

組織培養によるカラマツ及びコナラ等の 増殖技術に関する研究

—カラマツの冬芽培養、及びコナラのカルス増殖—

古川 仁
奥村 俊介*

要 旨

- ①カラマツ冬芽の初代培養においてカイネチンのみのホルモン添加は、苗条育成または根原基の形成を阻害すると考えられた。
- ②コナラのカルス増殖においては、カルスを5mm角程度に切り取り増殖起源カルスとするのが効率的と判断された。
- ③コナラカルスの増殖用培地としては、供試培地7種の中で、1/2 MS 培地に IBA1.0mg/l、BAP0.1mg/l を添加したものが有効であった。

1. はじめに

カラマツは早生樹であり、また長野県は寒冷環境ということから植栽面積も大きく、今後も主要造林樹種の一つとしての位置付けは変わらないと考えられる。しかし、材の強度、耐久性に優れているが、天然（自然）乾燥によって材にねじれや割れなどを生じることが利用上の欠点の一つとなっており、その解決法として人工乾燥技術が開発されてきた。また一方で、ねじれの少ないカラマツの選抜も行われ、ねじれの少ない遺伝形質を有するクローンにより苗木が大量生産できればいっそう効果的と考えられる。しかしカラマツは発根性が悪く、挿し木によって増殖させることが困難な樹種の1つであるため、組織培養による増殖技術の開発が着目され取り組まれている¹⁾。

カラマツの茎頂培養・芽培養による増殖は、外殖体からの健全な苗条の育成、苗条の増殖、発根、順化の過程からなり、苗条の増殖以外の過程については技術的に可能となった²⁾とされているが、実用化はいまだに困難な状況であるためその実用化を目的として本研究を行った。

またコナラはシイタケ原木としての需要が高いが、優良原木不足の状況にある。しかし、コナラもまた発根性の悪さのため挿し木での形質優良個体からのクローン増殖が困難であるという問題点がある。このため組織培養による増殖技術の開発が試みられ、井出ら³⁾はコナラの芽生えからの幼植物体の再生に取り組み、小山⁴⁾はコナラの種子からの培養技術や、萌芽枝のえき芽を用いた増殖技術に取り組み成果を上げた。しかし、苗木の大量生産を行うにはまだ課題が多いので、実用化への一段階として本研究を行った。

2. カラマツの冬芽培養

カラマツの組織培養については現在、種子の胚培養による方法と、芽培養による方法が考えられている⁵⁾が、母樹と同一遺伝子をもつクローンの増殖という目的からここでは芽培養による方法を試みた。板鼻⁶⁾によると、雑菌による汚染と培地植え付け後の生育を考えると、茎頂培養よりも、冬芽を形成した一年生長枝の頂芽による芽培養がよいとされている。ここでは、冬芽によるカラマツの組織培養を試み、細胞分裂の促進と根の分化に有効とされるオーキシシンと、細胞分裂生長およ

* 元長野県林業総合センター技師

びカルス・器官からの不定芽・シュートの分化に関与するサイトカイニン¹⁾の2種類の植物ホルモン（以下、ホルモンとする）の、初代培養における添加濃度について検討する目的で実験を行った。なお、ここではオーキシンとしてIBAを、サイトカイニンとしてカイネチンを用いた。

(1) 材料と方法

ア 初代培養

1993年11月下旬に、当センター構内8年生カラマツ林内の複数木より冬芽を付けた枝先を約20cmに切り取り採取した。枝は水挿しし、東芝製偏光ランプによる照度2000~3000lux、温度20℃、湿度80%の明期11時間と、温度15℃、湿度80%の暗期13時間の環境で約1週間生育させた。長枝についた頂芽が開葉直前となったときに、冬芽をつけて1~2cmの長さに枝を切り取り、板鼻の方法³⁾で滅菌した。滅菌を終えた冬芽からクリーンベンチ内で無菌的に樹皮と鱗片を切り取り、芽と同程度の長さの枝をつけて外植体とした。初代培地は1/2 MS培地（表-1）にIBA、カイネチンを表-2のとおり添加

表-1 カラマツ冬芽培養、コナラえき芽培養・カルス増殖・再分化に用いた培地組成表 単位:mg/l

	1/2 MS 〔カラマツ冬芽 コナラカルス 増殖・再分化〕	改変 BTM 〔コナラえき芽培養〕	WPM 〔コナラ再分化〕
NH ₄ NO ₃	825	165	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	950	240	
KNO ₃		190	
K ₂ SO ₄		860	990
CaCl ₂ ・2H ₂ O	220	44	96
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O		640	556
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27.8		27.8
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	37.3
Fe-EDTA		27.8	
MnSO ₄ ・4H ₂ O	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.025	0.02	
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025	0.25	0.25
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
KI	0.83	0.15	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
ニコチン酸	0.5	0.5	0.5
塩酸ピリドキシン	0.5	0.5	0.5
塩酸チアミン	0.1	1	1.0
ミオイノシトール	100	100	100
L-グリシン	2	2	2
L-グルタミン		2	

し、ショ糖30g/lを添加後、pHを5.7に調整したのち、寒天8g/lを加えた4種の培地（A~D）を使った。そして各々の培地に12個ずつ外植体を植え付けた。

イ 継代培養：根原基形成

初代培地で苗条を形成したもの全ての下部1~2mmをメスで切り取り、根原基形成用の培地に移植した。根原基形成用の培地は、1/2 MS培地にオーキシンとしてNAA 0.3mg/lと、IBA 0.3mg/l、ショ糖30g/lを添加し、pHを5.2に調整したのち、寒天6g/lを加えた。

ウ 継代培養：発根

根原基形成用培地で赤い根原基を形成した個体（写真-1）から随時発根培地に再移植した。発根培地はホルモンフリーの1/2 MS培地である。なおこれはショ糖30g/lを添加し、pHを5.2に調整したのち、寒天6g/lを加えた。

なお、培養環境は温度25℃恒温の明期16時間（白色蛍光灯、3000~4000 lux）で行った。



写真-1 根原基形成後、発根培地（1/2MS、ホルモンフリー）に移植したカラマツ苗条（初代培地植え付け後75日）

(2) 結果と考察

ア 初代培養

表-2に初代培養（植え付け33日目）におけるカラマツ冬芽の生育状況を示した。なお、表では雑菌により汚染された3個体を除いた割合で示してある。これによると、枯死率は培地間で大きな差はみられないが、茎の長さについてC培地（ホルモンとしてカイネチンの

み添加)の生長不良という差がみられる。そこでそれぞれの培地間で、茎の長さの平均値の差についてt検定(危険率両側5%)を行ったところ、C培地と他の全ての培地とにおいて有意な差がみられた。また、C培地に葉が2、3枚しかないが茎はあるという生育異常を示した個体がよくみられた。これらのことからカイネチンのみの添加はカラマツの冬芽の生育に阻害作用を与えるのではないかと考えた。

表-2 初代培養におけるカラマツ冬芽の生育状況

単位: %

培地	ホルモン (mg/ℓ)		茎の長さ					枯死
	IBA	カイネチン	6~10	11~25	16~20	21~25	25mm以上	
A	0.2	0.02	0	42	8	8 (8)	8	33
B	0.2	-	0	27	27 (9)	0	9	36
C	-	0.02	36 (27)	27	0	0	0	36
D	-	-	0	46	27	0	0	27

注) 培地: 1/2 MS (ショ糖、寒天 8 g/ℓ)

培養期間: 33日間

生育異常: 茎は発達したが葉が2~3枚しか発生しないもの。

() 内は生育異常で内数

イ 継代培養: 根原基形成

初代培養から33日目に苗条まで生育したものを根原基形成用培地に移植した。表-3に根原基形成用培地における生育状況を示した。表は移植後に雑菌による汚染のあった1個体を除いたデータである。初代培養をC培地で行った個体は移植後41日目までに半分近くが枯死し、また、107日目までに根原基を形成したものはなかった。C培地以外の培地で初代培養を行ったものの中には、根原基形成について大きな差はみられなかったことや、アでの結果と合わせ、ホルモンとしてカイネチンのみ添加した培地での初代培養は適当でないと考えた。

表-3 根原基形成用培地におけるカラマツ冬芽起源苗条の生育状況

単位: 本

由来 (初代培養)	移植数	移植~41日		42日~69日		70日~107日		全期間合計	
		枯死	根原基形成	枯死	根原基形成	枯死	根原基形成	枯死	根原基形成
A	8	1	0	2	1	0	1	3	2
B	7	2	1	0	1	0	0	2	2
C	7	3	0	0	0	0	0	3	0
D	8	0	2	0	1	0	0	0	3

注) 培地: 1/2MS、ショ糖 30 g/ℓ、寒天 6 g/ℓ、NAA 0.3mg/ℓ、IBA 0.3mg/ℓ

ウ 継代培養: 発根

外植体を根原基形成用培地に移植して41日目から根原基の形成のみられたものを発根培地に再移植した(写真-1)。しかし、発根(写真-2)に至った個体数が、全部で6個体と予想以上に少なくなってしまったため、初代培養におけるホルモン添加濃度と発根の関係について検討は出来なかった。

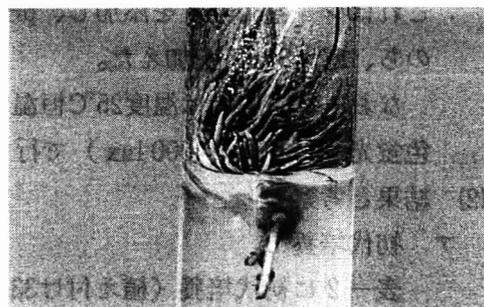


写真-2 発根しているカラマツ苗条(写真-1と同じ個体)(初代培地植え付け後84日)

3. コナラのカルス増殖

組織培養を用いたコナラのクローン増殖において小山³⁾は、水挿し丸太から発生したえき芽培養を行い成果を得ている。ここでは大量増殖という観点からカルス誘導によるコナラの増殖を考え、まずカルスの増殖を目的として培養に適切なカルス塊の大きさ、ならびに添加ホルモンの検討を行った。

(1) カルス塊の大きさと増殖

ア 材料と方法

材料は、小山⁴⁾を参考に、改変BTM (表-1) 培地を用い、BAP 0.5 mg/ℓ、ショ糖 30 g/ℓ を添加し、pH を 5.8 に調整したのち、寒天 8 g/ℓ を加えた培地にコナラの萌芽枝のえき芽を挿し付けて得られたカルスを用いた。採取したカルスは、小 (1 mm 角程度)、中 (5 mm 角程度)、大 (8 mm 角程度) と 3 種の大きさに切り取り培地に植え付けた。培地は 1/2MS 培地に、ホルモン、ショ糖 50 g/ℓ を添加し、pH を 5.7 に調整したのち、寒天 7 g/ℓ を加えた。添加ホルモンはオーキシニンとして IAA、2,4-D、サイトカイニンとしてカイネチン、BAP を表-4 のとおり用い、3 種の培地 (A~C) を作った。

培養一ヶ月後カルスの体積を測定し、初期の体積に対する増殖率を求めた。また、植え付け時のカルスの個数はそれぞれの培地ごとに小 2 個、中 3 個、大 1 個とした。

なお、培養環境は温度 25℃ 恒温の明期 16 時間 (白色蛍光灯、3000~4000 lux) で行った。

イ 結果と考察

表-5 に培地別と初期のカルスの大きさ別の一ヶ月後のカルスの平均増殖率を示した。ここで培地 A、B、C ごとの増殖率の平均値の差の検定 (t 検定、危険率両側 5%) を行ったところ、三者間に有意な差は認められなかった。また、初期のカルスの大きさ別にもとづく増殖率は表-5 に示したように中 > 大 > 小となり、それらの間には有意な差が認められた。このことからカルスを増殖目的で植え付けるときは、5 mm 角程度に切り取り増殖させることがカルス増殖に最も適当と考えられた。

(2) 添加ホルモンとカルス増殖

表-4 コナラカルス増殖に用いた 1/2 MS 培地のホルモン添加量

培地名	添加ホルモン (mg/ℓ)			
	IAA	2,4-D	カイネチン	BAP
A	-	1.0	0.1	-
B	0.1	-	-	0.1
C	-	1.0	-	0.1

注) ショ糖 50 g/ℓ、寒天 7 g/ℓ

表-5 コナラカルス増殖率の結果

培地別平均増殖率 (%)	カルスの初期の大きさ別平均増殖率 (%)	
	小 (1mm 角程度)	大 (8mm 角程度)
A	94	0
B	168	175
C	26	51

注) 培養期間: 1 ヶ月

表-6 コナラカルス増殖に用いた 1/2 MS 培地のホルモン添加量

単位: mg/ℓ

培地名	IAA	2,4-D	IBA	カイネチン	BAP
A	-	1.0	-	0.1	-
B	1.0	-	-	-	0.1
C	-	1.0	-	-	0.1
D	1.0	-	-	0.1	-
E	-	-	1.0	0.1	-
F	-	-	1.0	-	0.1
G	-	-	-	-	-

注) ショ糖 50 g/ℓ、寒天 7 g/ℓ

ア 材料と方法

材料は上記(1)の培地において増殖させた生育の良いとみられるカルスを5mm角程度に切り取ったものを用いた。培地は(1)の1/2MS培地と同様に作成した。なお、添加ホルモンにはオーキシンとしてIAA、2,4-D、IBA、サイトカイニンとしてカイネチン、BAPを表-6に示すとおり6種(A~F)に組み合わせて用いた。なお、対照としてホルモンフリーのG培地を用いた。カルスの植え付け個数は、A~F培地まではそれぞれ6個、G培地のみ14個とした。植え付け後14日目と、41日目にカルスの体積測定および色の観察を行い、生育差を求めた。

イ 結果と考察

14日目と41日目の測定結果を図-1に示した。これによるとF培地 (IBA1.0mg/ℓ、BAP0.1mg/ℓ) での増殖が目立った。増殖分体積について全ての培地間の組み合わせにおいて平均値の差の検定 (t検定、危険率両側5%) を行ったところ、F培地での増殖分体積は他の培地との間で14日目および41日目とも有意な差がみられた。

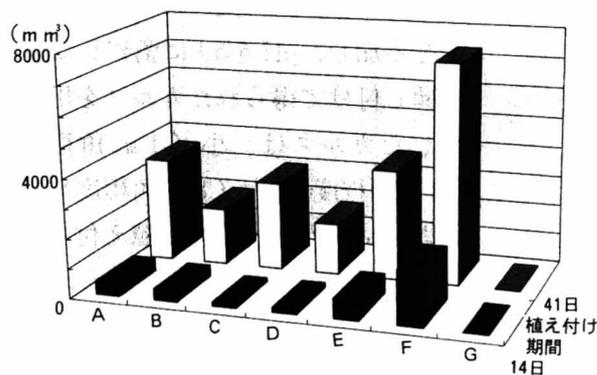


図-1 コナラカルスの培地別増殖体積の比較 (1/2MS、ショ糖50g/ℓ、寒天7g/ℓ)

14日目にはGを除く全ての培地において白色の新しいカルスの増殖がみられた。G培地では植え付け14個中8個のカルスが黒変し、その大きさは植え付け時と同じだった。また、他の6個も黒変はしていないものの大きさに変化はなかった。41日目ではこの黒変が14個中13個と増え、このカルスを取り出したところ、全体が堅くなっており、メスで割って中身を光学顕微鏡下で観察したところ、枯死したものと判断された。また残り1つも黒変はしていなかったものの、新しいカルスの増殖はみられず、植え付けたときと同じ形状であった。ホルモンフリーのG培地で一切の増殖がみられなかったことからコナラカルスの増殖にはホルモンの添加が必要と考えられた。

AからG培地の41日目の観察結果を表-7に示した。B、D、E、F培地の緑色を帯びたカルスは葉緑素が生成されたと考えられた。なおこれらから根、茎等の器官が再分化するか検討するため、その後2カ月間にわたって培養を続けたが、カルスの増殖はみられるものの、器官の再分化はどれにもみられなかった。なお、2,4-Dを添加したA、C培地に関してはカルスの緑色化もみられなかった。

以上のことから、IBA1.0mg/ℓ、BAP0.1mg/ℓ添加がコナラカルスの増殖には一定の効果を持つと判断された。

表-7 1/2MS培地におけるコナラカルスの生育状況

培地	植付け本数	観察結果
A	6	白色と焦げ茶色のカルスが増殖していた。
B	6	緑色を帯びたカルスの増殖がみられた。
C	7	白色のカルスの増殖がみられた。
D	6	B培地のカルス同様緑色のカルスの増殖がみられた。
E	6	茶色味を帯びた緑色のカルスの増殖がみられた。
F	6	E培地とほぼ同様緑色であるが、微妙に茶色が強く、部分的にピンク色をしたカルスの増殖がみられた。
G	14	14個中13個枯死。残りも増殖は一切みられなかった。

注) ショ糖50g/ℓ、寒天7g
培養期間: 41日

4. コナラカルスからの器官等の再分化の誘導

I_{DE}ら⁸⁾はクヌギえき芽からの組織培養を行い、クヌギ近縁種のコナラについてもこの手法が適用できる可能性があるとして述べている。そこで、ここではS_{ASAKI}ら⁹⁾がクヌギカルスからのシュート、根の再分化に用いた培地、ホルモンを参考にコナラカルスからの器官等の再分化に適する培地、ホルモンの検討を行った。なお、ホルモンについては一般にカルスからの不定芽・シュートの再分化に関与するといわれているサイトカイニンについて検討を行った。

(1) サイトカイニン濃度

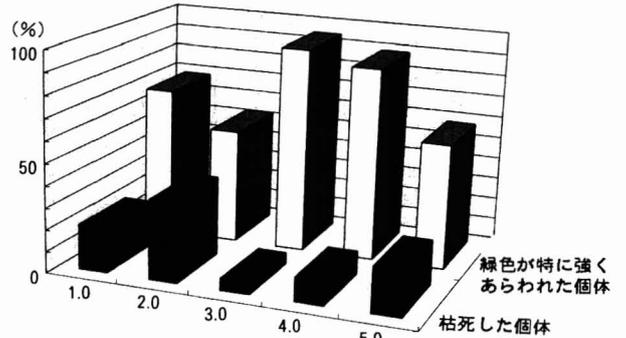
ア 材料と方法

添加するサイトカイニン濃度について検討する目的で次の実験を行った。再分化用の培地は1/2MS培地にショ糖50g/lを添加し、サイトカイニンとしてBAPを5段階（1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mg/l）で添加し、pHを5.7に調整したのち、寒天10g/lを加えた。これら5種の培地には前述3—(1)で増殖させ、生育の良かった白色カルスを約5mm角に切り取り各20個ずつ計100個を植え付けた。

なお、培養環境は温度25℃恒温の明期16時間（白色蛍光灯、3000～4000lux）で行った。

イ 結果と考察

各培地のカルスは植え付け直後から3—(1)培地にあったときと同様に増殖した。これは添加されたサイトカイニン（BAP）による細胞分裂の促進効果によるものと考えた。植え付け一ヶ月後頃にはほとんど全てのカルスが濃さに差はあるものの葉緑素の生成によると思われる緑色を帯びはじめた。植え付け51日目の観察でカルスが枯死したものと、緑色が特に強くあらわれていたものの割合を図—2に示した。なお、



図—2 コナラカルスの再分化培地別増殖率の比較(1/2MS、ショ糖50g/l、寒天10g/l)

ここでは雑菌による汚染のあった7個体については削除してある。図—2により、BAPの添加が3.0mg/lと4.0mg/lの培地で緑色を強く表している個体が多く、枯死率が減少しているのがわかる。このことより、コナラカルスの葉緑素の生成にはBAP3.0～4.0mg/lの添加が有効だと考えた。

なお、92日目までにカルスの枯死、衰退が増加し、根、茎等の器官が形成されることはなかった。

(2) 添加サイトカイニン濃度および培地の検討

ア 材料と方法

添加するサイトカイニン濃度および培地について検討する目的で次の実験を行った。材料は前述4—(1)において生育の良かった白色カルスを、約5mm角に切り取り用いた。使用した培地は表—8のとおりWPM（表—1）培地と1/2MS培地で、それぞれにサイトカイニンとしてBAP濃度を5段階に設定した培地8種（表—8）を実験に用いた。カルスは各培地に14個ずつ計112個植え付けた。カルスの植え付け後、18日、24日、38日、55日、70日、80日、95日目に観察調査をした。

イ 結果

個体ごとに明らかな差があらわれはじめたのは植え付け後55日目からであるが、やはり器

官等の再分化に至らなかった。表-8に55日目と80日目の観察結果を示した。

(55日目の観察結果)

表-8より、カルスの枯死および衰退が1/2 MS 培地の BAP 濃度0.05mg/ℓ 添加区で著しく多く、WPM培地においてもBAP 0.05mg/ℓ 添加区にて多いのが分かる。また、カルスの増殖が WPM 培地 BAP 0.50mg/ℓ 添加区で特に多い。

(80日目の観察結果)

増殖を続けているものは認められなかったが、WPM 培地の BAP 0.50mg/ℓ 添加区では枯死した個体がなく、8割以上が生存を続けていた。また1/2 MS 培地においては、BAP 0.05mg/ℓ 添加区で枯死した個体が特に多いが、0.10mg/ℓ 添加区においてカルスの生存率が若干高かった。

表-8 各種培地に植え付けたコナラカルスの生育状況

単位：%

培地	BAP (mg/ℓ)	55日目				80日目			
		枯死	衰退	変化なし	増殖	枯死	衰退	変化なし	増殖
WPM 培地 (シヨ糖20g/ℓ 寒天3g/ℓ pH5.5)	0.05	14.3	0.0	28.6	57.1	57.1	35.7	0.0	7.1
	0.10	7.1	0.0	7.1	85.7	35.7	21.4	0.0	42.9
	0.50	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	14.3	0.0	85.7
	1.00	7.1	0.0	7.1	85.7	21.4	57.1	0.0	21.4
1/2 MS 培地 (シヨ糖30g/ℓ 寒天3g/ℓ pH5.5)	0.05	42.9	42.9	0.0	14.3	78.6	7.1	0.0	14.3
	0.10	21.4	0.0	0.0	78.6	28.6	7.1	0.0	64.3
	0.50	21.4	0.0	0.0	78.6	21.4	28.6	0.0	50.0
	1.00	21.4	0.0	0.0	78.6	42.9	7.1	0.0	50.0

注) 変化なし：植え付け時と形態に全く変化のないカルス
増殖：植え付け時より増殖し、現在生存中のカルス

引用文献

- (1) 井出雄二・山本茂弘：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、1987
- (2) 板鼻直栄：林木の組織培養技術実用化に関する研究、東北林育年報、55-60、1987
- (3) 板鼻直栄：木本植物の増殖と育種、65-71、1989、農業図書株式会社
- (4) 板鼻直栄：カラマツの芽培養による幼植物体の再生と順化、林育研報11、17-36、1993
- (5) 小山真澄：木本植物の増殖と育種、138-145、1989、農業図書株式会社
- (6) 小山真澄：コナラ萌芽枝のえき芽の培養による植物体の再生、日林論100、509-510、1989
- (7) 三上進・板鼻直栄：組織培養による育種苗の大量増殖技術の開発、東北林育年報、72-73、1985
- (8) 佐藤亨：木本植物の増殖と育種、28-30、1989、農業図書株式会社
- (9) Yoshinori SAsAKI, Yukihiko SHOYAMA, Itsuo NISHIOKA and Tamio SUZUKI : Clonal Propagation of *Quercus acutissima* Carruth by Somatic Embryogenesis from Embryonic Axes. J.Fac.Agr.,Kyushu Univ.,33 (1・2),95-101,1988
- (10) Yuji IDE and Shigehiro YAMAMOTO : In vitro plantlet regeneration from axillary buds of juvenile seedlings of kunugi (*Quercus acutissima*).J.Jpn.For.Soc.68,472-474,1986