

有用林木遺伝資源の保存と増殖技術の開発

1996年度～2003年度（国補・地域バイテク）

吉田 和広

要 旨

組織培養による樹木、山菜類の増殖技術の開発に取り組んだ。スギ老齢木では、品種ごとの最適植え付け部位（当年枝の先端あるいは根元）を明らかにし、培養を行うことで不定芽の誘導が可能となった。雄性不稔交雑スギでは、芽生えの幼芽を外植体とすることで、遺伝的に均質な幼植物体を複数生産することが可能となった。また、試験管内で植物体として保存することが可能となった。シダレザクラは、冬芽を植え付けることで芽の伸長が可能となった。タラノキについては、葉柄からカルスを誘導することで多数の苗を生産することが可能となった。モミジガサについては、葉腋を外植体とすることで幼植物体を再生させることが可能となった。

I はじめに

本県には鳳来寺スギの老齢木をはじめとして、遺伝資源として確保するとともに保存しなければならない貴重な樹木が存在する。これらはいずれも老齢であり、早急に子孫を残さなければならぬが、挿し木によるクローン増殖は非常に困難である。また、地元から増殖の要請のある樹木についても、その地域における経済的、文化的意義から、増殖に取り組む必要がある。

そこで、本研究では貴重な樹木や有用な樹種について組織培養法を開発し、遺伝資源として省スペースで保存するとともに、増殖させることを目的とする。

II 材料と方法

増殖の要請のある鳳来寺スギ老齢木（以下六本スギ、傘スギ、浅川スギ）および花粉症対策とし

て富山県産雄性不稔スギと交配した本県産スギ精英樹（以下雄性不稔交雑スギ）、増殖の要請のある地元産シダレザクラ、中山間地域の短期収入源として需要のある山菜類（タラノキ、モミジガサ）を材料とした。

1. 効率的な増殖に有効な植物組織片の検索

(1) スギ老齢木

i 六本スギ、傘スギの挿し木苗（6年生）の枝を採取し、その当年生部をさらに先端と根元に分けて培養を行った。表面殺菌は、70%エタノール2分→0.5%アンチホルミン10分→滅菌水すすぎ2回を行い、培地はWS + BAP0.075mg/l + IBA 0.06 mg/l、寒天濃度は0.8%とした。

ii 六本スギ挿し木苗（11年生）について、雑菌による汚染の抑制と効率的な増殖を目的として当年生部から茎頂部を摘出し、その培養を行った。70%エタノールと0.5%アンチホルミンで表面殺

菌した当年生部から、実体顕微鏡下で茎頂部を丁寧に摘出し、WS、WPM、CDを基本培地として、IBA0.05 mg/l、BAP1.0 mg/l、シヨ糖20g/lを加えた0.8%寒天培地にそれぞれ置床した。

(2) 雄性不稔交雑スギ

富山県産雄性不稔スギと交配して得られた本県産精英樹種子は、苗床への直播きでは発芽率が低い。ため、育種素材の確保を目的として、無菌発芽させ、その芽生えを材料として培養を行った。ペンレート500倍液に1昼夜浸漬し、表面殺菌した種子を1%素寒天培地に置床し、無菌発芽させた。その芽生えを、子葉、幼芽、胚軸に分割し、それぞれWS + BAP 1 mg/l + シヨ糖 20g/l、寒天濃度0.8%とした培地に挿し付け、不定芽の誘導を行った。

2. 活性の高い植物組織片の誘導法の検討 六本スギ、浅川スギについて、雑菌による汚染の抑制と効率的な増殖を目的として前年度にミス挿しを行い、伸長した当年生部を外植体として培養を行った。表面殺菌は、70%エタノール2分→0.5%アンチホルミン10分→滅菌水すすぎ2回を行い、培地はWS + BAP0.5mg/l + IBA0.05mg/l + シヨ糖 20g/l、寒天濃度0.8%とした。

3. 効率的な表面殺菌技術の開発

六本スギ挿し木苗(10年生)当年生部を材料に、殺菌剤として従来から用いられているエタノール、アンチホルミンに加えて、蒸留水を電気分解して得られる強酸性水(pH2.5)を用いて、処理時間や処理方法を変えて外植体の表面殺菌を行い、殺菌効率を検討した。処理区は、エタノールと強酸性水を組み合わせたもの、エタノールと強酸性水を組み合わせて減圧処理したもの、強酸性水のみで減圧処理したものとした。

4. 個体別の効率的な培養条件の把握

(1) スギ老齢木

i 六本スギ、傘スギ挿し木苗(6年生)の当年

生部を採取し、0.1%塩化ベンザルコニウム10分→1%アンチホルミン10分→70%エタノール2分→5%過酸化水素水5分→滅菌水すすぎ2回で表面殺菌を行い、CD + NAA0.005mg/lを基本培地として、濃度を変えたBAPを加えたもので培養し、不定芽の誘導を行った。

ii 六本スギ、傘スギ挿し木苗(6年生)の当年生部を採取し、iと同様に表面殺菌を行い、RIM + BAP0.01mg/lを基本培地として、濃度を変えたIBAを加えたもので培養し、不定根の誘導を行った。

iii 六本スギ、傘スギ挿し木苗(9年生)の当年生部を採取し、iと同様に表面殺菌を行い、WS + BAP2.25mg/lを基本培地として、添加するオーキシンの種類を変えたもので培養を行った。

iv 六本スギ挿し木苗(11年生)の当年生部をiと同様に表面殺菌した後、WS + BAP0.5mg/l + IBA0.05mg/l + シヨ糖 20g/l、寒天濃度0.8%で培養して得られたシュートを切り取り、発根培地に移植した。発根培地はWS + BAP0.1mg/l + IBA 2 mg/l + シヨ糖 20g/l、寒天濃度0.8%とした。

(2) 雄性不稔交雑スギ

1. (2)の試験で得られた不定芽を切り取り、発根させるためにWS + NAA 0.05mg/l + シヨ糖 20g/l、寒天濃度0.8%の培地に移植した。

(3) シダレザクラ

i 地元産シダレザクラ3年生挿し木苗(母樹は伐採された)から1月中旬と2月下旬に採取した冬芽を、70%エタノール2分→0.5%アンチホルミン10分→滅菌水すすぎ2回で表面殺菌した後、実体顕微鏡下で芽鱗を取り除き、露出した幼芽を1/2濃度MS + BAP 1 mg/l + IBA0.1mg/l + シヨ糖 15g/l、寒天濃度0.8%の培地に植え付けた。

ii シダレザクラ挿し木苗(4年生)から採取した枝を室内で水挿しし、展開した芽を直接、発根培地に移植した。発根培地は、1/2濃度MS + IBA

よびフロリアライト（バーミキュライトと植物繊維からなる）とした。

(4) 山菜類

i タラノキについて、大量増殖を目的として培養を行った。タラノキ 10 年生苗から伸長の止まった当年生枝を採取し、葉柄を 70 %エタノール 2分→0.5 %アンチホルミン 10分→滅菌水すすぎ 2回で表面殺菌した後、1/2 濃度 MS + BAP 0.5mg/l + 2,4-D0.5mg/l + ショ糖 15g/l、寒天濃度 0.8 %の培地に置床し、カルスの誘導を行った。発生したカルスは、1/2 濃度 MS + ショ糖 15g/l、ホルモン無添加、寒天濃度 0.8 %の培地に移植し、25℃、16時間日長で培養した。

ii モミジガサの新梢を採取し、70%エタノール 2分→5%過酸化水素水 5分→滅菌水すすぎ 2回で表面殺菌した後、1/2 濃度 MS + BAP 0.5mg/l + ショ糖 15g/l、寒天濃度 0.8 %の培地で培養した。伸長した腋芽を切り取り、1/2 濃度 MS + ショ糖 15g/l、ホルモン無添加、寒天濃度 0.8 %の培地に移植し、発根培養を行った。

5. 簡略な培養法の開発

タラノキについて、順化作業の効率化を目的として、非滅菌下での順化を行った。順化用土は、バーミキュライト：鹿沼土＝1：1 (v/v)に混合したものを扱い、300ml 容フラスコに用土を入れ、4. (4) i の試験で得られた幼植物体を移植した。容器の口はセロファンフィルムで覆い、1週間に1度、市販の液体肥料 1000 倍液を施用した。

Ⅲ 結果と考察

1. 効率的な増殖に有効な植物組織片の検索

(1) スギ老齢木

i 不定芽発生率については、六本スギで先端 40 %、根元 50 %であったのに対して、傘スギでは先端 60 %、根元では全く発生しなかった（表一

1）。このように同じ当年生部でも、品種によって最適植え付け部位が異なることが明らかになった。

表一 スギ老齢木における植え付け部位別不定芽発生率

クローン	先端	根元
六本スギ	4/10	5/10
傘スギ	6/10	0/10

※4/10は(不定芽発生試料数)／(供試数)を示す。

ii 六本スギ茎頂部の培養では、雑菌に汚染されたものは1つも無かったが、1ヶ月以内に全てが褐変枯死した。このことから、茎頂部は雑菌に汚染されていないが、培養効率は高くないと考えられた。しかしながら、草本類では茎頂培養による大量増殖法が確立されているので、今後、培地組成等について検討を行う必要がある。

(2) 雄性不稔交雑スギ

培養2ヶ月後の結果は、表一2のとおりである。子葉からは不定芽が発生せず、胚軸、幼芽からは不定芽が発生した。特に幼芽からは、写真一1のように複数の不定芽が発生した。これら不定芽をそれぞれ培養することにより、1つの芽生えから遺伝的に均一な複数の苗を生産することが可能となる。以上のことから、スギ芽生えの培養には、幼芽が適していると考えられた。

2. 活性の高い植物組織片の誘導法の検討

培養2ヶ月後の結果は、表一3のとおりである。コンタミ（雑菌による汚染）について、野外から直接採取した試料が 50 %であったこと（2）と比較して低くなっているため、ミスト挿しによる材料の養成は効果があると考えられた。しかし、浅川スギについて、葉害によると考えられる枯死が多く見られたので、今後は殺菌方法について検討する必要がある。また、発生した試料は少ないが、写真一2のように不定芽の発生が見られた。

表-2 雄性不稔交雑スギ芽生えの培養結果

	不定芽発生 芽伸長	コンタミ	枯死	変化なし	供試数
子葉	0	8	2	4	14
胚軸	3	0	17	0	20
幼芽	21	0	5	0	26

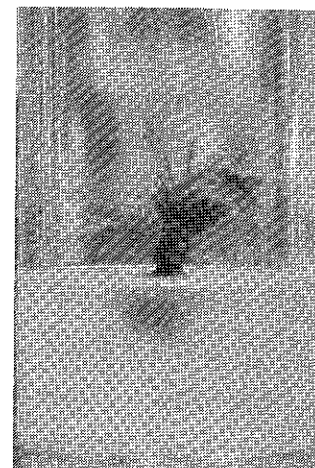


写真-1 交雑スギ芽生え幼芽部から複数発生した不定芽

表-3 スギミスト挿し苗当年生部の培養結果

	不定芽発生	コンタミ	枯死	変化なし	供試数
六本スギ	2	7	2	9	20
浅川スギ	3	7	8	2	20

3. 効率的な表面殺菌技術の開発

殺菌方法ごとの雑菌汚染率を表-4に示した。エタノールと強酸性水の組み合わせでは、植え付け1週間後では通常法（エタノール+アンチホルミン）と同程度であったが、1カ月後に全て雑菌に汚染された。また、強酸性水のみでは、1週間後に全て雑菌に汚染された。このことから、強酸性水の殺菌力はあまり強くないと考えられる。一方、コナラの表面殺菌に用いた場合、シュートの成長促進に働いた事例がある（1、2）。また、強酸性水は放置しておくで分解して水に戻るため安全性が高く、外植体にもダメージが少ないと考えられる。今後は、これらの利点を持つ強酸性水

を中心とした効率の良い殺菌方法を検討するとともに、材料の採取時期や採取部位等についても検討する必要がある。

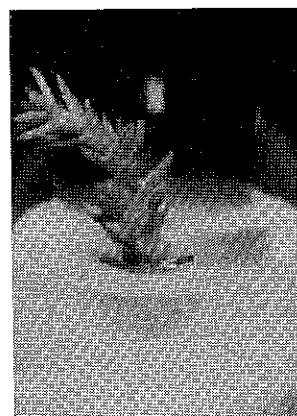


写真-2 スギ老齢木当年生部から発生した不定芽

表-4 殺菌方法の違いによる雑菌汚染率

殺菌方法	1週間後	2週間後	1カ月後
70%エタノール2分+強酸性水20分	4/10	7/10	10/10
70%エタノール2分+強酸性水30分	3/10	9/10	10/10
70%エタノール2分+強酸性水10分(減圧処理)	3/8	7/8	8/8
70%エタノール2分+強酸性水20分(減圧処理)	2/8	8/8	8/8
強酸性水30分(減圧処理)	8/8	8/8	8/8
強酸性水60分(減圧処理)	8/8	8/8	8/8
70%エタノール2分+アンチホルミン10分+すすぎ2回	2/8	3/8	4/8

※4/10は(コンタミ試料数)/(供試数)を示す。培地はWS+BAP0.5mg/l+IBA 0.05mg/lを用いた。減圧処理は、減圧デシケーター内に殺菌剤と試料を入れ、アスピレーターで吸引した。

4. 個体別の効率的な培養条件の把握

(1) スギ老齢木

i 結果は表-5のとおりである。BAP濃度が高いほど不定芽が形成されやすい傾向が見受けられた。

ii 結果は表-6のとおりである。六本スギではIBA0.2区、傘スギではIBA5区で根原基の観察された試料が最も多かった。これは品種によるオーキシン感受性の違いではないかと考えられる。

iii 不定芽の発生については、六本スギではIBAを添加したWSでのみ、傘スギではIBA、Dichloro-IBA、NAAを添加したWSで見られ、IBA区で最も多く発生した(表-7)。このことから、

スギの組織培養には系統を問わず、IBAを添加したWSが適していることがわかった。

iv 写真-3のように、ほとんどの試料は基部にカルスを生じたが、発根したものは無かった。また、カルスを除去して再度移植したが、やはり発根しなかった。このことは、オーキシン(IBA)濃度が最適濃度より高かったことによると考えられる。iiの結果(表-6)では、六本スギはIBA5mg/lでも根原基と考えられる部分が観察されたが、その後の培養では発根しなかった。今後は、高濃度オーキシン培地で根原基を誘導した後、ホルモンフリーの培地に移植するなど発根条件の検討が必要である。

表-5 BAP濃度別のスギ老齢木培養結果

BAP濃度(mg/l)	六本スギ(n=10)			傘スギ(n=10)		
	コンタミ	枯死	不定芽発生	コンタミ	枯死	不定芽発生
0.225	7	0	0	5	0	1
1.125	3	0	0	5	0	2
2.25	1	0	2	4	0	3
11.25	5	0	2	1	0	2

※数字はその項目に当てはまる試料数を示す。各処理区の試料数の合計が10にならないのは、外観的に変化が見られない試料があったためである。

表-6 IBA濃度別のスギ老齢木培養結果

IBA濃度(mg/l)	六本スギ(n=10)			傘スギ(n=10)		
	コンタミ	枯死	根原基	コンタミ	枯死	根原基
0	2	0	2	3	0	2
0.2	4	0	5	0	3	3
1	5	0	3	6	0	2
5	5	0	2	1	1	5

※数字はその項目に当てはまる試料数を示す。各処理区の試料数の合計が10にならないのは、外観的に変化が見られない試料があったためである。

表-7 ホルモン種類別のスギ老齢木培養結果

植物ホルモン	六本スギ(n=20)			傘スギ(n=20)		
	コンタミ・枯死	不定芽発生	変化なし	コンタミ・枯死	不定芽発生	変化なし
IBA	17	2	1	15	5	0
NAA	18	0	2	14	3	3
Dichloro-IBA	17	0	3	17	3	0

※数字はその項目に当てはまる試料数を示す。ホルモン濃度はそれぞれ0.06mg/lとした。

(2) 雄性不稔交雑スギ

発生した不定芽を発根培地に移植したところ、写真-4のように発根し、発根率は80%であった。また、不定芽を切り取った元の培養物をさらに不定芽誘導用の培地（WS + BAP + ショ糖）で培養すると、新たに不定芽が発生した。この新たに発生した不定芽を発根培地に移植すると、発根して幼植物体が再生した。以上のことから、芽生えの幼芽部分を外植体として用いることにより、クローン化と増殖技術が確立された。今後は、試験管内での保存技術について検討する必要がある。

(3) シダレザクラ

i 植え付けた幼芽の雑菌汚染率は、70～80%と高かった。また、採取時期による雑菌汚染率の違いはほとんど無かった。雑菌に汚染されていないものは写真-5のように展開・伸長した。殺菌方法が今後の課題と考えられた。

ii 展開した芽から直接発根させる方法については、表面殺菌によるダメージもしくは雑菌による汚染で、全て枯死した。今後は、殺菌条件の検討が必要である。対象にしているサクラはエドヒガン系であり、この品種は培養・順化が難しいことが知られている。今後は、現在培養できているものの増殖と試験管内での培養保存について検討する必要がある。

(4) 山菜類

i (タラノキ) 全ての葉柄からカルスが誘導された。誘導されたカルスを分割して移植したところ、写真-6のように再分化し、幼植物体が発生した。このときの再分化率（幼植物体が発生したカルス数/移植したカルス数×100）は、26.7%、根のみの再分化分を加えると60%であった。今回の結果から、発生した幼植物体を分割し、ポットに移植することによって、多数の苗を生産することが可能となった。今後は、再分化能の高いカ



写真-3 六本スギ培養物基部に生じたカルス

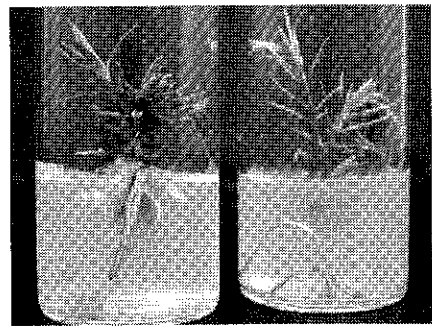


写真-4 発根した雄性不稔交雑スギ



写真-5 伸長したシダレザクラ冬芽

ルスを誘導する方法を検討するとともに、再分化率の高い培地組成を検討し、より効率的なポット苗生産方法の確立を目指す必要がある。

ii (モミジガサ) 植え付けた葉腋のうち、約12%で写真-7のように腋芽が展開・伸長し、切り取って移植した腋芽全てが写真-8のように発根し、植物体として再生した。今後は、腋芽の展開・伸長率を高める培地組成の検討が必要である。

5. 簡略な培養法の開発

非滅菌下で順化したタラノキ幼植物体は、写真-9のように成長した。このように、タラノキ幼植物体は、非滅菌下で順化が可能であり、作業の効率化が期待される。今後は、カルスからの再分化条件を詳細に検討し、より効率的な増殖技術の開発を目指す必要がある。

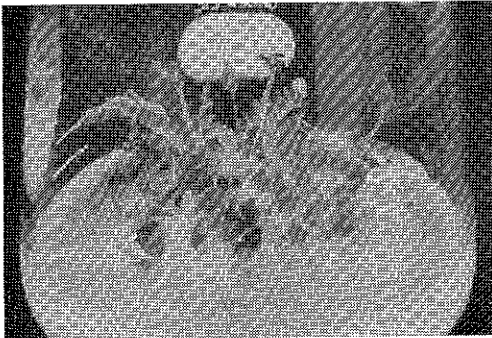


写真-6 タラノキカルスから再分化した幼植物体

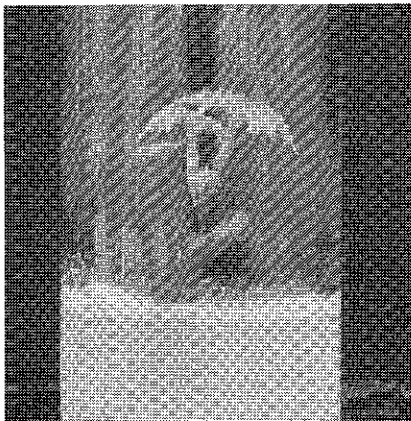


写真-7 伸長したモミジガサ腋芽

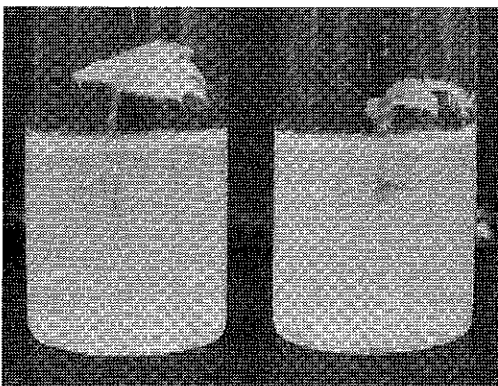


写真-8 再生したモミジガサ幼植物体

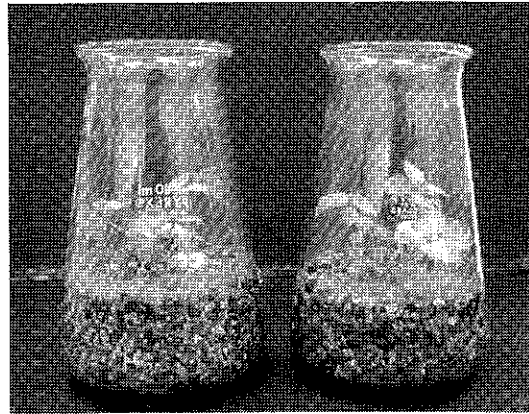


写真-9 非滅菌下で順化中のタラノキ幼植物体

IV まとめ

スギ老齢木では、材料をミスト挿しして養成したものをを用いて培養することで、不定芽の誘導が可能となった。しかし、雑菌汚染率の高さや発根の難しさなどの問題も残されている。

雄性不稔交雑スギでは、芽生えの幼芽を外植体とすることで、遺伝的に均質な苗を複数生産することが可能となり、無花粉スギ作出のための育種母材の確保に資することができた。

シダレザクラは、冬芽の培養によって試験管内で芽を伸長させることが可能となった。このシダレザクラについては、挿し木によって、わずかながら後継樹が育成でき、地元に戻還することができた。

山菜類については、組織培養によって苗の生産が可能となり、山菜栽培による中山間地域の活性化に資することができた。

V 引用文献

- (1) 平山一木、竹内英男(1996) コナラの育種に関する研究. 愛知林セ報 33 : 59-62
- (2) 吉田和広 (2000) コナラ組織培養の効率化に関する研究. 愛知林セ報 37 : 43-47

