

組織培養による松くい虫抵抗性松の増殖技術の開発

誌名	愛媛県林業試験場研究報告
ISSN	03892875
著者名	余吾,初徳
発行元	愛媛県林業試験場
巻/号	14号
巻号補足	
掲載ページ	p. 21-30
発行年月	1993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



組織培養による松くい虫抵抗性松の 増殖技術の開発

余 吾 初 徳

I はじめに

松くい虫被害跡地は、土壌条件が良好な林地では、ヒノキ・クヌギなどの造林が行われているが、風致上の観点等から松林の再生を要望する地域もある。

これらの地域に、組織培養により効率的に、松くい虫に抵抗性のある苗木を供給する技術を開発する目的で樹種をクロマツにしぼり試験を行った。

II 研究期間

昭和63年～平成3年度

III 研究項目

- 1 培養用材料の育成確保
- 2 器官培養（葉束を用いた場合）
- 3 器官培養（萌芽枝の不定芽を用いた場合）
- 4 器官培養（冬芽を用いた場合）

IV 方法及び結果と考察

1 培養用材料の育成確保

(1) 雑菌の少ない材料の確保

- 温室内で管理した松くい虫抵抗性クローンのつぎ木苗の葉束
 - " 萌芽枝
- を材料に検討を行った。

その結果は、表－1に示したとおりである。

コンタミ率に個体差がみられたが、葉束では平均29%と低く、外植体の殺菌処理は、70%エタノール1分、5%過酸化水素水15分が適していると思われた。

また、萌芽枝よりも葉束のほうが全般的にコンタミ率が低かったことは、萌芽枝採取の時期が葉束採取時期よりも遅かったことに起因しているものと思われた。

(2) 供試材料の通年化

松くい虫抵抗性クローンのつぎ木苗を鉢上げし、ガラス温室で育成管理した。これから、春の展葉時期に葉束を材料として採取した後、伸長部分をせん定し、再度萌芽させることにより、萌芽枝を利用でき、さらに冬期には冬芽の一部も材料として利用することが可能になった。

表-1 葉束ならびに萌芽枝初代培養におけるコンタミ調査結果

個体 No	植 付 日	殺 菌 処 理	植付本数(本)	コンタミ本数(本) カビ、バクテリア	コンタミ率 (%)	供 試 個 体
1	1989/08/03	70%エタノール1分、5%過酸化水素水15分	6	0	0	温室内つぎ木萌芽枝
2	"	"	1	0	0	"
3	"	"	7	5	71	"
4	"	"	5	2	40	"
5	"	"	6	4	67	"
6	"	"	2	1	50	"
7	"	"	5	2	40	"
8	1989/07/26	"	10	9	90	"
計			42	23	55	
1	1989/05/24	70%エタノール1分、5%過酸化水素水15分	60	16	27	温室内つぎ木苗葉束
2	"	"	60	12	20	"
3	"	"	60	5	8	"
4	1989/06/01	"	60	29	48	"
5	"	"	60	46	77	"
6	1989/06/08	"	80	9	11	"
7	"	"	70	4	6	"
8	1989/06/09	"	36	5	14	"
9	"	"	36	5	14	"
10	1989/06/13	"	80	15	19	"
11	1989/06/14	"	80	18	23	"
12	1989/06/15	"	80	18	23	"
13	1989/06/17	"	80	10	13	"
14	1989/06/21	"	35	28	80	"
15	"	"	35	7	20	"
16	1989/06/27	"	60	18	30	"
17	"	"	60	7	12	"
18	"	"	60	35	58	"
19	1989/07/05	"	73	51	70	"
20	"	"	60	11	18	"
21	"	"	60	21	35	"
計			1,291	370	29	

2 器官培養（葉束を用いた場合）

(1) 初代培養

① 切片の滅菌法

コンタミの発生は、殺菌法によるよりも材料となる植物の管理法による影響のほうが大きい傾向があるため、鉢上げして温室内で雨に当てない管理をした。

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、5%過酸化水素水でマグネティックスターラーにより15分間攪拌殺菌するのが比較的効果的であった。

② 個 体

「培養用材料の育成確保」の項で述べた、つぎ木苗から伸長した当年枝の葉束を基部を付けて切り取り調整したものを外植体として用いた。（写真1）この場合、葉長3～4cm程度のものがよかった。

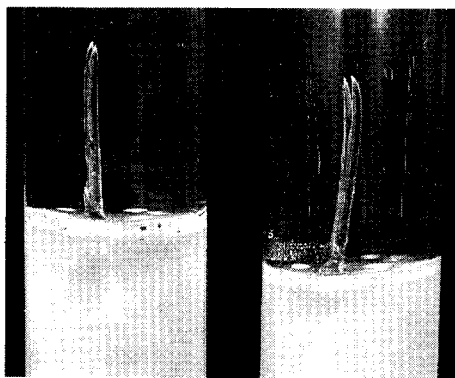


写真1

③ 培地組成

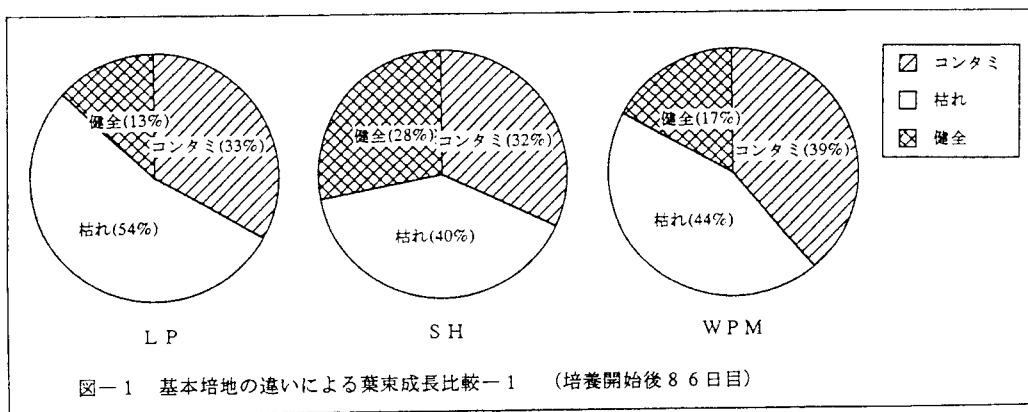
基本培地には、LP¹⁾、SH²⁾、WPM³⁾を用いた試験ごとに改変した。

ア 基本培地が異なる場合の比較－1

表－2のような培地組成でシュートの培養試験を行った。結果は、図－1のとおりであり、SHでの葉束の健全割合が高かった。しかし、さし付けた葉束の状態はさし付け直後とほとんど変化がなく伸長もしなかった。

表－2 培養に用いた培地組成

基 本 培 地	改 変 事 項	BAP (m o l)	NAA (m o l)	活性炭 (%)	リボフラビン (mg/ℓ)
LP	な し	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	0.8	0.2
SH	CaCl ₂ ・2H ₂ O、Fe-EDTAを除く無機塩濃度を1/2	〃	〃	〃	〃
WPM	アデニン5倍量、ニコチン酸10倍量、シュクロース3%	〃	〃	〃	〃



イ 基本培地が異なる場合の比較-2

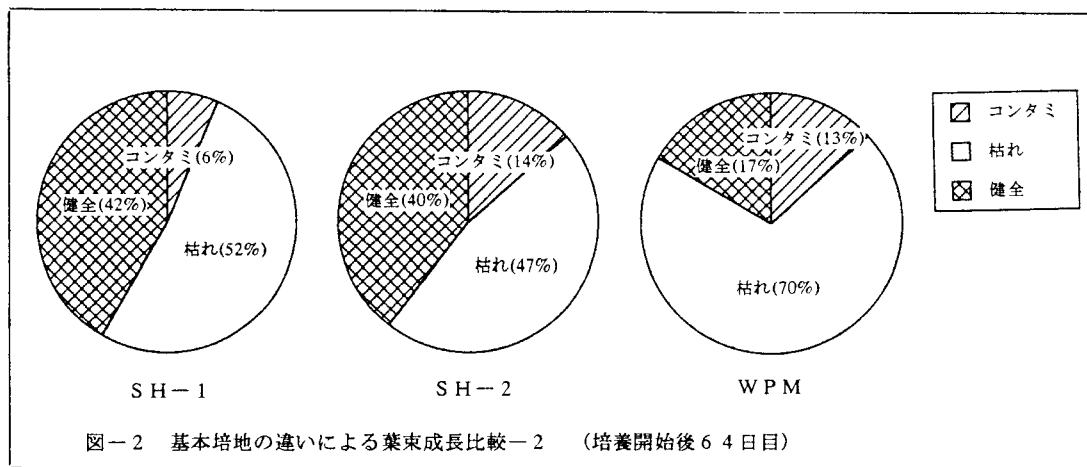
表-3のような培地組成でシュートの培養試験を行った。結果は、図-2のとおりであり、SH-1での葉束の健全割合が高かった。しかし、SH-1では、さし付けた葉束の状態は、さし付け直後とほとんど変化がなく伸長もしなかった。それに対し、SH-2では、葉束基部に膨らみを生じ(写真2)展葉するものがみられた。



写真2

表-3 培養に用いた培地組成

培地名	改変事項	BAP (mol)	NAA (mol)	リボフラビン (mg/l)
SH-2	無機塩濃度を1/2	10^{-6}	10^{-7}	0.2
SH-2		10^{-5}	"	"
WPM	なし	3.16×10^{-6}	"	"

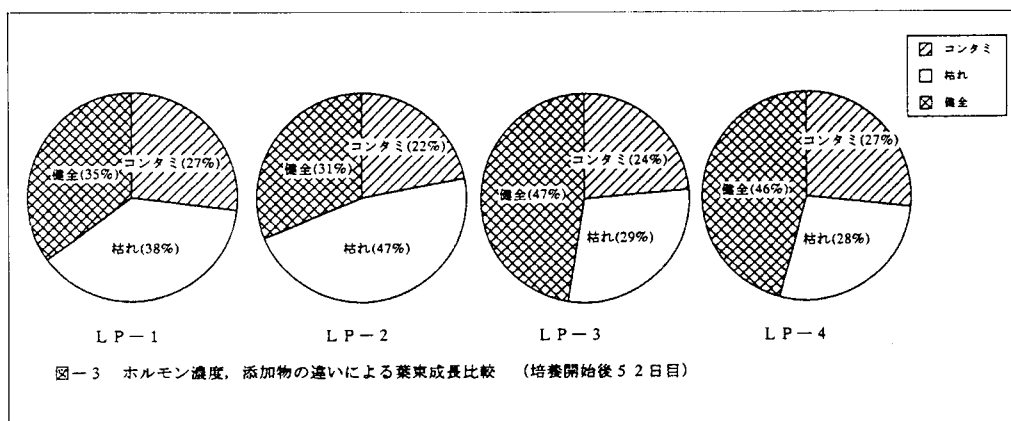


ウ ホルモン濃度、添加物が異なる場合の比較

表-4のような培地組成でシュートの培養試験を行った。結果は、図-3のとおりであり、LP-3、LP-4での葉束の健全割合が高かった。このことから、活性炭の添加は健全率の向上につながると思われた。しかし、さし付け基部に膨らみを生じるものは活性炭無添加区の方が多く、活性炭添加区は外植体の葉束のみ伸長するものが多くみられたため、葉束の初代培養における活性炭の添加効果は必ずしもあるとは思われなかった。

表-4 培養に用いた培地組成

培地名	改変事項	BAP (mol)	NAA (mol)	活性炭 (%)	リボフラビン (mg/l)
LP-1	なし	10^{-5}	10^{-7}	0	0.2
LP-2	なし	10^{-4}	"	"	"
LP-3	なし	10^{-5}	"	0.8	"
LP-4	なし	10^{-4}	"	"	"



④ 培養環境

培養は、約6,000 lx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

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

初代培養で比較的成績のよかった無機塩濃度を1/2に減じたSHにBAP 10^{-5} mol、NAA 10^{-7} mol、リボフラビン0.2mg/l添加した培地で継代培養を行ったが、初代培養の時点で展葉する率が極めて低いため、継代培養での最適培地組成の検索には至らなかった。また、一定期間継代培養は続けられたものの、やがてほとんど褐変枯死した。

③ 培養環境

温度、照明、培養容器とも、初代培養と同じ条件で行った。

(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比較的伸長が良好なものを選んで行った。

② 培地組成

前述のように、健全な継代培養シュートの確保が困難であったため計画的な培地組成の検索はできなかった。しかし、無機塩濃度を1/2に減じたSHにBAP 10^{-5} mol、NAA 10^{-7} mol添加した液体培地で支持体にポリエステルウールを使用したもので、発根する個体もみられた。(写真3)

③ 培養環境

温度、照明は、葉束を用いた場合の初代培養と同じ条件で、また培養容器は、30mm×200mmの試験管を用いた。

3 器官培養（萌芽枝の不定芽を用いた場合）

(1) 初代培養

① 切片の滅菌法

殺菌に用いる薬剤、及び殺菌時間ともに葉束を用いた場合と同じ条件で行った。

② 個 体

「培養用材料の育成確保」の項で述べた、つぎ木苗から伸長した当年枝をせん定し得られた萌芽枝の不定芽を外植体として用いた。

（写真4）

③ 培地組成

基本培地には、LP、SH、WPMを用い葉束を用いた場合と同様の試験を行った。しかし培地毎に顕著な成長の差はみられなかった。

④ 培養環境

温度、照明、培養容器とも、葉束を用いた場合の初代培養と同じ条件で行った。

(2) 継代培養

① 個 体

供試したシュートは、継代培養中のものの中から比較的健全なものを選んで行った。

② 培地組成

葉束を用いた場合と同様に、健全な継代培養シュートの確保が困難であったため計画的な培地組成の検索はできなかった。しかし、基本培地にLPを用い表-5のように改変した培地組成でクロマツ不定芽培養での活性炭有無の影響を調べた。その結果、活性炭添加区でのシュートの伸長がよい傾向にあると思われた。（写真5）



写真3



写真4

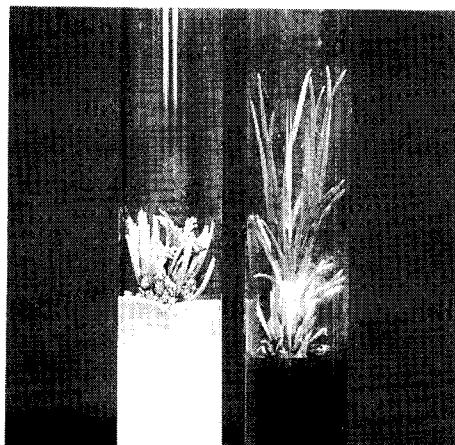


写真5

表-5 培養に用いた培地組成

基 本 培 地	改 変 事 項	BAP (m o l)	NAA (m o l)	活性炭 (%)	リボフラビン (mg/ℓ)
LP	無機塩濃度を1/2 シュクロース 1.5%	10^{-5}	10^{-7}	0	0.6
LP	無機塩濃度を1/2 シュクロース 1.5%	"	"	1.2	0.6

③ 培養環境

温度、照明、培養容器とも、葉束を用いた場合の初代培養と同じ条件で行った。

(3) 発根培養

継代培養時点での、健全な継代培養シュートの確保が困難であったため発根培養試験はできなかった。

4 器官培養（冬芽を用いた場合）

(1) 初代培養および継代培養

培養に供してからの冬芽の成長速度が遅いため、初代培養と同じ培地組成で継代培養も引き続き行った。

① 切片の滅菌法

薬剤による殺菌処理としては、70%エタノールで1分間攪拌殺菌を行った。

② 個 体

「培養用材料の育成確保」の項で述べた、つぎ木苗に形成された冬芽を採取し、鱗片を除去後、1.5～2 cmに分割調整したものを外植体として用いた。（写真6）

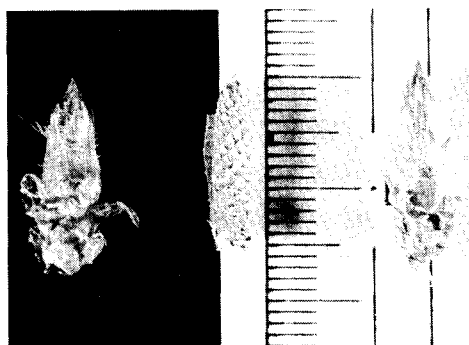


写真6

③ 培地組成

基本培地にはSHを用い、表-6のように改変した培地組成でクロマツ冬芽初代培養での活性炭有無の影響を調べた。その結果、活性炭添加区でのシュートの伸長がよい傾向にあると思われた。（写真7、8）

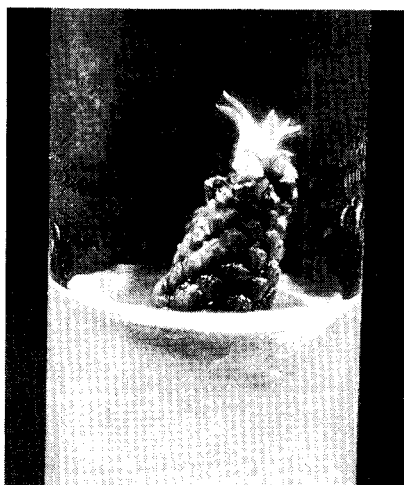


写真7 活性炭無添加区

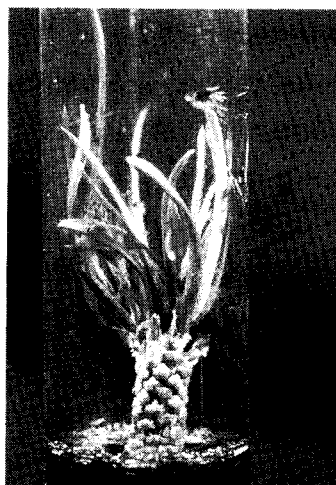


写真8 活性炭添加区

表-6 培養に用いた培地組成

基 本 培 地	改 変 事 項	B A P (m o l)	N A A (m o l)	活性炭 (%)
S H	無機塩濃度を1/2	2.22×10^{-5}	2.67×10^{-7}	0
S H	無機塩濃度を1/2	"	"	0.5

④ 培養環境

温度、照明、培養容器とも、葉束を用いた場合の初代培養と同じ条件で行った。

(3) 発根培養

継代培養時点での、健全な継代培養シュートの確保が困難であったため発根培養試験はできなかった。

V 研究の要約

1 培養用材料の育成確保

- ・ つぎ木苗を作成し、温室内で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（葉束を用いた場合）

- ・ 初代培養では、SHの無機塩を1/2濃度に減じ、BAP 10^{-5} mol、NAA 10^{-7} mol、リボフラビン0.2mg/ℓを添加した培地で比較的シュートの成長がよかった。

- ・ 活性炭の添加は、初代培養では健全率の向上につながると思われたが、シュートの増殖との関係は明らかではなかった。
 - ・ 継代培養では、ほとんどの個体が褐変枯死したため、最適培地の検索には至らなかった。
 - ・ 発根培養では、SHの無機塩を1/2濃度に減じ、BAP 10^{-5} mol、NAA 10^{-7} mol添加した液体培地で、支持体にポリエステルウールを使用したもので発根する個体もみられた。
- 3 器官培養（萌芽枝の不定芽を用いた場合）
- ・ 初代培養では、葉束初代培養と同様の試験を行ったが、培地毎に顕著な成長の差はみられなかった。
 - ・ 継代培養では、LPの無機塩を1/2濃度に、また、シュクロースを1.5%に減じ、BAP 10^{-5} mol、NAA 10^{-7} mol、リボフラビン0.6mg/ℓ、活性炭1.2mg/ℓ添加した培地が比較的シュートの伸長が良好であり、活性炭の添加効果があると思われた。
- 4 器官培養（冬芽を用いた場合）
- ・ 初代培養及び継代培養では、SHの無機塩を1/2濃度に減じ、BAP 2.22×10^{-5} mol、NAA 2.67×10^{-5} mol、活性炭0.5mg/ℓ添加した培地でシュートの伸長が良好であった。

VI おわりに

この試験は、松くい虫抵抗性クロマツの組織培養による植物体再生の足がかりとなったが、増殖や発根にはクローン間の差異が大きいと思われ、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と思われる。

また、培養を開始してから培地や植物ホルモンなどの影響が現れるまでに長時間を要する傾向があるので、今後は効率的な培養法の検討をする必要があると思われる。

引用文献

- 1) AITKEN — CHRISTIE, J. and THORPE, T. A. : Clonal propagation: Gymnosperms. In Cell culture and somatic cell genetics of plant. Vol.1 (ed. VASIL, I. K) PP 82~95. Academic Press. Inc. 1984.
- 2) SCHENK, R. U. and HILDEBRANDT, A. C. : Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50 : 199~204, 1972
- 3) 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