

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 5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21380196

研究課題名(和文) 熱帯林再生基盤としてのアカシア早生樹の大量増殖および不稔化技術の開発

研究課題名(英文) Development of the methods for mass propagation and production of sterile strains of fast growing timber tree crop of Acacia.

研究代表者

三位 正洋(MII MASAHIRO)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：30093074

研究成果の概要(和文)：

熱帯林木として重要な *Acacia mangium* およびその *A. auriculiformis* との種間雑種数系統に関して、組織培養によりカルス及び多芽体を経由した効率よい苗の大量増殖法を開発した。ついでこの培養系を用いて、アグロバクテリウムを用いて遺伝子導入を行い、形質転換したカルスと不定芽原基を誘導することが出来た。また、*in vitro* 苗の腋芽を数種の倍加剤で処理することにより、4倍体を作出することができた。

研究成果の概要(英文)：

Efficient method for micropropagation of *Acacia mangium* and its interspecific hybrids with *A. auriculiformis* was established through callus and multiple shoot formation. By utilizing this system, transgenic callus and shoot primordia were obtained through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method. Tetraploid plants were also obtained by treating axillary buds of *in vitro* propagated plantlets with some chromosome doubling agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：林木、バイオマス、形質転換、大量増殖、組織培養、遺伝子組換え、染色体倍加、熱帯林再生

1. 研究開始当初の背景

アカシア属(*Acacia*)植物は東南アジアやオセアニアなどの熱帯から亜熱帯地域を中心に分布するマメ科の植物であり、建築材、薪炭材、花木・緑化樹、タンニン等の二次代

謝産物資源等幅広く利用される有用植物を多く含んでいる。なかでもマンガウム種(*A. mangium*)は、その旺盛な成長と比較的材質のよいことから10年程度の短期間で収穫可能な建築材として注目されている。さらにアカ

シアは、根が窒素固定能力を持つためにやせた土地でも生育可能であり、ユーカリのような過度の土壤養分収奪を起こさないことから、東南アジアの熱帯地域において持続的林業を可能にする早生樹として、急速にその植林面積を拡大している。また最近では、本種とその近縁種 (*A. auriculiformis*) との自然交雑によって得られた種間雑種が、生育、通直性、材質等で *A. mangium* よりも優れていることが判明し、その急速な増殖技術の開発と積極的な育種による優良系統の作出が望まれている。しかしその一方では、これらの種とその雑種が旺盛な種子繁殖能力を有することから、自生熱帯林への外来種による浸食を引き起こすのではないかと憂慮されている。こうした状況から、今後の熱帯林業に不可欠な *A. mangium* およびその種間雑種の優良系統を対象に、組織培養を利用した苗の大量増殖法の開発、およびその組織培養法を利用した遺伝子組換えおよび倍数体を利用した不稔性個体の作出が望まれていた。

2. 研究の目的

熱帯早生アカシア樹種の優良系統を短期間にクローン増殖し、積極的に植林するための手段として、組織培養による苗の大量増殖方法を確立する。また、本研究ではそれらの樹種の造林が種子の自然散布による‘雑草化’などの環境に与える負荷を軽減し、且つ熱帯林再生の手段として積極的に活用するため、雄性不稔遺伝子の導入及び3倍体作出を通じた不稔系統の作出を究極の目的として、大量増殖法として確立した組織培養系を基礎とし、遺伝子組換えおよび倍数体の作出方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 組織培養系の開発：植物材料として、越井木材工業株式会社がマレーシアサバ州に

において選抜した、*A. mangium* と *A. auriculiformis* との種間雑種優良個体数系統を用いた。各系統の *in vitro* 植物から茎頂組織を摘出し、種々のオーキシシンとサイトカイニン添加培地による多芽体および苗状原基誘導条件を検討した。その際、すでに予備実験で最も有効と思われる thidiazuron (TDZ) とオーキシシン類との組合せを中心に検討した。

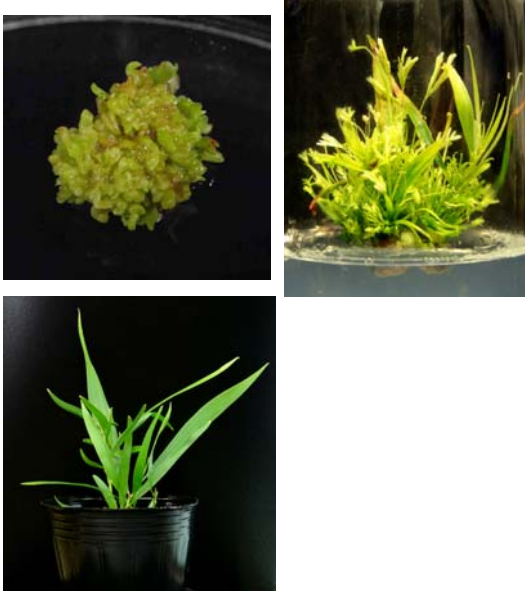
(2) 形質転換系の開発：*in vitro* 植物から得られたカルスや多芽体を対象に、*Agrobacterium* の感染条件を検討した。GUS 遺伝子をレポーター遺伝子として利用し、*A. tumefaciens* の菌株、菌の前培養条件、接種時間、温度、アセトシリシリンゴンの濃度、培地の無機塩組成 pH、外植片の前培養、共存培養期間、超音波等の傷つけ処理、脱気処理の有無等の諸条件が一過的 GUS 発現に及ぼす影響を調査し、感染に最適な条件を検討した。なお筑波大学の江面らによって開発された ACC デアミナーゼ遺伝子を組み込んだ菌系統（スーパーアグロ）を用い、感染時における植物組織からのエチレン生成が菌の感染を阻害する可能性についても検討した。

(3) 倍加個体作出：多芽体と茎頂培養由来の *in vitro* 植物を対象に、コルヒチン、オリザリン、アミプロフォスメチル等の紡錘糸形成阻害剤の濃度、処理時間、温度等の影響を比較した。倍加の確認にはフローサイトメーターを用いた。

(4) 倍加個体の評価：すでに予備実験で得られ、越井木材(株)のマレーシアサバ州にある植林地で1年前に植栽した4倍体1系統に関して、その生育状況を観察すると共に、試験期間内の開花の可能性を検討した。

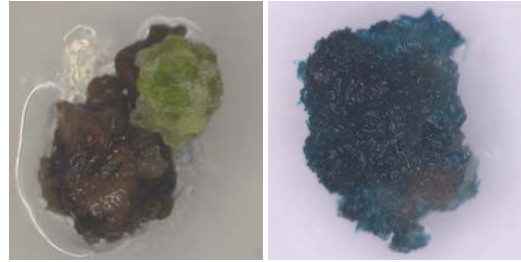
4. 研究成果

(1) *Acacia mangium* と *A. auriculiformis* の種間雑種優良系統数種を用いて、茎頂組織からの無菌植物育成条件を検討した。その結果、WPM 培地に thidiazuron (TDZ) 0.1-1 mg/l を添加した培地で、正常なシュート形成がみられた。また、高濃度(5-10 mg/l)では nodular callus が得られ、これを TDZ 無添加培地に移すことにより正常なシュートが得られた。これらのシュートは同組成の培地で節ごとに切って継代することにより、増殖が可能であった。こうして得られたシュートはフローサイトメーターによる DNA 含量の測定により、DNA 含量に変異のないことを確認した。



(2) *A. mangium* の実生組織や、培養で得られたカルスや苗条原基集塊を対象に、*Agrobacterium tumefaciens* の EHA101 (pIG121Hm) 菌株を用いて形質転換の可能性を検討した。その結果、*A. mangium* において、実生の腋芽の付いた茎切片を接種材料にした場合に、ハイグロマイシン抵抗性で GUS 遺伝子を導入したカルスが得られた。このカルスを継代している間に、不定芽原基が形成されたが、継代中に褐変枯死した。その結果を

受けてさらに、同様な手法でハイグロマイシン抵抗性カルスを作成したが、不定芽原基を得るには至っていない。*A. mangium* と *A. auriculiformis* の雑種 1 系統由来の苗条原基集塊を対象に、同じ菌株を用いて形質転換を行った結果、ハイグロマイシン抵抗性で GUS 遺伝子の発現したカルスが得られたものの、このカルスからも不定芽原基は形成されなかった。



(3) *in vitro* で増殖した 4 系統の種間雑種に由来するシュートをアミプロフォスメチルで処理し、倍加の可能性を検討した。その結果、1 系統において 60 mg/l のアミプロフォスメチルを含む液体培地で 120 時間処理した場合に、完全に倍加した 4 倍体のシュートを得ることができた。この 4 倍体はもとの 2 倍体同様、茎節切片培養による増殖が可能であった。さらに倍加剤としてオリザリンおよびブタミフォスを用い、*in vitro* 植物の茎節切片を 10 mg/l ブタミフォスで 24 時間振とう浸漬処理することによりその倍加効果をコルヒチンと比較した。その結果、3 種類の倍加剤すべてで倍加効果は認められたものの、コルヒチンおよびオリザリンでは 2 倍体と 4 倍体のキメラが大半であるのに対し、ブタミフォスはキメラでない 4 倍体が 20% 得られた。この 4 倍体の一部は順化することが出来た。

(4) 本研究開始時にすでに得られていた 4 倍体をクローン増殖し、マレーシアのボルネオ島にある越井木材(株)の植林地において

試験栽培を行った。現時点で4年が経過しており、2013年3月に現地調査を行った。その結果、この4倍体は同時に植栽したものの2倍体とほぼ同等の生育状況を示しているが、2倍体がすでに半数近く開花しているのに対し、4倍体はまだ開花に至っていない。従って、当初目的とした2倍体との交配による不稔の3倍体作出は今後に残された課題となった。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三位 正洋 (MII MASAHIRO)

千葉大学・大学院園芸学研究科・教授

研究者番号：30093074