

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19380023

研究課題名(和文) シロイヌナズナ側根発生システムの解明に基づく果樹ミクロ挿し穂の発根改善

研究課題名(英文) Improvements in rooting of microcuttings of fruit trees by applying the findings in development of lateral roots of *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

鉄村 琢哉(TETSUMURA TAKUYA)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00227498

研究成果の概要(和文): 屈曲した培養根は多数の側根を形成するというシロイヌナズナで認められた知見をもとに、バーミキュライトを添加し、ゲルライトで固化した培地を根発達培地として使用することにより、カキ栽培品種およびマンゴー実生由来のミクロ挿し穂から発生した1次根に側根を形成させることに成功した。この根発達培地は発根能力の低いニホンナシ栽培品種やマンゴー実生由来のミクロ挿し穂の発根率を向上させた。シロイヌナズナの側根形成に関わる遺伝子解析のための変異系統の作出に成功した。

研究成果の概要(英文): We had shown that waving primary roots of *Arabidopsis thaliana* produced more lateral roots than straight roots, and then, by using vermiculite-containing and gellan gum-solidified medium as a root development medium, we were successful in inducing lateral roots from adventitious roots produced from microcuttings of kaki cultivars and mango seedlings. The root development medium also improved rooting of the microcuttings of Japanese pear cultivars of low-rooting-ability and mango seedlings. To analyze the genetic makeup of lateral roots, we produced mutated strains of *Arabidopsis thaliana* having many lateral roots and few lateral roots.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 6,200,000 | 1,860,000 | 8,060,000 |
| 2008年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2009年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 2010年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,700,000 | 4,710,000 | 20,410,000 |

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学、造園学

キーワード：果樹、発根、ミクロ挿し穂

1. 研究開始当初の背景

組織培養によるクローン苗の大量増殖は花きなどの草本植物を中心にして実用化している。一方、木本植物の果樹では、わい性台木や自根苗の大量増殖が必要であることがわかっているものの、未だに組織培養による大量増殖は実用化のレベルには達していない。その理由の1つに、発根から鉢上げ・

順化のプロセス中での培養体の損失が非常に多く、コストがかかりすぎてしまうことがあげられる。今まで、この問題解決のために植物調整物質の種類・濃度の検討や鉢上げ方法の工夫等に実験目的がおかれてきたが、いっこうに解決のめどが立たないのは、ミクロ挿し穂に『発達した根系』を作り、順化・鉢上げ中の枯死や生育停止を減らすという実

験目的がおろそかにされてきたからだと考えられる。カキのミクロ挿し穂の発根は一般的に、全く側根を形成せず、貧弱な根系となっており、そのような幼植物体の鉢上げ中の枯死率は高く、たとえ生存しても成長速度は非常に遅く、苗として大きくするまでに長期間を要し、コストがかかり実用的でない。一方、草本植物の培養体から発生した根は、多くの側根を有しており、鉢上げが容易であり、鉢上げ後の成長も滞ることがない。側根の多い植物体は根端分裂組織が多く、そこで生産されるサイトカニン量が増加し、植物体の成長がおう盛になることは、多くの植物で認められており、組織培養で得られる幼植物体の成長にも当てはまるであろう。研究代表者は英国ノッティンガム大学のベネット教授の研究室で在外研究中にモデル植物であるシロイヌナズナの波形の根が、直線に伸びた根よりも多くの側根を発生させることを明らかにした。しかも、それらの根は屈曲部の頂点で多くの側根を発生させることを見つけ、分子生物学的な側根形成の仕組みを一部明らかにした。

2. 研究の目的

側根を形成しない果樹のミクロ挿し穂に側根を形成させることが本研究の主目的であり、同時に発根率の向上も目指す。そして側根を持つ充実した根系を有する幼植物体の鉢上げ成功率を高めることが目標である。そこで、果樹のミクロ挿し穂に波形あるいはそれに似た根を形成させるために、発生した後の根が伸長するための根発達培地を改良することが必要となってくる。ミクロ挿し穂から発生した不定根（一次根）は、通常濃度の寒天培地中では重力屈性のみで垂直に成長する。研究代表者らは、シナノグミのミクロ挿し穂の発根実験の際、ゲルライト（寒天）にパーミキュライトを添加した培地を使用した。これはクルミ雑種のミクロ挿し穂の発根率を改善するために開発された培地であったが、代表者らは発根率の向上のみならず、側根（二次根）の発生を促したことも明らかにした。また、ニホングリ実生のミクロ挿し穂を発根処理した後、上記と同じ培地に植えたところ、ゲルライトのみの培地に植えたものよりも発根率は高いうえ、発根したミクロ挿し穂の鉢上げ成功率も高く、鉢上げ後の成長も速かったことを明らかにした。これは、パーミキュライトに接触した一次根が曲がりながら下方へ伸長し、曲がった部分から二次根が発生し、充実した根系が形成されたことによるものだと推察される。以上の知見は予備的な実験の結果であり、詳細な処理区の設定は行っておらず、発根培地のさらなる改良が必要である。代表者は上記のカキ、クルミ、クリ以外にもニホンナシやブルーベ

リーなどの果樹も茎頂培養系を確立しており、マンゴーやライチなどの熱帯果樹の茎頂培養に着手した。これらの果樹においても同様の傾向が明らかになれば、多くの果樹の組織培養に適用できる技術になるだろう。

一方、ベネット研究室では、側根形成に関わるオーキシンの役割を組織レベルで調査している。その一つとしてオーキシンに対する反応性の異なるシロイヌナズナ変異体のスクリーニングを行い、側根形成に関わる遺伝子解析について実験を進めている。この研究に参画し、関連する遺伝子の情報を得れば、果樹のミクロ挿し穂では発根中にそれらの遺伝子がどのように働いているか明らかにすることができるだろう。

3. 研究の方法

ミクロ挿し穂の発根および側根形成に及ぼす根発達培地の影響を明らかにするために、茎頂培養由来のミクロ挿し穂を大量に得ることのできるニホンナシ栽培品種、カキ栽培品種および台木、ブルーベリー栽培品種などを実験に供試する。今までの実験においてゲルライトにパーミキュライトを添加した根発達培地での側根形成促進効果が認められたシナノグミ栽培品種およびニホングリ実生のミクロ挿し穂の根発達培地を参考にし、基本培地をゲルライトで固化した培地、基本培地をゲルライトで固化する際にパーミキュライトを添加した培地、およびパーミキュライトに液体の基本培地を加えた3種類の根発達培地が発根率、側根発生率、鉢上げ成功率、鉢上げ後の成長速度に及ぼす影響について調査を行う。発根誘導のためのIBAを使用した発根処理は、各ミクロ挿し穂に最適な方法を用いる。パーミキュライト添加のゲランガム固化培地することにより、発根率等の低下が認められる場合は、基本培地量とパーミキュライト量の比率を変えて実験を行い、最適比率を求める。一方、側根形成に関する品種や系統間差も明らかにし、側根形成率と鉢上げ成功率との関係を調査する。また、パーミキュライト添加の固化培地を使用により発根率や側根形成率が改善するものの、その率が絶対的に低い値の場合は、基本培地の濃度や種類を変更して実験を行い、栄養条件が側根形成に及ぼす影響を明らかにする。なお、マンゴー実生やライチ、ニホングリ栽培品種などについては茎頂培養系が確立していないので、まず、それらを確立して、大量のミクロ挿し穂が得られるようになってから、ニホンナシと同様の実験を行う。さらにニホングリ栽培品種においては、外植片導入時の培養器へのフィルター装着が有効であることがわかっていることより、エチレンの関与が考えられていること、また実生においてはパーミキュライト添加のゲルライト固

化培地の有効性が確認されていることより、ニホングリ栽培品種ミクロ挿し穂の根発達培地を使った実験においては培養器内のエチレン濃度を測定し、側根形成とエチレンとの関連を明らかにする。

ニホングリ栽培品種は挿し木が難しく、また発根後の生存率（活着率）も低いため、発生した根が伸長する挿し床の培土を変えることにより側根がより多く形成され、活着率を向上できるかどうかを試みる。

一方、シロイヌナズナの側根形成に関する変異体のスクリーニングに関しては、まず、EMS により側根の形成に変異を起こした、すなわち側根多形成系統、側根少形成あるいは側根無形成系統などの M2 系統群の 2 次スクリーニングを行う。その後、それらの変異体の自殖を行い、変異を確認しながら、固定を進める。固定できた系統に関しては、遺伝子構造の解析を行ってもらうため、種子をベネット教授へ渡し、側根形成に関わる新たな遺伝子がないかどうか探査してもらう。

4. 研究成果

得られた成果について各植物別に以下に列記する。

(1) ニホンナシ

ニホンナシ栽培品種‘長十郎’、‘豊水’、‘菊水’、‘幸水’および‘20 世紀’のミクロ挿し穂を IBA5 μ M (‘長十郎’のみ 10 μ M) で 5 日間暗黒処理した後、3 種類の根発達培地〔ゲルライト固化培地、パーミキュライト添加のゲルライト固化培地（混合培地）、液体培地を添加したパーミキュライト〕で発根させたところ、発根率の低い、すなわち発根能力の低い品種で混合培地での発根率が高くなった。混合培地の使用による発根数の増加や 2 次根発生率の改善は確認できなかったものの、鉢上げ成功率は高い傾向にあった。混合培地での発根率が全体的に高かった結果、発根処理したミクロ挿し穂に対する鉢上げ個体の獲得率はゲルライト固化培地よりも混合培地の方が有意に高く、混合培地の優位性が示され、クリやクルミなどと同様の結果になった。なお、‘長十郎’では、IBA5 μ M 発根処理では、全く発根しなかったため、IBA 濃度を倍以上にして発根処理することにより、発根させることができた。そして、他の発根能力が低い品種と同様、混合培地の使用による発根率の改善を示すことができたと同時に、鉢上げ成功率も混合培地で高い傾向にあることを明らかにした。

混合培地の使用により、発根能力の低い品種の発根率は改善されたものの、依然として発根率は 50% 以下と低かったため、混合培地に添加する基本培地の再検討を行った。すなわち、増殖用培地として有効であった MW 基

本培地の半量 (1/2MW) だけでなく、1/2MS や 1/2WP などの基本培地も混合培地に添加する基本培地として使用した。その結果、発根能力の低い‘豊水’ミクロ挿し穂において、基本培地を 1/2MW から 1/2WP に変更することにより発根率が高まるだけでなく、総根長は長くなり、2 次根発生率も高くなった。ただし、全ての処理区に混合培地を用いたこともあり、鉢上げ成功率は全ての基本培地で 100% であった。一方、発根能力の高い‘幸水’ミクロ挿し穂は基本培地の違いにより発根率が変化することはなかったが、総根長は 1/2WP が優れ、発根処理したミクロ挿し穂に対する鉢上げ個体の獲得率は 1/2MW 基本培地よりも 1/2WP 基本培地の方が高い傾向にあった。なお、1/2MS 基本培地を添加した混合培地は発根率等を改善しなかったことより、混合培地中の無機塩類濃度あるいはその比率は、根の発達に大きな影響を与えることがわかった。

(2) カキ

カキ 4 品種およびわい性台木 4 系統のミクロ挿し穂もニホンナシと同様の 3 種類根発達培地で発根させたが、混合培地や液体培地添加のパーミキュライトの培地で枯死するミクロ挿し穂が多く、一定した傾向が見られなかったため、発根容易なわい性台木系統 MKR1 と発根困難な栽培品種‘太秋’の 2 つに絞り、ゲルライトとパーミキュライトの混合比を様々に設定して発根実験を行った。すなわち今まで用いてきた培地とパーミキュライトとの比率を体積比で 4 対 5 にするだけでなく、それぞれ 6 対 5、8 対 5 と培地の割合を高めたものも根発達培地として用い、ゲルライト固化培地を対照区として、ミクロ挿し穂基部を 5 秒間 IBA1 . 25mM 浸漬処理して根発達培地に植え付け発根に関する調査を行った。その結果、培地の割合を高めることによりミクロ挿し穂の生存率が高まることがわかった。すなわち、培地の割合が高まることは、培地中の空隙の減少を意味し、カキのミクロ挿し穂の生存にはシュート基部が培地に触れていることが必要であることが示唆された。‘太秋’ミクロ挿し穂の発根率については、4 対 5 の培地ではミクロ挿し穂の枯死率が高いため、発根率は低くなったが、パーミキュライトに対する培地の割合を高めることにより、生存率が高くなると同時に発根率も高まった。総根長および根数に関しても、6 対 5 や 8 対 5 の培地で優れる傾向にあり、それらの培地では側根の形成も認められたが、1 ~ 2 割程度の発生率であり、鉢上げ成功率には影響がなかった。一方、MKR1 については‘太秋’のような傾向は見られず、ニホンナシと同様、発根能力の高いミクロ挿し穂にお

いて混合培地の有効性の無いことが確認された。

その後、新たにわい性花木3系統を追加して同様の実験を行ったが、全て発根率が高く、発根能力の高い系統を使用した実験で得られた結果と同様、パーミキュライトの添加による発根率等の改善効果は見られなかった。

(3) ブルーベリー

まずハイブッシュブルーベリー4品種‘オニール’、‘パークレー’、‘ブルークロップ’および‘アーリーブルー’を用いて、増殖用基本培地の再検討を行い、従来使用されていたWP培地よりもMW培地の方がシュートの成長が良好なことを明らかにした。その後、MW培地で伸長した‘パークレー’、‘ブルークロップ’および‘アーリーブルー’シュートよりマイクロ挿し穂を作成し、3種類の根発達培地で発根実験を行ったが、品種により発根率はばらつき、一定の傾向は見られなかった。ブルーベリーのマイクロ挿し穂はオーキシン無処理でも発根するほど発根容易で、発生した不定根は細く、また多数の側根を形成し充実した根系を作り、ほぼ100%鉢上げ可能であった。挿し木発根能力の高いブルーベリーは、マイクロ挿し穂においても発根能力は高い上、発生した根が非常に細いため、培地の種類に関わらず、屈曲しながら根が伸長していくことが原因であると考えられた。このような細根を持つ植物、すなわち草本性植物に近いものは、混合培地の利点は生かされないと考えられた。

(4) ニホングリ

まず、‘筑波’、‘銀寄’、‘丹沢’、‘利平’および‘ぼろたん’の5栽培品種を用いて挿し木に関する実験を行った。種々の培土で挿し木したが、全体的に発根率が低く、根系の発達レベルを比較できるほどの発根した挿し穂数を得ることができなかった。そこで、挿し穂の生存率を高めるミスト装置を作成し、3年間にわたって挿し木を試みたが、システムの調整が難しく、一定した結果を得ることができなかった。

一方、上記5品種のマイクロ繁殖を試み、試験管内の外植片の導入とシュート伸長には成功したが、効率的なシュート増殖方法を開発することができなかったため、根発達培地容器内のエチレンの増減とマイクロ挿し穂の側根形成の関係について明らかにすることはできなかった。

(5) マンゴー

世界的にも報告例のほとんどないマンゴーのマイクロ繁殖を確立するために、‘アーウィン’実生を材料にして外植片の導入を行った。コンタミネーションの発生をほぼ抑え、

その後のシュート伸長にも成功したので、効率的な増殖を行うための実験(サイトカイニンの種類や濃度の検討)を行いながら、実験の結果で得られたマイクロ挿し穂を用い、発根実験を行った。

まず、IBA処理や暗黒処理がマイクロ挿し穂の根原体の形成に必要であることを明らかにするとともに、IBA長期処理は根数の増加に影響を及ぼさないどころか、根の伸長に阻害的であることも明らかにした。ただし、これらの実験は、ゲランガム固化培地で行ったため、側根は全く形成されなかった。そこで混合培地と基本培地を組み合わせ、IBA25 μ M+暗黒3日間同時処理を行ったマイクロ挿し穂を、1/2WPあるいは1/4WP基本培地にパーミキュライト添加の混合培地に植え付けたところ、ゲランガム固化培地と比較して1/4WPを基本培地として使用した混合培地において発根率が向上した。1/2WPを基本培地として使用した混合培地では発根率の向上は観察されなかったが、総根長の有意な増加および側根形成は1/4WPを基本培地とした混合培地と同様に観察され、混合培地の有効性が示された。現在、これらの発根した挿し穂を用い、鉢上げ実験中である。

(6) ライチほか

ライチ実生由来の外植片を試験管内に導入してシュート増殖を試みた。シュート伸長までは成功したものの増殖に成功しなかったため実験に供試できるほどのマイクロ挿し穂を得ることができなかった。なおストロベリーグアバおよびイエローストロベリーグアの外植片導入はコンタミネーションの発生が著しく、外植片の定着すら出来なかった。

(7) シロイヌナズナ

EMS処理したM1種子を用い、側根多形成系統や側根未形成系統のスクリーニングを行った。まず、処理した種子の自殖後代の実生を検定し、側根発生に関わる変異発生率の高いM2系統を選抜した。それらの系統について再度、実生を選抜し、自殖してM3種子を得た。その後、形質の固定を進めるために以上の操作を繰り返し、いくつかのM6系統(種子)を獲得した。しかし、側根未形成系統は成長が著しく劣るため、選抜することが非常に難しく、側根少形成系統のスクリーニングを行うことに変更した。しかし、側根少形成系統も、成長の劣る系統が多く、種子の採取に困難をきたし、時間がかかったが、M5種子まで得ることができた。固定化できた系統(種子)は共同研究者の英国・ノッティンガム大学のベネット教授へ手渡した。その後、変異を生じた部分の遺伝子構造の解析をするためのスクリーニングが彼の研究室で行

われた後、遺伝解析が進められている。

(8) まとめ

以上の結果より、混合培地は発根困難な果樹のミクロ挿し穂においては発根率の改善に有効であることがわかった。また、発根した根からの側根形成は、側根が形成しにくいミクロ挿し穂に関しては混合培地が有効であることもわかった。ただし、ニホングリ実生のミクロ挿し穂のように側根数の大幅な増加が認められない限り、発根したミクロ挿し穂の鉢上げ成功率には大きな影響を及ぼさないこともわかった。シロイヌナズナ変異系統の遺伝子解析やマンゴーミクロ挿し穂の鉢上げ率の調査等の実験は継続中であり、その成果が期待される。

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5件)

Takuya Tetsumura, Kazumi Irishima, and Chitose Honsho. Development of *in vitro* root system from microcuttings of fruit trees. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society. 査読無. Vol. 58. 2009. 474-477.

Takuya Tetsumura, Yasuyo Matsumoto, Makiko Sato, Chitose Honsho, Kensuke Yamashita, Haruki Komatsu, Yasuhiro Sugimoto, Hisato Kunitake. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. Scientia Horticulturae. 査読有. Vol. 119. 2008. 72-74. <http://hdl.handle.net/10458/2763>

T. Tetsumura, S. Haranoushiro, C. Honsho. Improvement of rooting of cuttings of a dwarfing rootstock for kaki and its micropropagation. Acta Horticulturae. 査読有. Vol. 833. 2008. 177-182. http://www.actahort.org/books/833/833_28.htm

[学会発表](計6件)

Tetsumura, T., Ishimura, A., Aikou, Y., Eguchi, N., Kai, Y., Tashiro, K., Honsho, C. Vermiculite-containing and gellan gum-solidified medium improves rooting of microcuttings of Japanese pear cultivars. 28th International Horticultural Congress. Oct. 24, 2010. リスボン会議場(ポルトガル、リスボン)【Invited speaker】

鉄村琢哉・石村麻美・愛甲優瑞美・江口奈々・甲斐由利加・本勝千歳、ニホンナシ栽培品種のミクロ繁殖における基本培地と発根培地の再検討、園芸学会平成21年度秋季大会、平成21年9月27日、秋田大学手形キャンパス

鉄村琢哉・入嶋和美・本勝千歳、果樹ミクロ挿し穂の*in vitro*での根系発達、国際植物増殖者会議日本支部第15回茨城大会、平成20年10月18日、つくば国際会議場

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鉄村 琢哉 (TETSUMURA TAKUYA)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00227498

(2)研究分担者

本勝 千歳 (HONSHO CHITOSE)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：30381057

(3)連携研究者

研究者番号：