

老 齡 貴 重 木 の 組 織 培 養 I

—『中将姫誓願ザクラ(国指定天然記念物)』の冬芽培養について—

川尻秀樹・茂木靖和・中川 一

目	次
はじめに	9
1 試験方法	9
1.1 殺菌及び初代培養	9
1.2 外植体の継代培養	10
1.3 発根の検討	10
2 結果と考察	10
2.1 初代培養における サイトカイニンの影響	10
2.2 先代培養のシュート伸長量 が当代培養に及ぼす影響	10
2.3 シュート伸長量とカルスの成長量	12
2.4 継代培養途中の光条件の影響	12
2.5 BAP濃度が増殖に及ぼす影響	12
2.6 BAPとGA ₃ の併用効果 と継代培養でのホルモン濃度	14
2.7 発根の検討	15
まとめ	16
引用文献	16

は じ め に

本県は自然環境に恵まれているため、遺伝変異に富んだ貴重な樹木の遺伝資源が数多くある。なかでも、県内に残存する国および県指定の天然記念物や、文化財的にも価値の高い樹木は全国一で、187件が指定されている。一般に、これらの希少な樹木は老齢であるため、衰弱木が多い。このうち、とくに衰弱している個体については、過去、接ぎ木や挿し木等で増殖が試みられているが、優良後継樹の養成には至っていない。このため、こうした貴重樹木の養成技術の確立が急務となっている。

今回、増殖を試みた『中将姫誓願ザクラ』も、こうした天然記念物の一つである。このザクラは、岐阜市芥見字大洞の願成寺境内にあり、昭和4年4月2日に国の天然記念物に指定された有名なザクラである。花は芽の赤い八重ザクラで、花卉数が25～35枚あり、花卉が細長いのが特徴でヤマザクラ系のザクラである。これまで、地元では挿し木や接ぎ木による繁殖を試みたが、未だ後継樹の繁殖には成功していない。このため、本樹の後継樹養成が強く要請されていた。

そこで本報告では、この『中将姫誓願ザクラ』から本体を痛めることなく、少量の組織片を採取して組織培養による増殖を試みた。試験では、使用組織の大きさ別の成長特性について、継代培養過程で細かく調査した結果、貴重樹木の養成技術の一つとして「冬芽培養」に一定の成果を得たので報告する。

なお、本報告は国庫補助事業である「優良木からの種苗増殖技術の開発」の一環として研究開発したものである。また、本試験で供試した新サイトカイニンを提供していただいた、三菱ガス化学(株)新潟研究所の丸山岳人氏に心から謝意を表する。

1 試 験 方 法

1.1 殺菌及び初代培養

材料は10月に10cm程度の小枝を採取し、これを冬芽を含む長さ3cm程度の小さいチップ組織に切り分けた(図-1参照)。冬芽の芽鱗をナイフで、芽全体が緑色になるまで剥き、オスパン(逆性石鹼

水) 10%溶液に浸して、殺菌処理工程に移した。

次に70%エタノール(3~5分)、1%次亜塩素酸ナトリウム(3~10分)で殺菌処理し、クリーンベンチ内の滅菌水で3回すすいで用いた。冬芽は殺菌処理をした後、顕微鏡下でメスとピンセットで芽鱗を剥き取り、成長点近傍組織を摘出して培地に植え付けた。

基本培地はWPM (Woody Plant Medium) (1) とし、植物成長ホルモンはサイトカイニンとして、BAP (6-ベンジルアミノプリン) ホプロン、TG-19 (6-[2-(N-メトキシ-N-メチルアミノ)エチル]アミノプリン) を用いた。炭素

源としてはサッカロース(蔗糖)を用いるのが一般的であるが、この試験ではフルクトース(果糖)との比較も実施した。すべての試験の培養環境は、照度が蛍光灯4,000Lux、日長16時間とし、温度は平均25℃とした。

1.2 外植体の継代培養

初代培養で得られたシュートを切り分け、基本培地WPMで継代培養を検討した。継代培養する外植体は、頂芽または葉柄腋芽を含むY字型の組織とし、クリーンベンチ内で3mm~5mm長に切り分けて培養に供した。

試験はBAP濃度、GA₃濃度、炭素源を変化させるとともに、先代培養でのシュート伸長量が、当代培養伸長に及ぼす影響を検討した。また、一部蛍光灯照明を低照度と高照度の二区として、シュート伸長量とカルス生長量(カルスの直径成長量)を比較した。

1.3 発根の検討

基本培地はWPMとし、炭素源にサッカロースを使用して、発根促進ホルモン添加培地(IBA、NAA)と、活性炭施用の効果を検討した。

2 結果と考察

2.1 培養初期におけるサイトカイニンの影響

中将姫誓願ザクラの冬芽を材料とした場合の、培養初期におけるサイトカイニンと、炭素源に対する反応を検討した結果を表-1に示した。サイトカイニン濃度0.2ppmでの、培養日数19日後のシュート伸長量を比較すると、BAPが平均4.2mm、TG-19が平均1.5mm、ホプロンが平均2.0mmであった。BAPは炭素源がフルクトース20g/lに対し、他のTG-19とホプロンはサッカロース20g/lであることから、炭素源の違いによる影響も考えられるが、BAPが他のサイトカイニンに対して2倍以上の数値を示している。0.2ppm濃度ではクヌギのシュート伸長にみられるような、TG-19がBAPに優る傾向(2)は無かった。

シュート伸長量のバラツキについてみると、BAP 1.0mm~12.0mm、TG-19 1.0mm~2.0mm、ホプロン 1.0~3.0mmと、BAPを用いた場合のバラツキはTG-19、ホプロンの4倍以上と大きい。

カルスの平均成長量についてみると、BAPが1.9mm、TG-19が1.3mm、ホプロンが2.0mmで、TG-19が若干少ないもののあまり差は見られなかった。BAPを用いた場合は、どの個体もカルスが形成されたのに対し、TG-19とホプロンではカルスが全く形成されない個体も見られることから、カルスの成長がシュート伸長量に影響している事も考えられる。

2.2 先代培養のシュート伸長量が当代培養に及ぼす影響

BAP 0.2ppm、フルクトース20g/lの場合、継代培養途中における先代培養での伸長が、当代



図-1 サクラの冬芽(頂芽と腋芽)

表-1 中将姫誓願ザクラのサイトカイニンと炭素源の影響

ホルモン	炭素源	供試数	培養日数	シュート伸長量	カルス成長量
BAP 0.2ppm	フルクトース20g	13本	19日	4.2(1~12)mm	1.9(1.5~2.5)mm
TG-19 0.2ppm	サッカロース20g	13本	19日	1.5(1~2)mm	1.3(0~2.5)mm
ホプロン0.2ppm	サッカロース20g	13本	19日	2.0(1~3)mm	2.0(0~2.5)mm

注) 基本培地はWPM、()は最小~最大値を指す。

表-2 先代培養でのシュート伸長が5mm未満の組織の生長

継代培養代数	15代	17代	19代	20代
当代シュート伸長量	$\frac{8.8\text{mm}}{2\sim 21}$	$\frac{4.2\text{mm}}{0\sim 17}$	$\frac{4.9\text{mm}}{1\sim 12}$	$\frac{4.5\text{mm}}{1\sim 9}$
当代培養日数	27日	22日	16日	26日
累積培養日数	320日	368日	404日	430日

注) シュート伸長量の上段は平均伸長量、下段は最小~最大値。

表-3 先代培養でのシュート伸長が5mm以上の組織の生長

継代培養代数	15代	17代	19代	20代
当代シュート伸長量	$\frac{3.9\text{mm}}{1\sim 12}$	$\frac{3.8\text{mm}}{2\sim 7}$	$\frac{2.6\text{mm}}{0\sim 6}$	$\frac{1.4\text{mm}}{1\sim 2}$
当代培養日数	27日	22日	16日	26日
累積培養日数	320日	368日	404日	430日

注) シュート伸長量の上段は平均伸長量、下段は最小~最大値。

培養に及ぼす影響を検討した結果を表-2、3に示した。これは先代のシュート伸長量が5mm未満の個体と、5mm以上の個体に分けて、その後の伸長状況を継続調査したものである。なお、供試本数は各継代培養とも11~34本である。

表-2の先代培養でのシュート伸長が5mm未満の組織を用いて継代培養した場合、当代培養でのシュート平均伸長量は、培養日数に差はあるものの4.2~8.8mmであった。一週間当たりの成長に換算すると1.21~2.28mm成長したことになる。以上のことから、先代培養でのシュート伸長量が5mm未満と小さかった組織は、次の継代培養でシュートが伸長することがわかった。

表-3の先代培養でのシュート伸長が、5mm以上の組織を用いて継代培養した場合、当代培養でのシュート平均伸長量は、培養日数に差はあるものの1.4~3.9mmであった。一週間当たりの成長に換算

すると0.38~1.21mm成長したことになる。
 前述の、先代培養でのシュート伸長が5mm未満の組織を外植体とした場合と比較すると、2~3倍の成長差があり、先代でよく伸長したシュートを外植体とした場合は、当代で成長が衰えることがわかった。

以上の結果から、恒温条件下の組織培養でも、継代培養の途中でシュートが伸長しやすい成長期と、成長休止期があるものと思われる。

また、一般に組織培養では継代培養を繰り返すことによって、増殖率や伸長量が増加する傾向がある。しかし、表の成長状況を見ると継代培養の代数が増すごとに、シュート伸長量が減少している傾向があり、組織のエイジングが進行していることも考えられる。

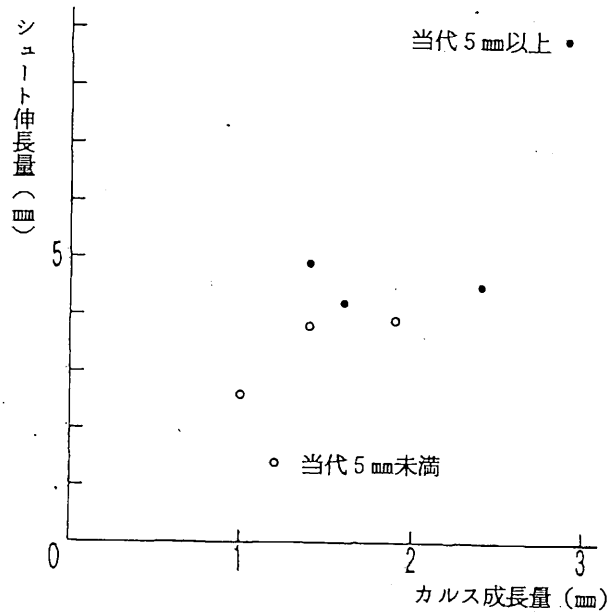


図-2 シュート伸長量とカルスの成長量の関係

2.3 シュート伸長量とカルスの成長量

BAP 0.2 ppm、フルクトース20g/lとし、継代培養途中でのシュート伸長量とカルス成長量を調査した結果を図-2に示した。調査した本数は合計90本で、先代のシュート伸長が各々5mm未満の個体と、5mm以上の個体に分けて合計8回調査した。

図から先代のシュート伸長量に関係なく、当代培養でシュート伸長量の旺盛であった個体はカルス成長量も大きい傾向が認められた。

2.4 継代培養途中の光条件の影響

継代培養途中の光条件を低照度(蛍光灯照度 1,500 Lux)と、高照度(5,500 Lux)の2条件下で培養した結果を表-4に示した。なお、継代培養で使用した培地は、BAP 0.2 ppm、フルクトース20g/lとし、外植体は21代培養組織で当代培養経過25日後の結果である。

表から低照度の場合、シュート伸長量、カルス成長量は各々1.4~1.6mm、1.0~1.2mmと、先代および二代前のシュート伸長量の多少に関係なく小さな値を示した。つまり、外植体とした組織のシュート伸長量が二代続けて5mm未満であっても、先代のシュート伸長量のみ5mm未満であっても、先代のシュート伸長量が5mm以上であっても、低照度下ではシュート伸長量が期待できない。

高照度の場合、シュート伸長量、カルス成長量は各々0.6~4.7mm、0.5~1.5mmと、低照度に比較して、試験区毎の差が大きくなっている。つまり、外植体とした組織のシュート伸長量が二代続けて5mm未満の外植体が最も成長が良く、先代のシュート伸長量のみ5mm未満の外植体が、低照度時と同等の成長量を示し、先代のシュート伸長量が5mm以上であった外植体は、低照度時よりも成長量が少ない。

前述の先代培養のシュート伸長量が当代培養に及ぼす影響で述べたように、先代培養でのシュート伸長量の違いが、当代培養でのシュート伸長量に大きな影響を及ぼしているが、こうした傾向は照度1,500 Lux程度の低照度下では判然としない。これに対し、5,500 Lux程度の高照度下では差が顕著になっている。

2.5 BAP濃度が増殖に及ぼす影響

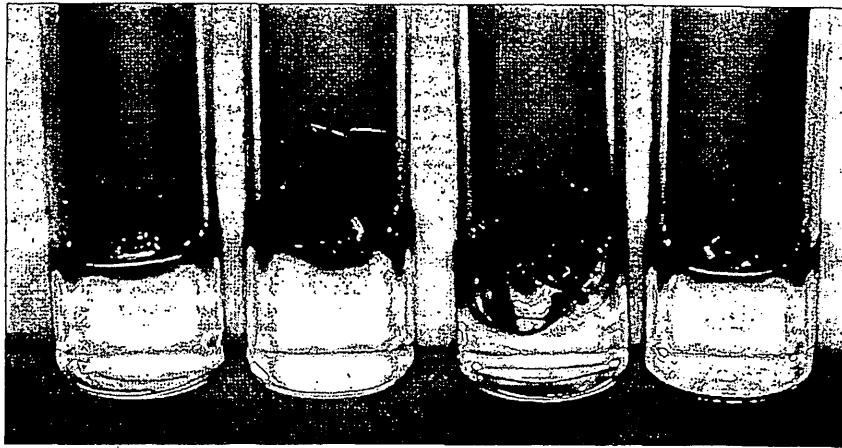
継代培養途中のBAP濃度が、シュート伸長量、カルス成長量、不定芽発生数に及ぼす影響を検討した結果を写真-1、表-5に示した。

なお、使用した培地炭素源はサッカロース20g/lとし、外植体は29代培養組織で当代培養経過35日後の結果である。

表-4 光条件とシュート伸長量・カルス生長量

	二代前伸長	先代伸長	供試数	シュート伸長量	カルス成長量
低照度	5 mm未満	5 mm未満	18本	1.6mm(0~3mm)	1.2mm(0~2.5mm)
	5 mm以上	5 mm未満	8本	1.4mm(1~2mm)	1.0mm(0~2.0mm)
	5 mm未満	5 mm以上	7本	1.5mm(0~3mm)	1.1mm(0~3.0mm)
高照度	5 mm未満	5 mm未満	17本	4.7mm(1~8mm)	1.5mm(0~2.5mm)
	5 mm以上	5 mm未満	7本	1.5mm(1~2mm)	1.1mm(0~2.0mm)
	5 mm未満	5 mm以上	8本	0.6mm(0~1mm)	0.5mm(0~2.0mm)

注) () は最小~最大値を指す。



BAP 0.2ppm 0.5ppm 1.0ppm 2.0ppm

写真-1 BAP濃度がシュート伸長量・カルス成長量・不定芽発生数に及ぼす影響

表-5 BAP濃度とシュート伸長量・カルス生長量・不定芽数

BAP濃度	供試数	シュート伸長量	カルス成長量	不定芽数
0.2ppm	19本	3.4mm(1~5mm)	2.4mm(0~3.5mm)	0.6(0~2)個
0.5ppm	18本	4.0mm(2~8mm)	3.2mm(2.0~4.0mm)	2.1(0~4)個
1.0ppm	20本	4.1mm(2~8mm)	3.6mm(2.5~4.5mm)	3.5(1~5)個
2.0ppm	20本	3.5mm(2~6mm)	4.2mm(2.5~6.0mm)	3.9(2~5)個

注) () は最小~最大値を指す。

シュート伸長量は四水準のBAP濃度で3.4~4.1mmと、濃度による影響は認められなかった。
カルス成長量は、BAP 0.2ppmで2.4mm、0.5ppmで3.2mm、1.0ppmで3.6mm、2.0ppmで4.2mmと、
BAP濃度が増すごとに増加した。

増殖に最も関係する不定芽発生数は、BAP 0.2ppmで0.6個であったものが、BAP 0.5ppmで2.1
個、1.0ppmで3.5個、2.0ppmで3.9個と、BAP濃度が増すごとに増加した。

なお、同試験時にBAP 0.2ppmで、炭素源をサッカロースとフルクトースによるシュート伸長量、カルス成長量、不定芽発生数を比較した結果、シュート伸長量と不定芽発生数は炭素源による差は見られなかった。しかし、カルス成長量はサッカロースがやや大きい傾向があった。

以上の四水準のBAP濃度では、シュート伸長量が大きく、不定芽発生数の多い濃度は、2.0ppmである。

2.6 BAPとGA₃の併用効果と継代培養でのホルモン濃度

植物成長ホルモンのBAPとGA₃の併用が、シュート伸長量、カルス成長量、不定芽発生数に及ぼす影響を検討した結果を表-6、写真-2に示した。使用濃度は、BAPが0.2ppmと2.0ppm、GA₃が0.5ppmと5.0ppmの各々二水準とし、培養26日後の結果を示した。

シュート伸長量は、最も成長したBAP 0.2ppm、GA₃ 0.5ppmが5.3cmで、最低がBAP 2.0ppmの3.7cmであった。BAP・GA₃濃度や併用処理によるシュート伸長量の傾向はあまり判然としない。但し、GA₃が併用された培地はBAP単用より伸長量が大きく、節間伸長作用のある植物成長ホルモンとしてGA₃が作用したことが考えられる。

カルス成長量はBAP濃度が0.2ppmと2.0ppmでは、2.0ppmの方が明らかに大きくなっている。また、GA₃との併用処理はBAP単用処理に比較して、カルスが小さい傾向がある。不定芽数はBAPが0.2ppmの場合は単用・併用に関係なく0.4個以下と極めて少なく、BAPが2.0ppmの場合は、単用が2.6個、併用が1.8個と多くなっている。

これらのことから、BAPとGA₃の併用効果については、シュート伸長量に多少の有効性が伺えるものの、カルスの成長や不定芽発生数についてはBAP 2.0ppm単用の方が効果的であった。

次に、継代培養時にBAP 2.0ppmの高濃度培地と、BAP 0.2ppmの低濃度培地に移植した場合の、シュート伸長量、カルス成長量、不定芽発生数の変化を表-7に示した。なお、先代培地ホルモンは2.0ppmのBAP単用の場合と、2.0ppmのBAPおよび5.0ppmのGA₃の併用とした。

シュート伸長量はBAP単用では、同じ2.0ppm培地で継代培養すると4.3mmであったのに、0.2ppmの低濃度培地で培養すると11.9mmと倍以上の伸長量を示した。この傾向は2.0ppmのBAPと5.0ppmのGA₃の併用でも同様に、継代培養で0.2ppm低濃度培地に移植した方はシュート伸長量が2倍であった。

これとは逆に、カルス成長量については低濃度BAPに継代培養した方は、引き続き高濃度培地に移植したものよりやや小さい傾向が見られた。

不定芽数についても同様に、低濃度BAP培地に継代培養した方は各々0.6個、1.3個と少なく、引き続き高濃度で継代培養した方は各々4.0個、4.3個と、継代時のホルモン濃度が増殖に及ぼす影響が見られた。低濃度BAP培地に継代培養した場合、先代培養が高濃度BAP単用培地より、高濃度BAP・GA₃併用培地の方が不定芽発生に残留効果があるように見られる。

以上のことから、シュート伸長量、不定芽発生数から高濃度ホルモンは有効であるが、継代培養時にシュート伸長量を目的とする場合は、低濃度のBAP培地に移植した方が有効であることがわかった。

表-6 BAPとGA₃の併用効果について(当代培養26日後)

ホルモン濃度	供試数	平均シュート伸長量	平均カルス成長量	平均不定芽数
BAP 0.2ppm	21本	4.1 mm	1.9 mm	0.2個
BAP 0.2・GA ₃ 0.5ppm	20本	5.3 mm**	1.6 mm	0.4個
BAP 2.0ppm	22本	3.7 mm	3.9 mm**	2.6個**
BAP 2.0・GA ₃ 5.0ppm	19本	4.4 mm*	2.1 mm	1.8個**

注) 表中の * は5%水準で有意、** は1%水準で有意である。

発根しなかった原因は供試個体数のうち半分が、シュートから展開した葉が大きく成り、培地上面に接触しそのまま成長してしまった。このため、茎が培地から離脱し空中に宙づり状態となったことによるものである。

ま と め

『中将姫誓願ザクラ』の冬芽を材料としてW.P.Mで組織培養した結果、僅かではあるが発根個体を得ることができた。

- 1 シュート伸長のためのサイトカイニンにはホブロン、TG-19に比較して、BAPが最も良かった。
- 2 BAPは他のサイトカイニンに比較してシュート伸長量のバラツキが大きく、4倍以上のバラツキがあった。
- 3 BAP濃度は2.0ppmがシュート伸長量、不定芽発生数の点から有効と考えられる。
- 4 継代培養時にシュート伸長量を目的とする場合は、BAP濃度が0.2ppm程度の低濃度培地に移植した方が有効である。
- 5 当代培地でのシュート伸長量は、先代培地でのシュート伸長量が影響することがわかった。恒温条件下の組織培養でも、シュートが伸長しやすい成長期と、成長休止期があることがわかった。
- 6 培養時の光条件は1,500 Lux程度の低照度より、5,500 Lux程度の高照度の方がシュート伸長量に適していた。
- 7 発根個体はホルモンフリー培地で、僅か1本しか得られなかった。今後、発根率の向上のための検討及び順化技術の検討が必要である。

引 用 文 献

- (1) LLODY, G. et al. : Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30, 421~427, 1981
- (2) SASAKI, Y. et al. : J. Jpn. For. Soc. 75, 150~153, 1993