

## 資料

# 組織培養によるコナラのクローン増殖

茂木靖和

キーワード：コナラ，組織培養，GA<sub>3</sub>，糖，増殖

## I はじめに

近年、岐阜県においてナラ枯れによるコナラの被害が拡大し、問題となっている。現在のところ、有効な対策が確立されておらず、被害の抑制には多方面からの検討が必要と思われる。その一つに、松枯れでも行われている抵抗性個体の選抜が考えられる。

コナラの被害林分には、カシノナガキクイムシの穿孔を受けて、枯れる個体や枯れない個体が存在する（黒田，2008）。枯れる個体はナラ枯れに対する感受性が、枯れない個体はナラ枯れ抵抗性が、高い可能性がある。しかし、コナラにナラ枯れ抵抗性があるかどうかは確認されておらず、これを明らかにするには検定などが必要である。病虫害抵抗性に関する検定では、クローン苗に病原菌などを人工接種する方法が行われている（栄花，1998）。しかし、コナラは挿し木やつぎ木が困難な樹種といわれており（最新バイオテクノロジー全書編集委員会，1989），クローン苗の育成が容易でない。そこで、これらに代わるクローン増殖法として、組織培養を検討した。

本報告では、カシノナガキクイムシの穿孔を受け、樹冠部の葉が萎凋状態にあったコナラの萌芽枝の腋芽を材料に用いて、効率的にシュートを増殖させる培地条件を検討した。

## II 実験方法

### 1. 各試験における共通条件

培地で使用されるサッカロースは一級を用いた。トレハロースは食品添加物を用いた。BAP，GA<sub>3</sub>は生化学用を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

各試験で配合した培地は、オートクレーブで121℃，1.2気圧で20分間殺菌を行った後、クリーンベンチ内でφ90mm深さ20mmの滅菌シャーレに約20mL分注して用いた。

培養条件は25℃，照度4000Lux，16時間照明とした。

### 2. 初代培養

#### (1) 材料および殺菌条件

材料には、2007年8月22日に岐阜県池田町で、カシノナガキクイムシの穿孔を受け樹冠部の葉が萎凋状態にあったコナラの根元から発生した萌芽枝の腋芽を用いた。萌芽枝は、採取した当日に葉柄を一部残し10～20mm程度に切断し、殺菌処理として70%エタノールに1分，1%アンチホルミンに10分浸漬した。次に、クリーンベンチ内でこれを滅菌水で3回洗浄した後、枝と葉柄の端を切り返して、培地に1個ずつ挿し付けた。

#### (2) 培地条件および調査方法

培地には、BAP0.2mg/L，糖（サッカロースまたはトレハロース）20g/Lを加えてpH5.8に調整したWP培地（最新バイオテクノロジー全書編集委員会，1989）に、ゲランガム2g/Lを添加した。

培養開始18日目に、雑菌発生の有無，シュート伸長の有無を調査した。供試数は10個である。

### 3. 継代培養

初代培養によって得られたシュートを、継代培養により維持・増殖のための条件を明らかにすることは、無菌材料の周年確保，増殖効率が高ければ大量増殖に繋がるといった利点があるので，検討した。

初代培養で得られたシュートを茎頂または腋芽を含むように3～10mmに切り分けて，初代培養と同一条件の培地に6～7個挿し付けて，2代培養を行った。これ以降も，先代の培養で得られたシュートを茎頂または腋芽を含むように3～10mmに切り分けて，同一条件の培地に6～12個挿し付けて継代培養を行い，17代培養（通算培養日数：446日）まで繰り返した。

\* 本研究の一部は、日本森林学会第120回大会(2009年3月)において発表した。

2, 5, 15, 17代培養終了時に各シュートの茎頂あるいは腋芽から発生した最大のシュート伸長量（以下、シュート伸長量）、次回の継代培養で分割可能な3mm以上のシュートの数、枯死個体数を調査した。供試数は6～18個である。

#### 4. 発根に用いるシュートを効率的に得るための培地条件の検討

クローン苗を育成するには、シュートから発根させる必要がある。コナラの発根には、少なくとも5～10mm程度のシュートが用いられている（最新バイオテクノロジー全書編集委員会，1989）。今回は、7mm以上伸長したものを発根に用いるシュートとした。ここでは、被子植物の茎成長を促進するとされるジベレリン（神阪ら，1994）の添加、およびチャなどで腋芽の成長や不定芽分化に影響することが報告されている糖の種類・濃度（中村，1990）を検討した。

##### (1) GA<sub>3</sub>の添加および糖の種類がシュート増殖に及ぼす影響

培地には、BAP0.2mg/L、ジベレリン（0または0.5mg/L）、糖（サッカロースまたはトレハロース）20g/Lを加えてpH5.8に調整したWP培地に、ゲランガム2g/Lを添加した。ジベレリンにはGA<sub>3</sub>を用いた。供試材料には、「3. 継代培養」で得られたシュートを茎頂又は腋芽を含むように3～10mmに切り分けて用いた。各培地には、切り分けたシュートを9個挿し付けた。

培養開始25日後に、シュート伸長量、7mm以上伸長したシュートの数、枯死個体数を調査した。供試数は18個である。

##### (2) 糖濃度がシュート増殖に及ぼす影響

(1)で、BAP0.2mg/L、GA<sub>3</sub>0.5mg/L、糖（サッカロース又はトレハロース）20g/Lを加えてpH5.8に調整したWP培地に、ゲランガム2g/Lを溶かし込んだ培地で得られたシュートを、茎頂又は腋芽を含むように3～10mmに切り分けて、同一条件の培地で継代培養を繰り返した。ここで得られたシュートを同様に切り分けて、糖濃度のみを変更した三種類の培地で培養した。培地の糖濃度が20g/Lの試験区を20区、30g/Lの試験区を30区、40g/Lの試験区を40区とする。この後、それぞれの糖濃度の培地で二回の継代培養を行った。各培地には、切り分けたシュートを10個挿し付けた。

各培養の終了時（培養期間：21～41日）にシュート伸長量、7mm以上伸長したシュートの数を調査した。供試数は10個である。

### III 結果と考察

#### 1. 初代培養

雑菌は20個体中12個体に発生した（表-1）。シュートは糖がサッカロースの培地で10個体中1個体に、トレハロースの培地で10個体中2個体に発生した（表-1）。70%エタノールに1分、1%アンチホルミンに10分浸漬の条件で殺菌を行うことにより、8月の材料採取にもかかわらず無菌のシュートを得ることが可能であった。

組織培養では一般に、野外に生育している個体の組織を直接採取し、殺菌してから培養に供するが、その場合、春先の時期を逃すと、7月には雑菌類による汚染が90%以上に達し、培養系からの除去が極めて困難となる（引田，1991）。このため、コナラの腋芽培養では、4月下旬から入梅前の枝・萌芽枝（最新バイオテクノロジー全書編集委員会，1989）や、屋内で水さした丸太から発生した萌芽枝（引田，1991）といった、発生してからの経過時間が短い枝を材料に用いると良いとされている。

カシノナガキクイムシの穿孔を受けて葉の萎凋・変色や枯死に至る個体は、梅雨明け後、7月中旬から8月にかけて発生するものが多いとされ、これらの中には、樹幹基部から萌芽枝の発生するものがあるといわれている（黒田，2008）。今回、培養に用いた樹冠部の葉が萎凋状態にあったコナラの萌芽枝は、採取時期が8月下旬であり、屋外に生育している個体から直接材料を採取して培養を行う場合に殺菌が困難な時期であったが、枝が発生してからの経過時間が短かったため、雑菌の発生しない個体が得られたと考えられる。

表-1 初代培養の結果

培地*の糖の種類	供試数(個)	シュート発生個体数(個)	雑菌発生個体数(個)	培養期間(日)
サッカロース	10	1	6	18
トレハロース	10	2	6	18

\*表に記載以外の培地条件は、基本培地:WP、BAP:0.2mg/L、糖濃度:20g/L、ゲランガム:2g/L。

#### 2. 継代培養

シュート伸長量は、サッカロースでは4.7～10.6mm、トレハロースでは7.0～8.8mmであった。3mm以上のシュート数は、サッカロースでは1.1～3.4個、トレハロースでは1.6～3.0個であった（表-2）。

コナラの継代培養では、引田（1991）がBAP0.5mg/L、NAA0.02mg/Lを加えたWP培地で6代（通算培養期間：

約200日)まで、維持・増殖できたことを報告している。今回は、初代～17代(通算培養期間:446日)まで、同一の培地条件(BAP0.2mg/L,糖(サッカロース又はトレハロース)20g/Lを加えたWP培地に、ゲランガム2g/Lを溶かし込んだもの)で、個体の維持・増殖が可能であった。

表-2 継代培養の結果

項目	培地*の糖の種類	2代	5代	15代	17代
平均値	シュート伸長量(mm)	6.0	10.6	5.5	4.7
	3mm以上シュート数(個)	7.2	7.6	7.0	8.8
	サッカロース	1.9	3.4	1.4	1.1
	トレハロース	2.0	3.0	1.6	2.3
枯死個体数(個)	サッカロース	0	2	0	0
	トレハロース	0	2	2	0
供試数(個)	サッカロース	7	18	18	12
	トレハロース	6	18	18	10
培養期間(日)		16	32	24	28

\*表に記載以外の培地条件は、基本培地:WP、BAP:0.2mg/L、糖濃度:20g/L、ゲランガム:2g/L。

### 3. 発根に用いるシュートを効率的に得るための培地条件の検討

#### (1) GA<sub>3</sub>の添加および糖の種類がシュート増殖に及ぼす影響

シュート伸長量については、当代および一代前までの培地の糖の種類に関わらず当代にGA<sub>3</sub>0.5mg/Lを添加した場合に12.2～17.3mmと大きく、GA<sub>3</sub>を添加しなかった場合に4.5～7.0mmと小さかった(表-3)。当代培地におけるGA<sub>3</sub>添加の有無と当代または一代前までの培地における糖の種類とのあいだには、二元配置の分散分析の結果、共にGA<sub>3</sub>添加の有無において1%水準で有意な差があった。また、当代の培地条件が同一の場合、一代前までの培地の糖がサッカロースよりもトレハロースの時にシュート伸長量が大きかった(表-3)。7mm以上のシュート数については、当代および一代前までの培地の糖の種類に関わらずGA<sub>3</sub>0.5mg/Lを添加した場合に0.5～1.4個と多く、GA<sub>3</sub>を添加しな

かった場合に0.3～0.4個と少なかった(表-3)。当代培地におけるGA<sub>3</sub>添加の有無と糖の種類とのあいだには、二元配置の分散分析の結果、GA<sub>3</sub>添加の有無において1%水準で有意な差があった。枯死個体数は、一代前までの培地の糖がサッカロース、当代培地の糖がトレハロースの時に5～7個と、GA<sub>3</sub>0.5mg/L添加の有無にかかわらず多かった(表-3)。

以上のことから、発根に用いる7mm以上のシュートを効率的に得るには、BAP0.2mg/L、トレハロース20g/Lを加えたWP培地で培養し続けた後に、BAP0.2mg/L、GA<sub>3</sub>0.5mg/L、サッカロース又はトレハロース20g/Lを加えたWP培地に継代する方法が有効と考えられる。

コナラの増殖におけるGA<sub>3</sub>添加の影響は、BAPとの併用で効果が報告されている。子葉の付いた胚軸の培養では上胚軸の発生(引田,1991)に、腋芽培養では不定芽誘導(川尻ら,1993)に有効であった。今回は、BAP0.2mg/L、GA<sub>3</sub>0.5mg/Lを併用することにより、シュート伸長量および7mm以上のシュート数に効果が確認された。

これまで、コナラの組織培養で用いられる糖はほとんどがサッカロース20～30g/Lであった(最新バイオテクノロジー全書編集委員会,1989;井出ら,1987;川尻ら,1993)。糖をフルクトース、グルコース、キシロース、マンニトールに変更した培地で培養も行われたが、シュート形成率が最も高かったのは、サッカロースであった(引田,1991)。今回、当代の培地条件が同一の場合、一代前までの培地の糖がサッカロースよりもトレハロースの時にシュート伸長量が大きかった。また、一代前までの培地の糖がトレハロース、当代培地の糖がトレハロースでGA<sub>3</sub>0.5mg/Lを添加した場合に、シュート伸長量が最も大きく、7mm以上のシュート数が最も多かった(表-3)。これらのことから、糖濃度が20g/Lの場合、シュート増殖に用いる培地の糖には、サッカロースよりもトレハロースが適すると考えられる。

表-3 GA<sub>3</sub>施用と糖の種類がシュートの増殖に及ぼす影響

一代前までの培地条件*	当代の培地条件*		平均値		枯死個体数(個)
	糖の種類	GA <sub>3</sub> (mg/L)	シュート伸長量(mm)	7mm以上シュート数(個)	
サッカロース	-	サッカロース	5.5	0.4	0
	0.5	サッカロース	12.2	0.9	2
	-	トレハロース	4.5	0.4	7
	0.5	トレハロース	12.3	0.5	5
トレハロース	-	サッカロース	6.0	0.3	0
	0.5	サッカロース	15.7	1.0	0
	-	トレハロース	7.0	0.4	2
	0.5	トレハロース	17.3	1.4	0

\*表に記載以外の培地条件は、基本培地:WP、BAP0.2mg/L、糖濃度:20g/L、ゲランガム:2g/L。培養期間:25日、供試数:18個

#### (2) 糖濃度がシュート増殖に及ぼす影響

糖がサッカロースの場合には、濃度が高くなるにしたがい、シュート伸長量が小さく、7mm以上のシュート数が少なかった(表-4)。同一サッカロース濃度で継代培養を繰り返すと、30および40g/Lではシュート伸長量が小さく、7mm以上のシュート数が少なくなり、三代繰り返すとシュート伸長がみられなくなった(表-4)。

糖がトレハロースの場合には、濃度が高くなるにしたがい、シュート伸長量が大きく、7mm以上のシュート数が多かった(表-5)。同一トレハロース濃度で

表ー4 サッカロース濃度がシュートの増殖に及ぼす影響

試験区*	シュート伸長量**(mm)		
	[7mm以上シュート数**(個)]		
	1代目	2代目	3代目
20区	14.3	8.7	12.2
	[1.1]	[0.6]	[0.9]
30区	7.6	1.4	0.0
	[0.6]	[0.0]	[0.0]
40区	4.9	3.4	0.0
	[0.4]	[0.1]	[0.0]
培養期間(日)	33	21	41

\*各試験区の糖濃度は20区:20g/L、30区:30g/L、40区:40g/L  
糖濃度以外の培地条件は、基本培地:WP、BAP0.2mg/L、GA<sub>3</sub>0.5mg/L、  
ゲランガム:2g/L。供試数:10個

\*\*平均値を示した。

継代培養を繰り返した時も、濃度が高くなるにしたがい、シュート伸長量が大きかった(表ー5)。

引田(1991)は、シュート伸長量と腋芽数から、コナラの腋芽培養において最適サッカロース濃度が20~50g/Lとしている。今回はサッカロース濃度が20および40g/Lでは、20g/Lよりもシュート伸長量が小さく、7mm以上シュート数が少なくなり、結果が異なった。糖がトレハロースの場合は、糖濃度が高くなるにしたがいシュート伸長量が大きかった。特に40g/Lで継代培養を繰り返した時のシュート伸長量は、20.4~24.6mmで20又は30g/Lで培養した時よりも大きかった。また、7mm以上のシュート数は、糖濃度の違いによる差が明らかでなかった。これらのことから、糖濃度が20~40g/Lの場合、シュート増殖に用いる培地の糖には、トレハロース40g/Lが適すると考えられる。

表ー5 トレハロース濃度がシュートの増殖に及ぼす影響

試験区*	シュート伸長量**(mm)		
	[7mm以上シュート数**(個)]		
	1代目	2代目	3代目
20区	8.7	14.6	13.4
	[0.6]	[1.3]	[0.8]
30区	10.3	15	14.8
	[0.7]	[1.0]	[0.8]
40区	12.5	24.6	20.4
	[1.1]	[1.0]	[1.2]
培養期間(日)	28	28	36

\*各試験区の糖濃度は20区:20g/L、30区:30g/L、40区:40g/L  
糖濃度以外の培地条件は、基本培地:WP、BAP0.2mg/L、GA<sub>3</sub>0.5mg/L、  
ゲランガム:2g/L。供試数:10個

\*\*平均値を示した。

## 引用文献

- 引田裕之(1991) コナラの組織培養による種苗生産に関する研究. 茨城県林試研報19:1-53.
- 井出雄二・山本茂弘(1987) コナラの芽生えから分離したえき芽の培養による幼植物体の再生. 日林誌69:109-112.
- 神阪盛一郎・宮本健助(1994) 茎の成長と分化. (植物ホルモンハンドブック [上]. 高橋信孝・増田芳雄, 655pp, 培風館, 東京). 84-88.
- 川尻秀樹・茂木靖和(1993) 組織培養によるコナラの増殖技術の開発. 岐阜県林セ研報21:19-40.
- 黒田慶子(2008) ナラ枯れと里山の健康. 166pp, 全国林業改良普及協会, 東京.
- 中村順行(1990) チャの組織培養における不定芽形成と腋芽の生育に及ぼす糖の影響. 静岡茶試研報15:1-5.
- 最新バイオテクノロジー全書編集委員会(1989) 木本植物の増殖と育種. 269pp, 農業図書, 東京.
- 栄花茂(1998) 育種. (林業技術ハンドブック. 全国林業改良普及協会, 1969pp, 全国林業改良普及協会, 東京). 687-711.