

## ク リ の 胚 培 養

熊本県林業研究指導所 山下 裕史

## 1. はじめに

クリ (*Castanea crenata*) は材の耐朽性が高いため鉄道枕木や家屋の土台角として重宝されている。宮島<sup>1)</sup>によると、クリ材はその用途ゆえに、ある一定の径級に達すると価格が安定する傾向にあり、広葉樹としては比較的短伐期で利用できる可能性がある。

そこで本研究では、クリの材利用を考慮した優良苗木の大量増殖を目的として、クリの組織培養による増殖技術を開発するため、胚を用いた培養特性の検討を行ったので報告する。

## 2. 材料と方法

材料には、熊本県旭志村の天然生クリから、種子を落果前に採種し用いた。これらは、総包・果皮を取り除き、70%エタノールと3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で滅菌した後、実体鏡下で胚を摘出し、6-ベンジルアミノプリン (BAP) を含むWoody plant medium (WPM) に植え付けた。これより得られた無菌の芽生えは、BAPを0.5ppm含むWPMに移し、腋芽を伸長させることによってシュートの増殖を行った。

## (1) シュート増殖培地の検討

シュート増殖における最適培地を検索するために、Murashige & Skoog培地 (MS)、MS培地の組成からショ糖以外の成分を半分にした培地 (1/2MS)、Broadleaved tree medium (BTM) 及びWPMの4培地とそれぞれにBAP0.1ppmを加えた培地を用いてシュートの培養を行った。供試したのは2クローン (A, B) で、用いるシュートは腋芽の数を4, 5カ所に揃えた。供試体数は各培地それぞれAが30個体、Bが20個体であった。

## (2) 発根培地の検討

予備試験の結果、オーキシン濃度が1.0ppm以上では一切発根せず、逆にホルモンフリーでも発根が認められたことから、オーキシン濃度の0.01ppmから0.1ppmの範囲でのオーキシンの種類と培地の種類、及び暗処

理の効果について検討した。

まず、培地をWPMに統一して、3-インドール酪酸 (IBA) と3-インドール酢酸 (IAA) とを0.01及び0.05ppm加えた培地にシュートを植え付け、明所と暗所に分けて60日間培養した (I)。次にIBAと $\alpha$ ナフチル酢酸 (NAA) を0.01ppm及び0.05ppm加えたWPMにシュートを植え付け、1週間の暗処理を含めて60日間培養を行った (II)。

次に、最適培地の検索には、MS, 1/2MS, WPM, BTMの4培地を用い、各々にIBAかIAAを0.02もしくは0.1ppm加えて培養を行った。この際の暗処理は10日間、培養期間は60日間とした。

用いたオーキシンは、全てオートクレーブ前に培地へ添加し、暗処理はクリーンルーム内に暗室を設けて行った。また各実験には2クローン (A, B) による反復を設けた。

## (3) 環境順化の検討

発根した個体は、パーミキュライトを入れた6cm径のビニールポットに鉢上げし、上部が透明なケースの中に入れ、超音波加湿器により湿度を調節して順化を行った。

## 3. 結果と考察

## (1) シュート増殖培地の検討

培地の種類による培養40日後のシュート獲得本数を表-1に示す。ここでシュート獲得本数とは、外植体として植えたシュートから伸長して、植え替えが可能となったシュートの本数の処理内平均値で示したが、BAP添加区ではMS以外の培地で3~4本のシュートが得られ培養中の枯死も見られなかった。BAP無添加でも腋芽の伸長が認められたが、培養中の枯死が目立ち、その傾向は特にMSで顕著であった。また、ホルモン無添加の培地で発根した個体がかかなりみられた。シュートの形状はMS培地では太く、獲得シュート数が多くなるほど細くなる傾向がみられた。

## (2) 発根培地の検討

添加オーキシン及び暗処理による発根率を示したのが表-2である。まず、明所での発根率は暗所に比べてかなり低く、発根が全く認められなかった処理区もあることから、発根に対して暗処理は有効な方法であると考えられる。オーキシンの種類では、Aクローンの発根がNAAで極端に悪い他は、全体的に20~60%の発根が見られており、また各濃度でIAAの発根率が最も高くなっているが、その差は大きいものではなかった。

次に、培地の種類による発根率の違いを示したものが表-3である。Bクローンでは供試体数が15と少ないがBTMとWPMでの発根率が50%を越えており、Aクローンでもこの2種の培地での発根率が他に比べ高かった。MS培地はシュート増殖の場合と同様に枯死個体が多く、この培養においては、MS培地は不適当であると考えられる。

以上のことから、クリの胚培養では培地にBTMかWPMを用い、BAPを0.1ppm添加してシュート増殖を行うと、40日で4本程度のシュートが得られ、同じ培地でIAAを0.05ppm前後加えて暗処理を施すことにより、5割程度の発根が望めるといえる。

ただし、各実験においてクローンによる反応の差がかなり表れており、今後供試する個体を広く取り、検討を加えなければならない。

(3) 環境順化の検討

クリ培養苗の順化は、クヌギで行っている方法<sup>9)</sup>では、ほとんど生存が認められなかった。この理由として考えられることは、クリ培養苗がクヌギ培養苗に比

べ①シュートの径が細く貧弱である。②根が貧弱で細根がみられない。③発根培地でもシュートが伸長しているため先端の柔らかい組織が乾燥に極端に弱い等の理由が考えられる。現在は、超音波加湿器によるミストを10分に1分から30分に1分程度の間隔で行い、2割程度の活着個体を得ることができた。

4. まとめ

今回のクリの胚培養では、シュート増殖、発根の各過程においてはまずまずの結果が得られたが、順化に問題が残った。順化率の低さは順化技術の問題もさることながら、シュート増殖過程におけるシュートの貧弱さ、発根過程における根の状態にも問題があったと思われる。シュートの太さは増殖率と相反しており、比較的シュートが頑丈であったMS培地で培養した個体は発根率が低かった。根の状態については、発根培地の固化剤にバーミキュライトを用いたところ、発根率の低下も大きくなく、細根が発達した個体がかかり得られた。

今後は、この順化率の高い個体を得るため、培地組成のNやKについて検討を行った後、個体間差の把握を行い、優良系統の増殖を行わなければならない。

引用文献

- (1) 宮島淳二：日林九支研論，41，15~16，1988
- (2) ————：日林九支研論，42，13~14，1989
- (3) 山下裕史：日林九支研論，43，63~64，1990

表-1 培地の違いによるシュート獲得本数

クローン		A (供試体数各30)					
培地	BAP濃度	平均シュート獲得本数	枯死数	発根個体数	平均シュート獲得本数	枯死数	発根個体数
BTM	0ppm	0.8	4	3	0.9	2	1
WPM	0	0.9	3	10	0.8	0	5
MS	0	0.6	16	1	0.8	10	2
1/2MS	0	1.0	5	2	1.1	6	0
BTM	0.1	3.5	0	0	4.1	0	0
WPM	0.1	3.6	0	0	4.5	0	0
MS	0.1	2.2	4	0	2.6	2	0
1/2MS	0.1	4.5	0	0	4.0	0	1

表-2 添加オーキシンの種類及び明所・暗所培養の違いによる発根率 (%)

クローン名		A		B		
オーキシン濃度 (ppm)		0.01	0.05	0.01	0.05	
I	I B A	明所	0	0	5	0
		暗所	20	40	41	28
	I A A	明所	0	3	0	15
		暗所	28	60	56	36
II	I B A	暗所	17	57	20	20
	N A A	暗所	7	0	23	21

表-3 培地の違いによる発根数

クローン名		A (供試体数各25)		B (供試体数各15)	
培地	IAA (ppm)	枯死数	発根数 (%)	枯死数	発根数 (%)
MS	0.02	23	0(0)	14	0(0)
	0.1	22	0(0)	13	0(0)
1/2MS	0.02	9	5(31)	3	4(33)
	0.1	17	1(12)	2	3(23)
BTM	0.02	10	7(47)	3	10(83)
	0.1	3	8(47)	3	7(58)
WPM	0.02	6	7(37)	1	9(64)
	0.1	5	7(35)	4	12(100)