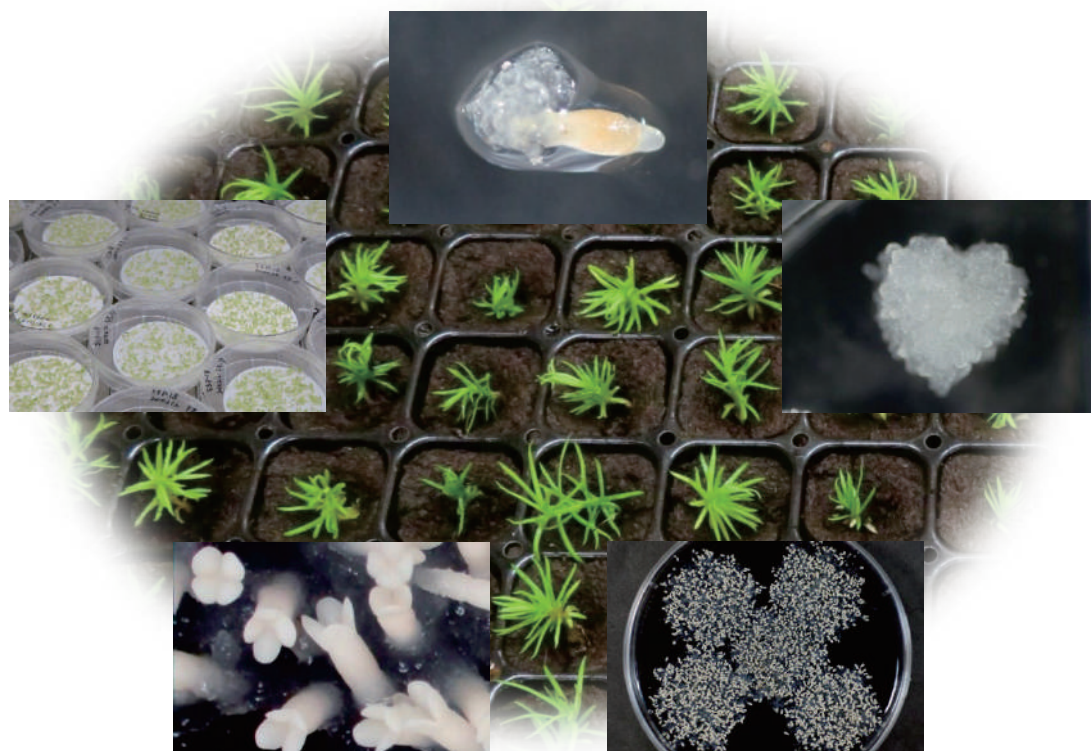


ISBN 978-4-909941-29-9

組織培養による無花粉 スギ苗の増殖マニュアル

version 1.2

2024 年 10 月 4 日版



国立研究開発法人 森林研究・整備機構

森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute

森林総合研究所 第5期中長期計画成果10（森林環境－4）

Manual for the propagation of pollen-free sugi (*Cryptomeria japonica*) via somatic embryogenesis

【表紙写真】中央：組織培養由来の無花粉スギプラグ苗の育成、上から右回り：外植体からの不定胚形成細胞の誘導・不定胚形成細胞・不定胚の形成・成熟した不定胚・不定胚の発芽

【裏表紙写真】山に試験植栽された組織培養由来の無花粉スギ苗

【撮影者】丸山毅



はじめに

スギは日本で古くから利用され、また現在でも主要な林業樹種として広く植林されている樹木です。一方で、春にスギの人工林から散布される大量の花粉により、多くの国民がスギ花粉症に悩まされています。このため、林業分野からの対策として、花粉の飛散の少ないまたは全く花粉を飛ばさないスギの品種を開発し、人工林のスギをこれらの品種に置き換えることで花粉の飛散量を減らす試みが進められています。花粉を全く飛ばさないスギは無花粉スギと呼ばれ、現在までに 20 以上の系統が見つかっています。無花粉の原因となる遺伝子の解析も進められており、雄性不稔を引き起こす遺伝子のひとつ *MALE STERILITY1* (*MSI*) とその原因となる変異型のアレル (allele : 対立遺伝子) *ms1* が同定されています。*MSI* 遺伝子の両方が変異型アレル (*ms1* のホモ接合、*ms1/ms1*) なら無花粉に、一つでも正常なアレル (*Ms1*) を持てば、正常に花粉が作られます (可稔)。*MSI* 遺伝子発見の成果と利用については、本マニュアル姉妹誌「スギの雄性不稔遺伝子 *MSI* 判別マニュアル」に詳しく記載されていますので、そちらをご覧ください。

しかしながら、無花粉スギの普及にはまだまだ様々な課題が残されています。そのうちの 하나가、無花粉スギの苗木供給の問題です。今日スギの植林面積は 440 万ヘクタールほどで、人工林の約 44% を占めており、それらを全て無花粉スギ系統に置き換えるには、膨大な数の無花粉スギの苗木が必要になります。現在、無花粉スギの苗木は、無花粉の母樹に変異型のアレルを一つ持った花粉親を掛け合わせてできた種子から作られています。こうして作られた苗は、無花粉と可稔がおおよそ 1 : 1 の割合で生じることになります。従来、無花粉と可稔の判断は、苗が数年後に花を咲かせられるようになるまでできませんでした。この方法では無花粉の判定までに時間がかかり、またそれまで半数ほどの可稔の苗も維持しなければなりませんでした。

そこで私たちの研究チームでは、組織培養技術を用いることで、これらの問題を解決するための基礎研究に取り組んできました。その成果として、人工交配に由来するスギ苗を大量に増殖させることに成功し、かつこの過程で効率的に無花粉苗を選抜する技術を開発しました。組織培養による無花粉スギ苗の大量増殖技術の普及を目的に、本マニュアルでは組織培養の開始材料となる未熟種子を準備するための人工交配、組織培養の手順、そして実際に植林に用いるコンテナ苗化までの手順を、Maruyama ら (2022) を基に一通り概説します。このマニュアルが各県の研究機関、種苗配布機関や苗木生産者に利用され、無花粉スギ苗の普及の一助となれば幸いです。

執筆者を代表して 丸山毅



目次

はじめに	iii
1. 組織培養由来の無花粉スギ苗生産の特徴	1
2. 人工交配による組織培養外植体の準備	2
2. 1. はじめに	2
2. 2. 準備するもの	2
2. 3. 手順	2
3. 組織培養による無花粉スギ苗の作出	4
3. 1. はじめに	4
3. 2. 準備するもの	4
3. 3. 各組織培養ステージの手順	4
3. 4. その他	8
4. <i>MSI</i> 遺伝子型の簡易判定	9
4. 1. はじめに	9
4. 2. 準備するもの	9
4. 3. <i>MSI</i> 遺伝子型の判定手順	9
5. 無花粉スギ苗の順化とコンテナ育成	11
5. 1. はじめに	11
5. 2. 準備するもの等	11
5. 3. 手順	11
5. 4. 各工程に必要な期間と調整可能な期間	12
おわりに	14
謝辞	14
引用文献	14
附表：各工程の効率のまとめ	15

執筆者一覧

鶴田燃海（森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域 主任研究員）
丸山毅（森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域 研究専門員）
上野真義（森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域 チーム長）
川上清久（株式会社ベルディ 培養事業部 商品開発担当）
番場由紀子（新潟県森林研究所 森林・林業技術課 専門研究員）
森口喜成（新潟大学大学院 自然科学研究科 准教授）

1. 組織培養由来の無花粉スギ苗生産の特徴

無花粉のスギ苗を作るには、まず *MSI* 遺伝子が両方とも変異型となった無花粉の母樹 (*ms1/ms1*) に、変異型アレルを一つ持った花粉親 (*Ms1/ms1*) を掛け合わせます。このような交配からは、メンデルの遺伝の法則に従い、無花粉と可稔の種子がおおよそ 1:1 の割合でできます。従来の苗木生産の方法では、苗を数年育成して花を咲かせられるようになるまで、無花粉か可稔かの判定ができませんでした。せっかく苗を育成しても、無花粉の苗は半分しか出荷できませんし、またそれまで可稔の苗も維持管理することになります。

一方、組織培養では培養を開始してすぐの段階で DNA 判定により無花粉の細胞系統のみを選抜することで、その後の培養や苗の育成にかかるコストを大幅に削減することができます。かつ、組織培養では交配で得られた種子数に制限されることなく、大量に再生植物体を増殖させることができます。これらの組織培養由来の植物体は、通常の実生と同様にコンテナ苗化することができます。またこれまでのところ、組織培養に由来するような生育の障害も見られていませんし、初期成長において実生由来の苗と同程度の成長を示す系統もみられました (Tsuruta et al. 2021b)。現在、その後の成長においても問題が無いか、実際に植栽した苗の成長を継続して調査しています。

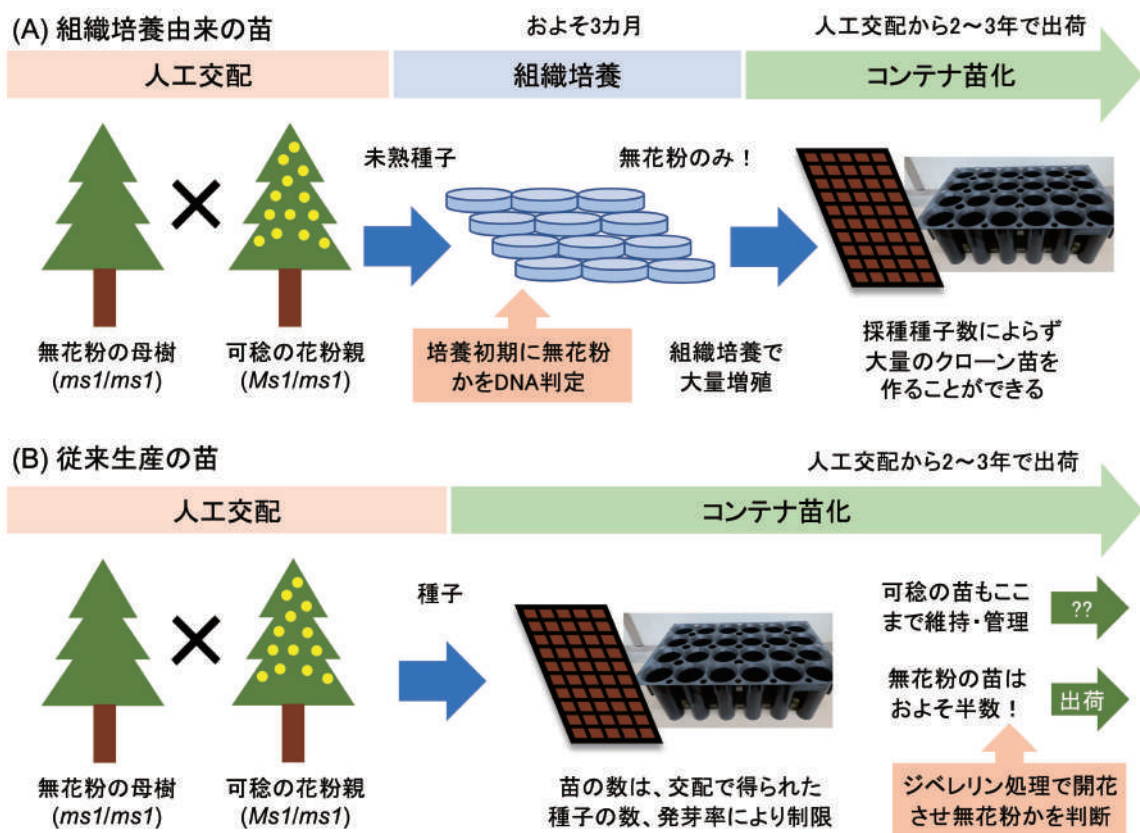


図 1-1 組織培養(A)および従来(B)による採穂園造成等に用いる無花粉スギの苗木生産の概要

2. 人工交配による組織培養外植体の準備

2. 1. はじめに

まずは、組織培養の材料（外植体）となる未熟種子を人工交配により準備することから始まります。人工交配の組み合わせは先述の通り、*msl* のホモ接合となった無花粉の母樹（*msl/msl*）に、変異型アレルをヘテロ接合で持つ花粉親（*Msl/msl*）を掛け合わせます。人工交配のやり方は普通のスギの交配と変わりはないので、各機関でのやり方、倉本・藤澤（2013）の記載等に従ってください。交配後、培養の成功率が高い7月に未熟種子を採取します（Maruyama et al. 2021）。

2. 2. 準備するもの

- ・ジベレリン A₃（協和発酵バイオ）
- ・スプレー
- ・バケツ
- ・脚立
- ・剪定バサミ
- ・花粉収集用の紙袋
- ・真鍮のふるい
- ・シリカゲル
- ・デシケーター
- ・花粉銃
- ・交配袋（不織布、グラシン紙等）

2. 3. 手順

2. 3. 1. ジベレリン処理による着花の誘導

着花を誘導するため、交配前年の7月末に親木の枝先にジベレリン処理を行います。100 mg/L に調整したジベレリン溶液をスプレーで枝先に吹き付ける（図 2-1）、またはバケツに入れたジベレリン溶液に枝を3～5秒漬け込むことで（図 2-2）、ジベレリンを塗布します。およそ1週間後（8月上旬）、追加でジベレリン処理を行います。

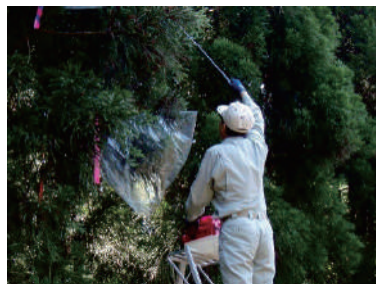


図 2-1 スプレーによるジベレリンの散布



図 2-2 バケツに入れたジベレリン溶液への枝の浸け込み

2. 3. 2. 枝の採取と花粉の収集

- ・1月下旬から2月上旬、周りのスギから花粉が飛散する前に、花粉親から雄花の付いた枝を採取します（図 2-3）。
- ・花粉収集用の紙袋で枝を覆った状態で水挿しをし、温室等に置いて雄花を開花させます（図 2-4）。
- ・紙袋内にこぼれた花粉を回収し、ふるいで花粉を選別します。
- ・集めた花粉は使用するまでシリカゲルを同封するなどして乾燥させ、交配まで冷蔵庫ま

たはデシケーター内で保存します。



図 2-3 雄花のついた枝の採取 図 2-4 雄花を開花させる様子

2. 3. 3. 人工授粉処理と球果の採取

- ・ 2月上旬までに、雌花の付いた母樹の枝を交配袋で覆います（図 2-5）。
- ・ 周りの枝の雌花に珠孔液の分泌が確認できたら（図 2-6）、先に集めておいた花粉を花粉銃で交配袋内に充満させます（2～3 回噴出、図 2-7）。受粉作業は 2～3 回ほど行うようにします。
- ・ スギ花粉の飛散が終わったら、交配袋を取り外します*¹。
- ・ 7月上旬から中旬、球果を採取します（図 2-8, 2-9）。採取後すぐに次章 3.3.1 の外植体の単離を行うのが理想ですが、採取した球果は 1 ヶ月ほど冷蔵庫（5℃）で保存することも可能です。



図 2-5 交配袋掛け

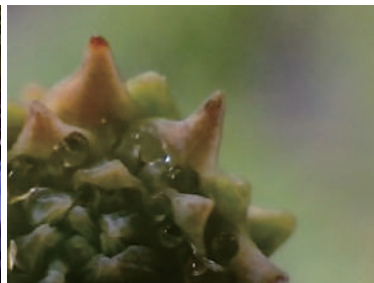


図 2-6 珠孔液が分泌した雌花



図 2-7 花粉銃による受粉作業



図 2-8 7 月中旬の球果



図 2-9 採取した未熟球果

¹ カメムシ等の被害があるなら、代わりに網袋を掛けておきます。

3. 組織培養による無花粉スギ苗の作出

3. 1. はじめに

近年、未熟種子を外植体として利用することで、様々な針葉樹でも組織培養により植物体再生が可能なが報告されています。スギにおいても同様に、未熟種子を外植体とした組織培養技術が報告されました (Maruyama et al. 2000)。これらの手法を参考に、外植体からの不定胚形成細胞^{*2}の誘導、不定胚の成熟化、不定胚の発芽を経て、無花粉スギの植物体を再生させます。なお、本章記載の各操作（オートクレーブ後の培地の準備・種子からの外植体の単離・培地への移植・継代など）は、無菌のクリーンベンチ内で行ってください。器具等も可能なものはすべて滅菌しておきます。

3. 2. 準備するもの

<器具など>

- ・実体顕微鏡　・スターラー　・ピペット　・ピンセット　・メス　・葉さじ
- ・ろ過滅菌用のフィルターとシリンジ　・フラスコ等　・茶こし^{*3}　・ろ紙
- ・滅菌シャーレ（径・厚さ：90×15 mm^{*4}、90×20 mm）　・パラフィルム

<試薬類・培地>

- ・滅菌水　・エタノール（滅菌用）　・次亜塩素酸ナトリウム水溶液（アンチホルミン）
- ・Embryo Maturation (EM) 培地 (Maruyama et al. 2000)：培養ステージごとに4つの培地を使用します（表 3-1）

<必要な設備等>

- ・オートクレーブ　・クリーンベンチ　・培養室（またはインキュベーター）

3. 3. 各組織培養ステージの手順

3. 3. 0. 培地の準備（※無菌操作）

- ・基本塩類を混ぜ合わせ pH を調整した培地を、オートクレーブで滅菌します（121℃、15 分）。
- ・ABA やアミノ酸（表 3-1 参照）はろ過滅菌し（図 3-1）、65℃以下に冷めた培地^{*5}（図 3-2）に添加します。
- ・培地が十分冷めたら（63～65℃）ビーカー等に小分けし、滅菌済みシャーレに分注していきます（図 3-3）。
- ・培地が固まったらラップで包み、保管します^{*6}（図 3-4）。



図 3-1 アミノ酸のろ過滅菌

² 未分化な培養細胞（カルス）のうち、不定胚形成の能力を持った細胞（embryogenic cell）。

³ 網が一重で、目が細かすぎないもの（40～60 メッシュ、目開き 355～500μm ほど）。

⁴ 培養細胞系統間や雑菌のコンタミネーションを最小限に抑えるため、できれば4分割シャーレを使用してください。

⁵ 滅菌した培地をオートクレーブから取り出し、攪拌しながら冷まします。

⁶ この状態で数週間冷蔵保存できますので、各培養操作の前日までに作成しておきます。

表 3-1 組織培養に用いる各培地の組成

培地組成	不定胚形成 細胞誘導	維持・増殖	成熟	発芽・ 個体再生
	EM-1 培地	EM-2 培地	EM-3 培地	EM-4 培地
基本塩類 (mg/L)				
KNO ₃	500	500	1000	500
MgSO ₄ ・7H ₂ O	250	250	500	250
CaCl ₂ ・2H ₂ O	37.5	37.5	75	37.5
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	30	30	60	30
NaNO ₃	30	30	60	30
KH ₂ PO ₄	35	35	70	35
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	80	80	160	80
KCl	40	40	80	40
MnSO ₄ ・4H ₂ O* ⁷	10	10	20	10
H ₃ BO ₃	20	20	40	20
ZnSO ₄ ・7H ₂ O* ⁷	12.5	12.5	25	12.5
KI	0.5	0.5	1	0.5
CuSO ₄ ・5H ₂ O* ⁷	1.2	1.2	2.4	1.2
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.1	0.1	0.2	0.1
CoCl ₂ ・6H ₂ O* ⁷	0.1	0.1	0.2	0.1
FeSO ₄ ・7H ₂ O	15	15	30	15
NaEDTA	20	20	40	20
ビタミン (mg/L)				
塩酸チアミン	2.5	2.5	5	2.5
塩酸ピリドキシン	0.25	0.25	0.5	0.25
ニコチン酸	2.5	2.5	5	2.5
グリシン	2.5	2.5	5	2.5
myo-イノシトール	500	500	1000	500
植物成長調節物質 (μM)				
2,4-D	10	3		
BAP	5	1		
ABA* ⁸			100	
アミノ酸 (mg/L)				
カゼイン* ⁸	500			
L-グルタミン* ⁸	1000	1500	2000	
L-アスパラギン* ⁸			1000	
L-アルギニン* ⁸			500	
L-シトルリン* ⁸			79	
L-オルニチン* ⁸			76	
L-リシン* ⁸			55	
L-アラニン* ⁸			40	
L-プロリン* ⁸			35	
他の添加物 (mg/L)				
スクロース	10000	30000		20000
マルトース			30000	
PEG 6000			175000	
活性炭素粉末			2000	2000
ゲランガム	3000	3000	3300	
寒天				10000
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

⁷ 赤字の薬品は特定化学物質または劇物指定の薬品のため、取り扱いに注意してください。⁸ ろ過滅菌をし、65℃以下に冷めた培地に加える必要がある薬品です。



図 3-2 滅菌後の培地の攪拌



図 3-3 培地の分注



図 3-4 作成した培地の保存

3. 3. 1. 不定胚形成細胞の誘導(※一部無菌操作)

- ・ 球果から未熟種子を取り出します (図 3-5)。
- ＜※ここからの操作はクリーンベンチ内で行います。＞
- ・ 種子を 1% (w/v) のアンチホルミンに 15 分浸け、表面を軽く殺菌します*⁹ (図 3-6)。
- ・ 滅菌水によるリンス (5 分) を 3 回行います*⁹。
- ・ 実体顕微鏡視野下で種子から胚を含んだ雌性配偶体を単離し (図 3-7)、これを外植体とします。
- ・ 外植体を EM-1 培地 (90 mm × 15 mm シャーレ) に置床します*¹⁰ (図 3-8)。
- ・ 25℃暗所で培養すると、12 週までに不定胚形成細胞が誘導されてきます (図 3-9)。



図 3-5 球果と単離した未熟種子



図 3-6 種子表面の殺菌の様子



図 3-7 単離した雌性配偶体

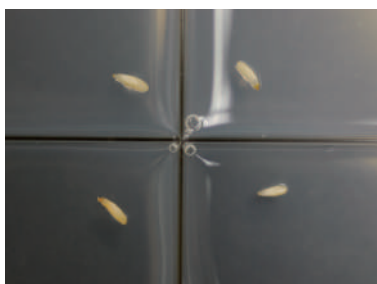


図 3-8 培地に置床後の外植体

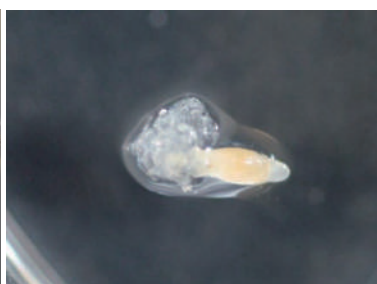


図 3-9 不定胚形成細胞



図 3-10 増殖した細胞の継代

3. 3. 2. 不定胚形成細胞の増殖と維持(※無菌操作)

- ・ 誘導された不定胚形成細胞をピンセットで EM-2 培地 (90 mm × 15 mm シャーレ) へと移し、25℃の暗所で培養します。

⁹ 殺菌およびリンスは、ビーカーの溶液に種子を浸漬し、攪拌しながら行ってください。

¹⁰ 培養シャーレはパラフィルムで封をします。以降、シャーレは同様に封をします。

- ・ 2～3 週間ごとに、増殖した不定胚形成細胞 25～50 mg（生重）を新しい培地（EM-2）へと継代します（図 3-10）。この間に無花粉かの判定を行い（第 4 章参照）、必要ない可稔の細胞系統は破棄します。

3. 3. 3. 不定胚の成熟化（※無菌操作）

- ・ 3～5 塊の不定胚形成細胞（約 100 mg）を EM-3 培地（90 mm × 20 mm シャーレ）に移し、均質に広げます*¹¹（図 3-11）。
- ・ およそ 6～10 週間の培養後、成熟した不定胚が得られます（図 3-12, 3-13）。



図 3-11 成熟培地への移植

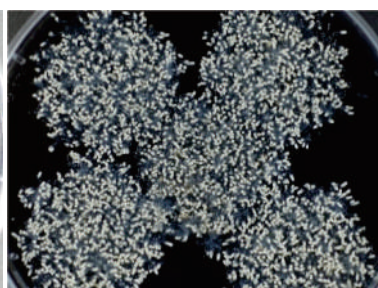


図 3-12 不定胚の形成



図 3-13 成熟した不定胚

3. 3. 4. 不定胚の簡易回収と発芽誘導（※無菌操作）

ここでは、大量の不定胚を簡易に回収する方法を説明します。発芽率を上げたい、または成熟した不定胚の数が少ない場合は、不定胚をひとつずつ選んで丁寧にピンセットでつまみ取り、発芽用の EM-4 培地に移植してください。

- ・ 誘導された不定胚を葉さじで回収し（図 3-14）、滅菌水の入ったフラスコに移します。
- ・ フラスコを数回強く振り、成熟した不定胚と未分化の細胞とを分離させた後（図 3-15）、茶こしで成熟した不定胚のみを回収します（図 3-16）。
- ・ 空のシャーレにろ紙を 2～3 枚重ね、そこに回収した不定胚を移します（図 3-17）。
- ・ 表層のろ紙を新しい空シャーレに移し、不定胚（50～150 個ほど）を均してから水を切ります*¹²（図 3-18）。この状態で密閉し約 2 週間静置し、脱水させます*¹³（図 3-19）。



図 3-14 不定胚の回収



図 3-15 未分化の細胞の分離



図 3-16 茶こしで不定胚を回収

¹¹ 半径が 2.5～3 cm の円（500 円玉程度の大きさ）になるように延ばします。

¹² シャーレを傾けても水が滴らない程度。余分な水はピペット等で取り除きます。

¹³ 簡易法では、このときに同時に不定胚の発芽を誘導しています。



図 3-17 ろ紙に載せ水分を切る 図 3-18 ろ紙上に均した不定胚 図 3-19 脱水と発芽の誘導

3. 3. 5. 不定胚の発芽と植物体の再生(※無菌操作)

- ・ 成熟した不定胚を発芽用の EM-4 培地 (90 mm × 20 mm シャーレ) へ移します (簡易回収法で脱水させた状態の不定胚をろ紙ごと、またはひとつずつピンセットで)。
- ・ 25℃、16 時間日長 (約 2,500～3,500 ルクス) で 8 週間ほど培養すると、発芽・再生した植物体^{*14}が得られます (図 3-20, 3-21)。

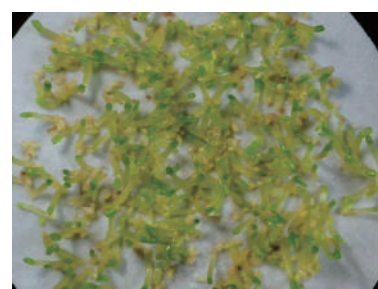


図 3-20 ろ紙上で発芽した不定胚

3. 4. その他

不定胚形成細胞は、継代を続けることで数年は維持することができます。また、成熟後の不定胚もしっかり密閉して冷蔵庫 (5℃) に置くことで (図 3-22)、少なくとも 2 年間、保存前と同等の発芽能力が維持されることが確かめられています (Maruyama et al. 2022)。

また、不定胚形成細胞の誘導率、成熟不定胚や再生植物体が得られる効率は、細胞系統によって異なります (図 3-23)。無花粉や目的の形質をもった系統であることに加え、培養に適した系統を選ぶことが重要になります。

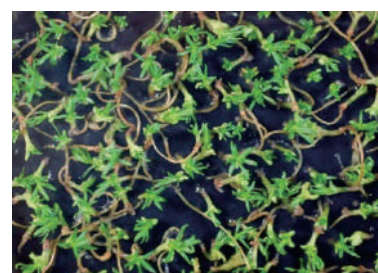


図 3-21 培地上の再生植物体

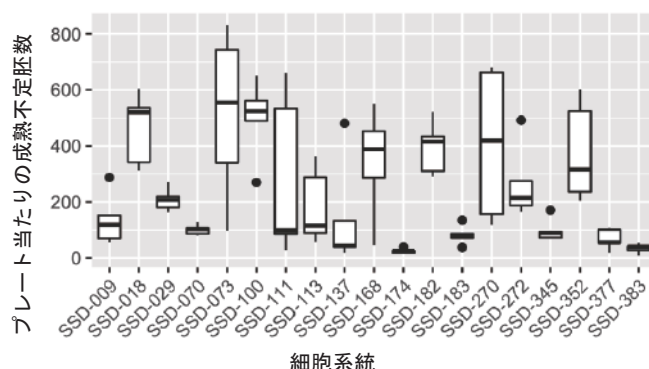


図 3-23 系統ごとにプレート当たり得られた成熟不定胚の箱ひげ図
(Tsuruta et al. 2021b の図を改変)



図 3-22 不定胚の冷蔵保存

¹⁴ ここでは根の出現を「発芽」、根と上胚軸が観察された状態を「再生」と呼びます。

4. MSI 遺伝子型の簡易判定

4. 1. はじめに

人工交配から得られた未熟種子に由来する組織培養系統は、およそ半分は無花粉ですが、残りは不要な可稔となります。そこで、DNA 分析により培養の初期に無花粉かどうかを判別することで、培養およびその後の作業・維持・スペース等のコストを大幅に削減することができます。ここでは ING マーカーを用い、不定胚形成細胞において無花粉・可稔を判定する方法を紹介します*¹⁵ (Tsuruta et al. 2021a)。DNA の抽出には、キレックス樹脂を含んだ InstaGene (BIO-RAD) を用います。詳細は、「スギの雄性不稔遺伝子 MSI 判別マニュアル」をご覧ください。

4. 2. 準備するもの

<試薬>

- ・InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD) ・QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN)
- ・オリゴ DNA プライマー (Tsuruta et al. 2021a 参照) ・滅菌水 ・TAE バッファー
- ・6× loading dye ・Midori Green Xtra (日本ジェネティクス) など染色液
- ・アガロース ・サイズマーカー (100bp ladder)

<実験機器>

- ・98℃の加熱ができる恒温機 ・ボルテックスミキサー ・マグネットスターラー
- ・遠心機 ・サーマルサイクラー ・電気泳動装置 ・ゲル撮影装置

4. 3. MSI 遺伝子型の判定手順

4. 3. 1. InstaGene による DNA の抽出

- ・およそ 5 mg の不定胚形成細胞 (図 4-1) を、200 μL の InstaGene Matrix (図 4-2A) に加えます*¹⁶。
- ・ボルテックスミキサーで 10 秒間撹拌します (図 4-2B)。
- ・98℃に 5 分ほど加熱*¹⁷した後 (図 4-2C)、再度 10 秒間撹拌します。
- ・遠心分離 (13,000 rpm、室温、1 分) をします (図 4-2D)。
- ・上澄み 1 μL を、そのまま PCR のテンプレートとして用います。
- ・残りの抽出液は、試料と樹脂が入ったまますぐに冷凍保存します*¹⁸。



図 4-1 DNA 抽出に用いる不定胚形成細胞の目安

¹⁵ 正確には、変異型のアレルのうち、*msl-1* と呼ばれるアレルの 4 塩基の欠失を判定します。

¹⁶ InstaGene Matrix は、口の大きなチップ (1000 μL 用) がついたピペッターを用い、キレックス樹脂が沈殿しないよう、マグネットスターラー等で撹拌しながら移してください。

¹⁷ 内容物が膨張し、チューブの蓋が開いてしまうおそれがあります。試料の紛失や火傷に注意してください。

¹⁸ 再度 PCR に使う際は、解凍後に 10 秒の撹拌と遠心分離 1 分を行い、上澄みを用います。



図 4-2 溶液への懸濁(A)、攪拌(B)、加熱(C)、遠心分離(D)による DNA の抽出

4. 3. 2. ING マーカーを用いた MSI の PCR 増幅

- ・ 上記 InstaGene 抽出液 1 μ L を、5 μ L の 2 $\times$ QIAGEN Multiplex PCR Master Mix、2 μ M の各プライマー、滅菌水を含む PCR 反応液に加えます。
- ・ 95 $^{\circ}$ C を 15 分の後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒の 3 ステップを 35 サイクル、最終伸長 72 $^{\circ}$ C を 5 分の条件で PCR 増幅を行います。

4. 3. 3. 電気泳動と遺伝子型、可稔・不稔の判定

- ・ PCR 終了後、チューブに 6 $\times$ loading dye を 2 μ L 加え、サイズマーカーとともに 1.5% のアガロースゲル（染色液を含む）で電気泳動します（図 4-3）。
- ・ ゲル撮影装置で泳動像を撮影し、MSI 遺伝子型を決定します。変異型アレル *msI* のホモ接合 (*msI/msI*) なら無花粉、正常型とのヘテロ接合 (*MsI/msI*) なら可稔と判断します（図 4-4）。

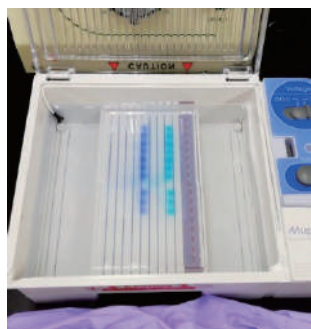


図 4-3 電気泳動の様子

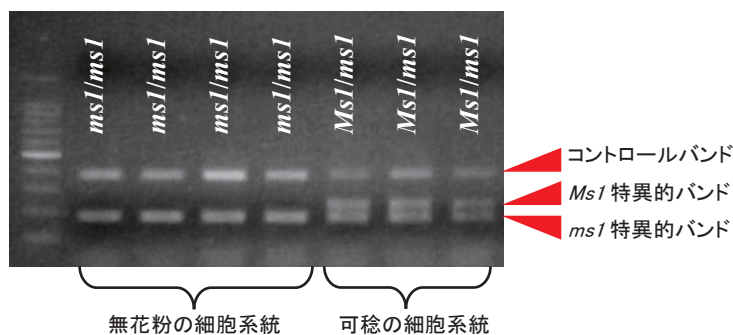


図 4-4 ING マーカーの電気泳動結果と無花粉の判定例

5. 無花粉スギ苗の順化とコンテナ育成

5. 1. はじめに

組織培養により再生された植物体を順化させ、山出しするコンテナ苗の育苗過程について紹介します。各工程の時期等は、新潟県での苗木生産スケジュールを参考にしました。コンテナ苗は普及が進み、森林総合研究所（2019）や各県でもコンテナ苗育成のマニュアルが整備されつつありますので、そちらも参照ください。ここでは JFA-150（全国山林種苗協同組合連合会）を用いた育成例を書きましたが、容量が 300 cc のものやスリットのあるコンテナを使用しても同様に苗が得られています。外気順化後は組織培養由来の苗も通常の苗と変わりはありませんので、各機関で普段行っている方法でコンテナ苗を育成ください。

5. 2. 準備するもの等

- ・育苗用セルトレー（プラントプラグ 200 穴、サカタのタネ）
- ・ピンセット
- ・コンテナ（JFA-150 等）
- ・コンテナ培土
- ・肥料
- ・ボルドー液などの殺菌剤、殺虫剤

5. 3. 手順

5. 3. 1. 培養苗の順化

- ・発芽から約 12 週育成した植物体（図 5-1）を、ピンセット等でプラントプラグに移植します（図 5-2）。
- ・最大でも 10,000 ルクス以下の光強度^{*19}、室温 15～35℃、相対湿度 30～70%^{*20}の環境の温室内で、植物体を外気順化させます（図 5-3）。灌水は、日中 30 分おきに 20～30 秒のミスト灌水と、毎朝 1 回の手灌水を行います（3～4 週間）。



図 5-1 培地で成長した植物体 図 5-2 プラントプラグへの移植 図 5-3 温室での順化と育成

5. 3. 2. プラグ苗の育成

- ・植物体の順化後^{*21}、ミスト灌水を止めて 1 日 1 回の手灌水のみにし、プラグ苗をさら

¹⁹ 光が強ければ、遮光ネットで覆うなどして調節してください。

²⁰ 外気順化を始める時期により大きく異なります。特に調整は必要なく、目安程度に。

²¹ 順調に外気順化して成長していれば、この時期、プラグ側面から発根が確認できます。

に 9～10 週ほど温室内で生育させます。生育環境は、光強度が最大で 25,000 ルクス^{*19}、室温は 15～35℃、相対湿度 30～70%^{*20}。

- ・ 週 1 回、施肥^{*22}を行います。

5. 3. 3. コンテナ苗の育成

- ・ 5 cm ほどの高さに成長したプラグ苗（図 5-4）を、コンテナ（図 5-5）へ移植します^{*23}。
- ・ コンテナ苗を、スプリンクラー灌水（午前中に 15 分灌水、夏季は朝 15 分と夕方 15 分の灌水）された屋外で育成します（図 5-6）。
- ・ 7 月から 9 月の間は、週 1 回施肥を行います。またおよそ 2 週間に 1 回、ボルドー液をまきます。
- ・ 翌秋^{*24}（コンテナに移植後 7～9 ヶ月）、育成したコンテナ苗を出荷します^{*25}。



図 5-4 成長したプラグ苗

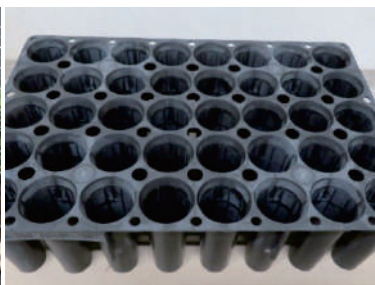


図 5-5 JFA-150 コンテナ



図 5-6 成長した培養コンテナ苗

5. 4. 各工程に必要な期間と調整可能な期間

系統により、またインビトロの培養から外気順化させるタイミング、生育場所の環境により、成長させたコンテナ苗の苗高はここで示した値と異なってくることが予想されます。この際、出荷時の規格に適合するよう、苗の育成の開始時期を各自調整する必要があります。不定胚形成細胞の増殖と維持を続け（第 3 章 3.3.2. 参照）、いつ不定胚の誘導を開始するか、また不定胚を保存しておくことで（第 3 章 3.4. 参照）、苗を出す時期は大きく調整が可能です。以下に各工程に必要な期間と調整可能な期間を示しましたので（図 5-7）、各県の出荷に合わせてスケジュールを設定してください。例えば、春にコンテナ苗を出荷するなら、遅くとも 2 月までに不定胚の発芽誘導を行えば、4 月にプラントプラグで順化開始、7 月にコンテナに移植ができ、翌春（9 ヶ月後）に十分成長したコンテナ苗が得られます。

²² ピータース 20-20-20（ハイポネックス）の液肥を 0.15%（w/v）、など。

²³ 培土はココピートオールド（80%）と鹿沼土（20%）の混合に、N-P-K 養分を追加。

²⁴ 新潟県では、主に秋にスギ苗の植栽が行われます。

²⁵ このとき出荷時の規格（30 cm）に満たなかった苗は、さらに苗畑で育成を続け、翌春または 1 年後の秋に出荷することになります。

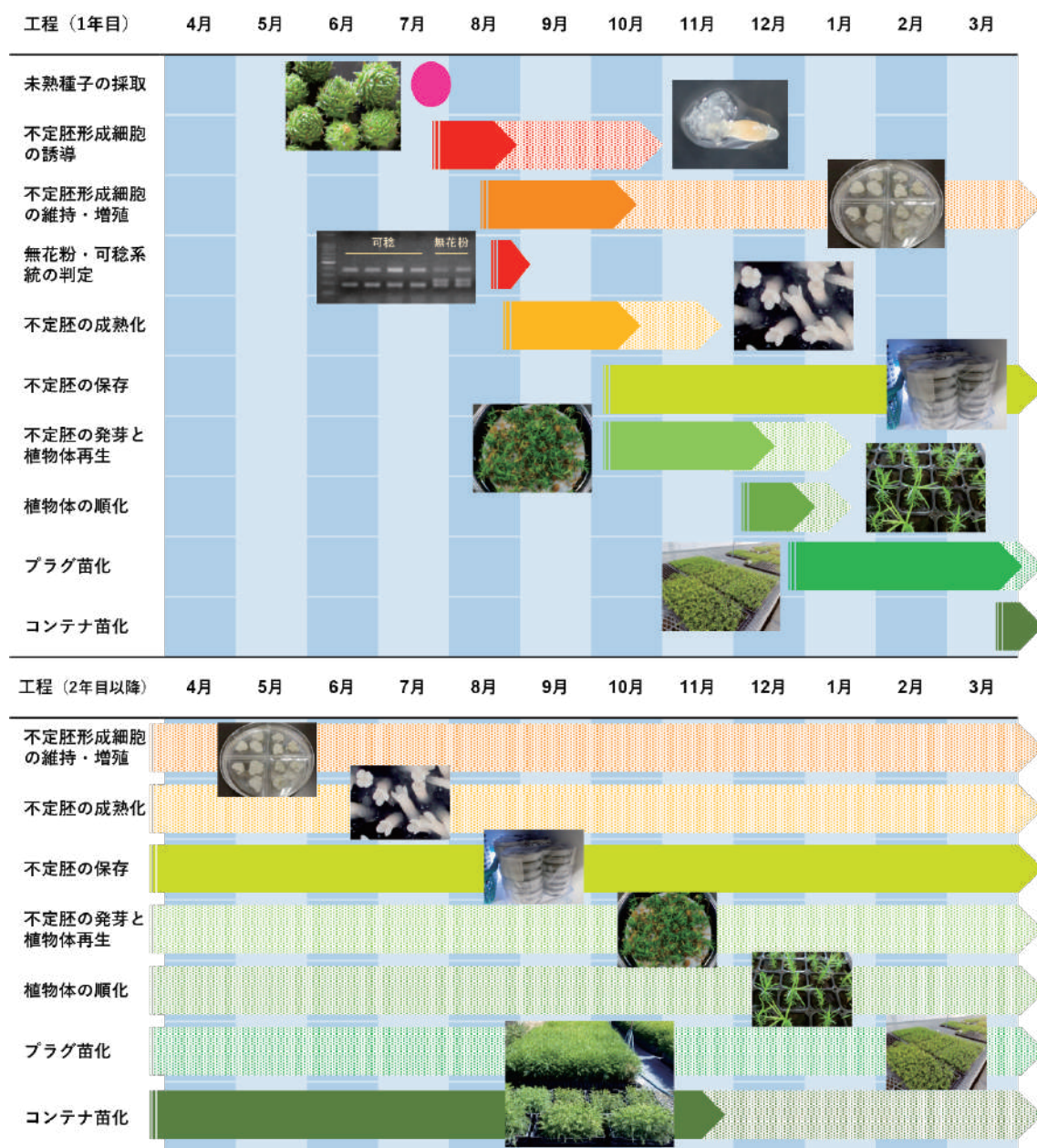


図 5-7. 各工程に必要な期間（実線）と調整可能な期間（網掛け線）

おわりに

このマニュアルの作成にあたっては、新潟県で行われているスギ苗木生産の規格、出荷のスケジュール等を参考にしました。また、プラグ苗の育成は愛知県豊橋市にて行った結果を記しています。交配等の準備、苗の成長等のタイミングは、各県で異なるかと思います。各県の実情に合わせて交配等を行い、出荷までの苗の生育期間と成長は第5章5.4.を参考に調整してみてください。本マニュアルに記載の手法を用いて得られた各工程における培養効率等の結果を附表にまとめましたので、参考にしてください。マニュアルでは特定のメーカーの商品名を記載していますが、これはそれらの使用を推奨するものではなく、附表で示した結果の実施条件を明らかにする目的のためです。組織培養による苗木は林業種苗法では想定されていなかった苗ですが、今後の組織培養由来の苗を山に植栽する行政的な仕組みの整備および本マニュアルの活用により、無花粉スギ苗の流通が促進されることを期待しています。

謝辞

このマニュアルは、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(28013BC)の支援により行われた研究成果の一部です。培養の各工程の検証に当たっては、新潟大学および新潟県森林研究所より提供いただいた無花粉スギ交配系統を外植体として用いました。元キリンホールディングス株式会社の大西昇氏からは、組織培養および育苗のご助言をいただきました。また新潟県森林研究所主任研究員の伊藤由紀子氏には交配等の写真を提供いただきました。森林総合研究所林業生産技術研究担当ディレクターの宇都木玄博士には、第5章についてご意見いただきました。関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 倉本哲嗣・藤澤義武 (2013) 講座：林木育種の現場の ABC (5) 人工交配技術—スギ—. 森林遺伝育種 2: 154–157.
- 丸山毅・細井佳久・二村典宏・斎藤真己 (2014) 無花粉スギ未熟種子からの不定腫形成細胞の誘導. 関東森林研究 65: 107–110.
- Maruyama, T.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.
- Maruyama, T.E., Tsuruta, M., Ueno, S., Kawakami, K., Bamba, Y., Moriguchi, Y. (2022) An improved and simplified propagation system for pollen-free sugi (*Cryptomeria japonica*) via somatic embryogenesis. Frontiers in Plant Science 13: 825340.
- Maruyama, T.E., Ueno, S., Hosoi, Y., Miyazawa, S-I., Mori, H., Kaneeda, T., et al. (2021) Somatic embryogenesis initiation in sugi (Japanese cedar, *Cryptomeria japonica* D. Don): Responses from male-fertile, male-sterile, and polycross-pollinated-derived seed explants. Plants 10: 398.
- 森林総合研究所編 (2019) 新しいコンテナ苗生産方法の提案 第4期中長期計画成果 20 (持続的

林業-2) . 森林総合研究所, つくば.

Tsuruta, M., Maruyama, T.E., Ueno, S., Hasegawa, Y., Moriguchi, Y. (2021a) Marker-assisted selection for pollen-free somatic plants of sugi (Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*): A simple and effective methodology for selecting male-sterile mutants with *msl-1* and *msl-2*. *Frontiers in Plant Science* 12: 748110.

Tsuruta, M., Maruyama, T.E., Ueno, S., Kaneeda, T., Moriguchi, Y. (2021b) Plant regeneration and *in vitro* growth performance of male-sterile somatic plantlets of sugi (Japanese Cedar, *Cryptomeria japonica*) derived from different embryogenic cell lines. *Forests* 12: 1592.

附表: 各工程の効率のまとめ

工程	工程の概要	結果要約*	引用文献
不定胚形成細胞の誘導	7 月上旬から中旬に採取した未熟球果から胚を含む雌性配偶体を単離し、EM-1 培地で 1～3 ヶ月培養	誘導率 (細胞系統ごとの平均値 $\pm$ SD と範囲、以下同様) : $26.0 \pm 18.9 \%$ (0.9～49.9%)	丸山ら 2014; Maruyama et al. 2021
不定胚形成細胞の増殖と継代	誘導された不定胚形成細胞を 2 週間ごとに継代 (EM-2 培地)	細胞系統ごとの増殖率 : 5.3 ± 1.0 倍 (3.5～7.5 倍)	Maruyama et al. 2022
無花粉の細胞系統の判定	InstaGene により不定胚形成細胞から DNA を抽出し、ING マーカーにより無花粉かを判定	無花粉の原因となる変異そのものをマーカーとしたため、100%の精度で判定が可能	Tsuruta et al. 2021a
不定胚の成熟化	不定胚形成細胞を EM-3 培地で 6～10 週間培養	プレートあたり得られる不定胚数 : 243.6 ± 163.7 個 (25.0～513.8 個)	Tsuruta et al. 2021b
不定胚の保存	成熟した不定胚を 5℃ で 0～2 年間保存 (EM-3 培地) した後、EM-4 培地で 8～12 週間培養	保存後の発芽率は保存前と変わらない (有意差無し)	Maruyama et al. 2022
不定胚の発芽と植物体の再生	成熟不定胚を EM-4 培地で 8～12 週間培養	発芽率 : $87.1 \pm 11.9 \%$ (52.1～97.5%) 再生率 : $84.8 \pm 12.6 \%$ (47.7～96.6%)	Tsuruta et al. 2021b
組織培養苗の外気順化と生育	ミスト灌水された温室内でプラントプラグへと移植された培養苗を 3～4 週間育成したのち、手灌水へと切り替える	プラグ苗生存率 : $77.6 \pm 12.1 \%$ (63.9～87.0%) ミスト灌水終了後 9～10 週でコンテナへ移植可能な 5 cm の苗が得られる	Maruyama et al. 2022
コンテナ苗育成	順化したプラグ苗をコンテナに移植し、屋外で 9～16 ヶ月育成	生存率 : $91.7 \pm 7.4 \%$ (89.6～100%) 早ければその年の秋までに山出し可能な 30 cm のコンテナ苗となる	Maruyama et al. 2022

* ここで示された各値は、算出に用いられた細胞系統およびその数が文献ごとに異なることに留意ください。



組織培養による無花粉スギ苗の増殖マニュアル

Manual for the propagation of pollen-free sugi (*Cryptomeria japonica*) via somatic embryogenesis

2022 年 2 月 初版第 1 刷発行

2024 年 10 月 初版第 3 刷発行

編 集：国立研究開発法人森林研究・整備機構
森林総合研究所 樹木分子遺伝研究領域

発 行：国立研究開発法人森林研究・整備機構
森林総合研究所 広報普及科編集刊行係

〒305-8687 茨城県つくば市松の里 1

電話 029-829-8373

E-mail kanko@ffpri.affrc.go.jp

印 刷：朝日印刷株式会社

※ 本誌掲載内容の無断転載を禁じます



国立研究開発法人 森林研究・整備機構

森林総合研究所

Forestry and Forest Products Research Institute

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。