

Tilia amurensis(アムールシナノキ)の実生幼苗の芽培養による試験管内幼植物体再生とその増殖

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	尹,陽 石井,克明 斎藤,明 大庭,喜八郎
発行元	日本林學會
巻/号	71巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 61-64
発行年月	1989年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



短 報

Tilia amurensis (アムールシナノキ) の実生幼苗の芽培養
による試験管内幼植物体再生とその増殖*

尹 陽**・石井克明***・斎藤 明***・大庭喜八郎**

YOUN, Yang, ISHII, Katsuaki, SAITO, Akira, and OHBA, Kihachiro: *In vitro* plantlet regeneration by bud culture and its multiplication in *Tilia amurensis* seedlings J. Jpn. For. Soc. 71: 61~64, 1989 The buds of *Tilia amurensis* RUPR. seedlings were cultured on the modified MURASHIGE and SKOOG (MS) and SAITO and IDE (IS) media to establish an effective micropropagation method. To investigate the effect of 6-benzylaminopurine (BAP) on shoot development in bud culture, five levels (0, 0.5, 1.0, 2.0, and 5.0 mg/l) of BAP concentrations were tested. The best results were obtained with 1.0 mg/l of BAP in both media. The grand mean of percentages of shoot development for the five levels of BAP in MS medium was somewhat greater than that of IS medium. Developed shoots were subcultured to induce multiple shoots on MS and IS media supplemented with 0.2 mg/l of BAP. The growth of shoots and multiple shoots was stimulated more in explants that were cultured previously on media with 1.0 mg/l of BAP. The maximum rate of multiplication per explant was six times after 30 days culture and the mean was 2.6 times. A 91.7% rooting rate from cultured shoots was achieved on a half-strength MS medium with 0.3 mg/l of indole-3-butyric acid (IBA).

I. はじめに

シナノキ属は温帯林を代表する広葉樹の一つとして、用材、合板材、器具材、彫刻材、バイオマス、パルプ材などとして利用され、経済的に重要である。とくに、*Tilia amurensis* RUPR. (アムールシナノキ) は韓国の中部以北に分布する落葉高木で、韓国の主要造林樹種として指定され、精英樹選抜の対象樹種である。その増殖は普通は種子によって行われるが、胚の未熟、堅い果皮あるいは水分の浸透しにくい種皮等のために種子の発芽率はきわめて低い(8)。また、さし木による増殖も非常にむずかしい。そこで、優良形質個体の組織培養による効率的なクローン増殖法の開発が望まれている。

シナノキ属の組織培養に関する研究はいくつか報告されている。BARKER(1)は *T. americana* L. のさまざまな組織からのカルス形成について研究した。CHALUPA(2)とYOUNら(7)はそれぞれ *T. cordata* MILL. (フユボダイジュ) の幼苗と成木の腋芽からの幼植物体の再生と増殖について報告している。*T. amurensis* については、幼苗の胚軸由来のカルスからの体細胞胚発生による植物体再生が報告されている(3)。

前報(7)で *T. cordata* 成木の腋芽を用いて、試験管内植物体再生について報告しており、本報では各種生育ステージにおける培養体系を確立する目的で、*T. amurensis* の実生幼苗の芽を外植体として、植物体再生とそれをもとにした増殖について検討した。

II. 材料および方法

韓国東部の五臺山において1986年の10月中旬に採取された *T. amurensis* の種子を11月から翌年3月の5カ月間4℃の冷蔵庫に貯蔵して後熟を図った。3月末、温室でバーミキュライトを用土としたポットに播種し、1カ月後発芽苗(発芽率約7%)をバーミキュライト:黒土(1:1)のポットに移植した。移植後3カ月間生長した幼苗から長さ約15~20 cmの健全なシュートを切り取って、そのシュートから葉を取り除き、表面消毒を行った。表面消毒は、芽を含む長さ約5 cmに調製したシュートを0.1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬し、70%のエタノールで5秒、つぎに7%のサラシ粉溶液に入れ、10分間マグネチックスターラーでかくはんしながら滅菌を行った。その後クリーンベンチの中で滅菌した濾紙の上に広げ、風乾した。

* 本報告の一部は第99回日本林学会大会で発表した。

** 筑波大学農林学系 Inst. of Agric. and For., Univ. of Tsukuba, Ibaraki 305

*** 森林総合研究所 For. and Forest Prod. Res. Inst., Ibaraki 305

表-1. アムールシナノキの培養に用いた培地の組成
Compositions of media used for bud culture of
Tilia amurensis (mg/l)

Components	I S	MS	1/2 MS
KNO ₃	170	1900	950
NH ₄ NO ₃	680	1650	825
CaCl ₂ · 2H ₂ O	—	440	220
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	710	—	—
KCl	140	—	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	185
KH ₂ PO ₄	80	170	85
H ₃ BO ₃	3.2	6.2	3.1
MnSO ₄ · H ₂ O	8.0	22.3	11.15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	9.0	8.6	4.3
KI	0.8	0.75	0.38
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.13
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25	0.25	0.13
CoCl ₂ · 6H ₂ O	—	0.02	0.01
Fe · EDTA*	5.6	5.6	2.8
Sym-Diphenylurea	3.0	—	—
Urea	10.0	—	—
Thiamine · HCl	0.1	1.0	1.0
Nicotinic acid	0.8	0.5	0.5
Pyridoxine · HCl	0.1	0.5	0.5
Fumaric acid	1.0	—	—
Ascorbic acid	1.0	—	—
Glycine	—	2.0	2.0
Lysine	100.0	—	—
L-Tyrosine	10.0	—	—
myo-Inositol	100.0	100.0	100.0

* Ferric ethylenediaminetetraacetic acid

外植体は頂芽または腋芽付きの約 20 mm のシュート(腋芽上部 3~5 mm, 同下部 15~20 mm)を滅菌済み寒天培地 20 ml を入れた 180×18 mm の試験管へ 1 本ずつ植え付けた。培地は改変 MURASHIGE と SKOOG 培地(MS)(4)と SAITO と IDE 培地(IS)(5)(表-1)を用い、いずれの培地にもシヨ糖 20 g/l と寒天 1% を加えた。これにサイトカイニンとして 6-ベンジルアミノプリン(BAP)を 0, 0.5, 1.0, 2.0 および 5.0 mg/l の 5 水準で添加した。供試個体数は各処理区 23~26 個体とした。

培養 1 カ月後に分化したシュートを増殖するため、それぞれの培地に BAP 0.2 mg/l を添加した培地に各処理区 14~23 個体を継代培養し、マルチプルシュートを誘導した。初代培養の処理区によって、形成されたシュートの数が異なった。

次に、シュートからの発根培地として、MS の無機塩類だけを半分にし(1/2 MS)(表-1)、シヨ糖 10 g/l と

寒天 1% を加え、さらに、インドール-3-酪酸 (IBA) を 0.03, 0.3 および 3.0 mg/l の 3 水準で添加した培地を用いた。この培地を径 18 mm の試験管にいれ、滅菌後約 2 cm 以上のシュートを試験管当り 1 本ずつ移植した。移植したシュートは、初代培養の際の BAP 濃度の前歴を考慮せず、ランダムに各処理区に配置した。培地は寒天を加える前に pH 5.7 に調整した後、120°C で 20 分間オートクレーブした。培養は約 25°C, 5,000 lx, 16 時間の日長の下で行った。

III. 結果と考察

1. 芽からのシュートの形成

頂芽または腋芽が一つずつ付くように調製した外植体からの初代培養では、培養開始 1 週間目から芽が膨らみ始めた。その後、芽の伸長が始まり、培養 2~3 週間目にはシュートが形成された。図-1 に示したように、培養 1 カ月後でのシュート形成率は、すべての処理区で 50% 以上であり、BAP の無添加培地でも比較的高かった。最も旺盛なシュート形成がみられたのは、MS 培地に BAP を 1.0 mg/l 添加した培地で、その形成率は 92.0% であった(図-2)。この結果は CHALUPA (2) が、*T. cordata* の実生の芽培養において、BAP 0.8~1.2 mg/l が効果的であったことと一致していた。

MS 培地では、BAP の無添加培地よりも添加培地のほうがシュート形成率がよいが、BAP の濃度が 2 mg/l 以上になるとシュート形成率は低くなる傾向にあっ

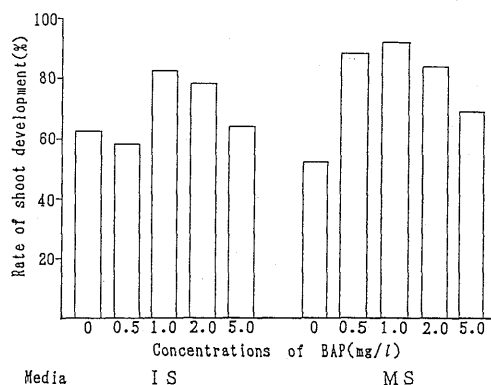


図-1. アムールシナノキの幼苗の芽培養における培地の種類および BAP 濃度のシュート形成に及ぼす効果

Effect of media and BAP concentrations on shoot development in bud culture of *Tilia amurensis* seedlings (Results of 23-26 explants per treatment after 30 days culture)



図-2. BAP 1.0 mg/l 添加 MS 培地における芽からのシュート形成

Shoots developed from buds on MS medium with 1.0 mg/l of BAP

た。これに対し、IS 培地では、シュート形成率は 0.5 mg/l で最低で、1.0 mg/l で最も高く、2.0, 5.0 mg/l と濃度が高くなるにつれて形成率は漸減傾向にあった。MS 培地でのシュート形成率の総平均値は 77.6 %、IS 培地では 68.9% となり、MS 培地のほうが IS 培地よりも初代培養に若干適しているように思われた。

2. シュートの増殖

初代培養で得られたシュートを、各 1 芽をつけ 10~15 mm の長さに調製して、それぞれ BAP 0.2 mg/l を加えた MS と IS 培地へ植え付け、マルチプルシュートの誘導を試みた。BAP はシュート形成には効果的であるが、シュートの継続的な生長を抑制するため、マルチプルシュートを誘導するには、濃度を 5~10 倍低くするほうが好ましいことが報告されており(2, 6)、継代培養では初代培養より BAP の濃度を一律に下げた。

培養 2 週間後からシュートが伸長するとともに、新しいシュートが増殖した。培養 1 カ月後にシュートの数とそれぞれのシュートの長さを調べ、その結果を図-3 に示した。シュート増殖率は初代培養で BAP 1.0 mg/l を添加した IS 培地で最高 6 倍、平均は 2.6 倍となり、増殖率が最も高かった(図-4)。シュートの生長は初代培養で BAP 1.0 mg/l 添加の MS 培地で平均 27.4 mm となり最も伸長した。初代培養の BAP の濃度の影響によって、継代培養でのマルチプルシュート形成率とそのシュートの生長に差がみられた。これは初代培養の BAP 濃度の影響が継代培養(少なくとも 1 代)に持続したためと考えられ、初代培養の際、培

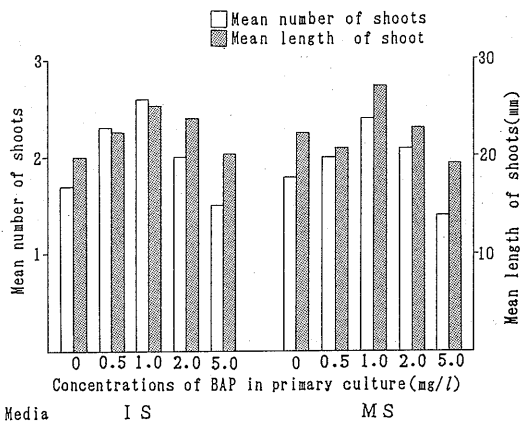


図-3. BAP 0.2 mg/l 添加の IS と MS 培地での継代シュート培養におけるマルチプルシュート形成とシュート生長に及ぼす初代培養での BAP 濃度の影響

Multiple shoot development and shoot growth on IS and MS media with 0.2 mg/l of BAP at five levels of BAP concentrations in primary culture (Result of 14-23 shoots per treatment after 30 days culture)

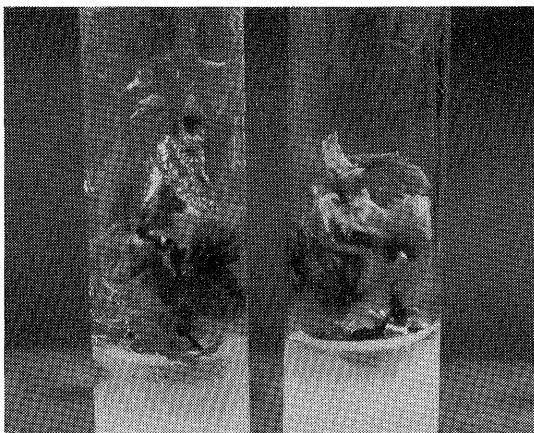


図-4. BAP 0.2 mg/l 添加 IS 培地におけるマルチプルシュートの形成

Multiple shoots developed on IS medium with 0.2 mg/l of BAP

養に適した条件でシュートを分化させることによって、その後の増殖と生長に良い効果をもたらすことができると考えられる。本実験の結果、シュート形成率、増殖およびシュートの生長において、初代培養では BAP 1.0 mg/l が最適条件であった。これは他の広葉樹の芽培養においても同様な結果が報告されている(2, 6)。

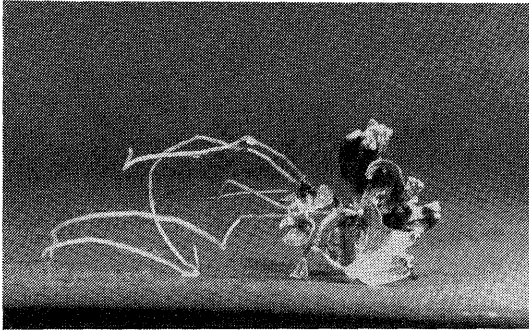


図-5. IBA 0.3 mg/l 添加 1/2 MS 培地におけるシュートからの発根

Rooting of shoot on 1/2 MS medium with 0.3 mg/l of IBA

表-2. 3水準の IBA 添加の 1/2 MS 培地における発根

Frequency and percentages of rooted shoots on 1/2 MS media with three levels of IBA

Concentration of IBA (mg/l)	No. of shoots cultured	No. of rooted shoots	Percentage of rooted shoots
0.03	23	2	8.7
0.3	24	22	91.7
3.0	22	6	27.3

Note: Data were taken after 6 weeks culture.

3. シュートからの発根

増殖した約 2 cm 以上のシュートを、IBA を 0.03, 0.3 および 3.0 mg/l の 3 水準で添加した 1/2 MS 培地に植え付けた。培養 2 週間後にはシュート下端の切断面が膨らみ始め、3~4 週間後には根が形成された(図-5)。表-2 に示したように、培養 6 週間後に発根率を調べた結果、IBA 0.3 mg/l の濃度では 91.7 % の高い発根率を示し、3.0 mg/l では発根率が低調であった。以上のことから *T. amurensis* の芽培養において、IBA の低い濃度が発根に効果があり、同じシナノキ属

の *T. cordata* の実生幼苗の芽培養(2)と同程度の IBA の濃度が適していた。

研究と留学にご配慮、ご援助をいただいた森林総合研究所企画調整部長(前造林部長)勝田 恒博士、韓国林木育種研究所所長 沈 相栄博士に対し厚くお礼申し上げます。また、研究材料を提供していただいた同研究所の金 在憲研究官に深く感謝する。

引用文献

- (1) BARKER, W. G.: Behavior *in vitro* of plant cells from various sources within the same organism. *Can. J. Bot.* **47**: 1334~1336, 1969
- (2) CHALUPA, V.: *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* MILL.). *Biol. Plant.* **26**: 374~377, 1984
- (3) KIM, J. H., MOON, H., PARK, J., and LEE, B.: Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from hypocotyl segments of *Tilia amurensis*. (Poster abstracts). In: Genetic manipulation of woody plants (HANOVER, J. W. and KEATHLEY, D. E., eds.), pp. 473~474, Plenum Press, New York, 1988
- (4) MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473~497, 1962
- (5) SAITO, A. and IDE, Y.: *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch. *J. Jpn. For. Soc.* **67**: 373~375, 1985
- (6) VIEITEZ, A. M., SAN-JOSE, M. C., and VIEITEZ, E.: *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur*, L. *J. Hortic. Sci.* **60**: 99~106, 1985
- (7) YOUN, Y., ISHII, K., SAITO, A., and OHBA, K.: *In vitro* plantlet regeneration from axillary buds of mature trees of *Tilia cordata*. *J. Jpn. For. Soc.* **70**: 315~317, 1988
- (8) 全国山林種苗協同組合連合会: 苗木づくりの基礎知識. 東京, 353 pp, 1987

(1988年6月15日受理)