

ベニバナトチノキの茎頂培養による多芽体からの幼植物体再生

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者	増淵, 充
巻/号	73巻4号
掲載ページ	p. 293-297
発行年月	1991年7月

短 報

ベニバナトチノキの莖頂培養による多芽体からの幼植物体再生

増 瀾 充*

MASUBUCHI, Mitsuru: *In vitro* plantlet regeneration from multiple shoots of red horse chestnut (*Aesculus × carnea* HAYNE) by shoot tip culture J. Jpn. For. Soc. 72: 293~297, 1991 Shoot tips were harvested from a 15-year-old red horse chestnut (*Aesculus × carnea* HAYNE) tree and were cultured on a modified MS (MURASHIGE and SKOOG) medium with various BAP (6-benzylaminopurine) and IBA (3-indolebutyric acid) concentrations. Shoot tips placed on the modified MS medium with 5 μM of BAP and 0.1 μM of IBA developed multiple shoots after 32 days of culture. The multiple shoots were transferred to a modified MS medium with 1 μM of BAP and 10 μM of GA₃ (gibberellic acid) which produced numerous shoots on the medium. The shoots were transplanted to a rooting medium which was modified WPM (Woody Plant Medium) with 0.1 μM of IBA and activated charcoal. Fifty-three percent of the shoots rooted during the 60 days after transplanting to the rooting medium.

I. はじめに

ベニバナトチノキは栃木県の県木であるトチノキと同属で、県のイメージアップを図ることと、県民一人ひとりに県土緑化の意識を高めてもらうことを目的として県によって普及され、県内の主要な幹線道や県立都市公園などの公共施設の緑地帯へ苗木の植栽が進められている。しかし近年苗木不足により価格が高騰してきているため、早期に苗木の養成を進める必要が生じている。

ベニバナトチノキは、セイヨウトチノキとアカバナアメリカトチノキとの交配種であるため、増殖には無性繁殖法が用いられる。ただし挿し木は困難で、一般には接ぎ木が増殖の手段となっているが、芽の数が少なく、速やかに大量増殖を行えない。このため、組織培養による増殖法の開発が望まれている。

トチノキ属では、セイヨウトチノキ(1, 3, 4, 8)、ベニバナトチノキ(5, 10)で葯, 胚, 形成層培養による胚様体の形成とその分化に関する報告はあるが、その中で植物体再生は一部で行われたに過ぎない。また、胚様体形成の再現性やその分化条件については、今後解明すべき点が多い。したがって、胚様体以外に大量増殖を図るための当面の手段としては、多芽体經由の植物体再生が重要であると考えられる。

筆者は、およそ15年生のベニバナトチノキの莖頂培養から多芽体を誘導させ、さらにそれらを継代培養す

ることにより大量のシュートを形成させることができた。また、その一部は植物体として再生できた。本報は、これらの一連の手法を報告するものである。

II. 材料と方法

栃木県今市市にある栃木県林業センター塩野室育種地に生育するおよそ15年生のベニバナトチノキ(接ぎ木由来)より1989年5月25日、葉の展開の終えた頂芽を採取した。

採取後ただちに長さ2 cmに調製した頂芽を0.5%に薄めた市販の超音波洗浄液(ホホワイト7-AL, ユーアイ化成(株))に浸漬し、5分間超音波洗浄を行い、水道水で十分すすいだ。次に表面殺菌のため70%のエチルアルコールで30秒間、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で20分間それぞれ浸漬、攪拌を行った後、滅菌水で3回すすぎ、クリーンベンチ内の滅菌ろ紙上で風乾した。

殺菌を終えた頂芽を実体顕微鏡の下で葉原基が3対(長さ:2 mm)になるまで調製し、ただちに20 mlの寒天培地が入った30 mm×100 mmの平底試験管へ置床した。

1. 初代培養(多芽体の誘導)

培地には硝酸アンモニウムと硝酸カリウムを1/2に修正したMS培地(7)を用い、これにシヨ糖30 g/lと寒天8 g/lを加えた。植物ホルモンは、6-ベンジルアミノプリン(BAP)の0, 1, 5 μM の3段階の濃度と3-

* 栃木県林業センター Tochigi Pref. For. Center, Utsunomiya 321-22

インドール酪酸 (IBA) の 0, 0.1 μM の 2 段階の濃度とを組み合わせる添加工, 計 6 種類の処理区を設けた。

各処理区の供試茎頂数は 10 個とした。

なお, 培養物は 30 日ごとに培養中のものと同じ組成の新しい培地へ移植し, 90 日間培養を行った。

2. 継代培養 (多芽体の増殖とシュート化)

初代培養において BAP 5 μM および BAP 5 μM + IBA 0.1 μM の処理区でそれぞれ茎頂基部の組織から誘導された 4 個の多芽体をおのおの 3 個 (5 mm 角) に分割し, 計 12 個を次の 3 種類の培地へ置床した。したがって 1 種類の培地当たりの供試数は 4 個である。なおこの組織は培養 30 日後には径 10~15 mm 程度に肥大するので次の継代培養においては再度その組織を 5 mm 角に切り分けるという方法で継代を繰り返した。

培地は初代と同じ修正 MS 培地を用い, 植物ホルモンは継代 1~3 回については BAP 1, 5 μM と BAP 5 μM + IBA 0.1 μM の 3 種類とした。また継代 4 回以降は多芽体のシュート化を図るため, BAP 1 μM + GA₃ 10 μM の 1 種類とした。

なお継代 1 回当たりの培養期間は 30 日間とした。

3. 発 根

継代培養によって得られた約 1 cm 以上のシュートを発根培地へ挿しつけた。

培地には, 無機塩類を 1/2, 1/4, 1/8 の 3 段階の濃度に修正した WP 培地 (6) を用い, これに IBA を 0.1, 1, 10 μM の 3 段階の濃度で組み合わせる添加工した。さらに 1/4 修正区には活性炭 (10 g/l) を添加した処理区も設け, 合計 12 種類とした。なお, ビタミン, アミノ酸類は 1/2 に修正し, これにショ糖 10 g/l とゲルライト 4 g/l を加えた。

培養に用いた培地はすべて pH 5.8 に調整し, 120 °C で 18 分間高圧蒸気滅菌した。また培養は 25 °C, 約 4,000 lx, 16 時間日長の下で行った。

III. 結果と考察

1. 初代培養 (多芽体の誘導)

培養 10 日目に外植体の雑菌による汚染の状況を調べたが, 60 個中雑菌に汚染されたものはなく, 茎頂培養における殺菌方法としては今回の方法が適していた。

培地に置床した茎頂は, 培養 10 日目ぐらいより白黄色から緑色へと変化したが, 30, 60, 90 日後の生育状態は図-1 に示すとおり, 各処理区によって異なった。

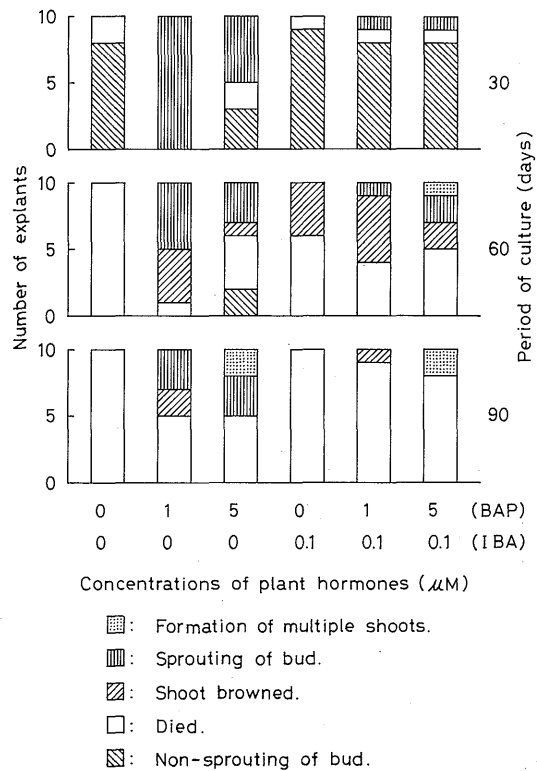


図-1. 初代培養において BAP, IBA の濃度が芽の成長に及ぼす影響

The effects of BAP and IBA concentrations on bud development in primary cultures

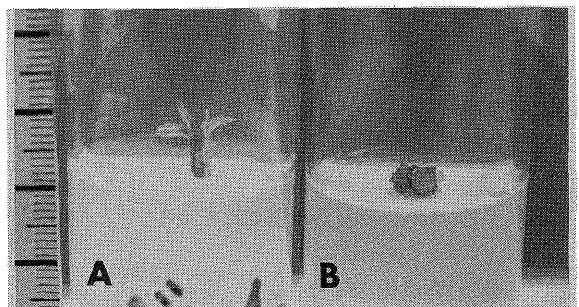


図-2. 初代培養 40 日後における茎頂の生育状況
Shoot tips cultured for 40 days on primary culture media: (A), shoot was developed on modified MS medium with 1 μM of BAP; (B), multiple shoots were formed on modified MS medium with 5 μM of BAP and 0.1 μM of IBA

Note: Scale is 1 mm.

BAP 5 μM および BAP 5 μM + IBA 0.1 μM 処理区では, 大量増殖に効果的とされる多芽体の形成 (図-2 B) が, それぞれ 71, 32 日後に認められ, 90 日後には 2 個

ずつ計4個が認められた。

その形成過程は、莖頂そのものが伸長するのではなく、基部の肥大した組織に芽ができ、多芽体に至るといったものであった。

このような多芽体の形成は、広葉樹10数種で確認されているが、いずれもBAP濃度が4.44 μM (1.0 mg/l) 程度の添加で起こっている場合が多い(9)。

今回の培養では、多芽体の形成率が2処理区とも2/10と高くなかったが、BAP濃度が5 μMの処理区でのみ多芽体が形成されたことから、多芽体誘導のためにはBAP 5 μM程度の添加が必要と考えられる。

BAPを添加しなかった2処理区では、芽を開じよしないまま、90日後にはすべてのものが褐変死した。

またBAP 1 μM処理区では、30日後にはすべてのものが芽を開じよし、葉を展開するものも認められた(図-2A)が、50日後ぐらいから芽や葉に褐変を起こすものが出はじめ、90日後には半数が褐変死した。

一方、BAP 1 μM+IBA 0.1 μM処理区では、90日後に10個中9個が褐変死した。

2. 継代培養 (多芽体の増殖とシュート化)

継代培養に供試した多芽体のうち、BAP 5 μM単独処理区由来の2個分の組織は、切り分けて培地に置床後間もなく組織が褐変し、培養30日後にはすべて褐変死した。このため、BAP 5 μM+IBA 0.1 μM処理区由来の多芽体についてのみ継代培養を続けた。

継代1~3回までの培養状況は、3処理区(BAP 1, 5 μMおよびBAP 5 μM+IBA 0.1 μM)とも芽を形成するのみでシュートの形成はほとんど認められなかった。ただし葉の展開状態は処理区間で異なった。

BAP 1 μM処理区では、大量に形成した芽一つ一つが伸長し、正常に葉を展開したが、BAP 5 μM+IBA 0.1 μM処理区では、葉が形成するものの展開は起こらず丸まったままの状態、そこへ白い粒状のカルスが発生し、併せてガラス化も認められた(図-3)。

この2処理区の葉の状態は継代3回が終わるまでそれぞれ同じであった。

またBAP 5 μM処理区では継代1回のみ正常に葉を展開したが、2回以降はBAP 5 μM+IBA 0.1 μM処理区と同じ結果となった。

このため、異常となった2処理区(BAP 5 μMおよびBAP 5 μM+IBA 0.1 μM)の培養を4回以降中止し、BAP 1 μM処理区で継代してきた組織についてのみ培養を続けた。継代4回以降では培地の植物ホルモンとしてBAP 1 μMの他に、多芽体のシュート化を図るた

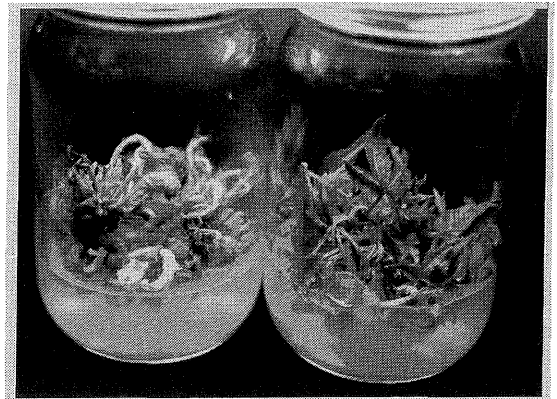


図-3. 継代培養(1回)30日後における多芽体の生育状況

Multiple shoots elongated after 30 days subculture of the first; multiple shoots formed different leaves by BAP and IBA concentrations; Left, abnormal leaves were formed on modified MS medium with 5 μM of BAP and 0.1 μM of IBA; Right, normal leaves were formed on modified MS medium with 1 μM of BAP

Note: Diameter of culture bottle was 60 mm.

表-1. BAPを1 μM, GA₃を10 μM添加した修正MS培地で継代培養した組織から形成されたシュートの長さ和本数の継代回数による変化
Changes in shoot length and number in tissues subcultured on the modified MS medium with 1 μM of BAP and 10 μM of GA₃

Number of subcultures	Number of tissues subcultured	Mean number of shoots per culture	Mean length of shoots per culture (mm)
4	7	1.9	8.9
5	7	2.0	13.7
6	10	3.7	11.6
7	12	2.4	14.0
8	14	4.5	14.4
9	15	5.4	19.3
10	16	10.4	17.9

Notes: Tissue was subcultured for the 1st to the 3rd on modified MS medium with 1 μM of BAP. The tissue was divided into 5 mm squares with multiple shoots and was subcultured. Period of one subculture was for 30 days. Data included mean lengths and numbers of shoots elongated on a tissue.

めGA₃ 10 μMを添加した。

その結果、表-1に示すとおり継代を繰り返すごとに1多芽体から得られるシュート(図-4)の平均の本数や長さは増加した。また培養期間中前記のような異常な

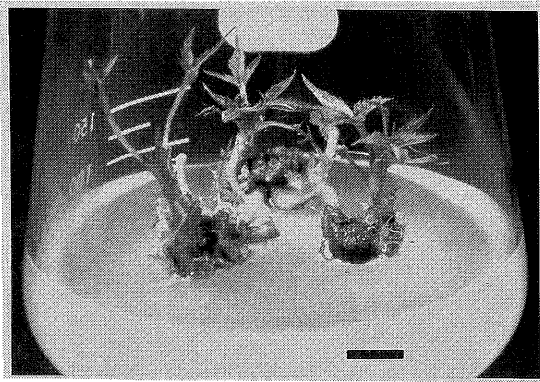


図-4. BAPを $1\mu\text{M}$, GA_3 を $10\mu\text{M}$ 添加した修正MS培地で形成されたシュート(継代5回・30日後)

Shoots were formed after 30 days subculture of the fifth on modified MS medium with $1\mu\text{M}$ of BAP and $10\mu\text{M}$ of GA_3

Note: Bar=10 mm.

表-2. 発根における培地と IBA 濃度の影響(60日後)
The effects of media and IBA concentrations on rooting*

Media	Concentra- tions of IBA(μM)	Numbers of shoots cultured	Numbers of rooted shoots	Percentages of rooted shoots(%)
1/2 WPM	0.1	10	0	0
	1	10	0	0
	10	10	0	0
1/4 WPM	0.1	18	3	17
	1	10	0	0
	10	10	1	10
1/8 WPM	0.1	15	0	0
	1	14	0	0
	10	17	0	0
1/4 WPM**	0.1	15	8	53
	1	15	4	27
	10	15	4	27

*Numbers of shoot which had rooted were counted on the 60th day after transfer to the rooting media.**Activated charcoal (10 g/l) was added.

葉の形成は認められなかった。

以上のことから、継代培養における植物ホルモンの濃度とその手順は、まず BAP $5\mu\text{M}$ +IBA $0.1\mu\text{M}$ で誘導された多芽体を BAP $1\mu\text{M}$ で培養し、芽の増殖と葉の正常な展開を図り、次いで BAP $1\mu\text{M}$ に GA_3 $10\mu\text{M}$ を添加し、多芽体のシュート化を促進させるという手順がシュートの増殖方法として効果的であると考えられる。

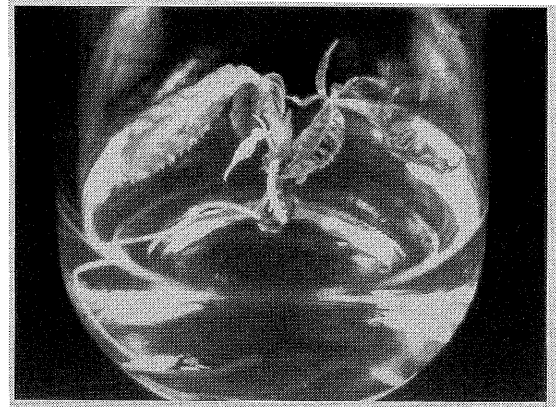


図-5. IBAを $0.1\mu\text{M}$ 添加した1/4 WPM培地におけるシュートからの発根

Rooting of shoot on 1/4 WPM with $0.1\mu\text{M}$ of IBA.
Notes: 60 days after transplanting to rooting medium; diameter of the culture bottle was 60 mm.

3. 発 根

発根用培地に移植してから60日後の結果は表-2のとおりで、無機塩類を1/4に修正した培地でのみ発根個体が認められ、IBA $0.1\mu\text{M}$ の添加区で17%の発根率が得られた(図-5)。また同培地への活性炭(10 g/l)の添加により発根率は向上し、53%となった。

コナラ、ミズナラの培養において、活性炭の培地への添加が発根率の向上に有効であることが認められているが(2, 11)、ベニバナトチノキにおいても効果的であることがわかった。

またIBAの濃度については、 $0.1\mu\text{M}$ という低い濃度の添加が適していたが、1および $10\mu\text{M}$ についてはとくに発根率に差がみられなかった。

IV. お わ り に

ベニバナトチノキの茎頂培養による多芽体からの植物体再生が大量増殖のための有効な手段であることを今回の研究を通じて確認できた。その培養における一連の培地条件と増殖量についてまとめると、次のとおりであった。

BAP $5\mu\text{M}$ +IBA $0.1\mu\text{M}$ を含む修正MS培地で32日後に誘導された多芽体を90日後5mm角に切り分け、BAP $1\mu\text{M}$ を含む同培地で90日間培養することにより、正常な芽や葉の形成とその増殖が図れた。次いでこれらの芽のシュート化を促進させるため同培地に GA_3 $10\mu\text{M}$ を添加したところ、多芽体から大量のシュートが形成された。継代培養開始後300日で茎頂

1個当たりから得られたシュート本数は202本となった。さらに、これらのシュートをIBA 0.1 μM と活性炭(10 g/l)を含む修正WP培地に挿しつけることにより、60日後には53%の107本が発根し、植物体として再生させることが可能になった。

一方、継代培養中の多芽体は1990年8月現在(継代12回)でも効率よくシュートの形成を続けている。

今後は茎頂から多芽体を効率よく誘導させるための検討を行うほか、植物体としての再生率を高めるための発根率の向上や順化について検討していきたいと考えている。

本研究を行うにあたり、終始ご指導をいただいた関東林木育種場育種第二研究室長近藤禎二博士、栃木県農業試験場生物学部大橋一夫主任研究員に対し感謝の意を表すとともに、本報告を行うにあたりご助言をいただいた森林総合研究所組織培養研究室長石井克明博士および木下 勲博士に対し厚くお礼申し上げる。

引用文献

- (1) JÖRG, J.: Somatic embryogenesis in *Aesculus hippocastanum* L. by culture of filament callus. J. Plant Physiol. 135: 240~241, 1989
- (2) 小山真澄: コナラ萌芽枝のえき芽の培養による植物体の再生. 100回日林論: 509~510, 1989
- (3) LJILJANA, R.: *In vitro* induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. Protoplasma 96: 369~374, 1978
- (4) ———: Plant regeneration of *Aesculus hippocastanum* L. (horse chestnut) through somatic embryogenesis. J. Plant Physiol. 132: 322~326, 1988
- (5) ———, NEVENA, D., and BRANKA, T.: *In vitro* induction of pollen embryos and plantlets in *Aesculus carnea* HAYNE through anther culture. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 17: 21~26, 1989
- (6) LLOYD, G., and McCOWN, B. H.: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421~427, 1981
- (7) MURASHIGE, T., and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473~497, 1962
- (8) ROSA, M. D., LILIANA, C., PAOLA, G., and PAOLA, P.: Callus formation and embryogenesis with leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. J. Plant Physiol. 126: 93~96, 1986
- (9) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会(編): 木本植物の増殖と育種. 98~180, 農業図書, 東京, 1989
- (10) SAITO, A.: *In vitro* differentiation of embryoid from somatic callus tissue in *Aesculus*. J. Jpn. For. Soc. 62: 308~310, 1980
- (11) 千木 容: 組織培養によるミズナラ成木からの幼植物体再生. 日林誌 72: 143~146, 1990

(1990年8月10日受理)