

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4RF-1801 小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの
Ex situ 保存技術の開発
(JPMERF20184R01)
平成30年度～令和2年度

Development of *Ex situ* Conservation of Endangered Ogasawara Mulberry for Recovery of Lost
Endemic Forest

<研究代表機関>

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

令和3年5月

目次

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究目標		
4. 研究開発内容		
5. 研究成果		
5-1. 成果の概要		
5-2. 環境政策等への貢献		
5-3. 研究目標の達成状況		
6. 研究成果の発表状況		
6-1. 査読付き論文		
6-2. 知的財産権		
6-3. その他発表件数		
7. 国際共同研究等の状況		
8. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II-1 小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの <i>Ex situ</i> 保存技術の開発	・・・・・・・・・・	16
（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）		
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		
III. 研究成果の発表状況の詳細	・・・・・・・・・・	32
IV. 英文Abstract	・・・・・・・・・・	33

I. 成果の概要

課題名 4RF-1801 小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの*Ex situ*保存技術の開発

課題代表者名 遠藤 圭太 (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)

重点課題 主：【重点課題⑫】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発

副：【重点課題⑬】森・里・川・海のつながりの保全・再生と生態系サービスの持続的な利用に向けた研究・技術開発

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 平成30年度～令和2年度

研究経費 (千円)

	契約額	実績額 (前事業年度繰越分支出額含む)
平成30年度	1,584	1,584
令和1年度	1,760	1,760
令和2年度	1,630	1,630
合計額	4,974	4,974

本研究のキーワード *Ex situ*保存、絶滅危惧IA類 (CR)、オガサワラグワ (*Morus boninensis*)、凍結保存、クローン保存、組織培養、D-plate法、種子生産、種子保存、オーソドックス種子

研究体制

(サブテーマ1) 小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの*Ex situ*保存技術の開発 (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)

他のサブテーマはない。

研究協力機関

研究協力機関はない。

1. はじめに（研究背景等）

生息域外 (*Ex situ*) 保存は、生息域内 (*In situ*) 保存とともに、生物多様性の保全に必要な技術である。絶滅危惧種などの生息域内だけでは維持、管理することが困難な生物種（遺伝資源）の保全には生息域外保存が不可欠である。植物遺伝資源の生息域外保存は、植物園やジーンバンク施設などで実施されており、様々な植物遺伝資源が苗や種子などの多様な形態で生息域外保存されている。

小笠原諸島には、小笠原固有の樹木であり絶滅の危機に瀕するオガサワラグワ (*Morus boninensis*) が生育する（図0.1）。オガサワラグワは、環境省レッドリストにおいて絶滅危惧IA 類（CR）に分類されており、天然木はわずか100本ほどであり、現在も減少している（表0.1）。過去には、オガサワラグワは小笠原諸島の湿性高木林を代表する樹木のひとつであったが、木材としての利用価値が高く開拓期に多くの大木が伐採され個体数が著しく減少した。さらに現在は、シマグワ (*M. australis*) との交雑によって純粋なオガサワラグワの種子生産がほとんどなく、自然環境下での更新が阻害されている。また、アカギ (*Bischofia javanica*) などの外来種の繁殖および拡大によって生育地が著しく縮小していることも、オガサワラグワが天然更新できない原因のひとつである。



図0.1 小笠原諸島の赤旗山で生残するオガサワラグワ。
個体名：AK3 (A), AK5 (B)

表0.1 オガサワラグワの生残数.

島		生残個体数（本）	
		天然木	植栽木
有人島	父島	39	4
	母島	28	41
無人島	弟島	30	0
	計	97	45

未発表.
令和2年12月時点.

自生地でのオガサワラグワの危機的な状況から、絶滅を防ぐためには、現地で生残個体を保護する生息域内保存だけでなく、それらを生息域から隔離して保存する生息域外保存が必要である。我々は、オガサワラグワの休眠芽を用いた組織培養技術を確立し、現存個体のクローンの増殖と維持を可能とした。さらに、培養体を用いたクローン苗の生産技術も開発した。そして現在は、小笠原諸島に生残する多くのオガサワラグワのクローンが、森林総合研究所林木育種センターで培養体およびクローン苗として生息域外保存されている（図0.2）。それらの生息域外保存コレクションの中には、小笠原諸島では既に枯死し、クローン苗でのみ現存する個体もある。我々は、クローン増殖と培養保存および温室内保存によって、オガサワラグワの絶滅リスクを顕著に低下させることができたと考えている。しかし、コストや労力などの問題から、今後も現行の生息域外保存法のみによってオガサワラグワを維持、管理し続けることは困難である。培養保存では、培養体を維持するために必要な器具や試薬の購入費、育成環境（温度と日長）の管理に必要な電気代、定期的な植え替え（継代培養）作業に必要な労力と労賃が必要である。また、温室内での苗木の管理も容易ではなく、剪定や灌水作業には多くの労力と労賃を費やしている。さらに、亜熱帯域である小笠原諸島に生育するオガサワラグワは耐寒性が低く、森林総合研究所林木育種センターのある茨城県日立市では野外では越冬できず、冬季には灯油ヒーターによって温室内を暖房して温度を維持している。そのため、オガサワラグワの生息域外保存を継続するには、保存に必要なコストや労力、保存スペースなどを軽減できる技術が必要であり、長期間実行可能なオガサワラグワの保存体系が必要である。

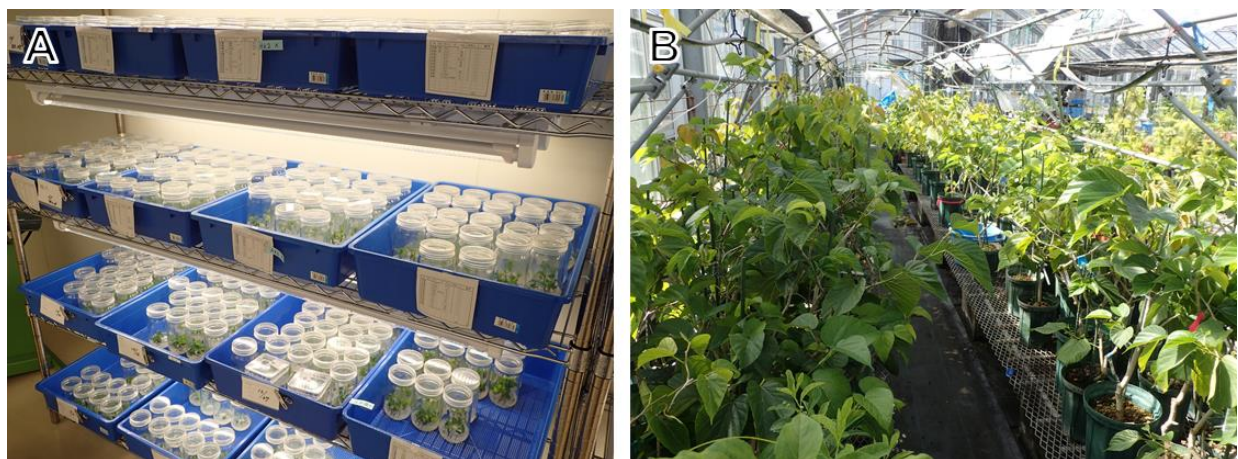


図0.2 オガサワラグワの生息域外保存.

(A) 組織培養によるクローン保存. (B) クローン苗の温室内保存.

父島と母島におけるオガサワラグワの純粋種子の生産不良は、オガサワラグワの保全を継続するための障壁であり、解決しなければならない課題のひとつである。過去に、養蚕を目的として有人島である父島と母島にシマグワが導入された。シマグワは、オガサワラグワの近縁種であり交雑して雑種を形成する。現在は、野生化したシマグワが島内の広域に生育しており、容易にオガサワラグワと交雑するため、純粋なオガサワラグワの種子生産がほとんどない。これに対して我々は、温室内で生息域外保存しているクローン苗に着花する個体を発見し、それらの着花個体を用いて純粋なオガサワラグワの種子の生産が可能であることを明らかにした。オガサワラグワの純粋種子の生産は、現地での個体数の増加に不可欠であり、本来の小笠原諸島の森林植生の復元に不可欠である。生息域外保存コレクションを用いて人工交配することで効率的により多くの純粋なオガサワラグワの種子が生産できる可能性がある。

凍結保存法は、液体窒素中（ -196°C ）などの極低温下で生物の組織や細胞を長期保存する技術であり、医療や畜産、果樹園芸などの生物を扱う様々な分野で利用されている。極低温下では生物的、化学的变化がほとんど起こらないため、サンプルの保存時の状態を半永久的に維持することができ、生物材料を長期間保存できる。また、組織培養や苗木の管理と比べて保存サンプルを維持するために必要な労

力が少なく、保存に必要なスペース（場所）が小さいといった利点もある。また、液体窒素を冷媒として-160℃以下に冷却される凍結保存容器内は、電力供給が停止しても1～2週間は極低温温度を維持することができるため、突発的な停電の発生時にも保存サンプルを一定期間保存できる。東日本大震災の発生時には、被災地域の研究機関および大学の冷蔵庫や冷凍庫で保存されていた研究用生物サンプルの多くが使用できなくなった。そのため、基礎生物学研究所では、震災にも耐え得る生物材料の保管を可能にすることを目的として“大学連携バイオバックアッププロジェクト”を立ち上げ、研究用生物材料の凍結保存および凍結保存技術の開発を行っている。さらに、これまでの凍結保存容器は定期的な液体窒素の供給が必要であったが、現在は、液体窒素の供給が稼働時の1度のみで使用可能な、定期的な供給が不要な凍結保存容器も開発されており、凍結保存の低コスト化が飛躍的に進められている。凍結保存法は、植物遺伝資源の長期保存にも有効な技術であり、品種の維持や希少種の保存などに利用されている。植物の凍結保存では、冬芽や茎頂などを用いてクローン保存が可能であり、また、冷蔵庫や冷凍庫では保存できない種子の長期保存が可能であるといったことも利点である。そのため、培養体の茎頂や人工交配して生産した種子の凍結保存技術を開発することで現在直面しているオガサワラグワの保全上の問題を解決できる可能性が高い。

本研究では、現存個体を効率的に生息域外保存するために、組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワの培養体の凍結保存技術を開発した。さらには、自生地（父島と母島）での純粋種子の生産不良問題を解決するために、生息域外保存コレクションを用いてオガサワラグワの種子の生産技術と凍結保存技術を開発した。そして、オガサワラグワの凍結保存技術の開発により、培養保存およびクローン苗の温室内保存と併せて長期実行可能な生息域外（*Ex situ*）保存体系の構築に取り組んだ。

2. 研究開発目的

小笠原固有の樹木であり絶滅の危機に瀕するオガサワラグワの凍結保存技術の開発を目的とする。オガサワラグワは個体数が極端に少ないため、生残木を確保することが絶滅を防ぐために不可欠である。組織培養によってクローン増殖した培養体を用い、茎頂の凍結保存技術を開発することでクローン保存を可能とし、現存個体の消失を防止する。また小笠原諸島では、外来種シマグワとの交雑により純粋なオガサワラグワの種子生産がほとんどなく、オガサワラグワの自然環境下での更新が阻害されている。そのため、人工交配技術を用いたオガサワラグワの種子生産は個体数を増加するためや自然での更新を回復するために重要である。本研究では、オガサワラグワの種子を人工交配によって生産し、それらの凍結保存技術を開発する。クローンおよび種子の凍結保存技術の開発によって、長期間にわたって実行可能なオガサワラグワの*Ex situ*保存体系へと発展させる。本研究の成果を林木ジーンバンク事業に導入し、現地で実施されているオガサワラグワの野生復帰試験に利用する。

3. 研究目標

全体目標	凍結保存法の導入によって希少樹木の生息域外（ <i>Ex situ</i> ）保存技術を発展させる。絶滅危惧種オガサワラグワの現存個体と人工交配種子の凍結保存技術を開発し、持続的に苗木を生産するための長期実行可能な <i>Ex situ</i> 保存体系を構築する。
サブテーマ1	小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの <i>Ex situ</i> 保存技術の開発
サブテームリーダー/所属機関	遠藤圭太／（国研）森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター
目標	組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワ培養体の茎頂の凍結保存技術を開発し、現存個体の消失を防止するとともに個体再生可能な状態で保存する。

温室内で維持、管理しているオガサワラグワ苗木を用い、種子生産のための人工交配技術と生産した種子の凍結保存技術を開発する。

これらの凍結保存技術の開発により、苗木生産の持続可能なオガサワラグワの*Ex situ* 保存体系を構築する。

4. 研究開発内容

【クローン保存のための培養茎頂の凍結保存技術の開発】

〈保存サンプルの調整〉

組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワの培養体を用いて培養茎頂の凍結保存技術の開発を行った。継代培養によって維持しているオガサワラグワ培養体から葉の展開が始まった腋芽を摘出し、およそ2週間培養して育成した。実体顕微鏡を用い、伸長した培養体の頂端部から茎頂（1～1.5 mm）を摘出し、1Mスクロースを含む寒天培地上で25℃の暗所にて一晩前培養して保存サンプルとした。

培養体を用いた植物組織の凍結保存では、低温処理により培養組織の保存性が向上して凍結保存後に高い再生育率を得ることができる。そこで、低温処理したオガサワラグワ培養体の凍結保存試験も実施した。継代培養によって維持しているオガサワラグワ培養体を、温度を4℃、日長時間を短日条件：8/16 h（明期/暗期）に設定した人工気象器内で2～4週間低温処理し、茎頂を摘出して前培養し保存サンプルとした。

〈凍結保存試験〉

植物の凍結保存にはガラス化法が最も利用されている。本研究では、ガラス化法を改良したV Cryo-plate法と比較的新しい凍結保存法であるD Cryo-plate法を用いて凍結保存試験を実施し、オガサワラグワの培養茎頂の凍結保存手法を検討した（図0.3）。凍結保存試験では、組織培養によってクローン増殖が容易であり、実験材料を効率的に作製できる個体をモデル培養体として用いた。

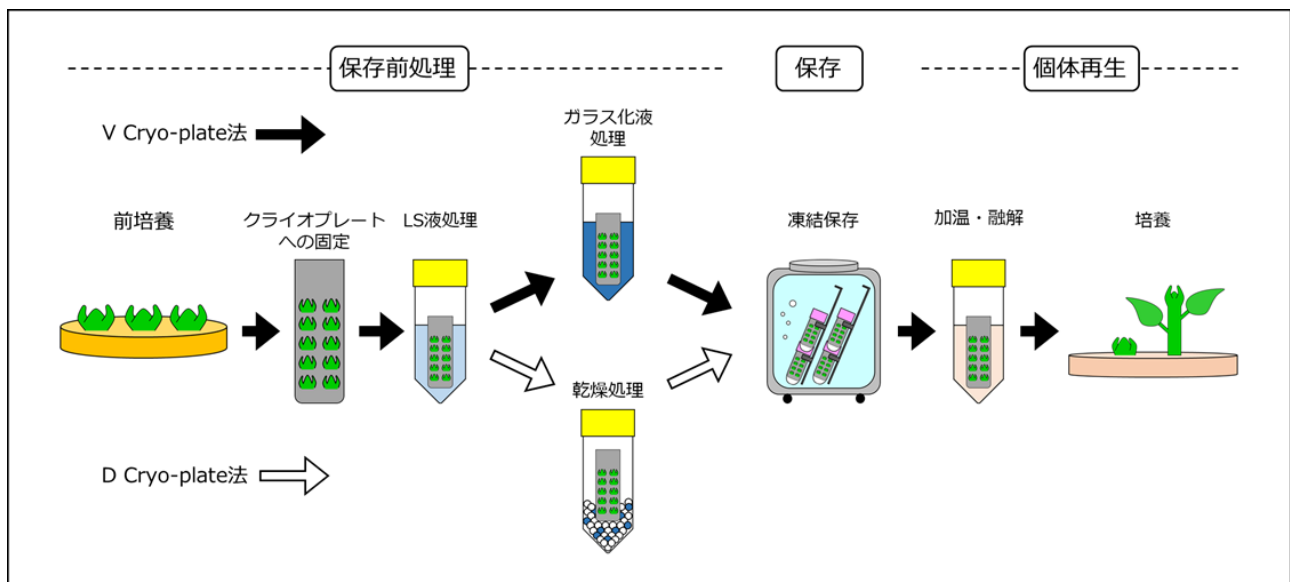


図0.3 凍結保存試験の流れ図.

V Cryo-plate法

培養体から保存サンプルとして作製した茎頂をV Cryo-plate法によって凍結保存し、各ガラス化液処理条件での凍結保存後の再生育率を比較した。前培養した茎頂を2%アルギニン酸ナトリウム水溶液と0.1M塩化カルシウム水溶液を用いてアルミニウム製のクライオプレート上に固定した。クライオプレー

トプレート1枚に8～12個の茎頂を固定し、保存サンプルが固定されたクライオプレートに2Mグリセロールおよび0.6Mスクロースを含むLS液 (Loading Solution) に30分浸漬してLS液処理をした。その後、30%グリセロール、15%エチレングリコール、15%ジメチルスルホキシドおよび0.4MスクロースからなるPVS2 (Plant Vitrification Solution 2) に試料を40～80分浸漬してガラス化液処理し、液体窒素中 (-196℃) に浸漬して急速冷却し、保存用チューブ内で凍結保存した。

また、ガラス化液として50%グリセロールと50%スクロースからなるPVS3 (Plant Vitrification Solution 3) を用いた凍結保存試験も実施した。

D Cryo-plate法

培養体から保存サンプルとして作製した茎頂をD Cryo-plate法によって凍結保存し、各乾燥処理条件での凍結保存後の再生育率を比較した。前培養した茎頂をアルミニウム製のクライオプレート上に固定し、2Mグリセロールおよび1Mスクロースを含むLS液に60分浸漬してLS液処理をした。その後、約10gのシリカゲルが入った50ml容のプラスチックチューブ内で保存サンプルを40～120分間乾燥処理し、液体窒素中に浸漬して急速冷却して凍結保存した。

〈再生育率測定〉

V Cryo-plate法およびD Cryo-plate法で凍結保存した保存サンプルを40℃に加温した1Mスクロース溶液に浸漬して急速融解し、同じ1Mスクロース溶液中で20分以上洗浄処理をした。洗浄後、クライオプレートから切り離れた茎頂を4ヵ月程度培養し、シュート (枝葉) を展開した保存サンプルを生存個体として再生育率を調べた。各処理につき3回行った凍結保存試験の平均を再生育率とした。

【種子の生産技術と凍結保存技術の開発】

〈供試材料〉

温室内で維持、管理している生息域外保存コレクションを用いて純粋なオガサワラグワの種子の生産技術と凍結保存技術の開発を行った。森林総合研究所林木育種センター構内 (茨城県日立市) の温室内で生育しているオガサワラグワのクローン苗は秋季が花期であり、2018-19年は9月中旬～11月下旬に開花した。

〈人工交配〉

チューブ法を用いてオガサワラグワを人工交配し種子を生産した。開花した雄花序を内径10mmのビニールチューブに入れてタップして花粉を採取した。採取した花粉の入ったチューブ内に柱頭が露出した開花中の雌花序を入れて受粉させて人工交配した。人工交配した雌花は交配袋を被せることで温室内で自然交配してコンタミ (他の雄株との交配) するのを防止した。人工交配後は果実の発達の様子を観察し、成熟して黒くなった果実から種子を摘出した。

〈凍結保存試験〉

超低温 (-170℃) 凍結保存試験

植物の種子は、乾燥耐性が非常に高いオーソドックス種子、中程度の乾燥耐性を持つサブオーソドックス種子および、乾燥耐性の低いリカルシトラント種子の3つの種子タイプに類別される。種子の保存方法はそれらの種子タイプによって異なり、オーソドックス種子は乾燥常温保存、冷凍凍結保存および超低温凍結保存が可能であり、サブオーソドックス種子は超低温凍結保存、リカルシトラント種子は種子から摘出した胚組織のガラス化超低温凍結保存が可能である。オガサワラグワの種子の凍結保存技術開発では、超低温温度 (-160℃以下) での凍結保存試験と乾燥耐性試験により保存条件の検討を行った。

自然交配で得られた充実種子を用い、種子乾燥法によって保存温度-170℃での凍結保存試験を行った (図0.4)。果実から摘出した種子を水選し、組織の未発達なシイナ種子と充実種子に選別した。得

られた充実種子を温度20℃の室内で異なる相対湿度（%RH）の下に1週間静置して乾燥処理をした。飽和塩化ナトリウム水溶液によって75%RH、飽和塩化マグネシウム水溶液によって33%RHに調整したデシケーター内、または、8%RHに維持された湿度制御可能なオートドライデシケーター内で種子を乾燥処理した。各相対湿度下で乾燥処理した種子を-170℃の凍結保存容器内で1～2週間凍結保存した。

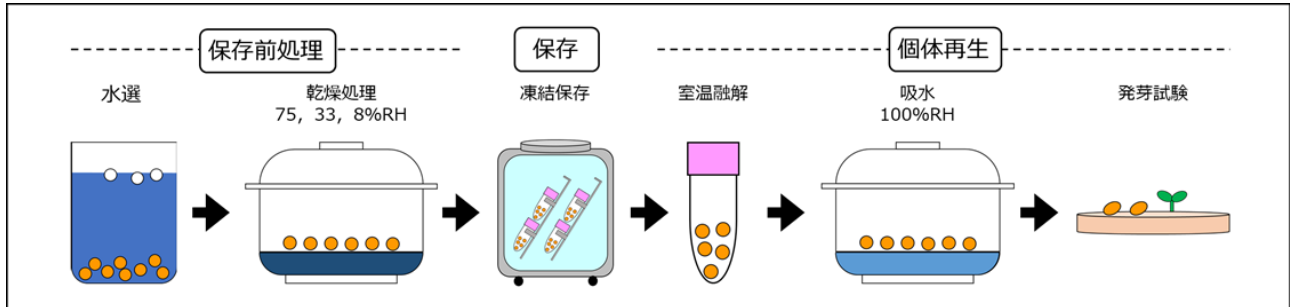


図0.4 種子乾燥法。

冷凍（-20℃、-80℃）凍結保存試験

汎用型冷凍庫での種子の凍結保存は利便性が高く、シードバンク施設で最も利用されている種子の保存方法のひとつである。オガサワラグワ種子の保存の汎用性を拡張し、現有品や既成品を用いた事業レベルでの簡易な種子保存を可能とするために、人工交配で得られた種子を用い、種子乾燥法によって-20℃、-80℃および、-170℃での凍結保存試験を実施した。果実から摘出した種子を水選し、得られた充実種子を相対湿度8%のオートドライデシケーター内で1週間乾燥処理をした。乾燥処理した種子は、-20℃および-80℃の冷凍庫、-170℃の凍結保存容器内で6ヵ月間凍結保存した。

発芽試験

凍結保存容器（-170℃）および冷凍庫（-20℃および-80℃）で保存した凍結保存種子、凍結保存前の乾燥処理のみをした乾燥種子および、乾燥処理前の新鮮種子の発芽試験を行い、オガサワラグワ種子の保存条件を検討した。凍結保存種子は室温で30分以上加温して融解し、100%RHに調整したデシケーター内で一晩吸水処理をした。また、乾燥種子も1週間の乾燥処理後に100%RHで吸水処理をした。30～40粒の種子をシャーレに作製した1%寒天培地上に播種し、種子の入ったシャーレを20/30℃（明期/暗期）および日長時間8時間に設定した人工気象器内に静置して発芽試験を行った。

〈含水率測定〉

乾燥処理前の新鮮種子および各相対湿度下で乾燥処理をした乾燥種子の50粒の重量を測定した。その後、105℃のオーブン内で一晩静置し、再度、種子重量を測定して新鮮重当たりの含水率を調べた。種子の含水率測定は3回行い、平均の値を新鮮および乾燥種子の含水率とした。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

【クローン保存のための培養茎頂の凍結保存技術の開発】

〈凍結保存試験〉

V Cryo-plate法およびD Cryo-plate法によって凍結保存した茎頂の保存後の再生育率を比較し、オガサワラグワの培養体を凍結保存するための保存条件を検討した。凍結保存した茎頂は保存サンプルによって枯死、カルス形成、葉のみを展開、芽の形成およびシュート形成などのいくつかの異なる再生育パターンを示した。本凍結保存試験ではシュートを形成した保存サンプルを再生育個体とした。

低温処理前のオガサワラグワ培養体から凍結保存サンプルを作製し、V Cryo-plate法によって凍結保存試験を実施した。植物の凍結保存に最も利用されているPVS2をガラス化液として用いると、ガラス化液処理によってオガサワラグワの培養茎頂は凍結保存前に再生育率が著しく低下し、PVS2に対して感受性を示した。PVS2をガラス化液として用いた凍結保存試験では、40～60分間ガラス化液処理した茎頂が比較的高い再生育率を示した。PVS2は、糖やグリセリンなどの溶質が高濃度に調整されており、組織内部への浸透によって細胞は相当な浸透圧ストレスを受ける。また、PVS2の主成分のひとつであるジメチルスルホキシドは濃度や細胞種によっては細胞毒性を示すことが知られている。オガサワラグワの培養茎頂は、PVS2処理によって凍結保存する前に著しく再生育率が低下した。そのため、ガラス化液としてPVS2を用い、V Cryo-plate法によってオガサワラグワの茎頂を凍結保存することが困難であるとわかった。

PVS2を用いてオガサワラグワの培養茎頂を凍結保存することが困難であるとわかったため、PVS2に次いでガラス化液として利用されるPVS3を用いて、V Cryo-plate法による凍結保存試験を実施した。PVS3処理のみをした凍結保存前の茎頂の再生育率は50%程度であり、同時間PVS2処理をした場合と比べて高い再生育率を示した。しかし、凍結保存後の茎頂の再生育率は、PVS3によってガラス化液処理した場合の方が低く、60分間PVS3処理して凍結保存した培養茎頂の再生育率は10%程度であった。PVS3はジメチルスルホキシドを含まないため細胞毒性が低く、PVS2に対して感受性を示す植物組織の凍結保存に利用される。一方、PVS3は体積のほとんどをグリセリンとスクロースが占めているため溶液の粘性が非常に高く、組織への浸透性が悪い。凍結保存前の茎頂の再生育率の違いが、PVS2とPVS3の細胞毒性もしくは浸透性の違いによるものかは不明である。PVS3を用いたオガサワラグワの培養茎頂の凍結保存はさらなるPVS3処理時間の検討が必要であるが、多くの場合、ガラス化液処理時間が長くなるとともに再生育率は低下するため、再生育率を飛躍的に向上させることは困難であると考えられる。

V Cryo-plate法を用いたオガサワラグワ培養茎頂の凍結保存は、保存後の再生育率が50%以下であった。そこで、保存性の向上を目指してD Cryo-plate法を用いた凍結保存試験を実施した。D Cryo-plate法はV Cryo-plate法と同様に植物の凍結保存法であるが、比較的新しい技法である。D Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワの培養茎頂は、乾燥処理時間によって異なる再生育率を示し、100分間乾燥処理した茎頂の再生育率が最も高かった。D Cryo-plate法では、凍結保存前の乾燥処理によって細胞内水分を減少させて液体窒素への浸漬時に細胞内での水の凍結を防止すること、および過度の乾燥処理による脱水障害の発生を防止することが保存を成功させる鍵要因である。本手法を用いた場合、オガサワラグワの培養茎頂の乾燥処理時間は、100分間程度が適していることが明らかとなった。

V Cryo-plate法ではガラス化液処理時間とガラス化液の種類を検討し、D Cryo-plate法では乾燥処理時間を検討して凍結保存試験を実施した。その結果、オガサワラグワの培養茎頂の凍結保存にはD Cryo-plate法が適しており、100分間乾燥処理すると凍結保存後に最も高い再生育率を得られることが明らかとなった。

〈他個体への適用〉

モデル個体を用いたオガサワラグワ培養茎頂の凍結保存試験では、V Cryo-plate法よりもD Cryo-plate法が凍結保存後に得られる再生育率が高く、また、100分間の乾燥処理時間が最適であった。そこで、D Cryo-plate法によって他の個体（モデル個体以外）の凍結保存試験を実施した。他個体への適用試験では、低温処理した培養体も用いてD Cryo-plate法によって凍結保存試験を実施し低温処理の効果も検証した。個体Aというオガサワラグワの培養体を用い、低温処理前の茎頂を100分間乾燥処理してD Cryo-plate法によって凍結保存した。すると、凍結保存後の再生育率は10%程度であり、モデル個体の再生育率と比べて著しく低かった。これに対し、2週間もしくは4週間低温処理をした培養茎頂を100分間乾燥処理して凍結保存すると再生育率は50%程度まで向上した。そのため、凍結保存サンプルの作製前に培養体を低温処理することが、凍結保存後により高い再生育率

を得るための重要な処理プロセスであることがわかった。そこで、個体Bおよび個体Cを用い、4週間低温処理した培養体の茎頂をD Cryo-plate法によって凍結保存した。すると、凍結保存後の再生育率は個体Aと同様に個体Bおよび個体Cのどちらもおよそ50%程度であった（図0.5）。

他個体への適用試験では、低温処理により保存性が向上することが明らかとなり、低温処理を保存プロセスに導入することで培養体の多くをD Cryo-plate法によって凍結保存できる可能性が示された。一方、低温処理をしないオガサワラグワ培養体は保存性が個体によって顕著に異なることがわかった。

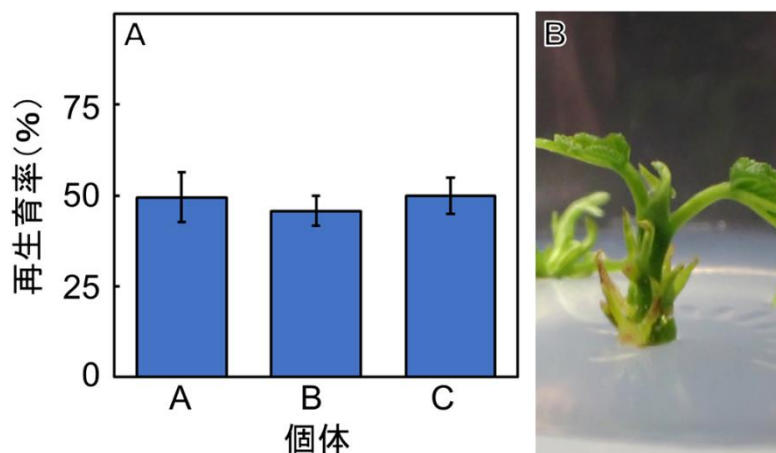


図0.5 D Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワ培養茎頂の個体別再生育率 (A) と再生育した培養体 (B) .

【種子の生産技術と凍結保存技術の開発】

〈種子乾燥法を用いた -170°C でのオガサワラグワ種子の凍結保存〉

自然交配種子を用いて種子乾燥法による -170°C での凍結保存試験を実施した。異なる相対湿度下で乾燥処理して含水率を調整したオガサワラグワの乾燥種子の発芽率は80%程度であり、乾燥前の新鮮種子の発芽率と同様であった。そして、乾燥処理後、 -170°C で凍結保存した保存種子の発芽率も乾燥種子や新鮮種子の発芽率と同様であった。これに対し、比較的高い含水率であった新鮮種子を直接凍結保存すると、保存後に発芽する種子はなかった。これらの結果から、オガサワラグワの種子が高い乾燥耐性を持つオーソドックス種子であり、種子乾燥法によって -170°C で凍結保存ができることが明らかになった。

〈冷凍庫を用いた種子の凍結保存〉

種子乾燥法を用いた -170°C での凍結保存試験により、オガサワラグワの種子が高い乾燥耐性を持つオーソドックス種子であることがわかった。そこで、オガサワラグワ種子の保存法を簡易にして汎用性を高めるため、汎用型冷凍庫を用いた -20°C および -80°C での凍結保存試験を実施した。相対湿度8%のオートドライデシケーター内での乾燥処理後、 -20°C 、 -80°C および -170°C で6ヵ月凍結保存した人工交配種子の発芽率は60%程度であり、凍結保存前の乾燥種子および新鮮種子の発芽率と同程度であった（図0.6）。それらの種子は発芽後に正常実生へと成長した。これらの結果から、オガサワラグワの乾燥種子が -170°C だけでなく、 -20°C および -80°C でも凍結保存可能であることが明らかとなった。オガサワラグワの種子は、高い乾燥耐性を示したことからオーソドックス種子に類別される。オーソドックス種子の冷凍凍結保存は、多くのシードバンク施設で利用されている植物遺伝資源の保存法のひとつである。本研究により、オガサワラグワの種子がオーソドックス種子であり、汎用型冷凍庫にて凍結保存可能であることが明らかとなった。そのため、オガサワラグワの種子の凍結保存をジーンバンク事業で実行可能となった。現在、林木ジーンバンク事業では、およ

そ200粒のオガサワラグワの種子を -20°C で凍結保存している。今後は、それらの凍結保存種子を利用して現地での野生復帰試験を推進していくことが重要である。

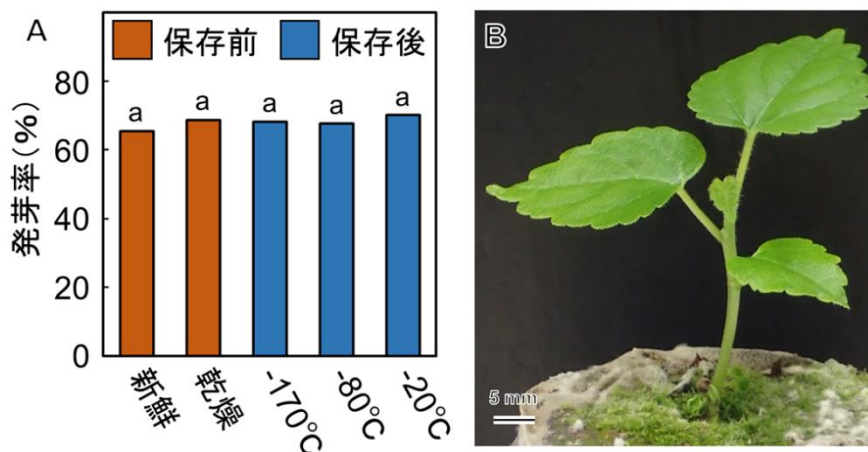


図0.6 汎用型冷凍庫で凍結保存した人工交配種子の発芽率 (A) と保存種子から成長した実生 (B) .

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

<行政等が活用することが見込まれる成果>

生物多様性条約(Convention on Biological Diversity)では、植物の多様性保全のために、Target 8として、“2020年までに各国の絶滅危惧植物種の75%を(可能な限り自国で)生息域外(*Ex situ*)保存し、さらに、それらの20%は野生復帰(復元・再導入)への利用が可能な状態にする”ことを目標としている。また、持続可能な開発目標(SDGs)では、目標15[陸上資源]として、“陸域生態系の保護、回復、持続可能な利用の推進、持続可能な森林の経営、砂漠化への対処ならびに土地の劣化の阻止・回復及び生物多様性の損失を阻止する”ことを目標としている。本研究は、日本の小笠原諸島に固有の樹木であるオガサワラグワを具体的な研究の対象種とし、小笠原諸島の失われた森林植生の復元を目指した、絶滅危惧植物(樹木)の生息域外保存体系を発展させた研究である。

令和元年2月13日には、環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室の松木崇司氏と意見交換会を行い、本研究の紹介と希少生物の生息域外保存などについて議論した。その際、本研究の成果を、オガサワラグワの保全だけでなく、多くの希少植物の保全にも応用できると良いという意見を頂いた。また、原島P0からは本研究成果を活かした植物の生息域外保存のためのフローチャートがあると良いとの意見も頂いた。そこで、植物の生息域外保存の体系図(図0.8)と培養植物(図0.9)および種子(図0.10)の凍結保存技術開発のためのフローチャートを作成した。私は多年生木本植物(樹木)を専門としており、比較的寿命の長い生物種を保全対象として扱っている。また、個体の巨大さから、個体再生可能な組織を多く採取できるといった特徴もある。そのため、1年性草本植物などの他の植物の生息域外保存とは違った視点があると考えられる。今回作成した*Ex situ*保存体系図と凍結保存技術の開発フローチャートは、オガサワラグワの生息域外保存(本研究成果)をモデルケースとした、植物の保全を推進するための原案として提案し、適宜、修正して改善していきたい。新宿御苑などで実施されている植物の保全事業に貢献したい。

*Ex situ*保存体系図を概説する（図0.8）。植物を含む生物の多様性保全には、大別して生息域内（*In situ*）保存と生息域外（*Ex situ*）保存がある。生物多様性の保全を確実に実施するためにはどちらの保存体系も必要である。本研究では、“長期間実行可能な”をキーワードとして生息域外保存体系の構築を目指し、凍結保存技術の開発に取り組んだ。そして、凍結保存技術を利用することでバイオリソースの長期保存が可能となった。他の生息域外保存技術と相補的に利用し、体系的に生息域外保存することが重要である。

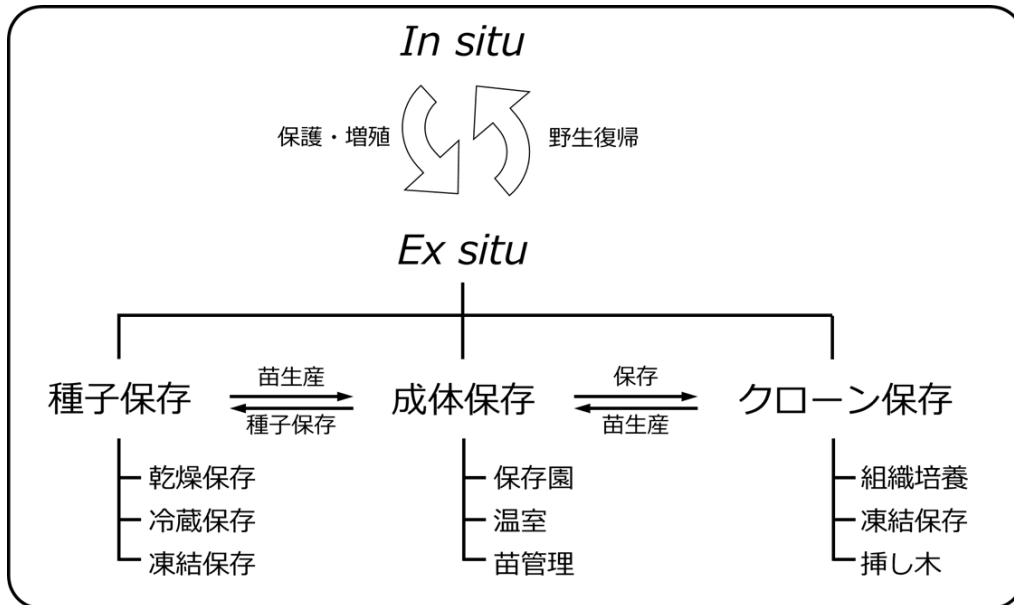


図0.8 凍結保存法を導入した植物の生息域外（*Ex situ*）保存体系。

培養植物の凍結保存技術開発について概説する（図0.9）。培養植物の凍結保存法は大別して、予備凍結法、ガラス化法および乾燥法がある。V Cryo-plate法はガラス化法を改良した手法であり、D Cryo-plate法は乾燥法を改良した手法である。培養植物の凍結保存に最も利用されているV Cryo-plate法、もしくは、比較的新しい手法であるD Cryo-plate法を用いて凍結保存試験を実施すると効率的に凍結保存技術を開発できる。予備凍結法は、最初が開発された実用的な植物の凍結保存手法であり、耐寒性植物の凍結保存に非常に有効な手法である。いずれの凍結保存手法においても、低温処理により保存性（凍結保存後の再生育率）が向上する。そのため、凍結保存試験前には低温処理試験を実施し、低温処理した培養体が凍結保存試験に利用可能かを明らかにするのが良い。

種子の凍結保存技術開発について概説する（図0.10）。種子は乾燥耐性によって保存手法が異なるため、種子の乾燥耐性を明らかにすることが重要である。発芽条件を検討するとともに、保存対象とする種子がオーソドックス種子、サブオーソドックス種子およびリカルシトランド種子のどの種子タイプに類別されるかを明らかにすると、効率的に（凍結）保存手法を選択できる。

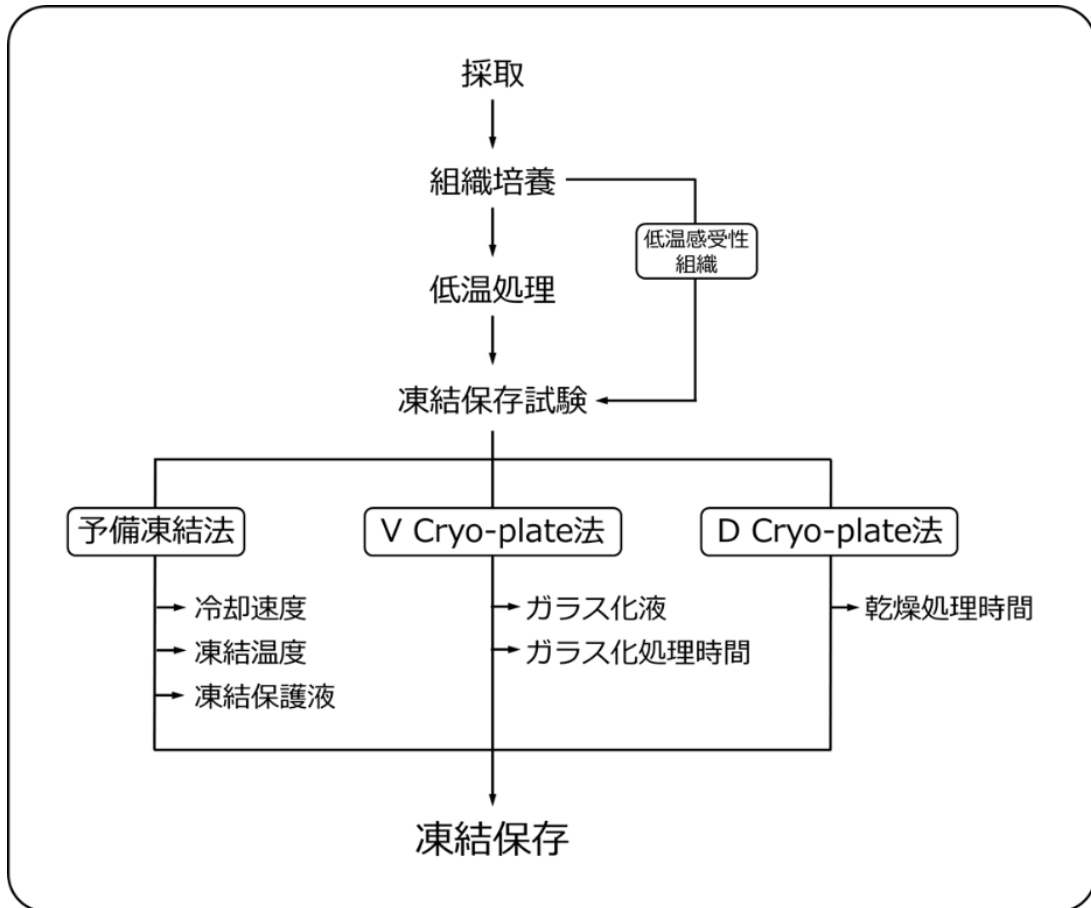


図0.9 培養植物の凍結保存技術開発のためのフローチャート.

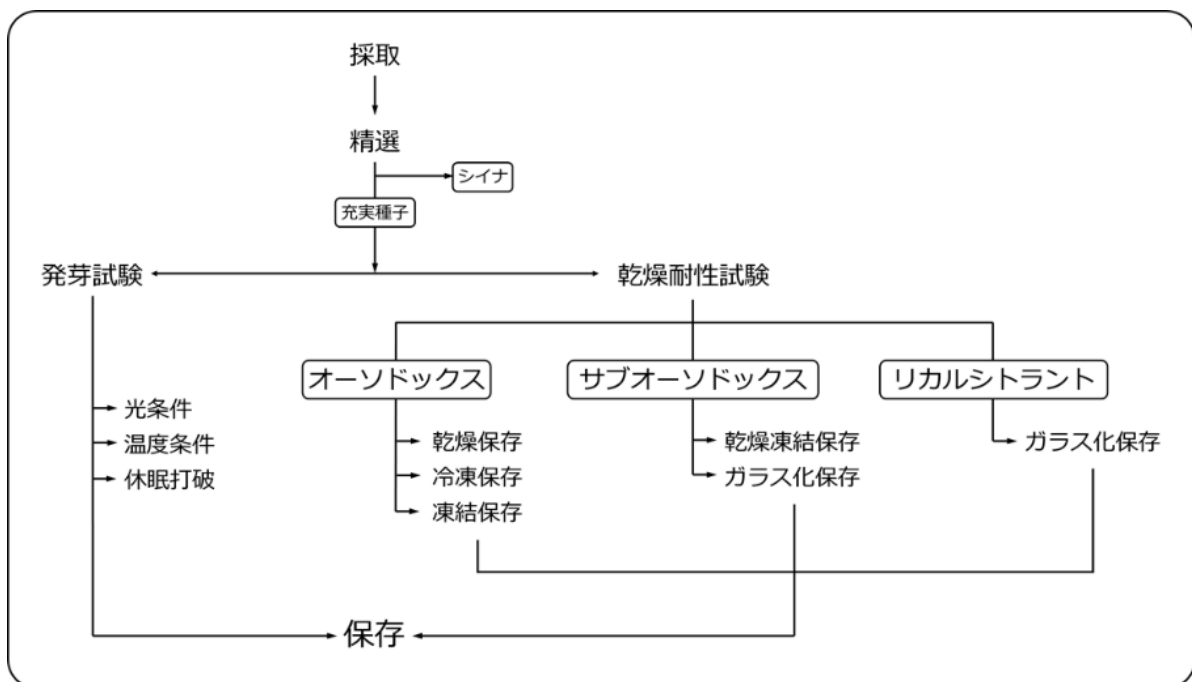


図0.10 種子の凍結保存技術開発のためのフローチャート.

5-3. 研究目標の達成状況

小笠原諸島に固有の樹木である絶滅危惧種オガサワラグワの凍結保存技術の開発に取り組んだ。現存個体を確保するためのオガサワラグワ培養体の凍結保存技術の開発では、組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワの培養茎頂を用いて凍結保存試験を実施し、最適なオガサワラグワ培養体の凍結保存手法を明らかにした（図0.11）。種子の生産技術と凍結保存技術の開発では、ビニールチューブ法を用いた人工交配法により純粋なオガサワラグワの種子生産が可能となり、また、それらの種子の凍結保存が可能となった（図0.12）。これらのオガサワラグワの培養茎頂と種子の凍結保存技術開発により、野生復帰のための苗木のバイオリソースとして利用できる長期実行可能なオガサワラグワの生息域外（*Ex situ*）保存体系を構築した（図0.13）。現在は、本研究で開発したオガサワラグワの凍結保存技術を用いて、現存するオガサワラグワの全個体保存と人工交配によって生産した種子の凍結保存が進捗している。

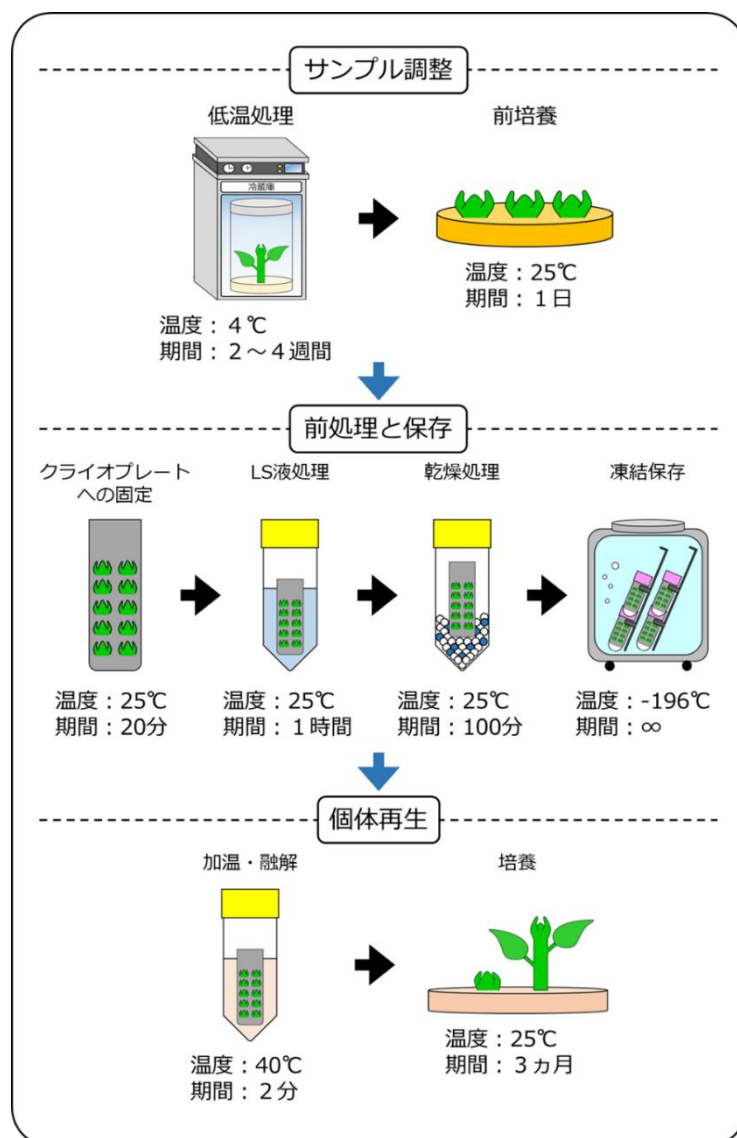


図0.11 オガサワラグワ培養体の最適な凍結保存法.

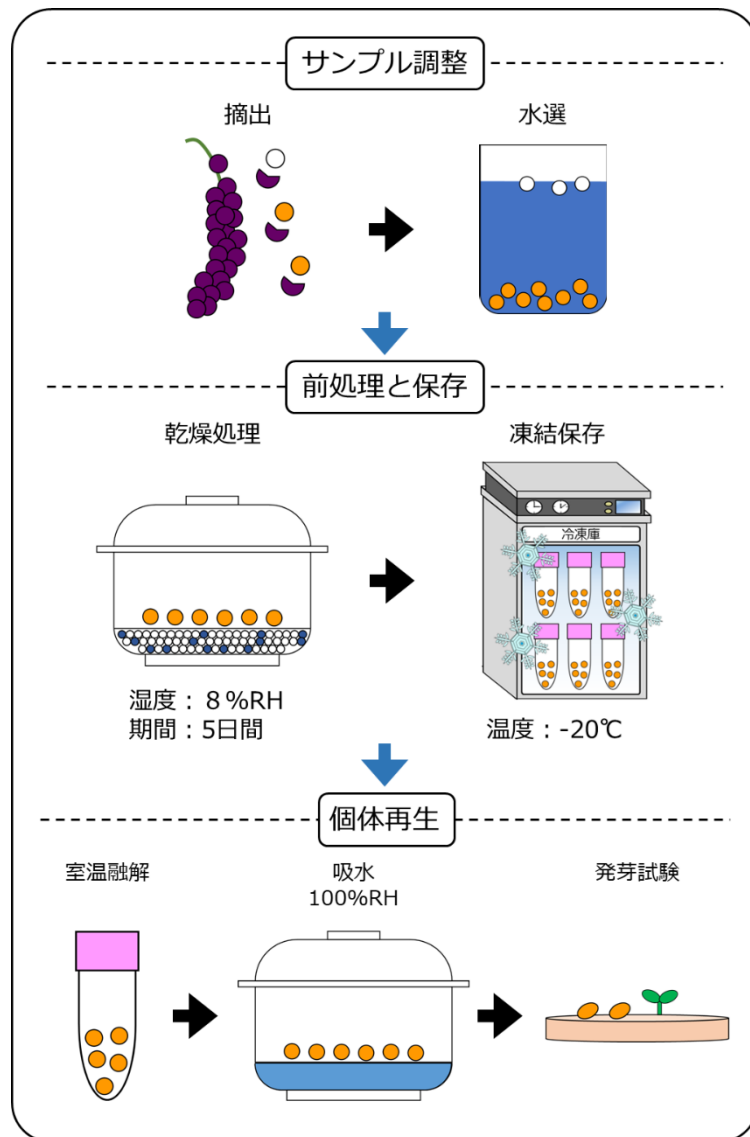


図0.12 オガサワラグワ種子の最適な凍結保存法.

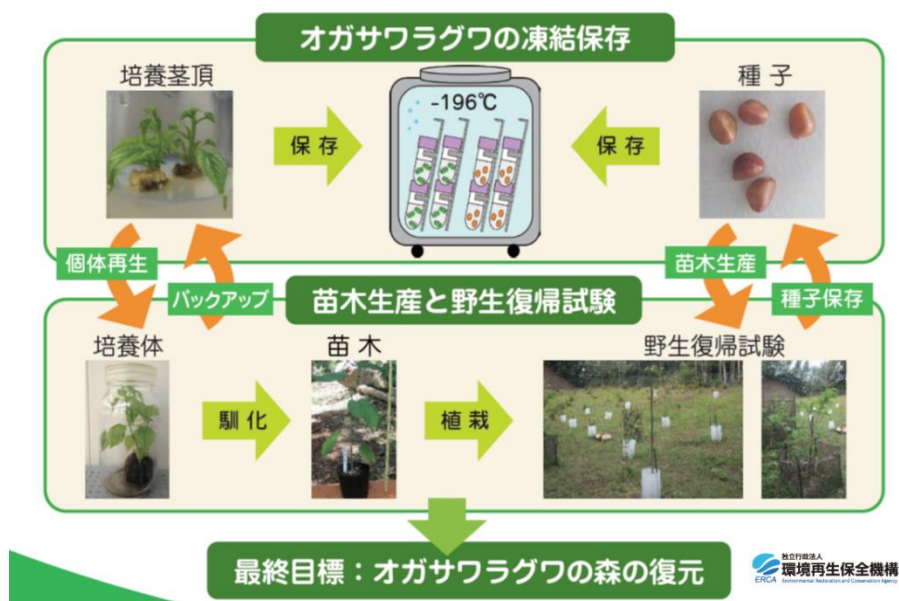


図0.13 凍結保存法を用いたオガサワラグワの生息域外保存体系.
エコプロ2018に出展した際にERCAと共同で作成.

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

1件

<主な査読付き論文>

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	1件
口頭発表（学会等）	4件
「国民との科学・技術対話」の実施	4件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	1件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

研究代表者

遠藤 圭太

北海道大学農学部卒業、博士（農学）、現在、（国研）森林研究・整備機構森林総合研究所林木育種センター遺伝資源部主任研究員

II. 成果の詳細

II-1 小笠原諸島の植生回復を目指した絶滅危惧種オガサワラグワの*Ex situ*保存技術の開発

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

遠藤 圭太

[要旨]

生息域外 (*Ex situ*) 保存は、生物多様性の保全に必要な遺伝資源の保存技術である。絶滅危惧種などの生息域内 (*In situ*) だけでは保全できない生物種の保全には生息域外保存が不可欠である。凍結保存法は遺伝資源の保存技術のひとつであり、樹木を含む植物では、培養組織などを用いたクローンの長期保存や、冷蔵庫および冷凍庫では長期保存できない種子の長期保存が可能である。

小笠原諸島には、小笠原固有の樹木であり絶滅の危機に瀕するオガサワラグワ (*Morus boninensis*) が生育する。過去には小笠原諸島の湿性高木林を構成する代表種のひとつであったが、木材利用のために大量伐採されて個体数が激減し、現在は150本ほどの成木が生残するのみと個体数が極端に少ない。また、アカギなどの外来種の侵入、繁殖によってオガサワラグワの生育地が著しく縮小している。さらに父島と母島では、養蚕を目的として導入されたシマグワとの交雑によって純粋なオガサワラグワの種子生産がほとんどなく、自然環境下での更新が阻害されている。本研究では、絶滅危惧種オガサワラグワを体系的に生息域外保存するために、オガサワラグワの凍結保存技術を開発した。現存個体を確保するために、組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワ培養体を用い、培養茎頂の凍結保存技術を開発した。また、現地では得ることのできない純粋なオガサワラグワの種子を、温室内で管理している生息域外保存コレクションを用いて人工交配によって生産し、得られた種子の凍結保存技術開発を行った。

培養茎頂の凍結保存技術開発では、凍結保存手法を最適化するためのV Cryo-plate法およびD Cryo-plate法を用いた凍結保存試験や、多くの個体を凍結保存するための他個体への適用試験、保存性を向上させるための低温処理試験などを実施した。その結果、オガサワラグワの培養茎頂は、培養体を4℃で1ヵ月程度低温処理した後、D Cryo-plate法を用いて100分程度乾燥処理して液体窒素中 (-196℃) で凍結保存すると保存後に最も高い再生育率を示すことが明らかとなった。現在は、D Cryo-plate法を用いた全現存個体の凍結保存が進捗しており、培養体の多くを50%程度の再生育率で凍結保存できると考えている。

種子の凍結保存技術開発では、温室内で維持、管理している現存個体のクローン苗を用い、ビニールチューブ法によって人工交配して純粋なオガサワラグワの種子を生産し、得られた種子を用いて、オガサワラグワ種子の乾燥耐性試験や温度別凍結保存試験を実施した。そして、オガサワラグワの種子が乾燥耐性の高いオーソドックス種子であり、種子乾燥法によって-20℃の冷凍庫内で非常に簡便に長期保存可能であることが明らかとなった。純粋なオガサワラグワ種子の生産と保存が可能となり、野生復帰などの現地でのオガサワラグワの保全への利用が期待される。

本研究では、培養茎頂と種子の凍結保存技術開発により、長期実行可能なオガサワラグワの生息域外保存体系を構築した。今後は、凍結保存法を利用した発展型生息域外保存を実行し、生息域内保存と連動しながらオガサワラグワの野生復帰を実現することが重要である。

1. 研究開発目的

小笠原固有の樹木であり絶滅の危機に瀕するオガサワラグワの凍結保存技術の開発を目的とする。オガサワラグワは個体数が極端に少ないため、生残木を確保することが絶滅を防ぐために不可欠である。組織培養によってクローン増殖した培養体を用い、培養茎頂の凍結保存技術を開発することでクローン保存を可能として現存個体の消失を防止する。また小笠原諸島では、外来種シマグワとの交雑により純粋なオガサワラグワの種子生産がほとんどなく、オガサワラグワの自然環境下での更新が阻害されている。そのため、人工交配技術を用いたオガサワラグワの種子生産は個体数を増加するためや自然での更新を回復するために重要である。本研究では、オガサワラグワの種子を人工交配によって生産し、それらの凍結保存技術を開発する。クローンおよび種子の凍結保存技術の開発によって、長期間にわたって実行可能なオガサワラグワの*Ex situ*保存体系へと発展させる。本研究の成果を林木ジーンバンク事業に導入し、現地で実施されているオガサワラグワの野生復帰試験に利用する。

2. 研究目標

組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワ培養体の茎頂の凍結保存技術を開発し、現存個体の消失を防止するとともに個体再生可能な状態で保存する。

温室内で維持、管理しているオガサワラグワ苗木を用い、種子生産のための人工交配技術と生産した種子の凍結保存技術を開発する。

これらの凍結保存技術の開発により、苗木生産の持続可能なオガサワラグワの*Ex situ*保存体系を構築する。

3. 研究開発内容

【クローン保存のための培養茎頂の凍結保存技術の開発】

〈培養体の作製と維持〉

小笠原諸島に生育するオガサワラグワ天然木および温室内で生息域外保存しているクローン苗から採取した休眠芽を用いて培養体を作製した（図1.1）。当年枝から摘出した休眠芽を0.02%塩化ベンザルコニウム溶液を付けたブラシを用いて表面洗浄し、さらに、70%エタノールで3分間、有効塩素5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で20分間、表面殺菌した。その後、オートクレーブして滅菌した蒸留水にて休眠芽を3回すすぎ、メスとピンセットを用いて休眠芽内部にあるシュートの原基を摘出した。摘出したシュート原基は、ムラシゲスクーグ（MS）培地成分、5 μ Mのベンジルアミノプリンおよび3%スクロースを含む0.8%寒天培地にて初代培養して培養体とした。培養体は、日長時間が16/8 h（明期/暗期）、温度が25°C（一定）の人工気象器内で育成し、生育状況に応じて1～2か月に1度程度植え替えを行い、継代培養によって培養体を維持した。

〈低温処理試験〉

培養植物を用いた茎頂などの栄養器官の凍結保存では、保存前に培養体を2週間～2ヵ月間、4°C程度で低温処理すると保存性が向上し、凍結保存後に高い再生育率を得ることができる。オガサワラグワは耐寒性が低く、低温下では枯死してしまうことが考えられたため低温処理試験を実施した。継代培養によって維持しているオガサワラグワ培養体を、温度を4°C、日長時間を短日条件：8/16 h（明期/暗期）に設定した人工気象器内で1～4週間低温処理をした。処理後、培養体の枝の頂端部から茎頂を摘出して培養し、再生育の可否を調べ、低温処理した培養体の凍結保存試験への利用可能性を検討した。

〈保存サンプルの作製〉

オガサワラグワの培養体を用いて凍結保存試験のための試料を作製した（図1.2）。保存サンプルとして凍結保存試験に用いる茎頂を作製するために、継代培養によって維持しているオガサワラグワ培養体から葉の展開が始まった腋芽を摘出し初代および継代培養と同様の培地で育成した。およそ2週間の

育成後、実体顕微鏡下で伸長した培養体の枝の頂端部から茎頂（1～1.5mm）を摘出し、1Mスクロースを含む寒天培地上で25℃の暗所にて一晩前培養して凍結保存試験に供試した。

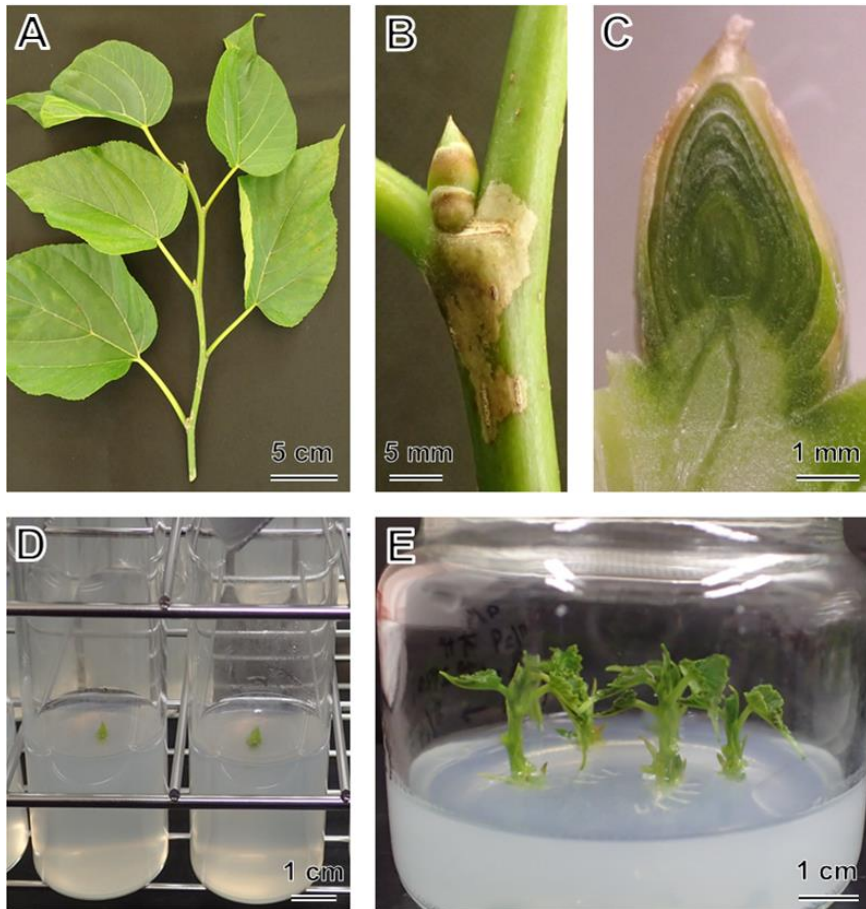


図1.1 オガサワラグワ培養体の作製と維持.

- (A) オガサワラグワの当年生枝. (B) 培養体に用いた当年生枝の休眠芽.
 (C) 休眠芽の縦断面. リン片に包まれた休眠芽内部には枝（シュート）の原基がある.
 (D) 初代培養の様子. (E) 継代培養によって維持されている培養体.

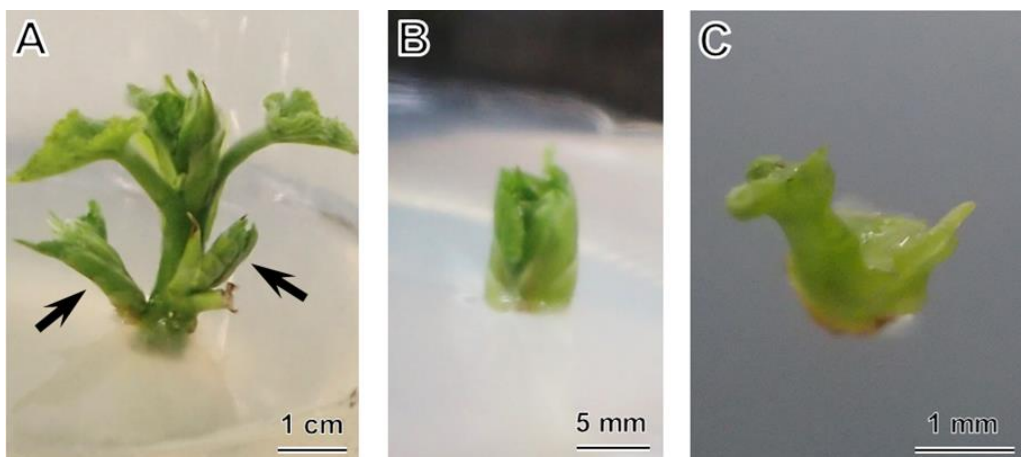


図1.2 凍結保存のための保存サンプル.

- (A) 培養体の腋芽（矢印）. (B) 培養体から摘出した腋芽の培養.
 (C) 枝の先端部から摘出した茎頂.

〈凍結保存試験〉

V Cryo-plate法

V Cryo-plate法（図0.3）と呼ばれるクライオプレート（Cryo-plate）を用いたガラス化法（Vitrification method）によって培養体から作製した保存サンプルである茎頂を凍結保存し、各ガラス化処理条件での保存後の再生育率を比較した。本凍結保存試験には、組織培養によってクローン増殖が容易な個体をモデル培養体として用いた。前培養した茎頂を2%アルギン酸ナトリウム水溶液に浸漬し、0.1M塩化カルシウム水溶液を用いてアルミニウム製のクライオプレート上に固定した。クライオプレートプレート1枚に8~12個の茎頂を固定し、保存サンプルが固定されたクライオプレートを2Mグリセロールおよび0.6Mスクロースを含むLS液（Loading Solution）に30分浸漬してLS液処理をした。その後、30%グリセロール、15%エチレングリコール、15%ジメチルスルホキシドおよび0.4MスクロースからなるPVS2（Plant Vitrification Solution 2）に保存サンプルを40~80分浸漬してガラス化処理し、液体窒素中（-196℃）に浸漬して急速冷却して保存用チューブ内で凍結保存した（図1.3）。

また、ガラス化液として50%グリセロールと50%スクロースからなるPVS3（Plant Vitrification Solution 3）を用いた凍結保存試験も実施した。



図1.3 凍結保存に用いた器具類.

- (A) クライオプレート（左）とクライオチューブ（右）.
 (B) 液体窒素の入ったデュワー瓶と保存サンプル. (C) 凍結保存容器.

D Cryo-plate法

D Cryo-plate法（図0.3）と呼ばれるクライオプレート（Cryo-plate）を用いた乾燥法（Drying method）によって培養体から保存サンプルとして作製した茎頂を凍結保存し、各乾燥処理条件での保存後の再生育率を比較した。本凍結保存試験には、V Cryo-plate法による凍結保存試験に用いた個体と同じクローンをモデル培養体として用いた。前培養した茎頂をクライオプレート上に固定し、2Mグリセロールおよび1Mスクロースを含むLS液（Loading Solution）に60分浸漬してLS液処理をした。その後、約10gのシリカゲルが入った50ml容プラスチックチューブ内で保存サンプルを40~120分間乾燥処理し、液体窒素中（-196℃）に浸漬して急速冷却して保存用チューブ内で凍結保存した（図1.3）。

〈再生育率測定〉

V Cryo-plate法およびD Cryo-plate法で凍結保存した試料を40℃に加温した1Mスクロース溶液に浸漬して急速融解し、同じ1Mスクロース溶液中で20分以上洗浄処理をした。洗浄後、クライオプレートから切り離れた茎頂を4ヵ月程度培養し、シュート（枝葉）を展開した個体を生存個体として再生育率を調べた。各処理につき3回行った凍結保存試験の平均を再生育率とした。

【種子の生産技術と凍結保存技術の開発】

〈供試材料〉

温室内で維持、管理している生息域外保存コレクションを用いて純粋なオガサワラグワの種子生産のための人工交配技術の開発を行った。さらには、人工交配して得られた種子を用いて種子の凍結保存技術の開発も実施した。森林総合研究所林木育種センター構内（茨城県日立市）の温室内で生育しているオガサワラグワのクローン苗（苗高：40～80cm）は、秋が花期であり2018-19年には9月中旬～11月下旬に13個体の雄株が開花し、また、22個体の雌株が10月中旬から11月下旬に開花した。

〈人工交配〉

人工交配はチューブ法を用いて行った（図1.4）。開花した雄花序を内径10mmのビニールチューブに入れてタップして花粉を採取し、採取した花粉の入ったチューブ内に柱頭が露出した開花中の雌花序を入れて受粉させて人工交配した。人工交配した雌花序は交配袋を被せ、温室内で自然交配してコンタミ（他の雄株との交配）するのを防止した。人工交配後は果実の発達の様子を観察し、成熟して黒くなった果実から種子を摘出した。果実の成熟には3～4ヵ月を要し、12月下旬～2月中旬に多くの種子が採取された。

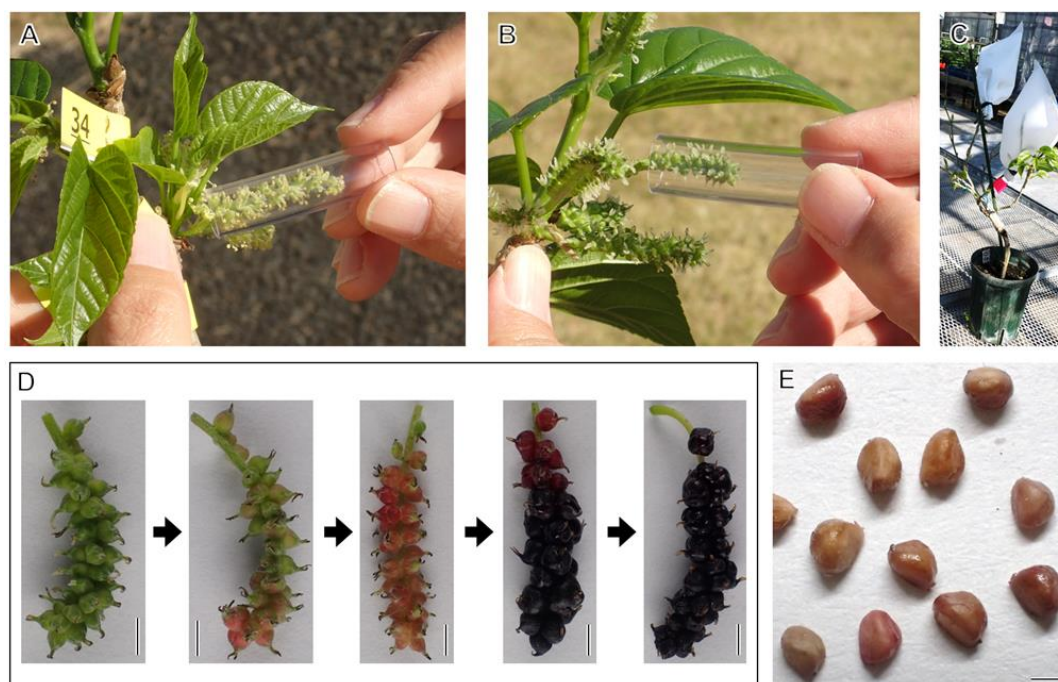


図1.4 ビニールチューブ法によるオガサワラグワの種子生産。

(A) 花粉採取. (B) 受粉操作. (C) 人工交配した苗木. 人工交配した雌花は交配袋によって隔離してコンタミを防止した. (D) オガサワラグワ果実の成熟過程. Bars=1 mm. (E) 人工交配種子. Bar=1 mm.

〈凍結保存試験〉

-170℃保存試験

自然交配で得られた充実種子を用い、種子乾燥法によって保存温度-170℃での凍結保存試験を行った（図0.4）。果実から摘出した種子を水選し、組織の未発達なシイナ種子と充実種子に選別した。得られた充実種子を温度20℃の室内で異なる相対湿度（%RH）の下に1週間静置して乾燥処理をした（表1.1）。飽和塩化ナトリウム水溶液によって75%RH、飽和塩化マグネシウム水溶液によって33%RHに調整したデシケーター内、または8%RHに保たれた湿度制御可能なオードドライデシケーター内で種子を乾燥処理し、-170℃の凍結保存容器内で1～2週間凍結保存した。

冷凍（-20℃、-80℃）凍結保存試験

人工交配で得られた種子を用い、種子乾燥法を用いて-20℃、-80℃および、-170℃での凍結保存試験を実施した。果実から摘出した種子を水選し、得られた充実種子を相対湿度 8 %のオートドライデシケーター内で1週間乾燥処理をした。乾燥処理した種子は、-20℃および-80℃の冷凍庫、-170℃の凍結保存容器内で6ヵ月間凍結保存した。

発芽試験

凍結保存した凍結保存種子、凍結保存前の乾燥処理のみをした乾燥種子および、乾燥処理前の新鮮種子の発芽試験を行い、保存条件を検討した。凍結保存種子は室温で30分以上加温して融解し、100%RHに調整したデシケーター内で一晩吸水処理をした。また、乾燥種子も、1週間の乾燥処理後、100%RHで吸水処理をした。30～40粒の種子をシャーレに作製した1%寒天培地上に播種し、種子の入ったシャーレを昼20℃、夜30℃および日長時間8時間に設定した人工気象器内に静置して発芽試験を行った。

〈含水率測定〉

乾燥処理前の新鮮種子および各相対湿度下で乾燥処理をした乾燥種子の50粒の重量を測定し、105℃のオーブン内で一晩静置した。その後、再度、種子重量を測定して新鮮重当たりの含水率を調べた。種子の含水率測定は3回行い、平均の値を新鮮および乾燥種子の含水率とした。

〈乾燥保存試験〉

人工交配種子の乾燥保存試験も実施した。水選後、得られた充実種子を相対湿度 8 %のオートドライデシケーター内で1年間、乾燥保存した。乾燥保存後、種子を100%RHで吸水処理し、1%寒天培地上で発芽試験を行った。

〈花粉採取適期の調査〉

効率的な種子生産のためには、より多くの稔性花粉を人工交配に用いることが重要である。花粉の採取適期を明らかにするために、発達ステージの異なる雄花序から花粉を採取し、花粉数と花粉生存率を比較した。2019-20年の花期（秋）に温室内のオガサワラグワのクローン苗より発達ステージの異なる雄花序を採取した。採取した雄花序は、同程度の長さで切ったビニールチューブに入れ、薬包紙に包み相対湿度 8 %のデシケーター内で2～3日乾燥した（図1.5）。乾燥後、薬包紙に包まれたビニールチューブを振って花粉の漏出を促した。薬包紙および雄花序を除いた後、ビニールチューブの中央部の内壁にある花粉数を計測した。雄花序1つから採取された1mm²あたりの花粉数を算出した。

〈花粉生存率試験〉

採取した花粉の生存率を寒天培地発芽検定法およびFDA(fluorescein diacetate)蛍光染色法によって測定した。寒天培地発芽検定法では、0～30%の濃度の異なるスクロースを含む1%寒天培地上に花粉を播種して発芽率を測定し、オガサワラグワ花粉の発芽に適した発芽床のスクロース濃度を調べた。発芽床に播種後、2～3日間25℃の暗所に花粉を静置し、光学顕微鏡下で50～80個程度の花粉における発芽した花粉の数を測定して割合を調べた。異なるシャーレに作製した発芽床で3回測定した発芽花粉の割合の平均を生存率とした。

FDA蛍光染色法では、1mg/mlの濃度でジメチルスルホキシド中に調整した1μlのFDAを1mlの花粉尘濁液に入れて15分蛍光染色した。蛍光染色した花粉を1mlの蒸留水ですすぎ、50μlの花粉尘濁液をスライドガラス上に滴下して蛍光観察して花粉生存率を測定した。

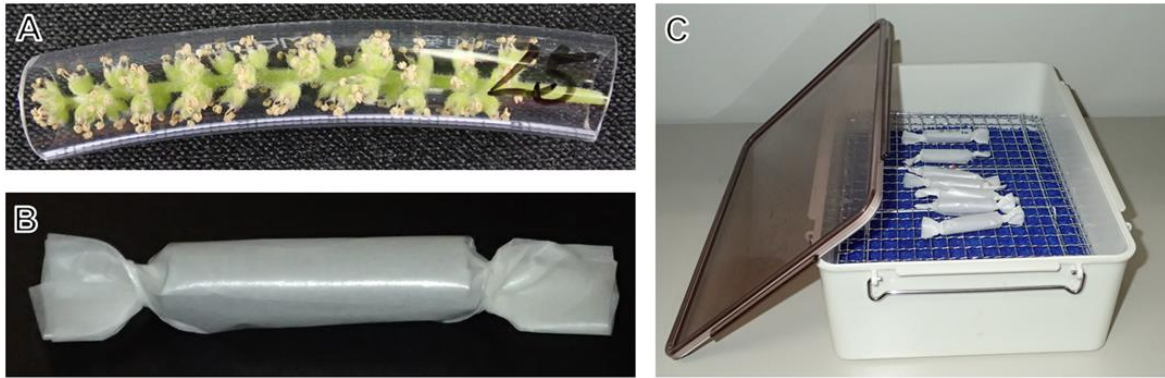


図1.5 花粉採取と保存.

- (A) 花粉採取用チューブに入った雄花序. (B) 薬包紙に包んだチューブ.
(C) 保存容器に入ったチューブ.

〈花粉保存試験〉

花期の異なる親間での人工交配を実施するためには、花粉の保存技術が必要である。そこで、花粉の冷凍保存試験を実施した。温室内のオガサワラグワのクローン苗より雄花序を採取し、同程度の長さのビニールチューブに入れた。薬包紙に包んだ後、相対湿度8%RHのデシケーター内で2～3日乾燥した。乾燥後、薬包紙に包まれたビニールチューブをよく振って花粉を漏出させ、乾燥状態を維持して保存するため、シリカゲルでおよそ5%RHとしたプラスチック容器内に雄花序の入ったビニールチューブを入れて-20℃の冷凍庫内で冷凍保存した(図1.5)。冷凍保存後、ビニールチューブの入った容器を室温で一晩静置して融解した。ビニールチューブから雄花序を除いた後、蒸留水で100%RHに調整したデシケーター内で花粉の吸水処理をし、寒天培地発芽検定を用いて花粉の生存率を試験した。

4. 結果及び考察

【クローン保存のための培養茎頂の凍結保存技術の開発】

〈低温処理試験〉

温帯性植物の培養体の凍結保存に有効である低温処理のオガサワラグワ培養体への適用の可否を検討した。16時間日長および25℃で継代培養しているオガサワラグワ培養体を8時間日長および4℃の人工気象器内に静置して低温処理をした。1～4週間低温処理をした培養体の茎頂の再生育率は、低温処理前の茎頂の再生育率と同程度であった(図1.6)。そのため、オガサワラグワ培養体が4℃で4週間の低温処理が可能であることがわかった。

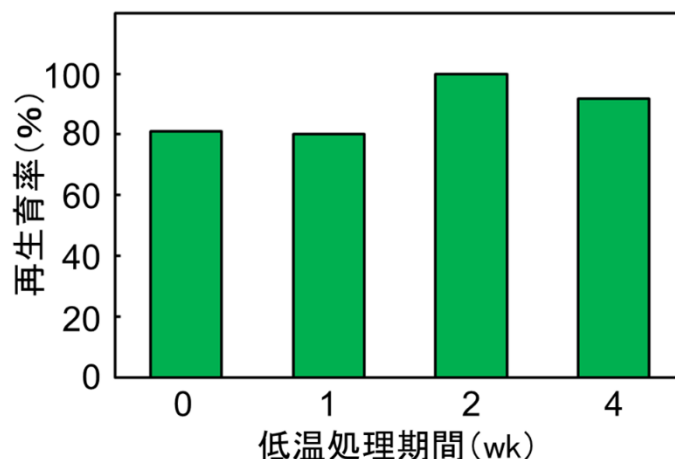


図1.6 低温処理した茎頂の再生育率.

〈V Cryo-plate法による凍結保存試験〉

オガサワラグワのモデル培養体から保存サンプルとして調整した茎頂を凍結保存すると、保存サンプルによって枯死、カルス形成、葉のみを展開、芽の形成およびシュート形成などのいくつかの異なる再生育パターンを示した（図1.7）。本凍結保存試験では、シュートを展開した保存サンプルを再生育個体として再生育率を調べた。

低温処理前のオガサワラグワ培養体から凍結保存サンプルを作製し、V Cryo-plate法によって凍結保存試験を実施した（図1.8と1.9）。オガサワラグワの培養茎頂は、PVS2を用いたガラス化液処理によって再生育率が著しく低下し、凍結保存前においても20分間のPVS2処理によって30%程度まで再生育率が低下した（図1.8）。凍結保存後の茎頂の再生育率はさらに低く、ガラス化液処理を20分間した後、凍結保存した茎頂の再生育率は約10%であり、40～80分間ガラス化液処理した茎頂の凍結保存後の再生育率は20～25%であった。本凍結保存試験に用いたPVS2は植物の凍結保存に最も利用されるガラス化液である。しかし、糖やグリセリンなどの溶質が高濃度に調整されているためPVS2の組織への浸透によって細胞は相当な浸透圧ストレスを受ける。また、PVS2の主成分のひとつであるジメチルスルホキシドは濃度や細胞種によっては、細胞毒性を示すことが知られている。オガサワラグワの培養茎頂はPVS2に対して感受性を示し、ガラス化液処理によって凍結保存前に著しく再生育率が低下した。そのため、ガラス化液としてPVS2を用い、V Cryo-plate法によってオガサワラグワの茎頂を凍結保存することが困難であるとわかった。

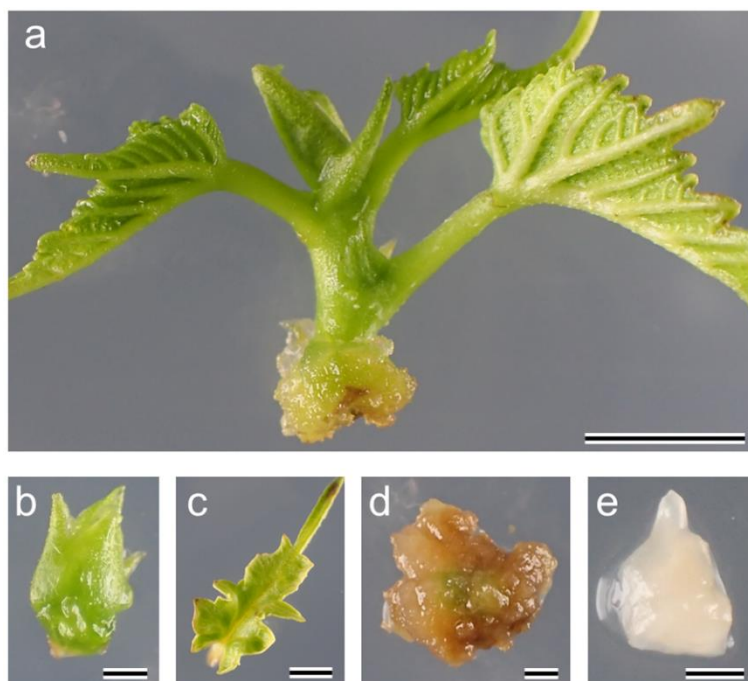


図1.7 凍結保存したオガサワラグワ培養茎頂の再生育の様子。

- (a) シュート（枝と葉）を展開した個体. Bar=5 mm (b) 芽を形成した個体.
 (c) 葉のみを展開した個体. (d) カルスを形成個体. (e) 枯死個体. Bars(b-c)=1 mm.

PVS2を用いたオガサワラグワの培養茎頂の凍結保存が困難とわかったため、PVS2に次いでガラス化液として利用されるPVS3を用いてV Cryo-plate法による凍結保存試験を実施した（図1.9）。PVS3処理のみをした凍結保存前の茎頂の再生育率は50%程度であり、同時間PVS2を用いてガラス化液処理をした場合と比べて高い再生育率を示した。一方、60分間のPVS3によるガラス化液処理後、液体窒素中で凍結保存した培養茎頂の再生育率は10%程度であった。PVS3はジメチルスルホキシドを含まないため毒性が低く、PVS2に対して感受性を示す植物組織の凍結保存に利用されている。一方、PVS3は体積のほとんどをグリセリンとスクロースが占めているため溶液の粘度が非常に高く、組織への浸透性が悪い。そのた

め、ガラス化液処理のみをした凍結保存前の茎頂の再生育率の違いが、PVS2とPVS3の毒性、もしくは浸透性の違いによるものかは不明である。PVS3を用いたオガサワラグワの培養茎頂の凍結保存はさらなるPVS3処理時間の検討が必要であるが、多くの場合、ガラス化液処理時間が長くなるとともに再生育率は低下するため、再生育率を飛躍的に向上させることは困難であると考えられる。

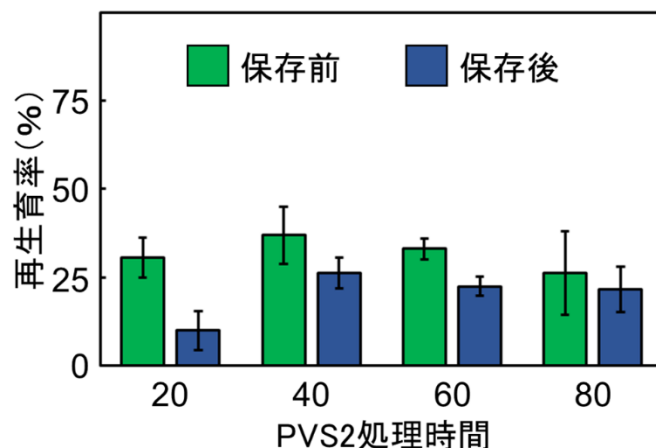


図1.8 PVS2を用いてV Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワ培養茎頂の再生育率.

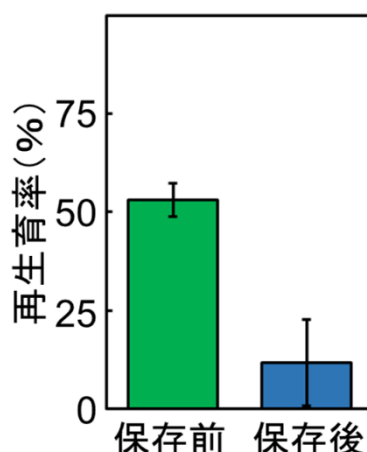


図1.9 PVS3を用いてV Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワ培養茎頂の再生育率.

〈D Cryo-plate法〉

低温処理前のオガサワラグワのモデル培養体から凍結保存サンプルを作製し、D Cryo-plate法によって凍結保存試験を実施した（図1.10）。D Cryo-plate法はV Cryo-plate法と同様に植物の凍結保存法であるが、比較的新しい技法である。D Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワの培養茎頂は、乾燥処理時間によって異なる再生育率を示した。乾燥処理時間が100分程度までは、乾燥時間が長くなるとともに再生育率が上昇した一方で、120分間乾燥処理をすると培養茎頂の再生育率は低下した。また、乾燥処理のみをした凍結保存前の茎頂の再生育率は、乾燥処理時間が長くなるとともに低下した。D Cryo-plate法では、凍結保存前の乾燥処理によって細胞内水分を減少させて液体窒素への浸漬時に細胞内での水の凍結を防止すること、および過度の乾燥処理による脱水障害の発生を防止することが保存を成功させる鍵要因である。本手法を用いた場合、オガサワラグワの培養茎頂の乾燥処理時間は、100分間程度が適していることが明らかとなった。

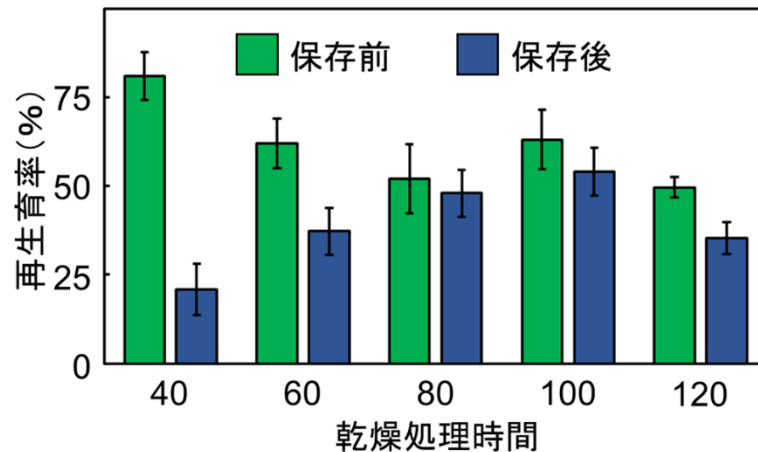


図1.10 D Cryo-plate法によって凍結保存したオガサワラグワ培養茎頂の再生育率.

〈他個体への適用試験〉

モデル培養体を用いたオガサワラグワの培養茎頂の凍結保存試験では、V Cryo-plate法よりもD Cryo-plate法が凍結保存後に得られる再生育率が高かった。そこで、D Cryo-plate法によって他の個体（モデル個体以外）の凍結保存試験を実施した（図0.5と1.11）。他個体への適用試験では、低温処理した培養体も用いてD Cryo-plate法によって凍結保存試験を実施し、低温処理の効果も検証した。個体Aというオガサワラグワの培養体を用い、低温処理前の茎頂を100分間乾燥処理してD Cryo-plate法によって凍結保存すると、凍結保存後の再生育率は10%程度であり、モデル個体の再生育率と比べて著しく低かった（図1.11）。これに対し、2週間もしくは4週間低温処理をした培養茎頂を100分間乾燥処理して凍結保存すると再生育率が50%程度まで上昇した。そのため、凍結保存サンプルの作製前に培養体を低温処理することが、凍結保存後により高い再生育率を得るための重要な処理プロセスであることがわかった。そこで、個体Bおよび個体Cを用い、4週間低温処理した培養体の茎頂をD Cryo-plate法によって凍結保存した。すると、凍結保存後の再生育率は個体Aと同様に個体Bおよび個体Cのどちらもおよそ50%程度であった。

他個体への適用試験では、低温処理をしないオガサワラグワ培養体のD Cryo-plate法による保存性が個体によって顕著に異なることがわかった。保存性の個体間差の原因は不明であるが、溶液の浸透性や乾燥耐性などの個体ごとの組織の性質の違いが影響しているのかもしれない。また、組織培養において、オガサワラグワは個体によって成長の速度や増殖効率が異なる。培養条件に対する挙動の違いも凍結保存後の再生育率に影響するのかもしれない。さらに本試験では、低温処理により保存性が向上することが明らかとなり、低温処理を保存プロセスに導入することで培養体の多くをD Cryo-plate法によって凍結保存できる可能性が示された。低温処理は、温帯や寒帯性植物の凍結保存に利用される保存性向上のための手法である。四季のある地域に生育する越冬性植物は、秋季に低温（10～0℃程度）に曝されると越冬のために耐寒性を獲得し、耐寒性の低い夏の組織と比べて凍結保存が容易となる。耐寒性を獲得する過程で生じる植物体内での生理的変化を利用して、保存性を向上させる処理が低温処理である。一方、亜熱帯域に自生するオガサワラグワは耐寒性が低く、温帯域の茨城県日立市では野外では越冬できない。そのため、温帯および寒帯性植物のような耐寒性の獲得機構を有していないと考えられる。オガサワラグワのような熱帯および亜熱帯産の植物は、凍結保存が最も困難な植物類とされている。本研究によって、亜熱帯産樹木であるオガサワラグワの凍結保存後の再生育率が低温処理によって向上することが明らかとなった。低温処理の適用により熱帯および亜熱帯産植物の保存技術開発につながる可能性があり、低温処理下で生じるオガサワラグワ培養体の生理変化を解明することが、植物の凍結保存技術を発展させるために重要である。

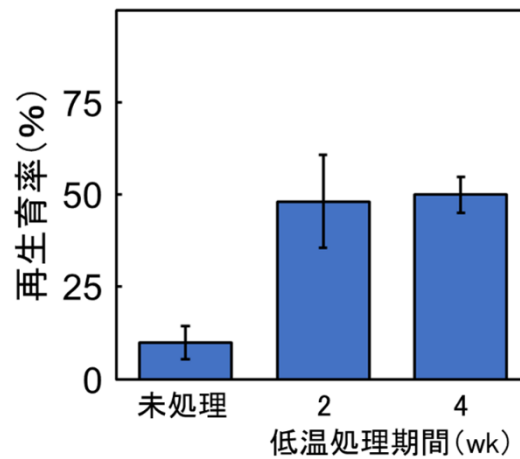


図1.11 D Cryo-plate法を用いて凍結保存した培養茎頂の再生育率に対する低温処理効果.

【人工交配種子の凍結保存技術の開発】

〈交配法の違いによる充実種子の生産効率と発芽率の違い〉

人工交配および温室内での自然交配によって得られた種子の生産効率を調べた (図1.12)。ひとつの果実あたりから得られる充実種子数は、人工交配よりも自然交配の方が多かった。また、種子の充実率 (充実種子/全種子 (充実種子+シイナ)) は、交配方法の違いによって顕著な差はなく60%程度であった。

得られた種子を20/30℃ (明期/暗期) および8時間日長の人工気象器内で播種すると、播種後、およそ2週間で発根が始まり、発芽には1~2か月程度を要した (図1.13)。種子の発芽率は交配法によって異なり、自然交配によって得られた充実種子の発芽率は80%程度であり (図1.14)、ビニールチューブ法を用いた人工交配によって得られた充実種子の発芽率は65%程度であった (図0.5)。

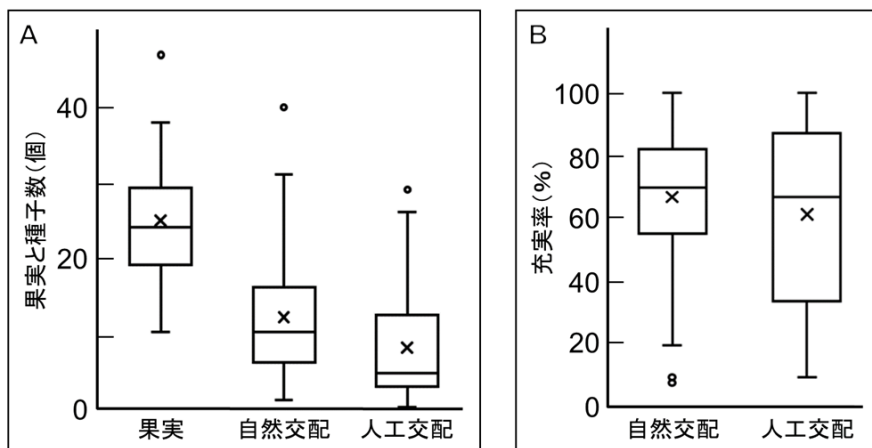


図1.12 果実あたりの小摘果と充実種子の数 (A) および、自然交配と人工交配によって得られた種子の充実率 (B) .



図1.13 オガサワラグワ種子の発芽。
(A) 発芽前の種子. (B) 発根した種子. (C) 正常実生. Bars=0.5mm.

〈種子乾燥法を用いた -170°C でのオガサワラグワ種子の凍結保存〉

自然交配種子を用いて種子乾燥法による -170°C での凍結保存試験を実施した。オガサワラグワの種子を異なる相対湿度下で乾燥処理して含水率を調整した。それらの乾燥種子の発芽率は、乾燥前の新鮮種子の発芽率と同様であった(図1.14)。そして、乾燥処理後、 -170°C で凍結保存した保存種子の発芽率も乾燥種子や新鮮種子の発芽率と同様であった。これに対し、比較的高い含水率であった新鮮種子を直接凍結保存すると、保存後に発芽する種子はなかった。これらの結果から、オガサワラグワの種子が高い乾燥耐性を持つオーソドックス種子であり、種子乾燥法によって凍結保存可能であることが明らかになった。

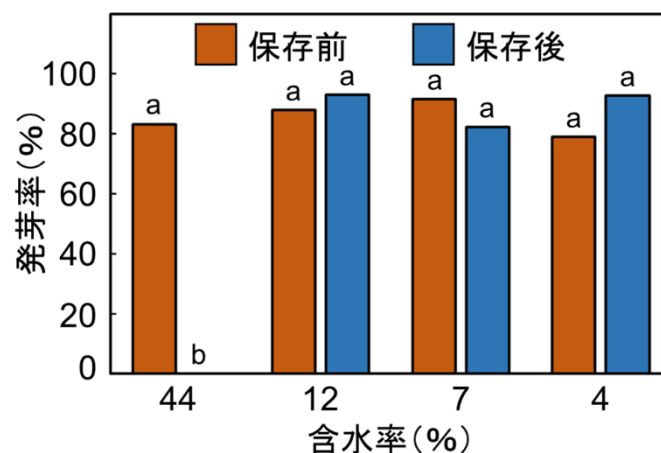


図1.14 種子乾燥法により -170°C で凍結保存したオガサワラグワ種子の発芽率.

〈冷凍庫を用いた種子の凍結保存〉

オガサワラグワ種子の保存の汎用性を高めるため、汎用型冷凍庫を用いた -20°C および -80°C での凍結保存試験を実施した。人工交配種子を相対湿度8%のオートドライデシケーター内での乾燥処理し、 -20°C 、 -80°C および -170°C で6ヵ月凍結保存した。それらの人工交配種子の発芽率は、凍結保存前の乾燥種子および新鮮種子の発芽率と同程度であった（図0.5）。そして、発芽後も正常に成長した。これらの結果から、オガサワラグワの乾燥種子が -170°C だけでなく、 -20°C および -80°C でも保存可能であることが明らかとなった。

植物種子は乾燥耐性の違いにより、乾燥耐性の高いオーソドックス種子、中程度の乾燥耐性を持つサブオーソドックス種子および乾燥耐性の低いリカルシトラント種子の3種類に大別される。オガサワラグワの種子は高い乾燥耐性を示したことからオーソドックス種子に類別される。オーソドックス種子の冷凍庫での凍結保存は、多くのシードバンクで利用されている植物遺伝資源の保存法のひとつである。本研究により、オガサワラグワの種子がオーソドックス種子であり、汎用型冷凍庫にて凍結保存可能であることが明らかとなった。オガサワラグワ種子のジーンバンク事業での保存が可能となったため、現在、林木ジーンバンク事業にて、およそ200粒のオガサワラグワの種子を冷凍凍結保存している。今後は、保存数を増やすとともに、凍結保存種子を利用して現地での野生復帰試験を推進していくことが重要である。

〈1年間乾燥保存した種子の発芽率〉

凍結保存試験では、オガサワラグワの種子がオーソドックス種子であり乾燥状態でも発芽率を維持できることが明らかになった。そこで、オガサワラグワ種子の乾燥保存の可否を検討した。人工交配種子を相対湿度8%RHのデシケーター内で1年間乾燥保存した。それらの種子の発芽率は60%程度であった（図1.15）。これに対し、保存前の種子の発芽率は65%程度であった。これらの結果から、オガサワラグワの種子はわずかに発芽率が低下する可能性があるが、8%RH雰囲気下で1年間はおおよそ発芽率を維持できることが明らかとなった。

保存種子の寿命は、種子の含水率と保存温度によって変化する。同含水率の種子では、保存温度が低いほど長期間発芽率を維持できる。一方で、常温保存は簡便で低コストで実施可能という利点がある。オーソドックス種子の保存条件は目的に応じて選択することが重要である。

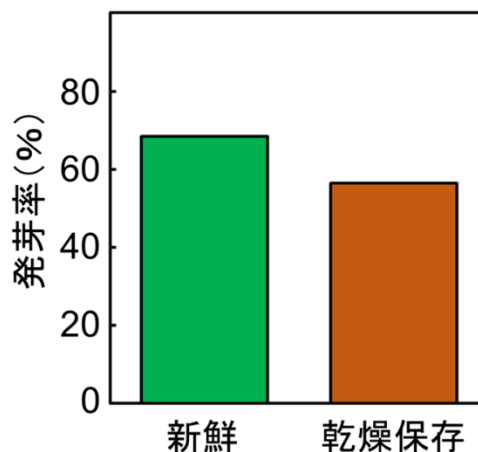


図1.15 1年間乾燥保存した種子の発芽率。

〈人工交配のための花粉採取の適期〉

雄花序の発達ステージと採取花粉数

人工交配による種子生産では、多くの稔性花粉を用いて交配することが重要である。そこで、異なる発達ステージの雄花序から花粉を採取し、花粉数と花粉生存率を調べて花粉の採取適期を検討した。

花芽が開芽した後、雄花序の発達の様子を観察し、雄花序の発達ステージを：ステージ0；開花前の葯の露出がない、1；葯の露出が始まった開花初期、2；50%程度の雄花から葯が露出した開花中期、3；満開、4；葯が褐変した開花後、の5ステージに類別した（図1.16）。異なる発達ステージの雄花序から得られた花粉の数は、発達ステージによって顕著に異なり、ステージ1～3の雄花序から採取される花粉が、ステージ0および4の雄花序から得られる花粉よりも多かった（図1.17）。



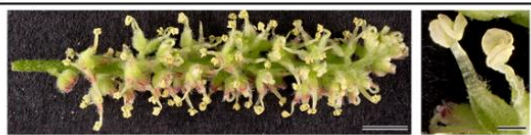

ステージ	写真	説明
0		開花前
1		開花初期
2		開花中期
3		満開
4		開花後

図1.16 花粉を採取した雄花序の発達ステージ。

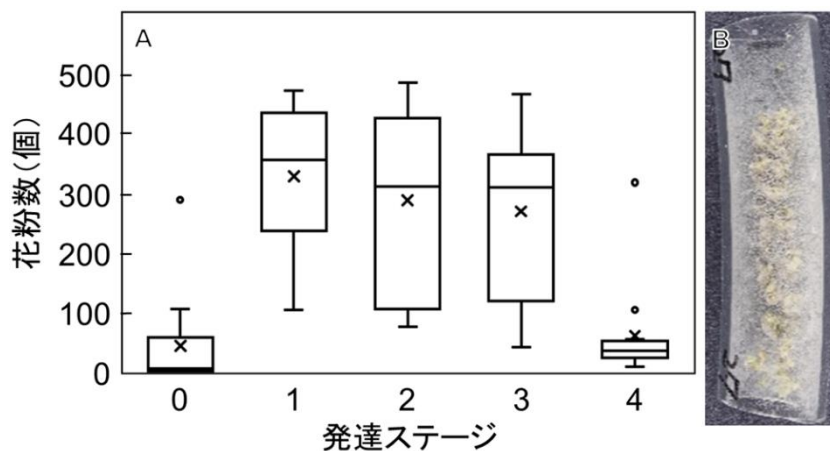


図1.17 異なる発達ステージの雄花序から採取した花粉数 (A) と採取した花粉 (B)。

雄花序の発達ステージと花粉発芽率

発達ステージの異なる雄花序から採取した花粉の生存率を調べ、さらなる花粉採取適期の検討を行った。本実験では、まず、花粉生存率を測定するための発芽条件を検討した。0～30%のスクロースを含む発芽床で花粉の発芽試験をすると、発芽床に含まれるスクロース濃度によって花粉発芽率が異なり、10～15%のスクロースを含む発芽床に播種した花粉の発芽率が比較的高かった。また、15%スクロースを含む発芽床での花粉発芽率は、FDA染色法によって調べた花粉生存率と同程度であった（図1.18）。そのため、15%程度のスクロースを含む発芽床が、寒天培地発芽検定法によるオガサワラグワの花粉の生存率試験に適していることがわかった。

発達ステージの異なる雄花序から採取した花粉の発芽率は、ステージ1～3の雄花序から採取される花粉の発芽率が、ステージ0および4の雄花序から得られる花粉の発芽率よりも高かった（図1.19）。これらの結果から、より多くの生存花粉を採取できる発達ステージ1～3がオガサワラグワの花粉の採取適期であることがわかった。オガサワラグワの開花のタイミングは個体によって異なるだけでなく、同一個体内においても花序によって異なる。そのため、効率良く花粉を採取するためには花期のオガサワラグワの成長観察が非常に重要である。

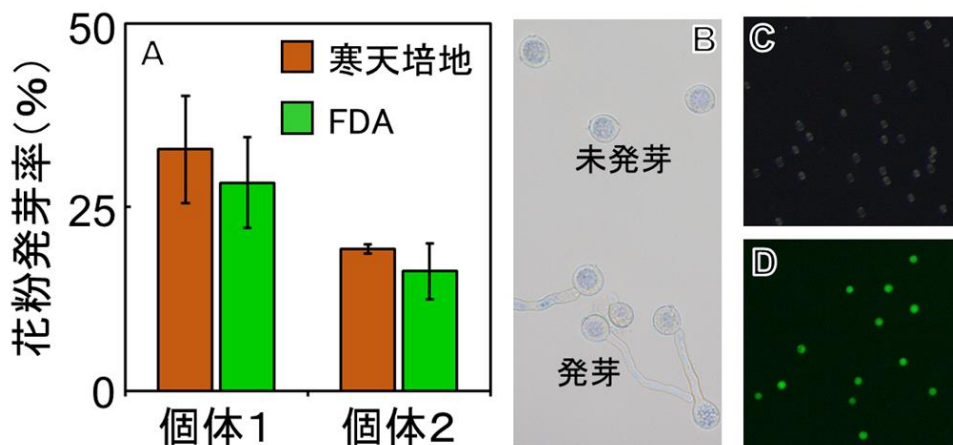


図1.18 寒天培地上での花粉発芽率とFDA蛍光染色法によって調べた花粉生存率 (A) .
寒天培地上で発芽した花粉 (B) .
FDAによって蛍光染色した花粉の明視野像 (C) と蛍光像 (D) .

花粉の冷凍保存

開花のタイミングの異なるオガサワラグワ同士を交配するためには花粉の保存が不可欠である。人工交配技術をさらに発展させるために花粉の保存技術開発にも取り組んだ。-20℃で2～3ヵ月間保存した冷凍保存花粉の発芽率を寒天培地発芽検定法によって調べた（図1.19）。冷凍花粉の発芽率は、保存前の乾燥花粉の発芽率と同程度であった。また、1年間-20℃で保存した冷凍花粉の発芽率も保存前の乾燥花粉の発芽率と同程度であった（図1.20）。これらの結果から、オガサワラグワの花粉が-20℃の冷凍庫で少なくとも1年間は保存可能であることがわかった。

花粉の保存技術開発により、開花のタイミングの異なる親同士の人工交配が可能となり、人工交配に用いる花粉親および種子親の選択肢が拡張した。小笠原諸島に生育するオガサワラグワは集団間で遺伝的構成が異なることが知られており、種子生産には、個体の出身地などを考慮して人工交配する必要がある。今後、人工交配により生産した種子を野生復帰試験などに利用するためには、交配親の選定が不可欠であり、保存花粉が多用されると予想できる。

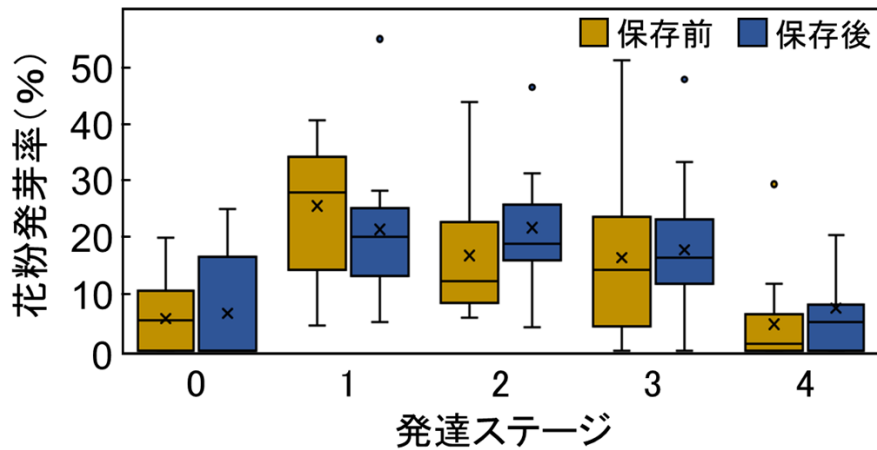


図1.19 異なる開花ステージの雄花序から採取した花粉数.

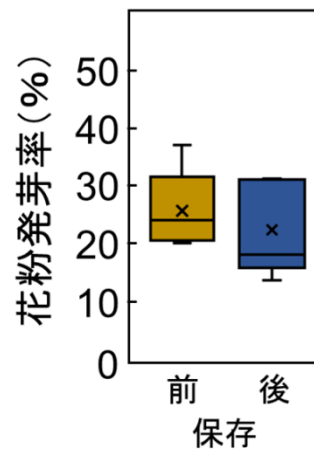


図1.20 -20°Cの冷凍庫で1年間保存したオガサワラグワの花粉発芽率.

5. 研究目標の達成状況

小笠原諸島に固有の樹木である絶滅危惧種オガサワラグワの凍結保存技術の開発に取り組んだ。現存個体を確保するためのオガサワラグワ培養体の凍結保存技術の開発では、組織培養によってクローン増殖したオガサワラグワの培養茎頂を用いて凍結保存試験を実施し、最適なオガサワラグワ培養体の凍結保存手法を明らかにした（図0.11）。種子の生産技術と凍結保存技術の開発では、ビニールチューブ法を用いた人工交配法により純粋なオガサワラグワの種子生産が可能となり、また、それらの種子の凍結保存が可能となった（図0.12）。また、オガサワラグワの種子が1年以上常温乾燥保存できることも明らかにした。さらには、より効率的な人工交配を実施するために、花粉の採取適期や保存技術なども明らかにした。これらの培養茎頂の凍結保存技術、種子の生産および保存技術の開発により、野生復帰のための苗木のバイオリソースとして利用できる長期実行可能なオガサワラグワの生息域外（*Ex situ*）保存体系を構築した（図0.13）。現在は、本研究で開発したオガサワラグワの凍結保存技術を用いて、現存するオガサワラグワの全個体保存と人工交配によって生産した種子の凍結保存が進捗している。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

- 1) 遠藤圭太、板鼻直榮：林木育種情報、36, 6-7 (2021)
「生息域外保存コレクションを用いた絶滅危惧種オガサワラグワの種子の生産と凍結保存」

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 遠藤圭太、板鼻直榮、松下通也、山田浩雄、生方正俊：第65回低温生物工学会大会（2020）
「絶滅危惧種オガサワラグワの種子生産と凍結保存」（口頭）
- 2) 遠藤圭太、板鼻直榮、山田浩雄、高橋誠、生方正俊：第64回低温生物工学会大会（2019）
「絶滅危惧種オガサワラグワの種子の凍結保存」（口頭）
- 3) 遠藤圭太、板鼻直榮、山田浩雄、生方正俊：Cryopreservation Conference 2019（2019）
「超低温保存法を用いた絶滅危惧種オガサワラグワの種子の長期保存技術開発」（口頭）
- 4) 遠藤圭太、板鼻直榮、山田浩雄、生方正俊：Cryopreservation Conference 2018（2018）
「絶滅危惧種オガサワラグワの凍結保存法の検討」（ポスター）

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 令和元年度森林総合研究所一般公開（2019年7月27日、森林総合研究所、来場者2,161名）にて研究紹介
- 2) 平成30年度林木育種成果発表会（2019年2月13日、木材会館7階ホール、参加者約130名）にて成果紹介
- 3) エコプロ2018 SDGs時代の環境と社会、そして未来へ（主催：（一社）産業環境管理協会、日本経済新聞社、2018年12月6～8日、東京ビッグサイト東ホール、来場者数162,217人）にて成果紹介
- 4) 第16回環境研究シンポジウム スマート社会と環境 豊かな暮らしと環境への配慮の両立を目指して（主催：環境研究機関連絡会、2018年11月13日、一橋大学一橋講堂、観客約80名）にて成果紹介

(4) マスコミ等への公表・報道等>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

- 1) 国立研究開発法人森林研究・整備機構 理事長賞、令和元年11月1日

IV. 英文Abstract

Development of *Ex situ* Conservation of Endangered Ogasawara Mulberry for Recovery of Lost Endemic Forest

Principal Investigator: Keita ENDOH

Institution: Juo, Hitachi City, Ibaraki, JAPAN

Tel: +81-294-39-7641 / Fax: +81-294-39-7352

E-mail: endohk@affrc.go.jp

[Abstract]

Key Words: *Ex situ* conservation, Endangered tree, *Morus boninensis*, Cryopreservation, Clonal conservation, Tissue culture, D-plate method, Seed production, Artificial-pollination, Seed conservation, Orthodox seeds

Ex situ conservation is a valuable tool for plant conservation. Cryopreservation is a useful for *ex situ* plant conservation and is well suited to the long-term preservation of plant genetic resources and mitigation against the loss of plant genetic resources of endangered species.

The Ogasawara mulberry (*Morus boninensis*) is a critically endangered tree species endemic to the Ogasawara Islands of Japan. Including planted trees, only approximately 150 adult trees have been confirmed to exist. Logging of *M. boninensis* for lumber and other applications in the past, combined with the high economic value of timber from this species, has resulted in this species becoming endangered throughout its range. Establishing seedlings has been complicated by the invasion by introduced tree species, such as *Bischofia javanica*. In addition, *M. boninensis* has been hybridized with *M. acidosa*, which was introduced from the Okinawa Islands, and which is now an invasive species in the Ogasawara Islands. In response to these threats, *ex situ* conservation is considered to be necessary to prevent the extinction of *M. boninensis*. In this study, cryopreservation techniques were optimized using *in vitro*-grown shoot tips for clonal preservation of existing *M. boninensis* trees. Seed cryopreservation was also examined by using *M. boninensis* seeds produced by artificial pollination using an *ex situ* living collection of trees maintained in a greenhouse.

Regrowth rates of shoot tips cryopreserved using the D Cryo-plate Method were higher than those of shoot tips cryopreserved using the V Cryo-plate Method. Chilling of *in vitro*-grown shoots at 4°C for one month increased the regrowth rate after cryopreservation by D Cryo-plate method. Clonal cryopreservation was thus feasible using the D Cryo-plate Method with *in vitro*-grown shoot tips, which were incubated at 4°C for one month.

Seed production and cryopreservation of *M. boninensis* was also examined. The seeds were produced by artificial pollination using vinyl tube method from an *ex situ* living collection maintained in a greenhouse. The *M. boninensis* seeds showed a characteristic high desiccation tolerance and maintained a high germination rate after drying. Cryopreservation of the dry seeds at -20, -80 and -170°C for 6 months resulted in maintenance of germination rates comparable to undried seeds before storage.

Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips and artificially pollinated seeds was

developed for long-term *ex situ* conservation of *M. boninensis*. *Ex situ* cryopreserved specimens represent a feasible bio-resource for future restoration programs.