

## 資料

# 組織培養によるハナノキのクローン増殖(Ⅱ)\* —培養容器と糖濃度の違いによる発根の検討—

茂木靖和・坂井至通

キーワード：ハナノキ, 組織培養, 発根量, 培養容器, 糖

### I はじめに

ハナノキ (*Acer pycnanthum* K.Koch) は東海地方のおもに湿地周辺の限られた場所に自生する日本固有の樹木である。近年のゴルフ場開発, 宅地造成, 自動車道の整備などの土地造成により自生地が消滅し, これと共に個体数も急速に減少してきている。また, 一方で街路樹や公園樹などに近縁種のアメリカハナノキ (*Acer rubrum* L.) の植栽が行われ, ハナノキの遺伝的な汚染も懸念されている。ハナノキは実生繁殖 (日本植木協会, 1991) が行われているが, 自生種の保護, 保全を考える場合, 組織培養などによる純系種の保存が重要となる。

組織培養によりハナノキ苗を作出するには, 材料の採取, 殺菌, 培養, 順化, 圃場での育成の過程を順に経る必要がある。林木における培養苗は多くの樹種でこのような過程を経て作出されている (最新バイオテクノロジー全書編集委員会, 1989) が, 詳細な検討がなされているのは培養の過程における発根の有無までである。近年組織培養による苗生産は林木でも実用化され始め, エゾヤマザクラなどで契約栽培が行われている (東ら, 2004; 佐藤, 1999)。しかし, 培養苗は高価なことから, 生産コストの削減が求められており, 順化以降の効率的な方法が必要となっている。

この順化成功の良否を決める条件の一つとして, 順化に移す培養植物体の発根状態がある。苗畑から山出しされる苗木 (以下山出し苗) は, 移植後の活着率が高く, その後の成長が旺盛で, 寒害や病害などの諸害に耐えるものが良いとされ, 形態的にはTR率が低く, 細根量の発達したものの評価が高いとしている (塘, 1965)。順化に移す培養植物体においても, 順化における活着とその後の成長が課題となることから, その形態は山出し苗と同様の状態が適していると思われる。

そこで, 本報告では効率的な順化方法を確立する一環として, 5種類のサッカロース濃度と2種類の培養容器を組み合わせた10試験区を設定し, TR率が低く, 細根量の多い培養植物体を作成するための培養条件を検討した。

### II 実験方法

#### 1. 材料

材料には, 約2年間継代培養で維持してきた胚軸由来の培養シュートを増殖させて得た同一クローンの培養シュートを用いた。なお, 胚軸培養に用いた種子, 種子の保存方法, 種子の殺菌方法, 胚軸の摘出方法, 継代培養方法, 試薬は, 茂木・坂井 (2004) と同一である。

#### 2. 培地及び培養条件

##### (1) 液体培地

基本培地をWPとし, ホルモンフリー, 糖として次に示すサッカロース量を加えて, pHを5.8に調整した液体培地を作成した。培地に加えるサッカロースの濃度は0g/l, 5g/l, 10g/l, 15g/l, 20g/lの5種類とした。

##### (2) 培養容器

ガラスを主体とする容器 (以下ガラス容器) とラップフィルムを主体とする容器 (以下ラップ容器) の2種類を用いた。

ガラス容器は, ガラス製のマヨネーズビン (直径60mm, 高さ110mm) にポリプロピレン製の蓋を組み合わせて用いた。

ラップ容器は, 針金を紙粘土で固定した枠組み (約70×70×110mm) にラップフィルム (日本生活協同組合連合会, 東京, ポリメチルペンテン製, 厚さ11μm)

\* 本報告の一部は第53回日本林学会中部支部大会に発表した。

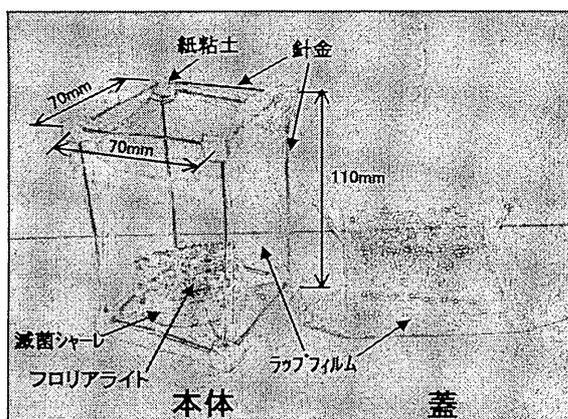


図-1 ラップ容器

で側面を4重に巻き付けた本体と4重にしたラップフィルムのシート（約120×120mm）を本体頂部に密着させて四隅をステープラーで固定した蓋を作成して用いた（図-1）。

### （3）培養容器への培地の設定

ガラス容器を用いる場合は、クリーンベンチ内でビンの中に支持体である25×50×20mmのフロリアライト（日清紡（株），東京）を置床し，これに液体培地を約20ml加えて蓋をした。

ラップ容器を用いる場合は、クリーンベンチ内で本体の中にφ60mmの滅菌シャーレを設置し，この中にフロリアライトを置床して，これに液体培地を約20ml加えて蓋をした。

なお，液体培地，培養容器（蓋付き），フロリアライトは，個別にオートクレーブを用いて120℃で15分間高圧滅菌したものを用いた。

### （4）培養シュートの植え付け及び培養条件

培養シュートの植え付けは，クリーンベンチ内で茎頂を含み15～20mm程度に調整した培養シュートを培地に挿しつけることにより行った。1個の培地には1本の培養シュートを挿しつけた。

植え付け後の培養は，培養30日目までは，25℃，照度4000Lux，16時間日長の培養室で行った。培養30～120日目の間は，屋内の日当たりの良い窓際に設置した簡易ビニール温室で行った。この間は3月上旬～6月上旬で，簡易ビニール温室内の温度は13～36℃であった。

### （5）給水

ラップ容器を用いた場合は，培養途中で給水を行った。

表-1 試験区とその表記

容器	サッカロース濃度				
	0g/l	5g/l	10g/l	15g/l	20g/l
ガラス	0M	5M	10M	15M	20M
ラップ	0R	5R	10R	15R	20R

培養20日目に第1回目の給水を行った。この時は，クリーンベンチ内で約10mlの滅菌水を給水した。その後は10～18日間隔で計5回，それぞれ約10mlの蒸留水を簡易ビニール温室外の屋内（有菌状態）で給水した。

## 3. 調査方法

### （1）試験区の設定

5種類のサッカロース濃度（0g/l，5g/l，10g/l，15g/l，20g/l）と2種類の培養容器（ガラス容器，ラップ容器）を組み合わせた10試験区を設定し，各試験区の表記を表-1に示した。

### （2）培養苗の生存率および発根率

培養30日目と120日目に培地の雑菌発生の有無を，培地からシュートを抜き取って発根の有無を，シュートを切断してその切り口から生死を確認した。また，雑菌発生数から雑菌発生率を，発根個体数から発根率を，生存個体数から生存率を次式により算出した。

供試数は10個体／試験区／培養日数とした。

$$\text{雑菌発生率} = \text{雑菌発生数} / \text{供試数} \times 100$$

$$\text{生存率} = \text{生存個体数} / \text{供試数} \times 100$$

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

### （3）発根個体の生育状況調査

発根個体については，個体毎に根数，全根長，全根重，シュート伸長量，シュート重を測定した。

これらのうち根数，全根長，全根重については一次根と二次根に分けて測定した。今回，一次根はシュートから発生している根，二次根は根から発生している根とした。

シュート重については供試部，伸長部の葉の全量（以下全展開葉），伸長部の茎（以下伸長茎）に分けて測定した。

なお，根重，シュート重については80℃で48時間乾燥させた絶乾重を測定した。また，根重とシュート重から次式によりTR率を算出した。

$$\text{TR率} = \text{シュート重} / \text{根重}$$

表-2 培養状況

試験区	生存率(%)		発根率(%)		雑菌発生率(%)	
	30日	120日	30日	120日	30日	120日
0M	100	70	20	60	0	0
5M	100	80	10	60	0	0
10M	100	80	40	70	0	0
15M	100	80	50	70	0	0
20M	100	90	40	60	0	0
0R	50	10	10	0	0	80
5R	30	0	0	0	0	60
10R	90	60	20	40	0	70
15R	100	80	20	30	0	70
20R	100	70	60	60	0	50

### III 結果

#### 1. 培養苗の生存率および発根率

ガラス容器とラップ容器での生存率と発根率を比較するため、培養30日目と120日目の生存率、発根率、雑菌発生率を表-2に示した。

培養30日目の生存率は、ガラス容器を用いた試験区では、全個体が生存した。ラップ容器を用いた試験区では、サッカロース濃度5g/l以下で30~50%と低く、サッカロース濃度10g/l以上で90~100%と高かった。

培養120日目の生存率は、ガラス容器を用いた試験区では70~90%であった。ラップ容器を用いた試験区ではサッカロース濃度5g/l以下で0~10%と低く、サッカロース濃度10g/l以上で60~80%と高かった。

培養30日目の発根率は、ガラス容器を用いた試験区では、サッカロース濃度5g/l以下で10~20%と低く、サッカロース濃度10g/l以上で40~50%と高かった。ラップ容器を用いた試験区では、サッカロース濃度15g/l以下で0~20%と低く、サッカロース濃度20g/lで60%と高かった。

培養120日目の発根率は、ガラス容器を用いた試験区では、サッカロース濃度の違いにかかわらず60~70%であった。ラップ容器を用いた試験区では、サッカロース濃度5g/l以下で発根個体が無く、サッカロース濃度10~15g/lで30~40%、サッカロース濃度20g/lで60%であった。

培養30日目の雑菌発生率は、全試験区で0%で

あった。

培養120日目の雑菌発生率は、ガラス容器を用いた試験区では0%で、ラップ容器を用いた試験区では50~80%であった。

#### 2. 発根個体の生育状況

##### (1) 培養30日目

二次根は全試験区で発生していなかった。このため、根数、全根長、全根重は一次根の値である。

各試験区の発根個体における諸形質の平均値(表-3)は、根数が1.0~2.3本、全根長が3.0~48.0mm、全根重が0.1未満~1.1mg、シュート伸長量が0~5.0mm、伸長茎重が0~0.8mg、全展開葉重が1.0~7.8mg、TR率が21.0~235.0であった。

各形質について二元配置の分散分析を行ったところ、培養容器の違いとサッカロース濃度の水準間に有意な差は無かった。

##### (2) 培養120日目

各試験区の発根個体における諸形質の平均値(表-4)は、根数が6.8~45.8本、全根長が76.4~558.9mm、全根重が0.7~14.9mg、一次根数が2.8~4.5本、全一次根長が60.0~251.8mm、全一次根重が0.6~10.6mg、二次根数が4.0~41.3本、全二次根長が16.4~307.1mm、全二次根重が0.1未満~4.3mg、シュート伸長量が6.0~21.0mm、伸長茎重が0.7~7.4mg、全展開葉重が6.2~25.3mg、TR率が2.7~44.5であった。

表一3 培養30日目の発根個体における諸形質の平均値

区分	発根 個体数 (個)	根数 (本)	全根長 (mm)	全根重 (mg)	シュート 伸長量 (mm)	伸長 莖重 (mg)	全展開 葉重 (mg)	TR率
0M	2	2.0	48.0	1.1	4.0	0.8	4.8	21.0
5M	1	1.0	5.0	0.0 <sup>*</sup>	5.0	0.0 <sup>*</sup>	2.3	153.5
10M	4	2.3	39.5	1.1	4.3	0.7	7.8	92.5
15M	5	1.8	22.2	0.5	4.2	0.4	3.1	86.5
20M	4	1.0	8.5	0.4	2.0	0.1	1.0	106.2
0R	1	1.0	3.0	0.0 <sup>*</sup>	0	0.0	5.2	235.0
10R	2	2.0	19.5	0.4	2.5	0.5	3.6	58.9
15R	2	2.0	34.5	0.1	3.0	0.1	3.6	74.1
20R	6	1.8	21.5	0.7	0.5	0.0 <sup>*</sup>	1.2	51.5

0.0<sup>\*</sup> : 0.1mg未満を示す。

表一4 培養120日目の発根個体における諸形質の平均値と検定結果

区分	発根 個体数 (個)	根数 (本)	全根長 (mm)	全根重 (mg)	一次 根数 (本)	全一次 根長 (mm)	全一次 根重 (mg)	二次 根数 (本)	全二次 根長 (mm)	全二次 根重 (mg)	シュート 伸長量 (mm)	伸長 莖重 (mg)	全展開 葉重 (mg)	TR率
0M	6	10.2	124.3	1.7	3.8	102.7	1.6	6.3	21.6	0.0 <sup>*</sup>	7.0	1.7	9.2	44.5
5M	6	6.8	76.4	0.7	2.8	60.0	0.6	4.0	16.4	0.1	9.0	0.7	6.3	39.5
10M	7	15.0	227.1	3.0	3.9	155.7	2.4	11.1	71.4	0.6	14.7	2.5	11.5	8.2
15M	7	15.7	301.0	5.0	3.6	224.7	4.2	12.1	76.3	0.9	17.3	3.5	16.0	6.3
20M	6	9.7	146.7	2.2	3.3	118.7	2.0	6.3	28.0	0.2	8.5	1.5	6.2	7.7
10R	4	45.8	558.9	14.5	4.5	251.8	10.5	41.3	307.1	4.0	13.8	6.3	20.8	2.7
15R	3	31.3	427.7	14.9	4.3	220.3	10.6	27.0	207.3	4.3	21.0	7.4	25.3	3.9
20R	6	21.8	248.7	5.7	3.0	135.5	4.2	18.8	113.2	1.5	6.0	2.5	10.3	19.8
容器	—	**	**	**			**	**	**	**		**	*	
糖濃度	—		*	*		*	**		*		*	*	*	

\*, \*\* : それぞれ5%, 1%水準で有意,  
0.0<sup>\*</sup> : 0.1mg未満を示す。

各形質について二元配置の分散分析を行ったところ、培養容器の違いについては根数、全根長、全根重、全一次根重、二次根数、全二次根長、全二次根重、伸長莖重が1%水準で、全展開葉重が5%水準で有意な差

があった。サッカロース濃度の水準間については全一次根重が1%水準で、全根長、全根重、全一次根長、全二次根長、シュート伸長量、伸長莖重、全展開葉重が5%水準で有意な差があった。

#### IV 考 察

ガラス容器を用いた試験区の発根率は、培養30日目にはサッカロース濃度が5g/l以下の試験区で低かったが、培養120日目には全試験区で高くなり、試験区間での差がほとんどなかった(表-2)。このことから、培養容器にガラス容器を用いる場合、サッカロース濃度は発根に要する時間的要因に対しては影響するが、最終的な発根率については大きな影響を及ぼさないと推測される。

一方、ラップ容器を用いた試験区の発根率は、サッカロース濃度が15g/l以下の試験区で、ガラス容器を用いた場合より低かった。特にサッカロース濃度が5g/l以下の試験区では、供試数のうち1個体しか発根しなかった(表-2)。これには、ガラス容器よりもラップ容器の試験区で、生存率が低かったこと、サッカロース濃度が5g/l以下では特に生存率が低かったこと(表-2)が影響している。また、培養120日目の発根率が低かった理由としては、ガラス容器を用いた試験区では雑菌の発生が無かったのに対し、ラップ容器を用いた試験区では培養120日目の雑菌発生率が60~80%と高かった(表-2)ことから、雑菌の発生による影響があると思われる。

次に、ラップ容器を用いた試験区で生存率が低かった理由としては、これらの試験区では培地の乾燥のため、培養途中に給水する必要があったことから、水分ストレスの影響が考えられた。また、サッカロース濃度が5g/l以下の試験区では10g/l以上の試験区よりも生存率が極端に低かった(表-2)ことから、ラップ容器を用いて培養シュートの生存率を高くするには、サッカロース濃度を10g/l以上にする必要があると推測された。

培養30日目の発根個体の諸形質は、培養容器の違いおよびサッカロース濃度の水準間に有意な差は無かった。これに対し、培養120日目の発根個体の諸形質は、培養容器の違いについては、根数、全根長、全根重、全一次根重、二次根数、全二次根長、全二次根重、伸長莖重が1%水準で、全展開葉重が5%水準で有意な差があった(表-4)。

これらのうち根に関係する諸形質の平均値は、ラップ容器を用いた試験区では、根数が21.8~45.8本、全根長が248.7~558.9mm、全根重が5.7~14.9mg、全一次根重が4.2~10.6mg、二次根数が18.8~41.3本、全二次根長が113.2~307.1mm、全二次根重が1.5~4.3mgであったのに対し、ガラス容器を用いた試験区では、根数が6.8~15.7本、全根長が76.4~301.0mm、全根重

が0.7~5.0mg、全一次根重が0.6~4.2mg、二次根数が4.0~12.1本、全二次根長が16.4~76.3mm、全二次根重が0.1未満~0.9mgで、全形質ともガラス容器よりもラップ容器を用いた試験区の水準の方が高かった。このことから、培養容器にはガラス容器よりもラップ容器を用いる方が、発根量、特に二次根(細根)量の多い個体が得られると考えられる。

シュート関係で有意な差のあった諸形質の平均値は、ラップ容器を用いた試験区では、伸長莖重が2.5~7.4mg、全展開葉重が10.3~25.3mgであったのに対し、ガラス容器を用いた試験区では、伸長莖重が0.7~3.5mg、全展開葉重が6.2~16.0mgで、両形質ともガラス容器よりもラップ容器を用いた試験区の水準の方が高かった。また、シュート伸長量は、培養容器の違いにより有意な差がなかった。これらのことから、培養容器にガラス容器よりもラップ容器を用いる方が、シュート伸長部の充実した個体が得られると考えられる。

田中ら(2001)はガス透過性に優れたポリメチルペンテン製のフィルムを素材とする培養容器(以下フィルム容器)と500ml三角フラスコ(ミリシール付きゴム栓、以下フラスコ容器)でシンビジウムを培養したところ、フィルム容器を用いた方が地上部生体重及び根重が重かったと報告している。また、培養容器内のエチレン濃度を測定したところフィルム容器の方がフラスコ容器よりもエチレン濃度が低かったと報告している(田中ら, 2001)。エチレンは特殊な場合を除き成長の阻害や抑制に働くといわれている(勝見, 1991)。このため、この濃度は高い方が成長に対して不利に働く。今回の発根した培養植物体も、ガラス容器で培養された場合は培養容器内にエチレンが蓄積したのに対し、ラップ容器を用いた場合は、容器の壁面からエチレンが放出され、培養容器内のエチレン濃度が高くならなかったことが推測される。このため培養を開始してからの経過時間が長くなるにしたがい、ガラス容器よりもラップ容器で培養した個体の方が発根量が多く、シュート伸長部の充実したものが多いと考えられる。

培養120日目の発根個体の諸形質におけるサッカロース濃度の水準間については、全一次根重が1%水準で、全根長、全根重、全一次根長、全二次根長、シュート伸長量、伸長莖重、全展開葉重が5%水準で有意な差があった(表-4)。このことから、サッカロース濃度も発根個体の諸形質に影響を及ぼすと考えられる。

有意差のあったこれらの諸形質について、各試験区の平均値から培養容器ごとに順位をつけたところ、サッカロース濃度10g/lと15g/lの試験区は、両培養容器の試験区とも常に上位2位以内であった。また、これら以外の発根量とシュート成長に関係する諸形質につい

ても、各試験区の平均値から培養容器ごとに順位をつけたところ、多くの場合、同様のことがいえた。そこで、全発根個体を対象とした場合、培養容器の違いおよびサッカロース濃度の水準間に有意な差が無かったTR率について、サッカロース濃度10g/lと15g/lの試験区の発根個体に絞って、二元配置の分散分析を行った。その結果、サッカロース濃度の水準間では有意な差がなかったが、培養容器の違いについては1%水準で有意な差があった。この時のTR率は、ラップ容器を用いた試験区では2.7~3.9、ガラス容器を用いた試験区では6.3~8.2で、ガラス容器よりもラップ容器を用いた試験区の水準の方が低かった。このことから、培養容器をラップ容器とし、サッカロース濃度を10g/l又は15g/lとすることにより、TR率の低い個体が得られたと考えられる。この条件は、ラップ容器を用いた場合に生存率が高いと推測されるサッカロース濃度、および発根量、特に二次根（細根）量の多く、シュート伸長部の充実した個体得られる培養容器に合致する点からも支持される。

#### 引用文献

- 東暁史他（2004）べた掛け法を用いた培養植物の順化。日林北支論52：51-53.
- 勝見允行（1991）植物のホルモン。118-123，裳華房，東京。
- 茂木靖和・坂井至道（2004）組織培養によるハナノキのクローン増殖。岐阜県森林研研報33：19-22.
- 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。
- 佐藤孝夫（1999）茎頂培養法によるチシマザクラ優良個体の大量増殖。北海道林試研報36：1-9.
- 日本植木協会（1991）緑化樹木の生産技術，第2集落葉広葉樹編。85-86，日本緑化センター，東京。
- 田中道男他（2001）高ガス透過性多層フィルムを素材とした培養システムにおけるシンビジウムクローン苗の生育。園学雑70別2：426.
- 塘隆男（1965）よい苗木の性質と施肥。（造林ハンドブック。坂口勝美・伊藤清三監修，935pp，養賢堂，東京）。232-236.