく組織培養室で栽培した後、苗テラス(簡易植物工場施設)にて、順化生育させることに成功した(図-2)。

表-3 無花粉スギ福島 5号のシュートからの発根への植物成長調節物質(PGR)の影響

基本培地	PGR ( $\mu$ M)	発根率 %
RIM	IBA(24.6), BAP(0.044)	23.3 $\pm$ 11 ab
RIM	IBA(4.4)	10 $\pm$ 0 b
RIM	IBA(0.99)	0 $\pm$ 0 c
RIM	IAA(28.6), BAP(0.044)	0 $\pm$ 0 c
RIM	IAA(28.6), BAP(0.44)	7 $\pm$ 4 bc
RIM	Cl-IAA(23.8), BAP(0.044)	46 $\pm$ 10 a
RIM	Cl-IAA(23.8), BAP(0.44)	36 $\pm$ 12 a
White	IBA(2.46), NAA(0.32)	0 $\pm$ 0 c
White	IBA(4.9)	0 $\pm$ 0 c
White	IBA(4.9), PVPP(500ppm)	16.7 $\pm$ 13 b
White	IBA(4.9), PVP(500ppm)	8.3 $\pm$ 0 b
White	IBA(0.99)	0 $\pm$ 0 c
WS	IBA(14.8), NAA(0.54)	20 $\pm$ 11 ab
CD	IBA(14.8), NAA(0.54)	10 $\pm$ 8 b
1/4WPM	IBA(9.85)	17 $\pm$ 10 b

図一 1 プラントボックスに増殖した無花粉スギ



図一 2 苗テラス（簡易植物工場施設）にて、順化生育中の無花粉スギ



#### (4) 野外植栽試験

順化後は、野外に植栽し、順調に生育することを確認した（図一 3）。さらに、成熟組織からの不定胚（胚性万能細胞）（図一 4）や苗条原基の誘導条件を解明した。また、発根や順化での適切な処理手法を開発することで、効率的増殖条件を明らかにした。更に、新たに、精英樹大井 7 と中 4 を交配して作出した無花粉スギの複数クローンについての培養条件を開発した。

図一 3 野外植栽の再生無花粉スギ



図一 4 無花粉スギの成熟組織からの胚性万能細胞の誘導



#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 10 件）

(1) 細井佳久、丸山 E. 毅、石井克明、スギ不定胚細胞および雄性不稔スギのフラスコ苗を利用したプロトプラスト単離と培養の試み、関東森林研究、64:2013、査読有

(2) 石井克明、細井佳久、栗田学、谷口亨、Recent research activity of conifer somatic embryos at FFPRI, Proceedings Advances in Somatic Embryogenesis of Trees and Its application p.114-115, 2012、査読無

(3) Ishii K, Hosoi Y, Maruyama E, Kanetani S., Preservation of an in vitro propagated endangered species Pinus armandii var. amamiana (Koidz.) Hatsushima, Propagation of Ornamental Plants, 11(4)210-212, 2011、査読有

(4) Ishii K, Hosoi Y, Taniguchi T, Tsubomura M, Kondo T, Yamada H, Saito M, Suda T, Fujisawa T, Tanaka K., In vitro culture of various genotypes of male sterile Japanese cedar (Cryptomeria japonica D. Don), Plant Biotechnology 28(1) 103-106, 2011、査読有

(5) Ishii K, Hosoi Y, Taniguchi T, Hase Y, Tanaka A., Mutation induction in sugi cedar by ion beam irradiation and tissue culture of non-pollen trees, The International Forestry Review, 12, 153, 2010、査読有

〔学会発表〕（計 8 件）

(1) 細井佳久、丸山 E. 毅、石井克明、雄性不稔スギの栄養器官および培養細胞からのプロトプラスト単離・培養、第 124 回日本森林学会大会、2013 年 3 月 27 日、岩手大学（盛岡市）

(2) 石井克明、細井佳久、谷口亨、坪村美代子、近藤禎二、壽田智久、雄性不稔スギ福島

不稔2号及び5号の組織培養、第121回日本  
森林学会大会、2010年4月3日、筑波大学(つ  
くば市)

[図書] (計2件)

(1) 谷口亨、小長谷賢一、スギの形質転換プ  
ロトコール、形質転換プロトコール、田部井  
豊編、化学同人 p. 286-293、2012、432pp

[その他]

<http://www.ffpri.affrc.go.jp/press/2013/20130321.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 克明 (ISHII KATSUAKI)  
森林総合研究所・森林バイオ研究センタ  
ー・センター長  
研究者番号：80353572

### (2) 研究分担者

細井 佳久 (HOSOI YOSHIHISA)  
森林総合研究所・生物工学研究領域・チー  
ム長  
研究者番号：50353842

### (3) 研究分担者

谷口 亨 (TANIGUCHI TORU)  
森林総合研究所・森林バイオ研究センタ  
ー・室長  
研究者番号：00360470