

組織培養によるハナノキのクローン増殖

茂木靖和・坂井至通

Micropropagation of *Acer pycnanthum* K.Koch by tissue culture

Yasukazu MOTEKI and Yoshimichi SAKAI

絶滅危惧種であるハナノキの個体保存を目的に、成木の腋芽と胚軸を材料として組織培養によるクローン増殖を試みた。その結果、どちらの材料を用いても増殖が可能で、発根個体を得られた。クローン個体を効率的に増殖させるには、成木の腋芽よりも胚軸を材料とする方が有利であった。胚軸を材料とする場合、クローンにより増殖に差がみられた。このうちのクローンは、増殖が旺盛で発根率が高かったことから、効率的な増殖を行う際の材料として有望であった。

キーワード：ハナノキ、クローン、組織培養、増殖、発根、個体間差

I はじめに

ハナノキ (*Acer pycnanthum* K.Koch) は、岐阜県東部とその周囲の愛知県、長野県を中心としたごく限られた地域に自生するカエデ科の雌雄異株の落葉高木である。本種は春の開葉に先立って開く真紅色の花と秋の紅葉が美しいことから、庭や公園などに鑑賞目的で植栽され、花木として利用されている。また、ハナノキは主に湿地周辺の限られた場所に生育しているが、こうしたところは道路建設やゴルフ場造成等で開発がすすみ、湿地の減少とともに個体数が急速に減少し、現在絶滅危惧Ⅱ類に指定されている（環境庁, 2000）。

ハナノキのクローン増殖は、酒谷（1989）が腋芽の組織培養を試みて順化に成功しているが、供試数が少なく、クローンを効率的に増殖するための詳細な検討がなされていない。また、組織培養によるクローン増殖には、培地条件の他に使用する材料や採取した個体間による増殖への影響が指摘されている（佐々木ら, 1988）。そのため、効率的なクローン増殖には、材料や個体ごとに適切な培養条件の設定が必要である。

そこで、本報告では絶滅危惧種であるハナノキの個体保存を目的に、一般的に用いられる成木の腋芽と胚軸を材料として、組織培養による効率的なクローン増殖を試みた。

II 実験方法

1. 材料

(1) 腋芽

岐阜県恵那市の民家に植栽された胸高直径約20cm、樹高約7mのハナノキ成木（雄木）の幹から発生した直径5mm以内の枝を2002年7月に採取した。枝は採取した当日に葉柄を一部残し10~20mm程度に切断し、中性洗剤で洗浄した後、70%エタノールに2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滅菌水で3回洗浄し、枝と葉柄の端を切り返した後、これを外植体として培地に挿しつけた。その後、伸長したシュートをそれぞれの個体が茎頂または腋芽を含むように3~10mm程度に切り分けて継代培養を繰り返した。継代培養で得られたシュートを所定の長さで切り分けて、各実験に供試した。

(2) 胚軸

胚軸培養に用いた種子は、岐阜県恵那郡坂下町で2002年5月に採取したもので、採取後すぐに容器に入った湿らせた砂に混ぜた。これを砂が乾かないように時々灌水しながら、涼しいところで約5ヶ月間保管したものを購入した。入手した種子は、種皮付きの状態です。1,000倍ベノミル液に1時間、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滅菌水で3回洗浄し、種子から種皮を取り除いて胚軸を摘出した後、これを外植体として培地に挿しつけた。その後、伸長したシュートをそれぞれの

個体が茎頂または腋芽を含むように3～10mm程度に切り分けて継代培養を繰り返した。継代培養で得られたシュートを所定の長さに切り分けて、各実験に供試した。

2. 培地及び培養条件

(1) 試薬

基本培地のWP（最新バイオテクノロジー全書編集委員会，1989）で使用される試薬は特級を用いた。サッカロースは一級を用いた。ゲランガムは植物組織培養用を用いた。BAP，GA₃は生化学用を用いた。トレハロースは食品添加物を用いた。

(2) シュート増殖用培地

基本培地をWPとし，サイトカイニンとしてBAP0.2 mg/l，糖としてトレハロース20 g/lを加えて，pHを5.8に調整し，支持体としてゲランガム2 g/lを溶かし込んで，φ25mmの試験管に約10ml分注した。

また，腋芽由来のシュート増殖では，上記の培地にGA₃0.5mg/lを添加する施用区と添加しない無施用区を設定した。

(3) 発根用培地

基本培地をWPとし，ホルモンフリー，糖としてサッカロース20 g/lを加えて，pHを5.8に調整した液体培地を作成した。この液体培地を支持体である25×50×20 mmのフロリアライト（日清紡㈱，東京）に約20ml加えた。培養容器は，φ60mmのマヨネーズビンを使用した。

また，胚軸由来のシュートの発根では，上記の培地および上記の培地の支持体をフロリアライトからゲランガム2 g/lへ代えたものを作成した。

(4) 培地の殺菌および培養条件

培地の殺菌は，オートクレーブを用いて120℃で15分間高圧滅菌した。また，培養条件は，25℃，照度4000Lux，16時間日長とした。

3. 腋芽のクローン増殖の検討

(1) 培養方法（a）

シュート増殖の検討では，継代培養を12回繰り返して，通算で約1年（364日）間培養したシュートを茎頂または腋芽を含むように3～10mm程度に切り分けた後，シュート増殖用培地に挿しつけた。供試数は各処理区20個とした。

発根の検討では，継代培養を13回繰り返して，通算で431日間培養したシュートを茎頂を含むように10～15 mm程度に切り分けた後，発根用培地に挿しつけた。供試数は8個とした。

(2) 調査方法（a）

シュート増殖の検討では，培養67日後のシュート伸長量と増殖数を測定した。増殖数は次の培養に供試できる数，つまり，伸長したシュートを茎頂または腋芽を含み3～10mm程度に切り分けることのできる数とした。

発根の検討では，培養40日後，80日後，160日後に発根個体数を測定し，発根率を次式により算出した。

$$\text{発根率} = \text{発根個体数} / \text{供試数} \times 100$$

培養40日後と80日後の発根は，フロリアライトから露出した根の有無を培養容器の外から観察することによって判定した。培養160日後は，観察により発根を確認できなかったものについて，フロリアライトからシュートを抜き取って，発根の有無を確認した。

4. 胚軸のクローン増殖の検討

(1) 培養方法（b）

シュート増殖の検討では，継代培養を6回繰り返して，通算で約1年（365～385日）間培養したシュートを「3. 腋芽のクローン増殖の検討」と同様に行った。各クローンの供試数は19～20個である。

発根の検討は，継代培養を5回繰り返して，通算で301～303日間培養したシュートを「3. 腋芽のクローン増殖の検討」と同様に行った。各クローンの供試数は20個である。

(2) 調査方法（b）

シュート増殖の検討は，培養15日後，培養30日後，培養45日後，培養60日後にシュート伸長量と増殖数を測定した。

発根の検討は，「3. 腋芽のクローン増殖の検討」と同様である。

III 結果と考察

1. 腋芽のクローン増殖の検討

個体保存のための培地条件を明らかにする目的で，成木の腋芽由来の1クローンについて，培養を行った。

培養67日後の処理区ごとのシュート増殖は，平均シュート伸長量（図-1(a)）では，GA₃無施用区がGA₃施用区より大きかった。平均増殖数（図-1(b)）では，GA₃無施用区がGA₃施用区より多かった。しかし，両処理区のシュート伸長量および増殖数についてU検定を行ったところ，有意な違いはみられなかった（ $P > 0.05$ ）。

ハナノキの腋芽を外植体とした組織培養は，酒谷（1989）がハナノキ当年枝を材料とし，窒素成分を1/2

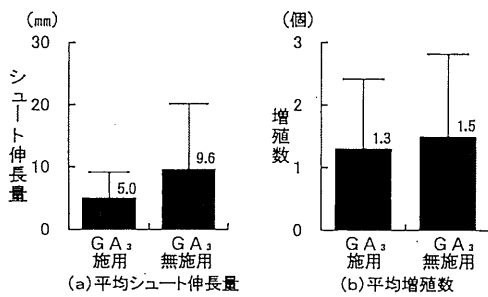


図-1 腋芽由来クローンのシュート増殖
 図中のバーの長さは標準偏差を示す
 各試験区, n=20

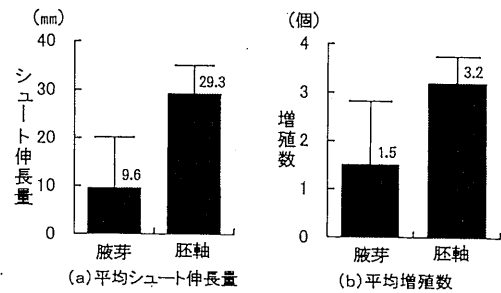


図-2 腋芽及び胚軸由来クローンのシュート増殖
 図中のバーの長さは標準偏差を示す
 腋芽, n=20; 胚軸, n=19

~1/4に減じたMS培地にBAPを1.0~8.0mg/l加えて行った初代培養と窒素成分を1/2に減じたMS培地にBAPを加えて行った継代培養がある。この時、シュート伸長のみられる腋芽があったが、供試数が少なかったことから培地条件と腋芽のシュート伸長との関係は明らかではなかったとしている。

今回、約1年間継代培養を続けたシュートを用いて、BAP0.2mg/l、トレハロース20g/lを加えたWP培地で、培養したところ、増殖可能であることが明らかになった。また、この培地の配合にGA₃0.5mg/lを加えた場合も増殖可能であったが、GA₃0.5mg/l添加によるシュート増殖への効果はみられなかった。

発根は、80日間の培養では1個体も観察できなかった。160日間の培養では観察により1個体の発根を確認したが、抜き取りにより新たな発根個体を確認することはできなかった。160日間の培養における発根率は13% (1/8) であった。この結果は、酒谷(1989)よりも良い結果とはならなかった。

2. 腋芽および胚軸のクローン増殖の比較

効率的な増殖に適した材料を選び出す目的で、成木の腋芽と胚軸由来の各1クローンについて、シュート増殖を比較した。

シュート増殖は、平均シュート伸長量(図-2(a))では胚軸由来のクローンが成木の腋芽由来のクローンより大きかった。平均増殖数(図-2(b))では、胚軸由来のクローンが成木の腋芽由来のクローンより多

かった。シュート伸長量および増殖数についてU検定を行ったところ、両クローン間に優位な違いがみられた($P < 0.01$)。

林木では、種子や発芽したばかりの若い個体では比較的增加が容易であるが、年齢が高くなるにしたがって、増殖が困難になってしまうことが多い(最新バイオテクノロジー全書編集委員会, 1989)といわれている。今回、ハナノキについても、1クローンの比較であるが、成木の腋芽より年齢が若い胚軸由来のクローンの方が高い増殖であった。このため、ハナノキの効率的な増殖には、成木の腋芽よりも胚軸を材料とする方が有利と考えられた。

3. 胚軸のクローン増殖における個体間差

効率的な増殖に適したクローンを選び出す目的で、胚軸由来の4クローンについて、増殖と発根を比較した。なお、各クローンは胚軸1~4と表記した。

培養60日後の各クローンのシュート増殖は、平均シュート伸長量(図-3(a))では11.8~46.0mm、平均増殖数(図-3(b))では1.9~4.9個の広い範囲にあり、各クローンの平均シュート伸長量と平均増殖数はすべて同じではなかった(Kruskal Wallis検定, $P < 0.01$)。胚軸4は平均シュート伸長量が46.0mm、平均増殖数が4.9個と増殖が旺盛であった。胚軸2と胚軸3は平均シュート伸長量が11.8~16.7mm、平均増殖数が1.9~2.5個と低い増殖であった。

培養30日後の各クローンの平均シュート伸長量は

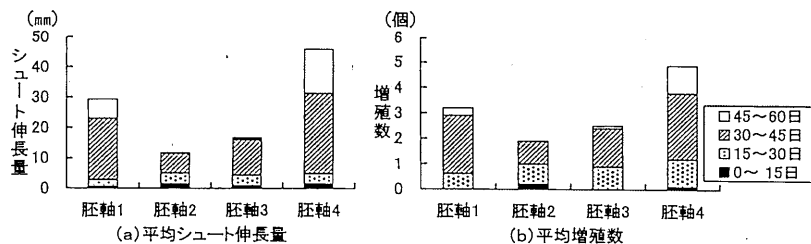


図-3 胚軸由来クローンのシュート増殖
 胚軸1, n=19; 胚軸2~4, n=20

2.8~5.0mm, 平均増殖数は0.6~1.2個と, 全クローンとも低い増殖であった。また, 培養60日後の増殖が低かった胚軸2と胚軸3は, 平均シュート伸長量が4.3~5.0mm, 平均増殖数が0.9~1.0個で, 他のクローンと大差無い増殖であった。培養30~45日の間の各クローンは, 平均シュート伸長量で6.6~26.4mm, 平均増殖数で0.9~2.6個とこれ以前の培養より大きく増殖した。また, この時の増殖は, クローンごとに大きく異なり, 個体間差を生じた。

これまで, 引田 (1991) がコナラで, 佐々木ら (1988) がクヌギで組織培養による増殖を行った時, 個体間差があることを指摘している。今回, ハナノキの胚軸由来クローンの増殖においても同様の傾向がみとめられた。このため, 増殖が旺盛なクローンの利用は, 効率的なクローン増殖に効果的と考えられた。

支持体にフロリアライトを用いた時の胚軸由来クローンのシュート発根率 (図-4) は, 培養160日後では4クローンとも70%以上であった。特に胚軸3と胚軸4の発根率は90%以上と高かった。胚軸4は40日後の発根率が55%と早期に発根する傾向がみられた。

支持体にフロリアライトまたはゲランガムを用いた時の胚軸1と胚軸4のシュート発根率 (図-5) は, 培養160日後では支持体がフロリアライトの時75~90%, ゲランガムの時40~70%で, 両クローンとも支持体にフロリアライトを用いた方が高い発根率であった。胚軸1は, 支持体の違いによる発根率の差が有意であり (カイ2乗検定, $P < 0.05$), フロリアライトを用いる効果が大きかった。

田中ら (1999) は発根に及ぼす支持体の影響をフロリアライトと寒天で比較したところ, クヌギではフロリアライトが, ヒノキでは寒天が高い発根率であったとしている。今回, ハナノキにおいては支持体にゲランガムよりフロリアライトを用いた方が高い発根率であった。

IV まとめ

ハナノキ成木の腋芽および胚軸を材料として, 組織培養によるクローン増殖を試みたところ, どちらの材料を用いても増殖が可能で, 発根個体が得られることがわかった。しかし, クローン個体を効率的に増殖させるには, 他の樹種と同様に成木の腋芽よりも胚軸を材料とする方が有利であった。また, 胚軸を材料とする場合でもクローンにより増殖に差があることから, 増殖が旺盛で発根率が高いクローンの利用が効率的で, 胚軸4はこのような条件を満たすクローンとして有望であることがわかった。

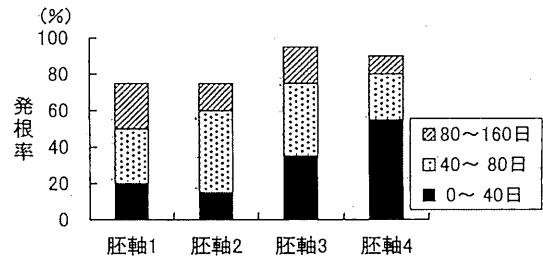


図-4 胚軸由来クローンのシュート発根率
各試験区の支持体はフロリアライト
各試験区, n=20

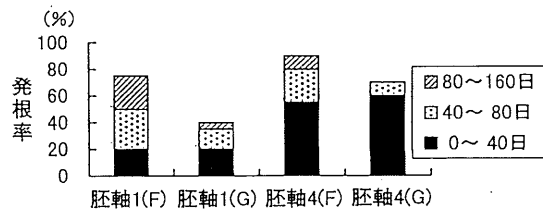


図-5 支持体の違いによる胚軸由来クローンのシュート発根率
(F), フロリアライト; (G), ゲランガム
各試験区, n=20

V 謝 辞

ハナノキの枝を提供していただいた岐阜県恵那市の三宅鉦氏および, 発芽のための好条件で管理保存をしたハナノキの種子を快くお譲りいただいたザ・ヤマグチプランツマンズナーセリー代表の山口清重氏に厚く御礼申し上げる。

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: 1-51
- 環境庁自然保護局野生生物課 (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物8植物 (維管束植物): 484
- 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
- 酒谷昌孝 (1989) 組織培養によるハナノキ増殖の試み. 奈良県林試林業資料No. 4: 28-31
- 佐々木義則・正山征洋 (1988) 林木の組織培養に関する研究 (I) -クヌギ組織培養における個体差の発現-. 日林九支研論NO.41: 63-64
- 田中正臣・石井克明 (1999) 培地支持体と炭素源の違いが発根培養におけるヒノキおよびクヌギのシュートに及ぼす影響について. 森林応用研究8: 155-160