

水耕栽培によるユーカリ挿し木からの不定根発生評価系の開発

町野 弘明 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小口 太一 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

ユーカリ属林木はパルプ原料や材木として、特に南半球において広く植栽されており、経済的に重要な植物の一つである。一方商業植林において、質の良いパルプ、木材生産を行うには、精鋭樹と呼ばれる材の質や成長速度に優れた樹木を選抜し、それをクローン増殖して利用することが効率的である。その際使用する増殖技術としては、主に組織培養と挿し木の2種類が挙げられる。挿し木は、切除した枝を土に挿すだけで苗生産となる容易な手法であり、古くから活用されてきた。しかし、種間・品種間・個体間で挿し木の発根効率は変動する。ユーカリ属林木でも、挿し木で不定根が発達する種としない種があることが知られる。例えば、良質なパルプ原料として広く商業的に植栽されている *Eucalyptus globulus* 種は難発根性であり種子による増殖が一般的である。そこで、ユーカリのクローン増殖を可能とすることで、より均質かつ高収量のパルプ生産が可能となると期待される。

私の所属する研究室では、ユーカリ属林木種間での不定根形成能の相違に着目した、ユーカリ属林木における不定根形成の分子生理学的研究に取り組んでいる。本研究では、ユーカリ属林木の不定根形成能を比較・検討できる実験系の開発を試みた。加えて、挿し木の不定根形成過程の変化を追跡するためのマーカーとなる遺伝子を探した。

【材料】

特定網室において栽培された樹高 1~2 m、直径約 3 cm の *Eucalyptus camaldulensis* を母木とした。そして先端に若芽があり、根元の直径が 1.8 mm~2.3 mm の若い枝から、腋芽 2 つを含む断片を切り出し、挿し木とした。

【実験方法】

(1) 実験系の開発

不定根形成過程の観察を容易にするため、水耕培地系による実験系の確立を試みた。最終的に、挿し木を発泡スチロール材のフロートに固定して液体培地に浮かべることとし、その液体培地として DW と 0.1x MS 液体培地を検討した。尚、水耕液には水槽用エアポンプにより常時通気を施した。液体培地を含む容器は、温度 25°C、光強度 80~100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明期 16 時間に制御したチャンバー内に設置した。

(2) 遺伝子マーカーの探索

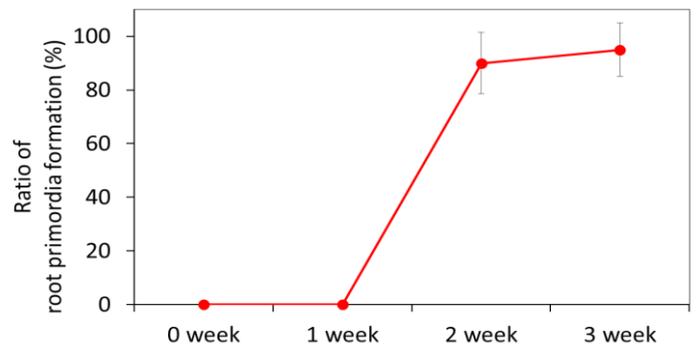
候補遺伝子からプライマーを設計し、定性及び定量 RT-PCR によって評価した。器官特異性評価では、*E. camaldulensis* の根、茎、葉から RNA を抽出、その逆転写反応物を鋳型に定性及び定量 RT-PCR を行った。また、不定根原基形成における発現解析は、水耕開始後 0、3、7、14 日の挿し木から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。

【結果】

(1) 実験系の開発

不定根形成の観察が容易な、水耕培地による実験系を考案・構築した。検討した DW と 0.1x MS 液体培地だが、後者の方が不定根原基形成にかかる日数が短く、その同調性も優れていたため、0.1x MS 液体培地を今後は用いることとした。また、培養初期は水耕培地における藻発生が問題となったが、培養器に遮光等の改良を加えることで抑制することができた。

構築した水耕培養系では、培養開始から 1 週目と 2 週目の 1 週間に 90% の挿し木で同調的に不定根原基の形成が見られた(下図)。一方で、その後の根の伸長は、不定根原基を形成した挿し木のわずか 5% でしか観察できなかった。



(2) 遺伝子マーカーの探索

文献およびゲノムデータベースの検索により、根器官で特異的に発現する遺伝子の候補を 3 つ (*EcPT2*, *EcPLT1*, *EcWOX5*)、またオーキシンの動態を見るためのマーカーとして *EcGH3* を選択した。器官特異性の検証では、*EcPT2*, *EcWOX5* で根特異的な発現が認められた。一方、*EcGH3* はすべての器官で発現が見られたが、根の発現量が最も高かった。

不定根原基形成過程での発現の変化は、*EcPT2* は原基の発達段階に対応した発現の増加が観察された。*EcWOX5* も発達段階に応じて発現が増加したが、変動量は小さかった。

【考察と展望】

挿し木後 2 週間で、同調的に不定根原基形成の観察を可能とする実験系を確立することができた。本系は、今後ユーカリの不定根形成を分子生理学的に解析するのに有効と考える。一方、不定根原基形成後、根が伸長する挿し木の割合は、5%(4 週間後)と低いことから、不定根原基形成と根の伸長には相関性がないことが推察された。根の伸長に関しては今後の検証が必要である。

遺伝子マーカーの探索では、*EcPT2* は根特異的な発現を示し、不定根原基の発達に伴う発現量の増加が観察されたことから、不定根原基形成の遺伝子マーカーとなりうることが示唆された。

今後、本研究で開発した実験系がユーカリ属林木の不定根原基形成のモデル実験系として、ユーカリ属林木種間での不定根形成能の評価等に活用されることが期待される。