

スギ胚乳からの半数性カルスの作出

森林バイオ研究センター 小長谷賢一・七里吉彦・谷口亨
林木育種センター育種部育種第一課 平尾知士

1 はじめに

幾つかの農作物では、花粉や雌性配偶体など核相が半数性の細胞から、組織培養技術によって植物体に分化させ、さらに倍加させることで（倍加半数体、double haploid, DH 系統とも呼ぶ）純系の個体作出することが可能となっている。純系は全ての対立遺伝子が同一であり、純系を両親とした交雑集団を利用することで、その遺伝解析から有用形質に関連する遺伝子座を高感度に検出できる。一方で、針葉樹は他殖性であるため、量的形質の遺伝解析では、両親それぞれから受け継いだ異なる対立遺伝子が形質の分離を複雑にし、純系の場合と比べて量的形質遺伝子座の検出感度が低下し、詳細な解析が困難となっている。

針葉樹における倍加半数体の作出に向けた試みは 1950 年代からカラマツ属、マツ属、トウヒ属、イトスギ属、イチイ属等で行われており、小孢子や成熟花粉、胚乳から細胞塊であるカルスが誘導されているが、カルスから植物体再生にまで至った研究報告はごく僅かである (Baldursson and Ahuja 1996)。再生した植物体の核相分析により、半数体であることが確認できなかった事例もあり、カルス培養時に残存していた胚由来の細胞からの個体再生や、個体再生の過程で倍加している可能性も考えられる (von Aderkas and Bonga 1993)。

針葉樹の胚乳は、珠心基部の胚のう母細胞 (2n) が減数分裂することによって生じた胚のう細胞 (n、大孢子とも呼ばれる) がさらに核分裂することによって形成された組織である (図 1; 横山 1975)。そのため、半数性の組織として遺伝的に均一であり、未成熟種子から取得が容易であることから、針葉樹における半数体培養の研究によく用いられている。また、巨大ゲノムである針葉樹のゲノムシーケンスの情報量を半分小さくさせる目的としても、胚乳由来のカルスが利用されており (Arrillaga et al. 2014, Krutovsky et al. 2014)、半数性カルスの利用価値は高い。

森林総合研究所森林バイオ研究センターでは、国立研

究開発法人森林研究・整備機構第 5 期中長期計画 (2021～2025 年度) に基づき、バイオテクノロジーを利用した育種技術の開発を行っている。そこで本研究では、スギにおける組織培養技術を活用した倍加半数体の作出に向け、スギの雌性配偶体である胚乳から半数性カルスの作出を試みたので報告する。

2 材料と方法

森林総合研究所林木育種センター (日立市) 場内に植栽されている 21 年生の精英樹 (中津川 2 号、南会津 2 号、双葉 2 号) および 10 年生の爽春について、2016 年の 6 月 16 日から 9 月 6 日にかけておよそ 2 週間おきに自然着果

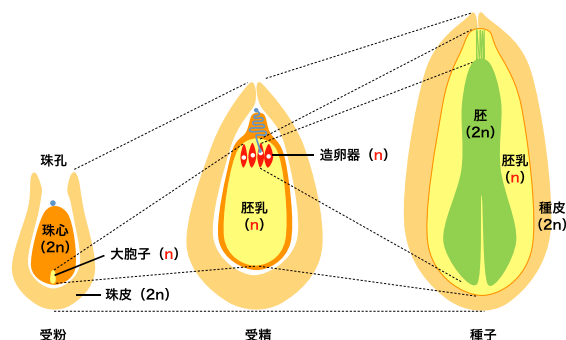


図 1 スギにおける受粉後の胚珠の成長

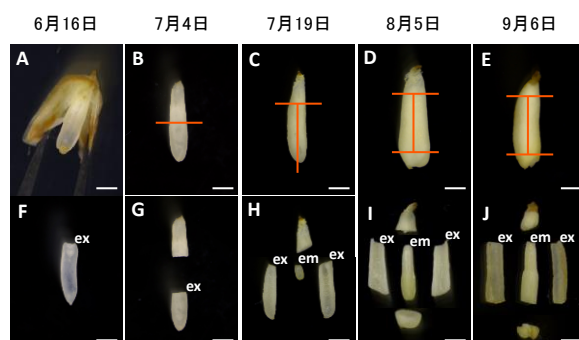


図 2 組織培養に用いた雌性配偶体とそこから供試した外植体
A: 未成熟種子からピンセットで雌性配偶体 (胚乳と造卵器) を摘出している様子, B-E: 各採取時期において単離した雌性配偶体 (上が珠孔側, メスで切断した部位を朱線で示した), F-J: 雌性配偶体由来の外植体, em: 胚, ex: 培養に供試した組織, Bars=1 mm

表1 スギ未成熟種子の各採取時期において観察された組織構造

採取時期	中津川2号	双葉2号	南会津2号	爽春
6月16日	造卵器, 胚原細胞群	胚原細胞群, 胚性細胞塊, 懸垂糸		
7月4日	懸垂糸, 胚性細胞塊, 幼胚			
7月19日	幼胚, 子葉原基			
8月5日	分化途中の子葉			
9月6日	胚の完成			

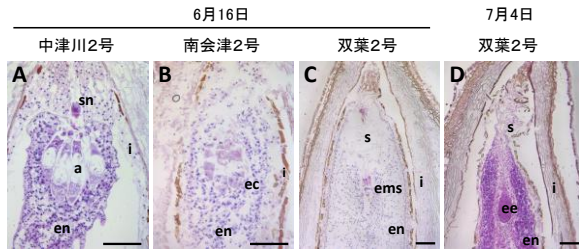


図3 未成熟種子における胚珠内の組織学的観察
a: 造卵器, ec: 胚原細胞群, ee: 幼胚, ems: 胚性細胞塊, en: 胚乳, i: 珠皮, s: 懸垂糸, sn: 精核, Bars=200 μm

した球果を採取し、スギの不定胚形成細胞の誘導法と同様の方法（小長谷賢一・七里吉彦 2020）により、滅菌した未成熟種子から未成熟胚を内包する胚乳を抽出した。なお、胚の発達段階を決定するため、未成熟種子を FAA で固定後、川本法（Kawamoto and Shimizu 2000）により永久プレパラートを作製して光学顕微鏡により組織観察した。抽出した組織は図2に示すようにメスで切断後、未成熟胚と胚乳に分離させ、胚乳部のみを外植体として初代培養培地（1/2MD' 培地）または不定胚形成細胞継代培地（1/2MD 培地）（小長谷賢一・七里吉彦 2020）に置床し、25°Cの暗所下で培養した。培養1ヶ月後に増殖したカルスを1/2MD 培地に移植し、同様の培養条件下で1ヶ月おきに継代培養した。

カルスの核相の判定は、初代培養からおおよそ7から10ヶ月継代培養したカルスから Nucleon PhytoPure (Cytiva 社、東京) によりゲノム DNA を抽出し、SSR マーカーを用いた遺伝子型解析（Moriguchi et al. 2003; Tani et al. 2004）により実施した。マーカーは Cjgssr77、Cjs0333、CS1226、CS1364、CS2169、CS1219、CS1579 の計7種を用い、親個体由来する対立遺伝子の内、全てのマーカーでどちらか片方の対立遺伝子のみが検出されたカルスを半数性として判定した。

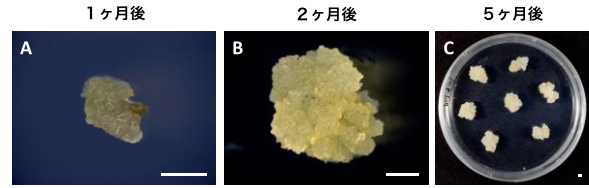


図4 胚乳からのカルス誘導と増殖。
一例として7月4日に採取した中津川2号の胚乳を1/2MD' 培地にて初代培養し (A)、その後、1/2MD 培地にて継代培養したカルス (B, C) を示した, Bars=2 mm

3 結果と考察

各時期に採取した球果における未成熟種子の胚発生のステージを表1および図3に示す。6月16日では、中津川2号は受精前の造卵器または受精卵から分裂した胚原細胞群が観察され、双葉2号、南会津2号、爽春では胚原細胞群の他、胚原細胞群から分化する懸垂糸および胚性細胞塊が観察された。7月4日では、全ての系統で懸垂糸が観察され、一部の未成熟種子では胚性細胞塊から分化する幼胚が観察された。7月19日では、幼胚または発達段階にある子葉原基が観察され、8月5日以降には全ての未成熟種子で胚の構造が完成していた。これらのことから、6月16日では中津川2号以外は受精が完了しており幼胚の発達前、7月4日では幼胚の発達期、7月19日では幼胚または子葉原基の発達期、8月5日以降は胚の構造が完成していると推定された。

滅菌した未成熟種子から胚乳を抽出し、1/2MD 培地または1/2MD' 培地で培養した結果、培養1から2ヶ月後にはいずれの培地においてもカルスの形成が認められた（図4）。初代培養を含めた培養4ヶ月後のカルス誘導率について表2に示す。カルス誘導率は各系統間および培養開始日によって差異が認められ、双葉2号および中津川2号は南会津2号または爽春と比較してカルス誘導率が高い傾向を示した。また、全ての系統において最も高いカルス誘導率を示す培養開始日は7月4日または7月19日であり、これは胚の発達段階が幼胚である時期と一致する。未成熟胚に由来する二倍体の細胞塊は不定胚形成細胞と呼ばれ、スギ等針葉樹における不定胚形成細胞の誘導効率が高い胚の発達段階は、子葉の原基が形成される前すなわち幼胚の時期とされており（Igasaki et al. 2003）、不定胚形成細胞の誘導と胚乳由来のカルス誘導に適した時期は同一である可能性がある。1/2MD 培地および1/2MD' 培地の初代培地間では顕著なカルス

表 2 系統、採取時期および培養条件のカルス誘導効率と半数性に及ぼす影響（右にカルス誘導率をグラフ化した）

系統	初代培地	培養開始日	供試 外植体数	カルスを誘導した		不定胚形成細胞を 誘導した外植体数 ^a (%)	SSRマーカーによる核相分析		カルス誘導率 (%)
				外植体数 ^a	(%)		分析数	半数性カルス数 (%)	
双葉 2号	1/2MD	6月16日	50	9 (18.0)	8 (16.0)	4	3 (75.0)	6	12.0
		7月4日	50	13 (26.0)	0 (0.0)	10	9 (90.0)	10	26.0
		7月19日	50	3 (6.0)	2 (4.0)	2	1 (50.0)	2	6.0
		8月5日	54	9 (16.7)	0 (0.0)	7	6 (85.7)	7	16.7
		9月6日	50	7 (14.0)	0 (0.0)	6	6 (100.0)	6	14.0
	1/2MD'	6月16日	50	11 (22.0)	8 (16.0)	9	6 (66.7)	9	22.0
		7月4日	50	14 (28.0)	0 (0.0)	12	12 (100.0)	12	28.0
		7月19日	50	17 (34.0)	0 (0.0)	7	7 (100.0)	7	34.0
		8月5日	48	10 (20.8)	0 (0.0)	7	7 (100.0)	7	20.8
		9月6日	50	3 (6.0)	0 (0.0)	2	2 (100.0)	2	6.0
南会津 2号	1/2MD	6月16日	45	3 (6.7)	2 (4.4)	2	2 (100.0)	2	6.7
		7月4日	50	4 (8.0)	0 (0.0)	2	2 (100.0)	2	8.0
		7月19日	51	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		8月5日	47	1 (2.1)	0 (0.0)	0	-	0	2.1
		9月6日	20	1 (5.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	1	5.0
	1/2MD'	6月16日	49	1 (2.0)	3 (6.1)	1	1 (100.0)	1	2.0
		7月4日	50	7 (14.0)	1 (2.0)	4	3 (75.0)	4	14.0
		7月19日	40	4 (10.0)	1 (2.5)	2	1 (50.0)	2	10.0
		8月5日	45	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		9月6日	48	0 (0.0)	1 (2.1)	0	-	0	0.0
中津川 2号	1/2MD	6月16日	50	1 (2.0)	0 (0.0)	0	-	0	2.0
		7月4日	50	21 (42.0)	0 (0.0)	10	10 (100.0)	10	42.0
		7月19日	68	11 (16.2)	0 (0.0)	9	9 (100.0)	9	16.2
		8月5日	50	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		9月6日	50	6 (12.0)	0 (0.0)	3	3 (100.0)	3	12.0
	1/2MD'	6月16日	49	2 (4.1)	0 (0.0)	2	2 (100.0)	2	4.1
		7月4日	50	10 (20.0)	0 (0.0)	5	5 (100.0)	5	20.0
		7月19日	42	12 (28.6)	0 (0.0)	9	8 (88.9)	9	28.6
		8月5日	50	3 (6.0)	0 (0.0)	3	3 (100.0)	3	6.0
		9月6日	50	11 (22.0)	0 (0.0)	8	8 (100.0)	8	22.0
爽春	1/2MD	6月16日	50	2 (4.0)	12 (24.0)	2	1 (50.0)	2	4.0
		7月4日	50	3 (6.0)	0 (0.0)	3	1 (33.3)	3	6.0
		7月19日	47	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		8月5日	50	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		9月6日	48	2 (4.2)	0 (0.0)	2	0 (0.0)	2	4.2
	1/2MD'	6月16日	49	0 (0.0)	3 (6.1)	0	-	0	0.0
		7月4日	50	3 (6.0)	2 (4.0)	2	1 (50.0)	2	6.0
		7月19日	49	3 (6.1)	1 (2.0)	0	-	0	6.1
		8月5日	51	0 (0.0)	0 (0.0)	0	-	0	0.0
		9月6日	50	1 (2.0)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	1	2.0
合計			1950	208 (10.7)	44 (2.3)	137	119 (86.9)		

^a 初代培養開始から4ヶ月後に計測

誘導の差異は認められなかったが、7月19日を培養開始日とした場合においては、全ての系統で1/2MD' 培地を初代培地としたカルス誘導率が1/2MD 培地と比較して高い傾向を示した。全試験区の中で最も高いカルス誘導率を示したのは、中津川2号において1/2MD 培地を初代培地とし、7月4日を培養開始日とした試験区で42%のカルス誘導率であった。

一方、不定胚形成細胞は球形の胚性細胞塊と特徴的な繊維状の懸垂糸から構成されるため、実体顕微鏡で観察することで判定が可能である。本研究では懸垂糸の細胞形態が観察される細胞塊を不定胚形成細胞として、胚乳由来のカルスとは区別してその誘導率も求めた。その結果、不定胚形成細胞は6月16日を培養開始日とした場合に最も高い誘導率を示した（表2）。6月16日に用いた外植体は未成熟胚を内包する胚乳全体を外植体として用いたため（図2F）、未成熟胚に由来する不定胚形成細胞が増殖したためと考えられる。未成熟胚が形成を始め

る珠孔側の胚乳組織を切断・除去することで、不定胚形成細胞の誘導を抑制できる可能性がある。

カルスからゲノムDNAを抽出し、SSRマーカーを用いた核相分析を行った。その結果、分析した全てのカルスにおける半数性の確率は86.9%と高く、特にカルス誘導率の高かった試験区（双葉2号の初代培地1/2MD' における培養開始日7月4日および7月19日と、中津川2号の初代培地1/2MD における培養開始日7月4日および初代培地1/2MD' における培養開始日7月19日）において、分析した全てのカルスに半数性が確認された（表2）。また、半数性として判定されたSSRマーカーによるフラグメントパターンを観察すると、片方の対立遺伝子以外のピークは一切検出されることはなかった（図5）。このことから、胚や雌花の体細胞に由来する二倍体の細胞や、他の遺伝子型の半数性カルスは混入しておらず、遺伝的に極めて均一なカルスであることが示唆された。

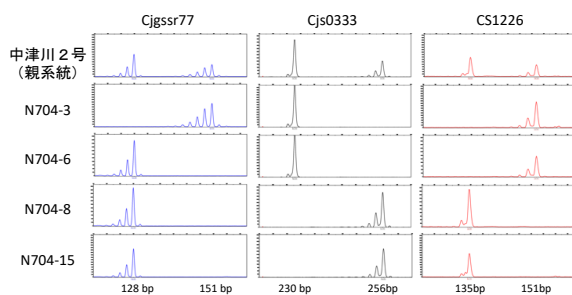


図5 SSR マーカーのフラグメントパターン一例として中津川2号より得られた4系統のカルスについて、遺伝子座 Cjgssr77, Cjs0333, CS1226 のフラグメントパターンを示す

4 まとめ

本研究により、不定胚形成細胞の誘導方法と同様の方法を用いて胚乳から最大42%の効率で半数性カルの獲得に成功した。半数性カルの誘導効率が高い外植体の採取時期は、不定胚形成細胞の誘導効率が高い幼胚の形成時期と一致しており、7月上旬が適すると推定される。系統間で半数体カルの誘導効率が異なるため、半数性カルの獲得には複数の家系について試験する必要がある。今回得られた半数性カルスからの個体再生については試験していないが、針葉樹において成功事例が極めて低いことを鑑みると、詳細な培養条件の検討だけでなく、個体再生前の倍加処理や、再分化に関わる因子の導入 (Gordon-Kamm et al. 2019) 等が必要となる可能性がある。

5 引用文献

Arrillaga I, Guevara MA, Munoz-Bertomeu J, Lazaro-Gimeno D, Saez-Laguna E, Diaz LM, Torralba L, Mendoza-Poudereux I, Segura J, Cervera MT (2014) Selection of haploid cell lines from megagametophyte cultures of maritime pine as a DNA source for massive sequencing of the species. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 18, 147-155

Baldursson S, Ahuja MR (1996) Haploidy in forest trees. *In vitro* haploid production in higher plants. Volume 3 (Springer), 297-336

Gordon-Kamm B, Sardesai N, Arling M, Lowe K, Hoerster G, Betts S, Jones AT (2019) Using

Morphogenic Genes to Improve Recovery and Regeneration of Transgenic Plants. *Plants*, 8, 38

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

Kawamoto T, Shimizu M (2000) A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol*, 113, 331-339

小長谷賢一・七里吉彦 (2020) スギの形質転換およびゲノム編集. ひとりではじめる植物バイオテクノロジー入門 組織培養からゲノム編集まで (国際文献社), 258-274

Krutovsky KV, Tretyakova IN, Oreshkova NV, Pak ME, Kvitko OV, Vaganov EA (2014) Somaclonal variation of haploid *in vitro* tissue culture obtained from Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) megagametophytes for whole genome *de novo* sequencing. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 50, 655-664

Moriguchi Y, Iwata H, Ujino-Ihara T, Yoshimura K, Taira H, Tsumura Y (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *TAG*, 106, 751-758

Tani N, Takahashi T, Ujino-Ihara T, Iwata H, Yoshimura K, Tsumura Y (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Ann Forest Sci*, 61, 569-575

横山敏孝 (1975) スギにおける胚の形成と球果の成長. *林試研報*, 277, 1-20

von Aderkas P, Bonga JM (1993) Plants from haploid tissue culture of *Larix decidua*. *TAG*, 87, 225-228