

組織培養による優良個体の増殖技術の開発

誌名	愛媛県林業試験場研究報告
ISSN	03892875
著者名	余吾,初徳 森,格良 仲田,幸樹
発行元	愛媛県林業試験場
巻/号	13号
巻号補足	
掲載ページ	p. 44-56
発行年月	1992年3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



組織培養による優良個体の増殖技術の開発

余 吾 初 徳
森 格 良
仲 田 幸 樹

I はじめに

シイタケ原木であるクヌギは、さし木による発根が悪く栄養増殖が難しい。また、つぎ木についても不親和性が認められるため、選抜された優良形質個体の増殖が困難である。その対応策として、組織培養による増殖法を開発し、遺伝的に安定した種苗の供給に資することを目的に試験を行った。

なお、この試験は、林業試験研究情報調査（国補）で、「組織培養による優良個体の増殖技術の開発」を、森林総合研究所と全国16の公立林業試験研究機関において、共同研究として実施したものである。

II 研究期間

昭和61年～平成2年度

III 研究項目

- 1 培養用材料の育成確保
- 2 器官培養（芽生えを用いた場合）
- 3 器官培養（成木えき芽を用いた場合）
- 4 再生幼植物体（発根苗）の順化

IV 方法及び結果と考察

- 1 培養用材料の育成確保（成木の場合）

(1) 雑菌の少ない材料の確保

- ・ 野外から採取した成木の普通枝
- ・ 野外の成木を断幹して得られた萌芽枝
- ・ 温室内で管理したクヌギ精英樹のつぎ木苗の普通枝及び萌芽枝
- ・ 枝の水ざしにより発生した萌芽枝¹⁾

を材料に検討を行った。

その結果、野外から採取したものでは、コンタミ率に個体差がみられ、採取時期が遅くな

るほどコンタミは多かった。しかし、断幹して発生した萌芽枝をせん定して、8月に再度発生させた萌芽枝の中にはコンタミの少ないものもあった。一方、温室内のつぎ木苗を枝に水がかからないよう管理したもの、および水ざしの萌芽枝は全般的にコンタミは少なかった。

(表－1)

(2) 供試材料の通年化

クスギ精英樹のつぎ木苗を鉢上げし、ガラス温室内で育成管理した。これから春の展葉期に材料を採取した後、枝葉をせん定し、再度萌芽させることにより、年数回の採取が可能になった。

表-1 成木えき芽のコンタミ調査結果

個体No	植付日	殺菌処理等	植付本数 (本)	コンタミ本数(本)		コンタミ率 (%)	供試個体
				カビ本数	バクテリア本数		
1	62/04/20	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 15分	40	15	0	38	屋外普通枝
2	"	"	80	48	1	61	"
3	"	"	80	31	21	65	"
4	62/04/21	"	99	0	0	0	"
5	"	"	99	4	1	5	"
6	62/04/22	"	119	37	0	31	"
7	62/04/24	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分	30	23	0	77	"
7	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分 ジベレリン浸漬 (3.16×10 ⁻⁵ M) 1時間	30	21	0	70	"
8	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分	30	8	0	27	"
8	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分	29	5	0	17	"
8	62/04/28	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分	60	13	0	22	"
8	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス15分	60	13	0	22	"
9	62/05/07	殺菌水浸漬 3時間	50	21	1	44	"
9	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 15分	50	23	1	48	"
9	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 15分	50	21	2	46	"
9	"	殺菌水浸漬 1時間	50				"
9	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 15分	50	15	1	32	"
10	62/05/19	ジベレリン浸漬 (3.16×10 ⁻⁵ M) 1時間	42	29	5	81	"
10	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	43	21	6	63	"
11	62/05/22	殺菌水浸漬 3時間	75	47	3	67	"
11	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	75	47	9	75	"
12	62/05/28	殺菌水浸漬 2時間	53	1	0	2	温室内つぎ木苗萌芽枝
13	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス30分	36	2	1	8	"
14	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス30分	33	0	0	0	"
15	62/06/05	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス30分	27	13	0	48	屋外萌芽枝
16	62/06/08	殺菌水浸漬 3時間	100	31	1	32	"
16	"	70%エタノール1分 1.5%ビュ-ラックス35分					"
14	62/07/02	殺菌水浸漬 3時間	50	43	0	86	温室内つぎ木苗普通枝
17	62/08/08	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	50	17	0	34	屋外萌芽枝
18	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	50	4	1	10	"
17	62/08/12	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	40	31	0	78	"
19	"	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	40	13	0	33	"
15	62/10/05	70%エタノール1分 1.5% NaOCl 30分	40	0	14	35	温室内枝水ざし萌芽枝

2 器官培養（葉生えを用いた培養）

(1) 初代培養

① 切片の滅菌法

10月下旬、愛媛県温泉郡重信町のクスギ林から収集した堅果（ドングリ）をよく水洗し、次いで果皮を除去した後70%エタノール液に3分間浸漬して殺菌した。

② 個体

上記堅果を無菌発芽させ得られた上胚軸（長さ約6cm）を、切断面を下にして試験管内の培地に置床した。

③ 培地組成

無菌苗育成用の培地には、McCownとLloydによって処方されたWPM²⁾（Woody Plant Medium）に植物ホルモンとして、BAPを0.71mg/ℓとNAAを0.02mg/ℓを加えて、pHを5.4に調整し、寒天（0.8%）を添加後、オートクレーブで120℃20分間滅菌したものをを用いて培養した結果、シュートの増殖及び伸長は良好であった。

④ 培養環境

培養は、約6,000luxの蛍光灯照明下で16時間日長、温度25℃（明期）と23℃（暗期）で行った。培養容器は、18mm×180mmの試験管を使用した。

(2) 継代培養

① 個体

芽生えの上胚軸を培養して得られたシュートのカルス部分を切り捨て、その上胚軸を継代培養した。

② 培地組成

初代培養と同じWPMに、BAPを0.71mg/ℓとNAAを0.02mg/ℓ添加して培養した結果、シュートの増殖・伸長は良好であった。

③ 培養環境

温度・照度は初代培養と同じで行い、培養容器としては、キノコ袋栽培用通気フィルターを取り付けた、ポリカーボネイト製の通気性容器（φ8cm、H10cm、通気孔1.5cm）を使用した。このことにより、シュートの増殖及び伸長が全般的によくなり、初代培養から4年経過した現在（平成3年9月）でも継代されている。

(3) 発根培養

① 個体

供試したシュートは、継代培養中のものの中から伸長の良好なものを選んで、長さ約3cmに切り取って使用した。

② 培地組成

- ・ IBAの濃度の違いによる発根比較

発根用培地はWPMの無機塩類とショ糖を半分にし、ピリドキシン塩酸とグリシンを

除いたものを使った。これを試験管（ $\phi 18 \times 180$ mm）に10mlずつ分注した寒天培地を使用した。IBA濃度は、0（対照）、0.1、0.3、0.6、1.0mg/lの5水準とした。経時的な発根率の変化は図-1のとおりで、IBAを添加した区で発根が早まった。さし付け後1.5カ月目の発根調査の結果は表-2のとおりで、1.3mg/lと0.6mg/l添加区ですべての培養物から発根があった。また、IBA濃度が高い区ほど主根の数が多く、逆に、一本当りの根の長さは短い傾向が見られた。頂端部の枯死は、1.0mg/l添加区でわずかに見られた。以上の結果から、発根用培地へのIBA添加濃度は、0.3~0.6mg/lが適当と考えられる。

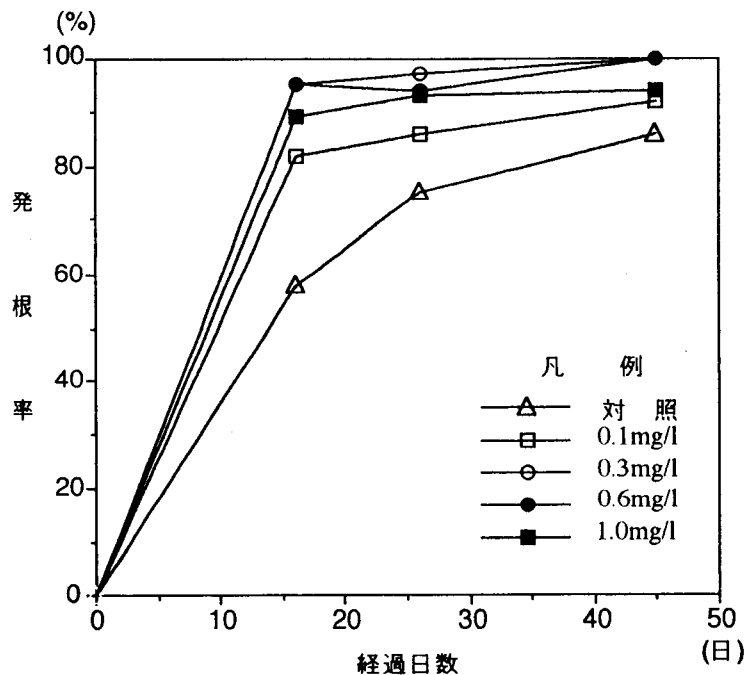


図-1 IBA添加処理による発根率の変化

表-2 IBA添加処理濃度別発根結果

項目 処理区	本 数	クローン数	発 根 率	平均根数	平均根長	先 枯 率	残 存 率
対 照	36 本	21 個体	86 %	1.1 本	3.6 cm	0 %	75 %
0.1mg/l	36	21	92	1.4	2.7	0	83
0.3mg/l	36	21	100	2.1	2.3	0	病 気 枯 死 (地上部)
0.6mg/l	36	21	100	2.2	2.0	0	
1.0mg/l	36	21	94	2.4	2.0	3	

・ 養分濃度の違いによる発根比較

前2回の実験で、培地の無機養分とショ糖の濃度を減らして良好な結果が得られたので、養分濃度の面から検討を行った。すなわち、WPMの無機養分とショ糖の濃度を、標準、1/2（ただし、ピリドキシン塩酸とグリシンを除き、その他の有機養分はそのまま）、1/4（同）、0（対照）の4水準とし、ホルモンフリーで発根の検討を行った。

経時的な発根率の変化は図-2のとおりで、養分濃度を1/2と1/4におとした区で発根が早く、30日目にはすべて発根したが、対照区では発根が遅れた。さし付け後43日目の発根調査の結果は表-3のとおりで、対照区では発根が55%と低く、出た主根も他の3区に比べると細いものが多かった。また、展葉も悪く、葉の色も緑が薄かった。他の3区については、主根の数や長さ、葉の色や展開状況とも特に違いは見られなかった。以上の結果から、WPMを発根に用いる場合には、養分濃度を1/2から1/4に下げるのがよいと思われた。

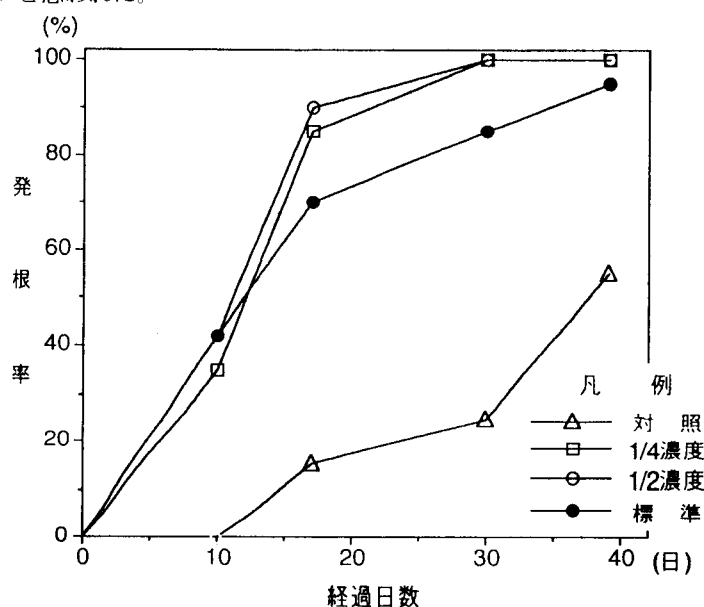


図-2 培地濃度別の発根率の変化

表-3 培地養分濃度別発根結果

項目 処理域	本 数	クローン数	発 根 率	平 均 根 数
対 照	20 本	8 個体	55 %	1.1 本
1/4 濃 度	20	8	100	1.4
1/2 濃 度	20	8	100	1.4
標 準	20	8	95	1.3

③ 培養環境

温度・照度・培養容器とも継代培養と同じ条件で行った。

3 器官培養（成木えき芽を用いた培養）

(1) 初代培養

① 切片の滅菌法

コンタミの発生は殺菌法よりも材料の採取時期や、管理法による影響のほうが大きく、屋外から材料を採取する場合には、当年枝が伸長し始めた早い時期に採取したり、また、鉢上げして温室内で雨に当たらない管理をすることが有効であると思われた。

薬剤による殺菌処理としては、70%エタノールで1分間殺菌し、1%次亜塩素酸ナトリウムで10分間浸漬の殺菌が比較的良好であった。

② 個体

「培養用材料の育成確保」の項で述べたつぎ木苗や野外の成木から、伸長した当年枝のえき芽を軸と葉柄をつけて2～3cmのY字状に切り取り調整したものを外植体として用いた。この場合、軸が成熟しないうちに採取し培養すると、外植体の褐変枯死はみられず、培地の変色も少なかった。

③ 培地組成

芽生え材料の初代、及び継代培養に用いたのと同じWPMを基本とする培地で培養すると、えき芽が水っぽくなって展開しないものがみられたため、NAAを1/10濃度の0.002mg/ℓに下げたところ、えき芽は正常に展開・伸長した。

④ 培養環境

温度・照度・培養容器とも芽生えの初代培養と同じ条件で行った。

(2) 継代培養

① 個体

継代は約1カ月の周期で、伸長したシュートの基部にできたカルスを切り除き、新しい培地へ移植するという方法で行った。

② 培地組成

初代培養と同じ培地で継代を続けていると、先端部から枯損していくクローンが増えてきたため、無機塩、糖の種類及び濃度、pH、オーキシン及びサイトカイニン濃度等について種々の検討を試みた。その結果、供試クローンすべてのネクロシスを防止できる最適の培地組成を検索することはできなかったが、芽生え材料と同じWPMにBAP0.71mg/ℓ、NAA0.02mg/ℓ添加した培地が比較的良好で、いくつかのクローンについては継代が可能になった。

③ 培養環境

温度・照度・培養容器とも、芽生えを用いた培養と同じ条件で行った。この場合でも通気性容器を用いることによりシュートの増殖及び伸長が全般的によくなった。

(3) 発根培養

① 個体

供試したシュートは、継代培養中のものの中から伸長の良好なものを選んで、長さ約3 cmに切り取って使用した。

② 培地組成

発根試験に用いた培地は、芽生え由来のシュートからの発根に使ったのと同じで、WPMの無機塩とショ糖の濃度を下げ、ピリドキシン塩酸とグリシンを除いたものである。培地に添加したオーキシンのうちIBAとIAAは、その都度溶解して使用した。培地はpHを5.4に調整し、添加、溶解後、オートクレーブで、120℃20分間滅菌した。

発根用培地は、WPMの無機塩とショ糖を1/2にしたもの（以下1/2 WPという）を使った。

・ IBAとIAAの検討

前述した1/2 WPを使って、添加するオーキシンの種類と濃度について検討した。

（表－4）2 mg/ℓのIBAまたはIAAと、0.06 mg/ℓのNAAを添加した実験1では、両区とも80%代の発根率を示し、健全本数、主根数ともほぼ同じであった。

ただ、IBA区では主根の長さが短いものが多かった。1 mg/ℓのIBAまたはIAAを単独で添加した実験2では、IBA区が94%と高く、IAA区よりまさっていた。この発根の経過を示したのが図－3で、植付後10日前後から発根が始まり、その後20日頃までがピークとなり、それからは漸減するというパターンであった。IAAについては、実験2～4、及び後述する実験3、4の結果から、1 mg/ℓ添加区でも2 mg/ℓ添加区でも発根率に大差なく、この程度が適当と考えられた。またNAAを併用した場合については、単独の場合と同等の発根率でその効果は認められなかった。

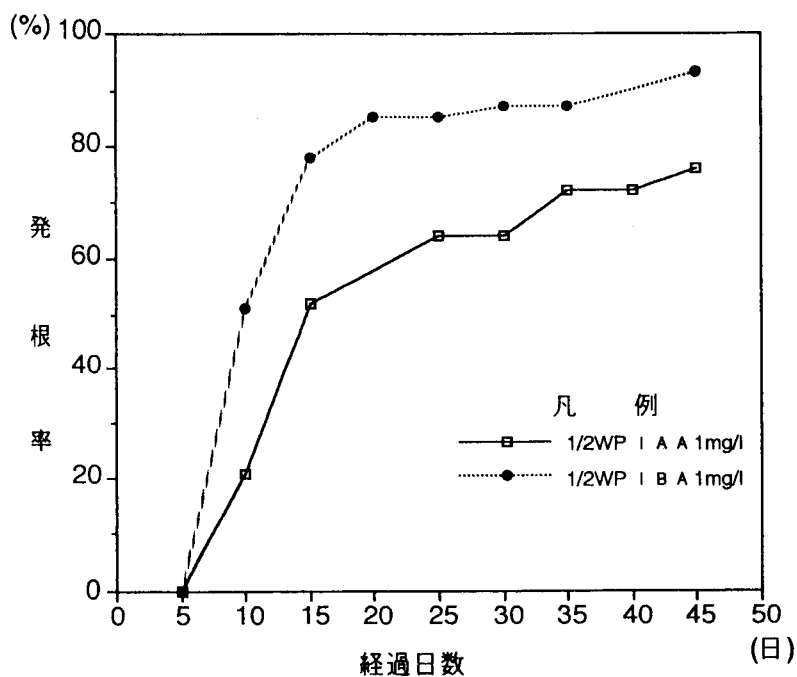


図-3 IBAとIAAの発根比較

表-4 IBAとIAAの比較

区分	オーキシン (mg/ℓ)			植付本数 (クローン数)	発根本数 (同率)	健全本数	主根数	備考
	IBA	IAA	NAA					
実験1	2.0		0.06	36 (5)	29 (81)	28	2.7/1~5	58日目調査
		2.0	0.06	36 (5)	31 (86)	30	2.4/1~5	
実験2	1.0			33 (7)	31 (94)	28	1.9/1~4	42日目調査
		1.0		33 (7)	25 (76)	25	1.5/1~3	

・ 養分濃度の検討

WPMの無機塩、及びブドウ糖の濃度を1/2, 1/4, 1/8にし、これにIAAを添加して、発根の検討を行った。(表-5)

IAA 2 mg/ℓを添加した実験5では、1/8, 1/2, 1/4の順に発根率が高く、IAA 1 mg/ℓを添加した実験6では、逆に1/4, 1/2, 1/8の順であった。しかし、発根率の差は少なく、健全本数、主根数ともにはほぼ同じであった。これにの結果から、WPMを発根に用いる場合、1/2から1/8の濃度では発根はほぼ同じで、この程度に下げて使用するのが適当と思われた。

表-5 養分濃度別比較

区分	培地	I A A (mg/ℓ)	植付本数 (クローン数)	発根本数 (同率)	健全本数	主根数	備考
実験3	1/2 WP	2.0	30 (5)	23 (77)	22	2.0/1~5	71日目調査 1/4 WPは3 本コンタミ
	1/4 WP	2.0	30 (5)	21 (70)	20	1.8/1~4	
	1/8 WP	2.0	30 (5)	25 (83)	24	1.9/1~4	
実験4	1/2 WP	1.0	26 (6)	22 (85)	21	2.0/1~4	35日目調査
	1.4 WP	1.0	26 (6)	23 (88)	22	2.0/1~4	
	1.8 WP	1.0	26 (6)	20 (77)	19	1.6/1~3	

・ N A AとI A Aの検討

1/2WPで約1カ月間培養すると、オーキシン無添加でも50%以上の発根が可能であった。これに、0.5 mg/ℓのN A Aあるいは、0.1 mg/ℓのI A Aを添加すると、おおむね80%以上に発根率が高まり、また、発根までの期間も短縮された。(図-4)

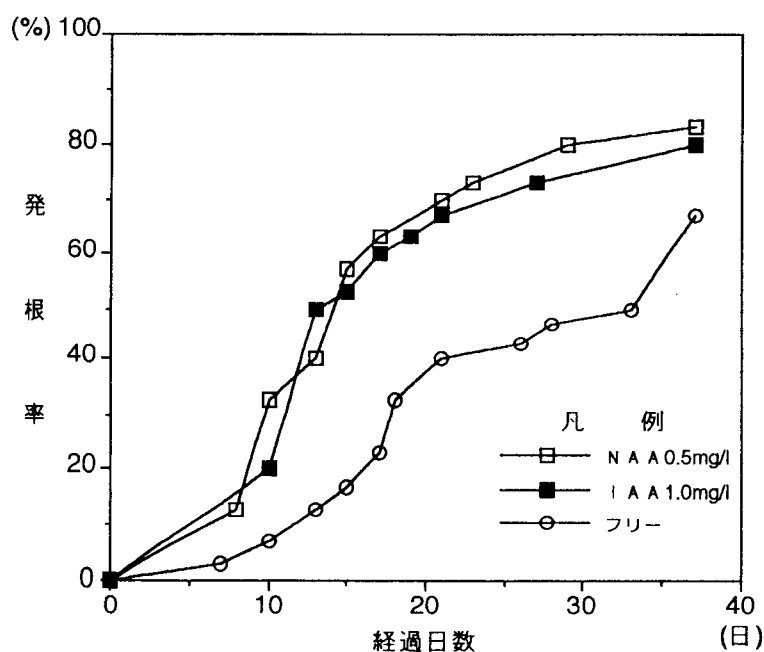


図-4 N A AとI A Aの発根比較

これまでに行った発根試験の結果から、健全な幼植物体を作出するためには、まず健全な苗条体を確保することが重要で、それが可能になれば発根は比較的容易であると思われた。

③ 培養環境

・ 暗黒処理の検討

暗黒処理は25℃の定温器内で行った。(表-6)

表-6 暗黒処理の検討

区 分	オーキシシン (mg/ℓ)			処 理	植 付 本 数 (クローン数)	発 根 本 数 (同 率)	健全本数	主 根 数	備 考
	I B A	I A A	N A A						
実 験 5	0.6		0.06	暗黒1週間	15 (2)	10 (67)	2	1.3/1~3	45 日 目 調 査
	0.6		0.06		15 (3)	3 (20)	0		
	0.9		0.06	暗黒1週間	15 (2)	9 (60)	2	1.5/1~3	
	0.9		0.06		15 (3)	4 (27)	0		
実 験 6		2.0			18 (2)	15 (83)	13	1.4/1~3	54 日 目 調 査
		2.0		暗黒1週間	〃	8 (44)	5	1.5/1~2	
		2.0	0.06		〃	16 (89)	14	1.6/1~3	
		2.0	0.06	暗黒1週間	〃	3 (17)	2	1.3/1~2	

(注) 健全本数は基端部の枯損がなく、基部にカルスの形成がないか、あっても小さいものの本数

実験5では、暗黒処理区の発根率が明らかに高く、その効果が見られた。しかし、発根した個体に基端部が枯死しているものが多かった。実験6では、逆に暗黒処理区の発根率が低かった。これは、1週間の暗黒処理によると思われるシュートの枯損がひどく、発根するまでに枯死するものが多かったためである。ちなみに、3日間の暗黒処理でも同様の症状が出ることが、別の実験で明らかになっている。このように2つの実験で、発根に関して全く逆の結果が出たことの原因として、使用したオーキシシンの違いとシュートの培養期間の違い(実験1は初代培養から3カ月目、実験2は初代培養から8カ月目)の2点が考えられるが、いずれにしても、クヌギの発根のための培養では、暗黒処理はマイナスになることがわかった。

なお、温度・照度・培養容器とも芽生えを用いた培養と同じ条件で行った。

4 再生幼植物体(発根苗)の順化

物理的方法による順化

4月から8月にかけて、ガラス室で幼植物体の環境順化試験を行った。鹿沼土を入れた育苗箱に鉢上げし、30分程度のミスト散水を毎日行うことにより、特別な順化処理を行わなくても70%以上の生存率が得られた。(表-7)

表-7 ガラス室での順化試験結果

発 根 試 験			順 化 試 験				供試本数	生 存 本 数 (同 率)
材 料	期 間	備 考	鉢上げ日	用 土	順化期間	備 考		
成 木	48		4/12	鹿沼土	20	3日間密閉	31	9 (29)
"	41		6/1	"	4	2日間密閉, 順化時散水 ミスト使用	67	54 (81)
"	28		7/12	"	0	ミスト使用	30	21 (70)
"	28		7/12	"	5	1日間密閉 ミスト使用	30	13 (43)
"	39	I A A 1 mg/ℓ	8/29	"	0	ミスト使用	35	30 (86)
"	39	N A A 1 mg/ℓ	8/29	"	0	ミスト使用	38	29 (76)

(注) 1 発根試験の期間は、培地から取り出して鉢上げするまでの期間

2 鉢上げは、45cm×30cmの育苗箱へ行った。

3 密閉処理は東名のプラスチック蓋を使って行った。

V 研究の要約

1 培養用材料の育成確保（成木の場合）

- ・ つぎ木苗を作成し、温室内でも管理を行うことにより、雑菌の少ない材料を長期間採取することが可能になった。

2 器官培養（芽生えを用いた培養）

- ・ 初代培養では、WPMにBAPを0.71mg/ℓとNAAを0.02mg/ℓを添加した培地でシュートの伸長が良好であった。
- ・ 継代培養でも、初代培養と同じ組成の培地で、シュートの増殖・伸長が良好であった。
- ・ 発根培養では、WPMの無機塩とショ糖を1/2～1/4にし、ピリドキシン塩酸とグリシンを除いた寒天培地を使用し、IBA0.3～0.6mg/ℓ添加した培地での発根率が高かった。

3 器官培養（成木えき芽を用いた培養）

- ・ 初代培養では、WPMにBAPを0.71mg/ℓとNAAを0.002 mg/ℓを添加した培地でシュートの伸長が良好であった。
- ・ 継代培養では、ネクロシスにより枯死するクローンが多かったが、WPMにBAPを0.71 mg/ℓとNAAを0.02mg/ℓを添加した培地が比較的良好であった。
- ・ 発根培養では、1/2～1/8WPMでIBAまたはIAAを1 mg/ℓ添加した培地で高い発根率を示した。

4 再生植物体（発根苗）の順化

- ・ 4～8月にかけては、ガラス室内で毎日30分程度のミスト散水を行うより、高い生存率が得られた。

5 その他

- ・ シュートの培養に用いる容器としては、キノコ袋栽培用通気性フィルターを取り付けた、ポリカーボネイト製の通気性容器（ ϕ 8 cm, H10cm, 通気孔 1.5 cm）を使用すると、シュートの増殖及び伸長が全般的にようになった。

VI おわりに

この試験で、クヌギの組織培養による植物体の再生が可能となったが、増殖や発根にはクローン間差異が大きいいため、各クローンについての最適培養条件を検討する必要があるだろう。

また、順化後の苗の成長が悪いという問題点も残っているので、育苗期間の短縮を目的とした苗木の育成法を検討する必要があるだろう。

引用文献

- 1) 伊東 祐道・松尾文昭：クヌギの組織培養による増殖，39回日林関西支講，229～232，1988
- 2) LLOYD, G. & MCCOWN, B. H. : COMMERCIALLY feasible micropropagation of mountain laurel (*kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proc. Int. Proc. Int. Plant Prop. Soc.30421 1～427, 1981