

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02237

研究課題名(和文)新規さし木手法がもたらすさし木発根誘導シグナルの特定

研究課題名(英文)Understanding of a novel signal for tree adventitious root

研究代表者

渡辺 敦史(Watanabe, Atsushi)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：10360471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、さし木による新たな不定根誘導方式である「エア挿し」によって明らかとなった不定根誘導に土や水などの基質が不必要なこと、通常のさし木では確認できない部位から不定根が誘導される現象を明らかにすることを目的とした。不定根誘導に必須とされるオーキシンの受容体遺伝子をスギから単離し、さし木における発現変動を明らかにした結果、穂軸部でもオーキシンの動態が確認された。さらに、いくつかの処理実験から、不定根誘導に水分子が関与することを示唆する結果が得られた。したがって、「エア挿し」による不定根誘導は、水分子の付着がシグナルとして関与する可能性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は、樹木の生育に世界でも最も適した国の一つである。最近、林業等に利点を持つ樹木品種が数多く公表され、これら品種の利用は木材生産だけでなく、スギ花粉症や炭素吸収固定に極めて有効である。これら品種の特性を最大限活用するにはさし木による苗木生産が必須である。しかし、さし木によって不定根が誘導される科学的根拠は不明瞭であった。本研究では、さし木による不定根誘導メカニズムを科学的に理解するための重要なステップであるシグナルとして水分子の関与を初めて明らかにした。本研究は、樹木さし木メカニズムを科学的に理解する一歩であるだけでなく、本成果に基づく苗木生産手法は現場へフィードバックされはじめています。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the fact that the new method of inducing adventitious rooting does not require substrates such as soil or water for adventitious root induction, and that adventitious roots are induced from a site that cannot be confirmed by normal position. I isolated the auxin receptor gene, which is essential for adventitious root induction, from *Cryptomeria japonica*, and found that the expression of the auxin gene varied in the scion. Furthermore, several treatment experiments suggested that water molecules are involved in adventitious root induction. Therefore, adventitious root induction by new method is likely to involve the attachment of water molecules a signal.

研究分野：森林遺伝育種

キーワード：さし木 不定根誘導 シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、空中さし木法(通称「エア挿し」と名付けた新たなさし木手法の有効性を明らかにし、特許化した。本手法は、十分な灌水条件下で採取した枝(穂)を立てかけておくだけで根(不定根)を誘導する手法であり(図1)、用土へのさし付けは行わない。本手法は、用土を利用しないため労力や経費の大幅な省力化に寄与し、特別な施設も必要としない。本手法による不定根誘導は、最初に試験したスギ以外にも造林対象となる多くの針葉樹類、不定根誘導が一般的に難しいとされる広葉樹の一部にも適用できることを確認しており、現在、さし木生産が盛んな九州地域の産学官各機関が連携し、農林水産省プロジェクトとして「エア挿し」に基づく苗木生産体系確立に向けた取り組みが行われている。

さし木による不定根は、穂を採取する際の切断によって生じる傷害をシグナルとして、傷害応答によって誘導される植物ホルモンなどの内的要因と温度・水・光などの外的要因が相互に影響することによって生じると考えられている。国内の樹木では、スギを中心として植物ホルモン処理の効果や温度・光環境による不定根誘導への影響に関する研究が1960~70年代を中心に盛んに行われた。しかし、不定根誘導の難易は使用するクローンによって影響することもあり、不定根誘導の最適な外的要因に関する知見は樹木において必ずしも明確ではない。

一般的にさし木をする際に採取した穂は、用土にさし付けた地下部から根系を発達させ、地下部は、地上部とは異なる組織/器官へと変化する。申請者らは、さし木に利用される用土も含め複数の用土の三相分析を行い、用土が示す固有の気相と液相の比が不定根誘導の成否と関連することを明らかにした(4)。さらに、申請者らは、19,200遺伝子を搭載したマイクロアレイチップを利用して同じ穂の地下部と地上部における変化を遺伝子発現レベルから明らかにした結果、さし付け3日目頃には地上部の遺伝子発現は採取前の枝と同様の遺伝子発現へと回復するのに対し、地下部では採取した枝とは全く異なる遺伝子発現へと変化することを明らかにしている。実際、さし付け深さを段階的に変化した場合には、深さに応じて根が出現する深さも変化する。発根は地下部に制限される(図2)。これらのことから、申請者らはさし木の際に利用する用土は不定根を誘導する傷害以外の重要な外的要因の一つであると考えてきた。しかし、「エア挿し」の結果は、さし付け時に使用する用土は不定根の誘導に必須要因では無いことを示しており、むしろ、用土は不定根が発生する範囲を規定する要因であることが示唆された。用土による制限がない「エア挿し」では傷害部位付近から離れた穂の先端部付近でも不定根が認められ、穂によっては軸部全体で不定根が認められることがある(図3)。しかし、さし木手法の違いにより不定根誘導部位が変化することに対する科学的根拠は不明である。

申請者らは、取り木による技術を利用し、3年生苗に傷処理を行い(対照は無処理)、ホルモン処理を組み合わせた試験を行った結果、ホルモン処理の有無に関わらず、傷処理した場合のみ不定根が傷害部位付近に認められることを確認している(図4)。さし付け深さを段階的に変えた試験でも、不定根の多くは切断した部位付近で認められ、定説通り傷害は不定根が誘導されるための必須シグナルであることは間違いない。しかし、発根は傷害部位から離れた地下部の地際付近でも認められ、「エア挿し」に至っては、穂の軸部全体でランダムに発生し、傷害との関連性



図1_エア挿しの風景
穂を網に立てかけるだけで不定根を誘導できる。写真内矢印は誘導された不定根を示している。

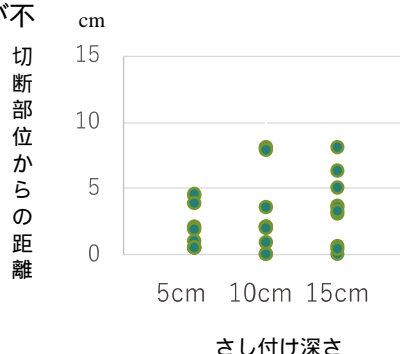


図2_さし付け深さを変化した際の根が出現する部位の変化
上図はさし付け深さを変えた試験のイメージ。下図は実際に5~15cmのさし付け深さで出現した切断部位からの距離(cm)を示している。

は不明瞭である。マイクロアレイ分析の結果も傷害部位から離れた地上部では、傷害による影響は比較的早い段階で消失する。むしろ地上部と地下部の外的要因の相違が遺伝子発現に影響をしていることを示唆している。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでの研究から通常のさし木で観察される地下部と「エア挿し」による穂の軸全体にランダムに発生する不定根の発生（発根）の相違には、何らかの外的要因が作用する結果と仮定した。これは、傷害に続く、不定根誘導を決定または規定する何らかの外的要因がシグナルとして作用する、とする仮説である。本申請課題では、「エア挿し」と通常さし木の比較研究を行うことで、樹木、特に針葉樹類における新たな不定根誘導シグナルの存在を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. AUX 受容体遺伝子の単離

挿しつけ 4 週目の穂の葉部分から RNA を抽出し、サンガー法により配列を決定した。単離した配列と造林学研究室で保有するスギ遺伝子データベースからスクリーニングした AUX 受容体候補配列を比較し、スギ穂木で発現する遺伝子配列を特定した。

3-2. AUX 受容体遺伝子発現量比較

寒冷紗を利用して光量が 100・50・5% になるような条件でそれぞれ挿し木を行い、挿しつけ後、2・6・10 週目の穂木の頂端部と基底部を採取した。採取は 3 本の穂木に対してそれぞれ行った。採取したサンプルから RNA を抽出し、逆転写後 qPCR を行った。相対発現量は $\Delta\Delta Ct$ 法によって算出し、差しつけ時の AUX 受容体遺伝子発現量に対する各光量の AUX 受容体遺伝子発現比を求めた。

3-3. 光量による発根重量変動確認

寒冷紗を利用して光量を 100・62・50・25・5% に調整し、それぞれの条件で挿し木を行った。挿しつけは各光量とも 10 本とし、挿しつけ 12 週目に発現していた不定根を採取した。採取した不定根は 60 で 6 時間乾燥させた後、重量を測定した。有意差は多重比較検定によって求めた。

3-5. 水と不定根形成の関係

図 5 のような処理を施したエア挿しを行い、切断部から離れた位置での発根の有無を確認した。本研究では、飼肥 1 号と玖珠 12 号を使用し、穂木への処理には水保持能力の違いが期待されるわたと土の 2 素材を用いた。



図 3 「エア挿し」における不定根が誘導される部位
スギ穂の軸からも不定根が誘導されている（記号で示した部分）

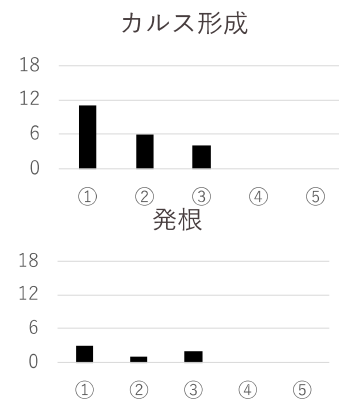


図 4 傷害とホルモン処理によるカルスと発根の関係
縦軸は個体数、横軸 ~ は処理の違いを示す。

傷害のみ
傷害+オーキシシン
傷害+エチレン
オーキシシンのみ
エチレンのみ

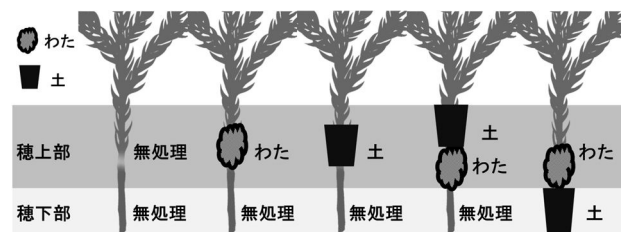


図 5_ 水条件の処理一覧

3-6. ワセリン処理による不定根形成部位の制御

供試したクローンは飢肥署 1 号・県玖珠 12 号・県日田 20 号である。ワセリンは、穂の上側・下側・全体・片側に塗布し、

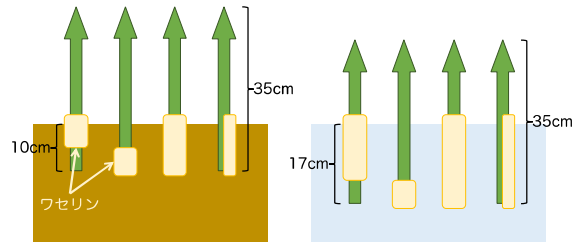


図 6_ ワセリン処理の概要

それぞれ土または水を基質としたさし床に挿しつけた (図 6)。供試した本数は 12

本/系統/処理区である。挿しつけは 2022 年 4 月 13 日に行い、発根評価はおおよそ 3 ヶ月後となる 2022 年 7 月 25~29 日に行った。評価項目：総発根本数 & 発根範囲の下限・上限 (0.5cm 単位) 『どこからどれだけ出てきたか』で行った。

4. 研究成果

4-1. AUX 受容体遺伝子の単離

スギ遺伝子データベースから確認した 5 AUX 受容体遺伝子候補配列のうち、穂木で単離されたのは被子植物で AUX 受容体遺伝子とされる配列と単系統群を形成した 3 配列であった (図 7)。そこで、以後はこれら 3 候補配列を対象として遺伝子発現解析を行った。

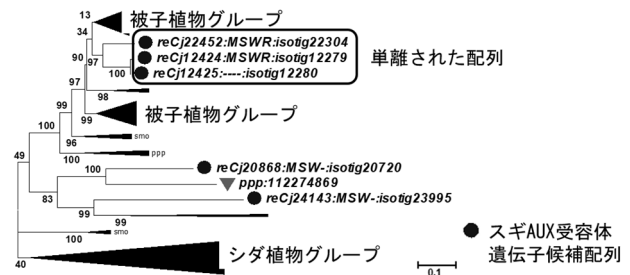


図 7_ KEGG に登録されたアミノ酸配列に基づくスギ AUX 受容体遺伝子の NJ tree

4-2. AUX 受容体遺伝子発現量比較

各光量で挿しつけた穂木の AUX 受容体遺伝子の発現を時系列に従って分析した。その結果、3 候補遺伝子のうち、1 遺伝子で挿しつけ 2 週目の基底部分で光量に従った遺伝子発現の変動が示唆された。頂端部でもわずかにその傾向は認められた。一方で、挿しつけ 6 および 10 週目では光量による明確な差は認められなかった (図 8)。

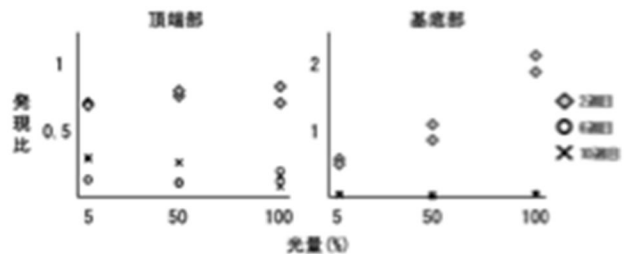


図 8_ 挿しつけ開始時と比較したスギ AUX 受容体遺伝子発現比

4-3. 光量による発根重量変動確認

光量が多いほど不定根の重量は増加しており、遮光による自然光の制限は発現する不定根量に影響を与えることが示唆された (図 9)。

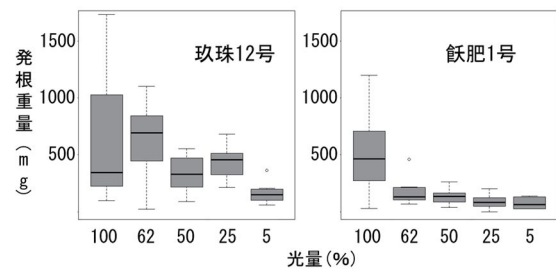


図 9_ 挿しつけ 12 週目の穂木から発現した不定根の乾燥重量

供試した 2 クローン間には光量に従った発根重量変動の様子に差が認め

られ、飢肥 1 号では遮光度 38% から大きく重量が減少したのに対し、玖珠 12 号では光量の減少に従って発根重量も減少していた。多重比較検定では、飢肥 1 号では 100%-25%、100%-5% 間、玖珠 12 号では 100%-5%、62%-5% 間で 5% 水準の有意差が確認された。この結果は、光量が制限された場合、十分な不定根量が得られないことを示している。

4-4. 水と不定根形成の関係

Bao et al (2014) は、水の接触が側根の発現位置を規定することを報告しており(4) スギ不定根でも水が発現位置を規定している可能性が考えられる。そこで、穂木の水条件を変化させた挿し木試験を行い、水の条件変化による発根位置の変化を確認した。

穂全体での不定根の発根率と、切断部から離れた穂上部からの発根率は表1に示した。切断部から離れた穂上部での発根が確認されたことから、装着物によって保持された水が穂上部での発根を誘導した可能性が示唆された。加えて、わたを穂上部に装着した場合、穂下部が無処理であれば上部から発根するのに対し、下部が保水能力に優れる土であれば上部から発根しない事から、穂木は水保持力の差を感知している可能性も示唆された。

表 1_水条件を変化させた挿し木試験の発根率と切断部から離れた穂上部からの発根率(%)

クローン	飼肥 1 号				
	穂上部	わた	土	土+わた	わた
穂下部	無処理	無処理	無処理	無処理	土
供試数	24	10	10	10	10
発根数	5	4	9	7	10
発根率	20	40	90	70	100
穂上部発根率	—	10	20	20	0

クローン	玖珠 12 号				
	穂上部	わた	土	土+わた	わた
穂下部	無処理	無処理	無処理	無処理	土
供試数	30	9	10	10	10
発根数	2	0	6	4	9
発根率	10	0	60	40	90
穂上部発根率	—	0	0	10	0

4-5. ワセリン処理による不定根形成部位の制御

穂にワセリン処理した結果、ワセリン処理分では不定根形成は認められなかった。このことから、不定根形成には水分子がシグナルになる可能性が高いと考えられる。さらに、水挿しでは、水深が深くなるに従って不定根が発生しなかった。これは溶存酸素が影響していると考えられる。

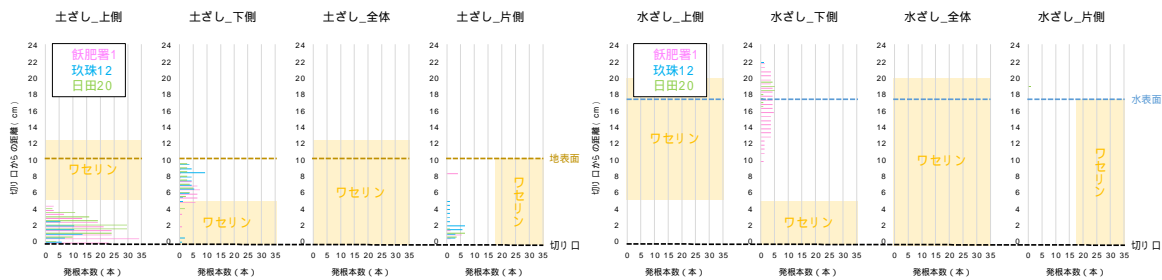


図 10_ ワセリン処理後の土挿し(左)と水挿し(右)の発根部位

まとめ

本研究から、水分子が穂に作用し、オーキシン誘導を促進させることが示唆された。これは、針葉樹不定根形成に Hydropatterining が関与している可能性を示唆するものである。酸素については、シグナルとして作用するのか、細胞形成を促進させる上で必要なのか、今後検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田淳之介・栗田学・田村美帆・渡辺敦史
2. 発表標題 スギ不定根形成に対する光量の影響
3. 学会等名 森林遺伝育種学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	栗田 学 (Kurita Manabu) (40370829)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	福田 有樹 (Fukuda Yuki) (50781621)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・研究員 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------