

組織培養によるグイマツ雑種Fの芽ばえ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 | 黒丸, 亮 佐藤, 孝夫 |
| 巻/号 | 69巻9号 |
| 掲載ページ | p. 355-358 |
| 発行年月 | 1987年9月 |

短 報

組織培養によるグイマツ雑種 F₁ の芽ばえからの幼植物体再生*

黒丸 亮**・佐藤孝夫**

KUROMARU, Makoto and SATOH, Takao: **Plantlet formation from cotyledon-epicotyl explant of hybrid larch (*Larix Gmelinii* × *L. leptolepis*) F₁ by tissue culture** J. Jpn. For. Soc. 69: 355~358, 1987 To develop more efficient technology in the propagation of hybrid larch (*Larix Gmelini* LEDEB. × *L. leptolepis* GORD.) F₁, tissue culture was tried using cotyledon-epicotyl explants from sterilized hybrid germinants. On SCHENK and HILDEBRANDT medium (SH) with BAP (6-benzylaminopurine, 3 mg/l) adventitious buds were induced on explants in 7 to 8 weeks. Buds clusters were separated into individual buds and transferred to woody plant medium (WPM) without hormones. Some buds elongated into shoots and rooted in 10 to 12 weeks culture. However the others did not elongate bud or became brownish and died. The numbers of total divided cultures, elongated shoots, and rooted plantlets per explant (the average of 8 explants) in 42 weeks were 14.6, 8.5, and 6.3, respectively.

I. はじめに

グイマツ雑種(グイマツ×ニホンカラマツ) F₁ は一般にニホンカラマツよりも野ネズミや野ウサギの食害を受けにくく、幹曲がりが少ないなどの利点を備えており、さらに生長の速さもニホンカラマツ以上である。このため北海道における新たな造林材料として需要が急増している。現在の雑種種子の事業的生産は、グイマツとニホンカラマツの混種採種園における自然受粉方式で行われているが、採種量の年変動が大きいことや、幼苗段階で雑種苗と非雑種苗を判定、選別する必要があるため、雑種苗の効率的な増殖技術の開発が望まれる。

そこで、近年林木の増殖技術としても注目されている組織培養によるグイマツ雑種 F₁ の増殖法を検討してきた。今回は、無菌発芽させた雑種採種園産種子の芽ばえから幼植物体を再生できたので、その結果を報告する。

本研究を進めるにあたり、実験施設の使用と、ご指導をいただいた、北海道立中央農業試験場バイテク研究室の皆様にお礼申し上げます。

II. 材料と方法

用いた種子は、グイマツ雑種採種園(滝川市, 1971年造成)から1983年8月に採種し、実験までの約2年間5°Cの保冷庫に保管したものである。なお、採種母樹のグイマツは雌性着花個体であるため(6)ほとんどの種子は雑種と考えられる。種子は、30%の過酸化水素水で

1時間攪拌して消毒した。その後、滅菌水で2時間すすぎ、沈んだ種子だけをホルモンを含まない MURASHIGE and SKOOG (MS) 培地(3)に置床し、25°Cに調整した恒温器で発芽させた。置床して2週間後に、発芽した8本の芽ばえの上部(子葉、上胚軸および数mmの下胚軸を含む部分、図-1, A)を外植体として切りとり、3 mg/l の BAP (6-benzylaminopurine) を含んだ一部改変した SCHENK and HILDEBRANDT (SH) 培地(7)に挿しつけ、25°C, 18時間日長の条件下で培養を開始した。その後、1週間間隔で同じ組成の培地に移植し、培養開始後8週目からは、ホルモンを含まない一部改変した Woody plant medium (WPM) 培地(2)で培養を続けた。なお、ここで用いた3種類の培地組成は表-1のとおりである。

III. 結果と考察

BAP を含む SH 培地に外植体を挿しつけて3週間ごろから子葉の基部付近から数ミリの葉が発生し、7~8週目にはそれらが多くの不定芽の集まりであることが確認できた。そこで、8週目からは、その集まりをホルモンを含まない WPM 培地に1週間間隔で株分け、移植したところ、10週目からは伸長する株がみられ、12週目以降では発根する株も認められた。外植体から不定芽が発生し幼植物体になるまでの発育段階は図-1のとおりである。また、外植体1個当りからの総株数、シュート伸長株数および発根株数は、外植体8個の平均で42

* 本報告の大要は第98回日本林学会大会(1987)で発表した。

** 北海道立林業試験場 Hokkaido For. Exp. St., Bibai, Hokkaido 079-01

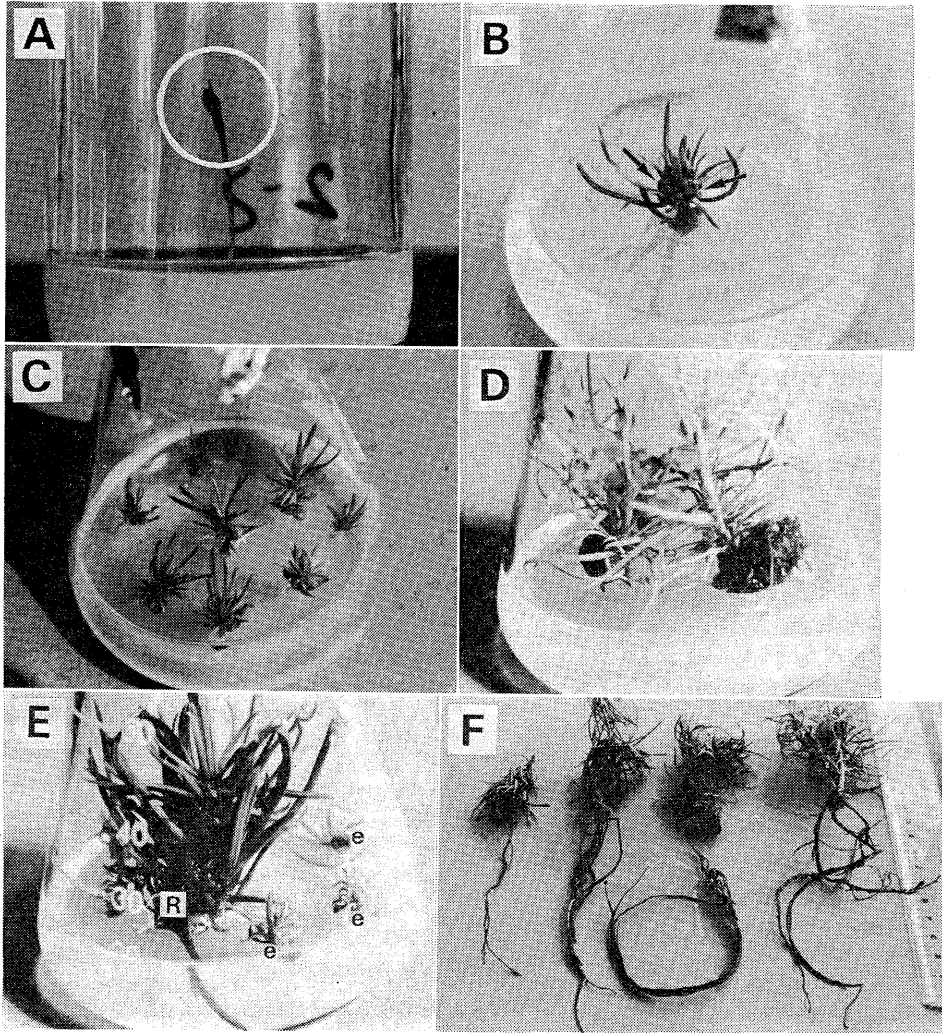


図-1. グイマツ雑種 F_1 の子葉-上胚軸部から幼植物体が再生するまでの发育段階
Developmental stages of cotyledon-epicotyl explants in plantlet formation of hybrid larch F_1

- A: 無菌発芽苗, 円内の部分を外植体として用いた。
A seedling germinated sterilely (in circle) used as a cotyledon-epicotyl explant.
- B: 培養して7週後の不定芽 (矢印) 塊
A cluster of adventitious buds (arrows) after 7 weeks culturing.
- C: 培養して14週後の不定芽塊を分けた株 (一つの株が複数の不定芽からなっている場合もあった)
Adventitious buds separated from a cluster of buds after 14 weeks culturing. (Some consisted of plural buds after separation.)
- D: 培養して18週後の伸長株
Elongated shoots after 18 weeks culturing.
- E: 培養して18週後の発根株 (R) と伸長していない株 (e)
Rooted plantlet (R) and non-elongated buds (e) after 18 weeks culturing.
- F: 培養して2週後の再生した幼植物体
Plantlet formation after 42 weeks culturing.

表-1. 培養に用いた培地の成分組成
Nutrient components of test media (mg/l)

| Components | MS(3) | SH(7) | WPM(2) |
|--|--------|--------|--------|
| NH ₄ NO ₃ | 1,650 | — | 400 |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | — | 300 | — |
| KNO ₃ | 1,900 | 2,500 | — |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | — | — | 556 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | 400 | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | — | 170 |
| K ₂ SO ₄ | — | — | 990 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | 200 | 96 |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 22.3 | 10 | 22.3 |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | 5 | 6.2 |
| ZnSO ₄ ·4H ₂ O | 8.6 | 1 | 8.6 |
| KI | 0.83 | 1 | — |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 | 0.2 | 0.25 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | 0.1 | 0.25 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 | 0.1 | — |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | 15 | 27.8 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | 20 | 37.3 |
| myo-Inositol | 100 | 100 | 100 |
| Thiamine-HCl | 0.4 | 5 | 1 |
| Nicotinic acid | 0.5 | 5 | 0.5 |
| Prydoxine-HCl | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Glycine | 2 | — | — |
| BAP* | — | 3 | — |
| Sucrose | 30,000 | 30,000 | 30,000 |
| Agar | 7,000 | 7,000 | 7,000 |

*: 6-benzylaminopurine

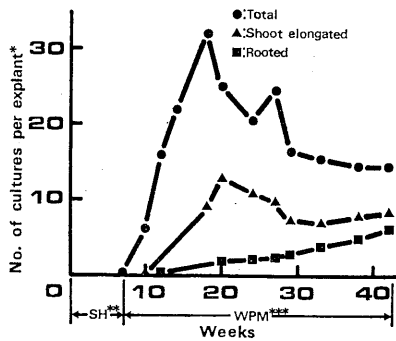


図-2. グイマツ雑種 F₁ の子葉-上胚軸部から誘導した不定芽の発育段階別株数の変化

Numerical changes of cultures in each developmental stage of bud from a cotyledon-epicotyl explant of hybrid larch F₁.

* 外植体 8 個の平均値

The average of 8 explants.

** BAP を 3 mg/l 含む SH 培地で培養

Cultured on SH medium with BAP (3 mg/l).

*** WPM 培地で培養

Cultured on WPM medium

週目まで図-2 のように変化した。ここでの株分けは、原則として不定芽 1 個ずつに分けることとし、そのうちシュートの長さが約 1 cm 以上のものをシュート伸長株、シュートが伸長して発根したものを発根株とした。ただし、とくに 14 週目までの株分けでは、不定芽が小

表-2. 各外植体からの増殖株数および個体再生率 (42 週目)

Number of propagated cultures and propagated proportion from each explant (42-weeks-culture).

| Explant No. | Total (A) | Shoot elongated (B) | Rooted (C) | Propagated proportion (C/A, %) |
|-------------|-----------|---------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | 12 | 6 | 1 | 8.3 |
| 2 | 36 | 20 | 15 | 41.7 |
| 3 | 17 | 3 | 3 | 17.6 |
| 4 | 19 | 12 | 11 | 57.9 |
| 5 | 7 | 4 | 0 | 0.0 |
| 6 | 7 | 7 | 7 | 100.0 |
| 7 | 4 | 4 | 4 | 100.0 |
| 8 | 15 | 12 | 9 | 60.0 |
| Average | 14.6 | 8.5 | 6.3 | 48.2 |

さく肉眼でははっきり確認できないものがあつたため、結果的に 1 個の株が複数の不定芽を含んでいる場合が多かつた。すなわち、総株数、シュート伸長株数が 14 週目まで急増したのは、株分け、移植の繰り返しによって小さな不定芽の生長が促進されたり、あらたに不定芽が形成されたためと考える。一方、株分けの過程で枯死するものもみられた。枯死の原因は不明であるが、シュートが伸長していない小さな株ほど枯れる場合が多かつた(図-1, C)。また、伸長したシュートの下の葉から枯れ上がり枯死するものもあつた。42 週目現在での芽ばえ 1 本当たりから総株数、伸長株数、発根株数は、8 本の平均で、それぞれ 14.6, 8.5, 6.3 であつたが、外植体によるばらつきは大きい。表-2 には培養して 42 週目における各外植体からの増殖株数と個体再生率(発根株数/総株数)を示した。なお、発根した再生個体は、順次温室へ移植しているが、これまでのところ枯死するものはみられない。

以上の結果は、グイマツ雑種 F₁ の短期大量増殖の可能性を示唆するものである。これまでに報告されているトウヒ、マツ類などの芽ばえを用いた増殖試験での培養経過は、今回の経過とよく似ている。RUMARY ら (5) は、トウヒ類の芽ばえを用い、BAP を含む SH 培地で今回と同様の外植体から不定芽を誘導し、それらを糖量を減らした SH 培地に株分け、移植し再生個体を得ている。その中で、不定芽誘導には BAP 等のサイトカニン類と、SH 培地などの高濃度の塩類を含んだ培地が必要であり、不定芽の伸長にはホルモンを加えず糖量を減らした培地が適していると述べている。また、RAJ ら (4) はトウヒ類とマツ類と同様の結果を得ているが、シュート伸長や発根用培地の無機塩類の濃度は不定芽誘導用培地の半分であつた。今回の試験ではシュート伸長や発根用培地として WPM 培地を用いた。この培地は

SH 培地よりも窒素源が少なく、リン酸やカリウムなどの無機塩類を多く含んでいる(表-1)。このことが、不定芽の伸長や発根に適していたとも考えられるが、この点については、さらに検討が必要である。一方、不定芽の増殖率は、芽ばえの部位などによっても異なることが知られている(1,4)。

今後、培養期間の短縮や増殖率の向上、さらには、馴化段階における生長制御等に関する実験を進める予定である。

引用文献

- (1) AITKEN, J., HORGAN, K. J. and THORPE, T. A.: Influence of explant selection on the short-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11: 112~117, 1981
- (2) LLOYD, G. B. 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, 1980
- (3) MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473~497, 1962
- (4) RAJ, A. Y. and Ho, R. H.: *In vitro* propagation of some conifers by cotyledon and epicotyl culture. Proc. 20th meeting of the Can. Tree Improv. Assoc. Part 2: 68~75, 1986
- (5) RUMARY, C. and THORPE, T. A.: Plantlet formation in black and white spruce. I. *In vitro* techniques. Can. J. For. Res. 14: 10~16, 1984
- (6) 佐々木忠兵衛・倉橋昭夫・小笠原繁男・中坪三平・浜谷稔夫: グイマツ特殊選抜個体の着花習性. 日林北支講 21: 71~77, 1972
- (7) 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

(1987年4月3日受理)