

## クヌギ成木のえき芽の培養によるシュートの形成

宮崎県林業試験場 深江 伸男  
鐘ヶ江利常

## 1. はじめに

クヌギはサシキによる栄養繁殖が困難であり、また壮齡期になって現れる接木不親和性もあり、優良個体の増殖ができない。そこで、この数年、組織培養による増殖法の開発が進められている。成熟種子の胚軸・子葉等を外植体とした幼植物体の大量増殖法が報告<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>され、成木えき芽についても一部成功例<sup>4)</sup>、<sup>5)</sup>がある。そこで、本試験では、成木えき芽の除菌法、個別えき芽の初代および継代培養について検討したので、その結果を報告する。

本試験を行うにあたり、ご指導いただいた森林総合研究所生物機能開発部遺伝科長斉藤明博士ならびに組織培養研究室長佐藤亨氏に対し厚くお礼申し上げる。なお、本報告は、地域バイオテクノロジー研究開発促進事業「組織培養による優良個体の増殖技術の開発」の中で実施したものをとりまとめたものである。

## 2. 材料と方法

1988年2月下旬に、クヌギ精英樹候補木の3個体の接木1年生苗木を9号のポリ鉢に移植した。移植した接木苗木は、接木上部約30cm高きで断幹し、24時間1300Lux、温度約24°Cの恒温室内で育成した。

同年4月13日に、30～50cm長に伸長した新梢を採取し、葉柄の一部を残し、えき芽部位を約2cmのY字型に切断後、一時純水に浸漬した。次に70%アルコールで3分間、3%過酸化水素水で減圧15分間、0.5%昇汞水で減圧3分間の併用殺菌後、滅菌水で4回洗浄し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。風乾後3か所の切り口をメスで約1mm切除し、培養用寒天培地に5mm深さにさしつけた。さしつけは、各培地に8～14本行った。培養50日後、伸長してきたシュートのうち、1cm以上のものを継代培養用寒天培地に約5mm深さに無菌的にさしつけた。シュートのさしつけは、各培地に10本ずつ行った。

本試験では、いずれもWPMの修正培地<sup>3)</sup>を基本培地に用いた。えき芽の初代培養には、 $\alpha$ -ナチフル酢

酸(NAA)、インドール酢酸(IAA)およびベンジルアミノプリン(BAP)による4種類の培地(表-1)を用い、シュートの継代培養には、NAAとBAP、IAAとBAPでそれぞれ4種類、計8種類の培地(表-2,3)を使用した。

培地はすべてpH5.8に調整し、それぞれ30×200mmの試験管に約33mlずつ分注し、121°Cで20分間高圧滅菌した。

材料は、1日16時間約5,000Luxの蛍光灯照明下、温度約25°Cの恒温条件下で培養した。

## 3. 結果と考察

## 1) 成木えき芽の除菌法の検討

恒温室内で育成した新梢のえき芽のコンタミ率は表-1に示したとおりで、最高で20%、全体平均すると30%とわずかであった。同様に育成したえき芽を外植体として、70%アルコールで3分間、3%過酸化水素水で20分間、0.5%昇汞水で5分間と時間を多少長くした殺菌処理では、コンタミは全く認められなかった。ただし、切り口部分に多少葉害がみられた。

一方、野外の成木のえき芽について、同薬剤を用い、同程度の処理時間で殺菌処理の検討を行ったが、恒温室内で育成したものに比べ全体的にコンタミ率が高く、5月下旬に採取したもので生存率50%と最も少なく、6月以降になるとほとんど雑菌に汚染された。

## 2) 個別の成木えき芽の初代培養

精英樹候補木3個体の接木苗木のえき芽をNAA、IAAおよびBAPの濃度別に50日間培養した結果は、表-1のとおりである。

開じょ伸長率は、どの個体もIAAを添加した培地が良好であったが、シュート数、シュートの伸長から総合的にみると、初代培養培地としてはNAA 0.05mg/lとBAP 0.3mg/lを添加した培地が良い結果を示した。しかし、個体により多少培地に対する反応に違いがみられた。また、培養50日目では、発生したシュートの一部に枯れが生じつつあった。

## 3) 個別シュートの継代培養

表一 個体別クヌギ成木のえき芽初代培養の結果  
(培養50日)

個体	NAA (mg/l)				
	0	0	0.05	0	
	IAA (mg/l)				
	0	0	0	0.1	
	BAP (mg/l)				
	0.1	0.3	0.3	0.5	
諸塚5号	コンタミ率 (%)	20.0	0	0	6.7
	開じょ伸長率 (%)	50.0	80.0	40.0	92.3
12号	シュート数 (本)	1.0	3.8	1.5	2.5
	シュート長 (mm)	10.5	8.1	28.7	18.4
14号	コンタミ率 (%)	0	0	0	0
	開じょ伸長率 (%)	100	50.0	75.0	92.9
諸塚12号	シュート数 (本)	2.0	2.0	6.3	1.9
	シュート長 (mm)	14.8	12.5	6.4	13.7
14号	コンタミ率 (%)	0	0	0	6.7
	開じょ伸長率 (%)	83.3	66.7	66.7	100
諸塚14号	シュート数 (本)	1.2	2.0	2.0	2.1
	シュート長 (mm)	8.3	10.0	16.5	11.4

えき芽培養と同じ3個体について、NAAとBAPの濃度別に加えた培地でシュートを継代培養した結果は表一2のとおりである。

シュート数はNAA0.05mg/lとBAP1.0mg/lを添加した培地が発生数は多く、また、シュートの伸長はNAA0.05mg/lとBAP0.5mg/lを添加した培地が良好であった。しかし、えき芽の初代培養と同様に、個体間による差が多少認められた。また、シュート生存率はNAA0.05mg/lとBAP0.5mg/lを添加した培地が高く、個体では諸塚14号の生存率が高かった。しかし、全体的にシュートの伸長が不良で、また、伸びたシュートも枯死するものが多く、次の継代培養までには至らなかった。

次に、諸塚5号についてIAAとBAPの濃度別に加えた培地でシュートの継代培養した結果を表一3に示す。

シュート数はBAP濃度が高い培地ほど発生数は多く、シュート長はその逆の傾向がみられた。シュート数、シュート長は表一2で示した試験結果に比べ優れ、また、シュートの生存率も全体的に高く、このことから、IAAとBAPを添加した培地は、シュートの増殖に有効な傾向がみられた。

#### 4. おわりに

クヌギ成木えき芽の初代培養には、NAA0.05mg/l

表一2 個体別シュートの継代培養の結果  
(培養50日)

個体	NAA				
	0.05	0.5	0.05	0.5	
諸塚5号	BAP				
	0.5	0.5	1.0	1.0	
	シュート数 (本)	0.6	2.0	2.4	3.0
	シュート長 (mm)	13.3	5.2	3.8	3.5
	シュート生存率 (%)	100	16.7	10.0	26.7
諸塚12号	シュート数 (本)	2.2	0.6	2.6	0.6
	シュート長 (mm)	5.0	2.3	3.5	2.3
	シュート生存率 (%)	54.5	30.8	0	33.3
諸塚14号	シュート数 (本)	2.8	1.8	2.6	1.4
	シュート長 (mm)	4.4	7.1	4.2	2.9
	シュート生存率 (%)	64.3	61.5	75.0	57.1

表一3 シュートの継代培養の結果 (1個体)  
(培養45日)

個体	IAA (mg/l)				
	0.1	0.5	0.1	0.5	
諸塚5号	BAP (mg/l)				
	0.2	0.2	0.5	0.5	
諸塚5号	シュート数 (本)	4.1	4.9	4.6	5.4
	シュート長 (mm)	10.2	11.9	9.2	8.2
	シュート生存率 (%)	45.5	86.5	69.4	69.8

とBAP0.3mg/lを添加した培地が良好で、シュートの継代培養には、IAA0.1~0.5mg/lとBAP0.2~0.5mg/l添加した培地が良い結果を示した。しかし、個体によりホルモンの添加濃度に対する反応は多少違いがみられた。また、若い材料に比べシュートの発生数が少なく、伸びたシュートも枯死するものが多いことから、今後、増殖率を高めるための培養法を、さらに検討する必要がある。

#### 引用文献

- (1) 佐藤 享ら：日林誌，69 (1)，113~117，1987
- (2) 玉泉幸一郎：98回日林論，455~456，1987
- (3) 深江伸男：日林九支研論，41，65~66，1988
- (4) 佐藤 享：林試場報，288，2~3，1988
- (5) 佐々木義則ら：日林九支研論，41，63~64，1988