

## 組織培養による優良個体の増殖技術に関する研究

— 林 木 の 増 殖 —

(県単課題 平成6年～平成10年)

古川 成治  
青野 茂  
小野 武彦

## 目 次

要 旨 .....	61
I 緒 言 .....	62
II 材料及び方法 .....	62
1. キリの人工種子化技術の開発 .....	62
2. 成長抑制法によるキリの試験管内保存 .....	65
3. キリのカルス誘導と植物体再生 .....	66
III 結果と考察 .....	68
1. キリの人工種子化技術の開発 .....	68
2. 成長抑制法によるキリの試験管内保存 .....	71
3. キリのカルス誘導と植物体再生 .....	73
IV 参考文献 .....	75

## 要 旨

植物の分裂組織や体細胞胚をゲルで包埋して天然の種子と同じように扱う人工種子の概念が提案されているが、この概念を利用してキリの発根・馴化作業の簡略化に応用できないか検討した。8×BTM培地、シヨ糖20から40%、BAP 1 mg/ℓが発芽・発根に適した培地であった。非無菌下での発芽では、二重構造の人工種子で外側のゲルのシヨ糖濃度を0%にすることにより数個体ではあるが苗木が生産できた。しかし、発根率が最高でも18.2%と低かったため発根方法の検討が必要である。非無菌下での試験に用いた培地組成と6℃の条件で130日程度の短期保存が可能になった。

遺伝資源の保存のほかバイオテク研究に使う試験材料の確保を目的として、キリの成長抑制法について検討した。成長抑制因子内の最適条件としては、培養温度では5℃、シヨ糖濃度では6%、アンシミドール濃度では10mg/ℓが適していた。なお、マンニトール濃度の試験区では3%で1個体生き残ったほかはすべて枯死してしまい成長抑制の効果は不明であった。培養温度5℃でシヨ糖濃度を6%

にすると5℃の状態では8ヶ月間、22℃の培養室に移してから2ヶ月程度生存するので約10ヶ月間の保存が可能となることが判明した。また、ショ糖濃度6%の試験区では、通常の22℃の培養室で5ヶ月間の保存が可能であった。

キリの変異をおこさせることを目的に、カルス形成方法及びカルスからの植物体再生条件について検討した。ショ糖50g/l、2, 4-D0.2mg/l添加したMS培地で根及び茎を培養すると、白色カルスが高頻度で得られた。得られたカルスをBAP 2 mg/l添加した培地に移植すると、数個体ではあるが再生個体を得られた。再生個体は、形態的には違いが見られたが、RAPD分析でのバンドパターンに違いは見られなかった。

## I 緒 言

組織培養による植物体再生には、初代・継代培養及び発根・馴化の作業がある。この中で最も大変なのが無菌状態の植物体を野外の環境に慣れさせる馴化の作業である。植物の分裂組織や体細胞胚をゲルで包埋して天然の種子と同じように扱う人工種子<sup>1)</sup>の概念が提案されているが、この概念を利用して発根・馴化作業の簡略化に応用できないか検討した。

永年生の木本植物の遺伝資源の保存には、一般に広い圃場が必要でその管理や維持には多額の費用がかかる。また、自然災害や病虫害等で貴重な遺伝資源が消失してしまうことも懸念される。このため試験管内で枯損させず、かつ、いかに成育を抑制するかが課題となる。今回は遺伝資源の保存のほかバイテク研究に使う試験材料の確保を目的として、成長抑制法について検討した。

組織培養による大量増殖を考えるには、なるべく変異をおこさせないで大量に増殖する方法を用いる場合が多いが、逆に変異をおこすように培養することも可能である。組織培養の技術はこの両面に応用することが可能である。東北・関東のキリの遺伝的多様性をDNAを使用し分析した結果、2系統にしか分類されず、変異の幅が狭いことが確認された<sup>2)</sup>。そこで変異をおこさせることを目的にカルス培養方法及びカルスからの植物体再生条件について検討した。

これら、3項目の検討を行ったが、材料はすべてキリを用いた。

## II 材料及び方法

### 1. キリの人工種子化技術の開発

#### (1) 無菌下での発芽条件の解明

##### ① 目 的

無菌下での発芽条件の解明では、乾燥や微生物の影響を受けない滅菌した素寒天上(閉鎖系)の発芽・発根に必要な培地組成についての検討を行った。

##### ② 材料及び調整

キリ腋芽の包埋手順(写真-1)は、塩化カルシウムを除いたBTM培地<sup>3)</sup>にショ糖及び植物ホルモンを加え、アルギン酸ナトリウムを4%になるように加えて溶かした。次に2ヶ月間隔で継

代培養を実施している幼植物体の腋芽を含む部分を節の周辺部と共に約5mmくらいの断片として切り出してアルギン酸ナトリウム溶液に混ぜた。これをピンセットを用いて1.4%塩化カルシウム溶液中に落とすことによってそれぞれ1個の外植体を含む人工種子を作成した。

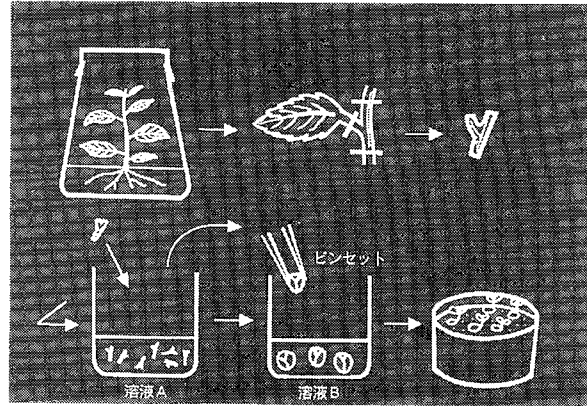


写真-1 材料の調整と包埋方法  
 溶液A：4%アルギン酸ナトリウム溶液  
 溶液B：1.4%塩化カルシウム溶液

### ③ 培地及び培養条件

基本培地としては、BTM培地を使用し、培養条件は、pH5.8、温度 $22 \pm 1$ ℃、16時間照明、5,000Luxで行った。200mlの培養フラスコを用い、1%素寒天培地を50ml分注し、この上で人工種子の発芽率等を調査した。

### ④ 試験及び調査方法

発芽に及ぼす影響を検討するために、次の3つの試験を行った。

#### [試験 1]

基本培地の濃度の検討を行うために、BTM培地をそれぞれ0、1、2、4、8培にし、ショ糖20%、BAP 1 mg/ℓ、pHを5.8に調整した5試験区を設定した。

#### [試験 2]

ショ糖濃度の検討を行うために、ショ糖をそれぞれ0、5、10、20、40g/ℓ添加し、8×BTM培地、BAP 1 mg/ℓ、pHを5.8に調整した5試験区を設定した。

#### [試験 3]

サイトカニン濃度の検討を行うために、BAPをそれぞれ0、0.1、1.0、5.0、10.0mg/ℓ添加し、8×BTM培地、ショ糖20%、pHを5.8に調整した5試験区を設定した。

発根に及ぼす影響を検討するために、次の試験を行った。

#### [試験 4]

8×BTM培地、ショ糖20%、BAP 1 mg/ℓを基本培地とし、IAA(0、0.01、0.10、1.00mg/ℓ)、IBA(0.01、0.10、1.00mg/ℓ)をそれぞれ単独に添加しpHを5.8に調整した7試験区を設定した。

各試験ともに、1試験区あたり22~28個の人工種子を使用し、1ヶ月後の発芽率、発根率及びシュート長の測定を行った。

## (2) 非無菌下での発芽条件の解明

### ① 目的

非無菌下での発芽条件の解明では、乾燥に耐えられて微生物の繁殖を抑えられる人工種子の構造及び発根条件についての検討を行った。

### ② 材料及び調整

キリ腋芽の包埋手順は、塩化カルシウムを除いたBTM培地にショ糖及び植物ホルモンを加え、

アルギン酸ナトリウムを4%になるように加えて溶かした。次に2ヶ月間隔で継代培養を実施している幼植物体の腋芽を含む部分を節の周辺部と共に約5mmくらいの断片として切り出してアルギン酸ナトリウム溶液に混ぜた。これをピンセットを用いて1.4%塩化カルシウム溶液中に落とすことによってそれぞれ1個の外植体を含む人工種子を作成した。

### ③ 培地及び培養条件

人工種子の内容物としては、8×BTM培地を使用し、BAP 1 mg/ℓ、シヨ糖20%とし、pHを5.8に調整した。温度22±1℃、16時間照明、5,000Luxで行った。培養土は滅菌していないパーライトとし、入れ物は植木鉢を使用した(写真-2、3)。

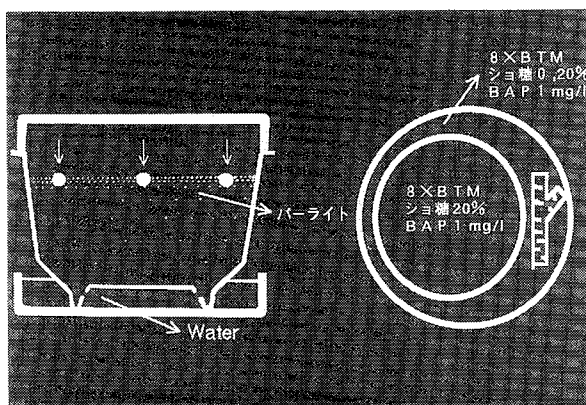


写真-2 非無菌下での培養方法の模式図と二重構造の人工種子の模式図

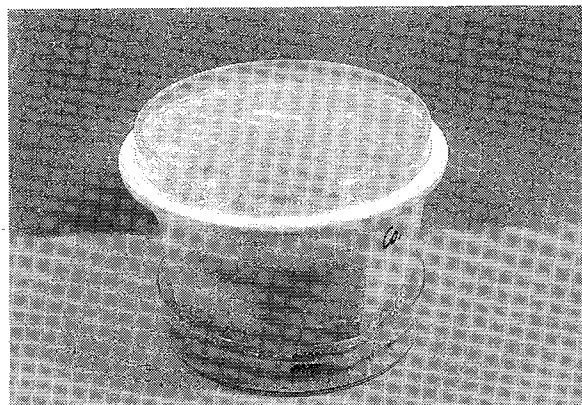


写真-3 非無菌下での管理状況

### ④ 試験及び調査方法

#### [試験 1]

乾燥及び雑菌汚染を防止するために試験区を設定した。通常の一重構造の人工種子と二重構造の人工種子(写真-2)の外側の内容物からシヨ糖を取りのぞいたものと、シヨ糖を20%添加したものの3試験区を設定した。

#### [試験 2]

二重構造の人工種子で外側のシヨ糖濃度0%の試験区では、発芽率と雑菌汚染数は少なかったが、発根数も少なかった。そこで二重構造の内側の内容物に活性炭を添加し、発根率が増加するか試験を行った。活性炭濃度としては、0、5、25、50g/ℓの4つの試験区とした。

各試験ともに、1試験区あたり22個使用し、人工種子の発芽率、雑菌汚染率、発根率等を調査した。

### (3) 短期保存方法の解明

#### ① 目的

短期保存方法の解明の中では、保存に耐えられる人工種子の構造、保存温度及び保存機関の検討を行った。

#### ② 材料及び調整

キリ腋芽の包埋手順は、塩化カルシウムを除いたBTM培地にシヨ糖及び植物ホルモンを加え、

アルギン酸ナトリウムを4%になるように加えて溶かした。次に2ヶ月間隔で継代培養を実施している幼植物体の腋芽を含む部分を節の周辺部と共に約5mmくらいの断片として切り出してアルギン酸ナトリウム溶液に混ぜた。これをピンセットを用いて1.4%塩化カルシウム溶液中に落とすことによってそれぞれ1個の外植体を含む人工種子を作成した。

### ③ 培地及び培養条件

基本培地としては、8×BTM培地を使用し、BAP 1 mg/ℓ、ショ糖20%、pH5.8、暗条件で行った。200mlの培養フラスコを用い、1%素寒天培地を50ml分注した。

### ④ 試験及び調査方法

#### [試験 1]

人工種子の構造(一重、二重構造)、貯蔵温度(6、12℃)を組み合わせた4試験区を設定し、貯蔵日数30日後に22±1℃、16時間照明、5,000Luxの培養室に移し、発芽率及び発根率を測定した。

#### [試験 2]

試験1で最適であった二重構造、貯蔵温度6℃の条件で貯蔵日数別に試験区を設定した。貯蔵後22±1℃、16時間照明、5,000Luxの培養室に移し、発芽率及びシュート長を測定した。

## 2. 成長抑制法によるキリの試験管内保存

### (1) 成長抑制因子別試験

#### ① 目的

無菌植物系を用いて成長抑制因子内の最適条件を把握するために次の試験を行った。

#### ② 材料及び調整

材料は、2ヶ月間隔で継代培養しているキリの培養シュート約1cmを使用した。

#### ③ 培地及び培養条件

各試験の温度や濃度以外の培養条件は、通常使用しているMSB培地((MS+BTM)/2培地)<sup>4)</sup>にBAP 2 mg/ℓ、ショ糖3%、pH5.8、温度22±1℃、16時間照明、3,000Luxで行った。200mlの培養フラスコを用い、固体培地を50ml分注した。

#### ④ 試験及び調査方法

#### [試験 1]

培養温度5、10、22、30℃の4試験区を設定した。

#### [試験 2]

ショ糖濃度0、1、3、6、9%の5試験区を設定した。

#### [試験 3]

マンニトール濃度(浸透圧調整剤)0、3、6、9%の4試験区を設定した。

#### [試験 4]

アンシミドール濃度(成長抑制剤)0、0.1、1.0、10.0mg/ℓの4試験区を設定した。

各試験ともに、1試験区あたりシュート12本使用し、調査項目としては、2ヶ月後の草丈、葉数、葉面積、莖数、枯損率とした。

## (2) 保存期間別試験

### ① 目的

成長抑制因子別試験で得られた3つの最適条件で保存期間の検討を行った。

### ② 材料及び調整

材料は、2ヶ月間隔で継代培養しているキリの培養シュート約1cmを使用した。

### ③ 培地及び培養条件

各試験の温度や濃度以外の培養条件は、通常使用しているMSB培地にBAP 2 mg/ℓ、ショ糖 3%、pH5.8、温度22±1℃、16時間照明、3,000Luxで行った。200mlの培養フラスコを用い、固体培地を50ml分注した。培養温度5℃の試験区では、8時間照明、1,000Luxで行い、保存後のシュートの伸長は、温度22±1℃、16時間照明、3,000Luxで行った。

### ④ 試験及び調査方法

試験区は培養温度5℃、ショ糖濃度6%、アンシミドール濃度10mg/ℓの3試験区とし、材料は1試験区あたり18本とした。調査は2ヶ月後から1ヶ月間隔で生存率を測定した。

## (3) 低温条件下でのショ糖濃度別試験

### ① 目的

低温条件下でのショ糖濃度の違いにより保存期間に差が現れるのか検討を行った。

### ② 材料及び調整

材料は、2ヶ月間隔で継代培養しているキリの培養シュート約1cmを使用した。

### ③ 培地及び培養条件

試験の濃度以外の培養条件は、通常使用しているMSB培地にBAP 2 mg/ℓ、寒天0.8%、pH5.8、温度5℃、8時間照明、1,000Luxで行った。200mlの培養フラスコを用い、固体培地を50ml分注した。保存後のシュートの伸長は、温度22±1℃、16時間照明、3,000Luxで行った。

### ④ 試験及び調査方法

試験区はショ糖濃度1、3、6、9%の4試験区を設定した。材料は1試験区あたりシュート20本とした。調査は2ヶ月後から1ヶ月間隔で生存率を測定した。

## 3. キリのカルス誘導と植物体再生

### (1) カルスからの誘導

#### ① 目的

不定胚もしくは不定芽を誘導するカルスの誘導条件についての検討を行った。

#### ② 材料及び調整

供試材料は、2ヶ月間隔で継代培養を行っている茎及び根を材料とし、メスで5mmに切断したものを使用した。

#### ③ 培地及び培養条件

培養条件については、温度22±1℃の暗条件とした。基本培地はMS培地を使用し、寒天8g/ℓ添加し、培地のpHはすべて5.8とした。200mlの培養フラスコを用い、固体培地を50ml分注した。

## ④ 試験及び調査方法

MS 培地を基本培地として使用し、2,4-D(0、0.2、2.0mg/ℓ)、ABA(0、5、10mg/ℓ)、シヨ糖(25、50g/ℓ)を組み合わせ添加した18試験区を設定した。1試験区あたり各12個とした。1ヶ月ごとに継代を行い、2ヶ月後にカルスの形成状況を調査した。

## (2) カルスからの再生

## ① 目的

カルスからの再生条件について検討する。

## ② 材料及び調整

供試材料は、4ヶ月継代培養を行ったカルスを材料とした。カルスを約3mm角に分割して使用した。

## ③ 培地及び培養条件

培養条件については、温度 $22 \pm 1$ ℃、16時間照明、3,000Luxで行った。基本培地はMS培地を使用し、寒天8g/ℓ添加し、培地のpHはすべて5.8とした。200mlの培養フラスコを用い、固体培地を50ml分注した。

## ④ 試験及び調査方法

MS培地を基本培地とし、シヨ糖25g/ℓにBAP0、2mg/ℓの2試験区を設定した。供試数は1試験区あたり各10個とした。2ヶ月後にシュートの形成状況及び発根状況を調査した。この試験は、平成9年度と平成10年度の2回続けて行った。

## (3) 再生個体の変異の確認

## ① 目的

カルスからの再生植物の変異の確認を行った。

## ② 材料及びPrimer

再生植物の葉約1gを使用した。Primerは、表-1のとおり10個とした。

表-1 RAPD分析に使用したプライマー

OPA-11	OPJ-16	OPG-18
OPH-19	OPJ-17	OPS-3
OPI-1	OPM-2	OPS-1
OPJ-4		

## ③ 全DNAの単離

成葉からの全DNAの単離は、MURRAY and THOMPSON<sup>5)</sup>のCTAB法を改良して行った。成葉1gを液体窒素で凍らせてからミキサーで破碎した後、20mlの2×CTAB溶液(20mMNa<sub>2</sub>EDTA、100mMTris-HCl、pH8.0、1.4M NaCl、2% CTAB、1%PVP、0.4%メルカプトエタノール)に入れ、室温で15分間振とう器で混和した後、3,000rpm(室温)で15分間遠心分離し、上層液を回収した。この溶液の2/3容量の冷イソプロパノール(-20℃)を加えた後、ゆっくり攪拌してDNAを沈殿させ、使い捨てピペットの先で巻き取り回収した。RNase処理をした後、フェノールを抽出を数回繰り返して上層液を回収し、この溶液の1/10容量の3MNaOAcと2.5倍

容量の99.5%冷エタノール(-20℃)を加えDNAを沈殿させた。その後、減圧乾燥機を用い20分間乾燥した。得られたDNAペレットは適量のTE溶液で溶解し、以下の実験に供した。

#### ④ RAPD 分析

得られた全DNAを鋳型DNAとしてRAPD(random amplified polymorphic DNA)分析<sup>6)</sup>を行った。PCR反応溶液組成は、50ng/ $\mu\ell$ の鋳型DNA、20mMTris-HCl、pH8.3、50mMKCl、2mMMgCl<sub>2</sub>、0.1mM各dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.2 $\mu$ MPrimer、0.5unit/ $\mu\ell$  Taq DNA Polymerase(LIFE TECHNOLOGIES社)である。反応処理は、最初に94℃で3分間変性処理を行った後、変性(94℃、1分)、アニーリング(36℃、1分)、伸長(72℃、2分)の3行程を40サイクル繰り返し、最後に72℃で5分間伸長反応を行った。得られたPCR産物は、2%アガロースゲルを用い50Vで1時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、UVトランスイルミネーター上で観察した。

### Ⅲ 結果と考察

#### 1. キリの人工種子化技術の開発

##### (1) 無菌下での発芽条件の解明

###### [試験 1]

培地濃度が発芽に及ぼす影響について表-2に示した。培地無添加の0×BTMをのぞいては7割以上の発芽状況を示した。発根については、2×BTM培地以上では、27.3%から42.9%の値を示した。平均シュート長をしてみると1.0から4.1mmの範囲であり培地の濃度が高くなるにつれて大きくなる傾向があった。発芽率は若干落ちるが発根個数及び平均シュート長から8×BTMが培地濃度としては適していた。

###### [試験 2]

シヨ糖濃度が発芽に及ぼす影響について表-3に示した。発芽率はシヨ糖0%を除いてほぼ7割以上であった。発根率は20%が45.5%、40%が31.8%とシヨ糖濃度0から10%とは有意差があった。また、平均シュート長をみても20から40%は比較的良好、20から40%の糖濃度が適していることがわかった。試験の1、2で培地濃度とシヨ糖濃度の最適培地が特定できたが、培地が通常の8倍、糖濃度は通常の約10倍と非常に高い濃度であることが示された。

###### [試験 3]

培地濃度と糖濃度が決まったので、さらに発芽率・発根率をあげるためにホルモン濃度の検討を行った。表-4はサイトカイニンが発芽に及ぼす影響を調べた結果である。発芽率、発根個数、平均シュート長ともに1mg/ $\ell$ が適していた。1mg/ $\ell$ より高濃度では発根せず、また、シュートも伸びないことが示された。逆に、1mg/ $\ell$ より低濃度では発芽率が低くなる傾向があった。

###### [試験 4]

BAP1mg/ $\ell$ 、シヨ糖20%、8×BTM培地を使用することにより発芽率は8割以上、シュートの伸長も比較的良好な結果が得られたが、発根率が最高でも55%と悪く、この点を改良するためにオーキシンを添加してみた。表-5は、オーキシン濃度が発根に及ぼす影響について調べた結



表-2 培地濃度が発芽に及ぼす影響

培地濃度 (培)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	平均シュート長 (mm)
0×BTM	22	13.6	0	1.0
1×BTM	22	77.3	13.6	2.1
2×BTM	23	91.3	39.1	2.9
4×BTM	22	81.8	27.3	3.4
8×BTM	28	76.6	42.9	4.1

注) ショ糖20%、BAP 1 mg/ℓを共通に添加した。

表-3 ショ糖濃度が発芽に及ぼす影響

ショ糖濃度 (%)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	平均シュート長 (mm)
0	22	13.6	0	1.5
5	22	68.2	4.5	2.6
10	22	90.9	13.6	2.8
20	22	86.4	45.5	3.1
40	22	90.9	31.8	2.9

注) 培養液中には、8×BTM培地、BAP 1 mg/ℓを共通に添加した。

表-4 サイトカニン濃度が発芽に及ぼす影響

BAP濃度 (mg/ℓ)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	平均シュート長 (mm)
0.0	22	46.2	18.2	1.9
0.1	22	59.1	13.6	2.8
1.0	22	86.4	45.5	3.1
5.0	22	68.2	0	1.6
10.0	22	31.8	0	1.2

注) 8×BTM培地、ショ糖20%を共通に添加した。

表-5 オーキシン濃度が発根に及ぼす影響

オーキシン濃度 (mg/ℓ)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	平均シュート長 (mm)
0	22	86.4	45.5	3.1
IAA0.01	22	81.8	13.6	2.3
0.10	22	63.6	0	1.8
1.00	22	36.4	0	1.4
IBA0.01	22	68.2	4.5	1.7
0.10	22	59.1	0	1.8
1.00	22	45.5	0	1.1

注) 8×BTM培地、ショ糖20%、BAP 1 mg/ℓを共通に添加した。

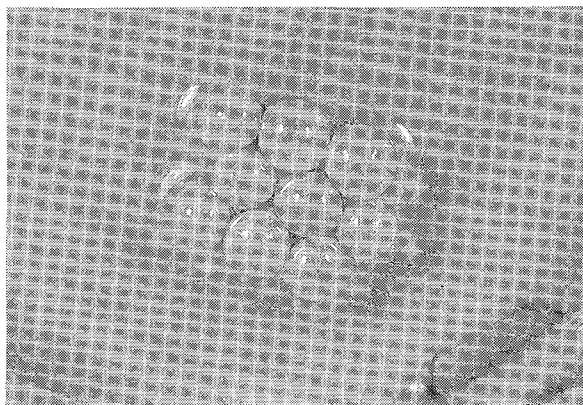


写真-4 キリの人工種子



写真-5 無菌下での人工種子の発芽・発根

果である。7試験区を設定したが対照に比べてよいものではなく、オーキシンの添加による効果は得られなかった。また、オーキシン濃度が高まるにつれて発芽率及びシュート長が逆に悪くなる傾向があった。

## (2) 非無菌下での発芽条件の解明

### [試験 1]

人工種子の構造と二重包埋のショ糖濃度の比較をしたのが表-6である。この結果を見ると、発芽については二重構造が一重に比べて良いことがわかった。一重包埋の方はアルギン酸ゲルの乾燥により外側のまくがかなりあつくなり、堅くなってしまわないかと考えられた。この理由としては、人工種子中の植物は芽が伸びているのだが、まくを破れないために、発芽できない個体が観察されたからである。また、雑菌汚染数をみてみると外側のゲルにショ糖が含まれていない二重構造Aが1個体しか雑菌に汚染されておらず、汚染されにくいことがわかった。発根

についてはすべての試験区を悪く、一番良い二重構造Aでも18.2%の発根率しか示さなかった。

[試験 2]

二重包埋は発芽率はよかったが、発根率は非常に悪く発根率改善のために活性炭濃度の試験を行った。その結果を表-7に示した。発根率のところを見ると、対照の0以外では活性炭濃度5%の1個体4.5%が発根しただけで活性炭の効果は認められなかった。

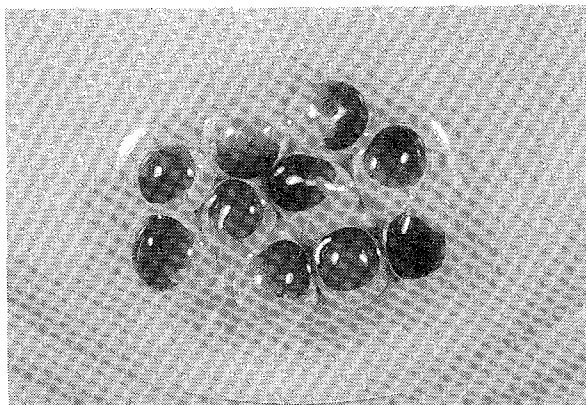


写真-6 二重構造の人工種子  
中の黒いのは活性炭

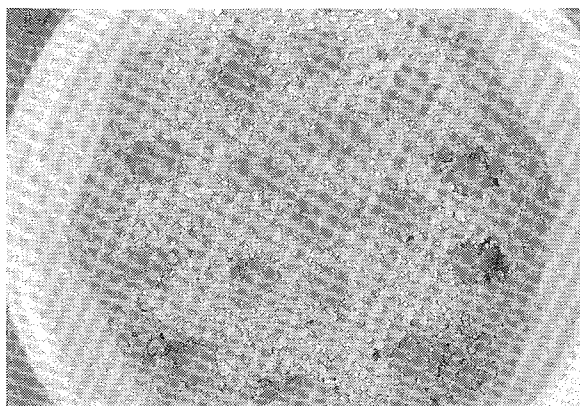


写真-7 非無菌下での発芽状況

表-6 非無菌下での発芽試験(試験1)

人工種子の構造	供試個体(個)	発芽率(%)	雑菌汚染率(個)	発根率(%)
一重構造	22	9.1	6	0
二重構造A	22	100	1	18.2
二重構造B	22	63.6	8	9.1

注) A:外側のショ糖0%、B:外側のショ糖20%

表-7 非無菌下での発芽試験(試験2)

活性炭濃度(g/ℓ)	供試個体(個)	発芽率(%)	発根率(%)	平均シュート長(mm)
0	22	100	18.2	2.8
5	22	68.2	4.5	1.3
25	22	86.4	0	2.6
50	22	72.7	0	1.5

注) パーライト上での発芽

(3) 短期保存方法の解明

[試験 1]

人工種子を野外で発芽させるには、普通の種子と同様に播種する時期が決まってくる。人工種子の保存が可能なら一度に大量に作らなくてよくなるので大量増殖するときに便利である。人工種子の構造と温度の2点について調べた結果が表-8である。一重構造の方は温度に関係なく発芽率は0になってしまった。6℃での人工種子中の植物体は特に褐変化している個体も少なく、発芽に必要な養分が保存期間中に外側に流れだしているためではないかと考えられた。また、二重包埋の12℃の発芽率の減少は、保存期間中に褐変化し枯れてしまう個体が多いためである。12℃では、一重構造が22個体中20個体、二重構造が22個体のうち10個体が褐変化してしまった。12℃という温度は、発芽はしないが保存には適さない温度だということが示された。よって、この試験区の中では、二重構造の貯蔵温度6℃が適していた。

[試験 2]

前の試験の条件でどのくらい貯蔵できるのか保存期間の試験を行った。その結果が表-9である。この結果から二重包埋で保存温度6℃の条件で130日位なら保存が可能になることがわかった。無菌下の発芽条件の解明からは、基本的な培地組成を検討し、8×BTM培地、ショ糖20から

40%、BAP 1 mg/ℓが発芽・発根に適した条件であった。非無菌下での発芽条件の解明からは二重包埋外側のゲルのシヨ糖濃度0%により非無菌条件下での発芽に成功し数個体ではあるが苗木が生産できた。また、短期保存方法の解明からは非無菌下での試験に用いた培地組成と6℃の条件下で130日程度の保存が可能になった。しかし、非無菌下での発根率がかなり低いため、発根率をあげるのが今後の最も重要な課題である。

表-8 人工種子の構造と貯蔵温度が貯蔵に及ぼす影響

人工種子の構造	温度 (°C)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	褐変変化数 (個)
一重構造	6	22	0	0	0
一重構造	12	22	0	0	20
二重構造	6	22	90.9	4.5	0
二重構造	12	22	36.4	0	10

注) 貯蔵日数30日後、22℃の条件で発芽

表-9 貯蔵日数が発芽に及ぼす影響

貯蔵日数 (日)	供試個体 (個)	発芽率 (%)	発根率 (%)	平均シュート長 (mm)
0	15	66.7	0	2.2
67	17	88.2	1	2.0
130	17	76.5	3	1.5
160	17	35.3	11	2.0
215	17	0	17	—

注) 二重構造、貯蔵温度6℃

## 2. 成長抑制法によるキリの試験管内保存

### (1) 成長抑制因子別試験

#### [試験 1]

表-10に培養温度と成長量の結果を示した。はじめにシュート長から見ていくと通常行っている培養温度の22℃に対し、高温での成長抑制効果は見られなかった。これに対し5、10℃はそれぞれ対照の半分から半分以下で成長抑制効果が見られた。なお、5、10℃では、2ヶ月前に植えた状態とほとんど変化がなく生理活動が低下していることがうかがわれた。葉の数では22、30℃とほとんど同じなほかは葉数、葉の面積、茎数ともに温度が高くなるにつれて大きくなるという傾向を示した。生存率はすべて100%であった。写-8は培養温度別の写真である。5、10℃の試験区では、植えた時とほとんど変化していなかった。

#### [試験 2]

表-11にシヨ糖濃度と成長量の結果を示した。草丈を見ていくと対照の3%と比べて低濃度での成長抑制効果はあまりみられなかった。また、0%の試験区では2ヶ月

表-10 温度と成長量(2ヶ月培養)

温度 (°C)	草丈 (mm)	葉数 (枚)	茎数 (本)	葉面積 (mm <sup>2</sup> )	枯損率 (%)
5	16.1	2.6	1.0	5.8	0
10	18.7	4.7	1.0	10.3	0
22	36.7	9.5	2.2	27.1	0
30	55.5	10.0	4.8	30.4	0

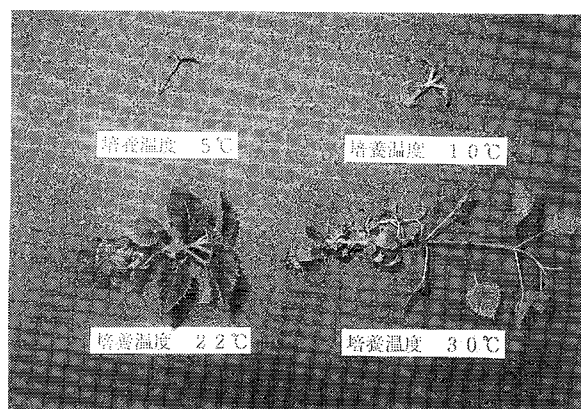


写真-8 培養温度別キリ成長状況

表-11 シヨ糖濃度と成長量(2ヶ月培養)

濃度 (%)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	茎数 (本)	葉面積 (mm <sup>2</sup> )	枯損率 (%)
0	—	—	—	—	100
1	32.2	10.5	2.0	20.8	0
3	36.7	9.5	2.2	27.1	0
6	15.2	10.6	1.7	3.8	0
9	13.7	5.3	1.5	2.0	25

後にはすべて枯死してしまいショ糖無添加区では育成しなかった。これに対し6、9%の試験区では対照の半分以下と成長抑制の効果が見られた。また、葉の数、茎数は濃度に関係なく比較的一定であるのに対し、ショ糖濃度が高くなるにつれ葉の面積が小さくなる傾向があった。このことから、葉の小型化が成長抑制に関係しているのではないかと考えられた。しかし、高濃度のショ糖添加は生存にも影響するらしく9%の区では、2ヶ月後の枯死率が25%を示している。6%の試験区では枯死率も0%、この試験区の中では6%の区が適していた。写-9に、ショ糖濃度別の写真を示した。0%では葉はまだ黄緑色をしているが茎は枯れている。6、9%の区の特徴として、葉が小型化していた。

[試験 3]

表-12に、マンニトールと成長量の関係を示した。3%の区で1個体生き残ったほかはすべて枯死してしまいこの試験区内ではマンニトールによる成長抑制の効果はわからなかった。写-10に、マンニトール濃度別の写真を示した。ほとんど成長しないうちに枯れてしまった。

[試験 4]

表-13に、アンシミドール濃度と成長量の関係を示した。葉の数、葉の面積、茎数が一定なのに対し、草丈はアンシミドールの濃度が高くなるに従い小さくなっている

表-13 アンシミドール濃度と成長量(2ヶ月培養)

濃度 (mg/l)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	茎数 (本)	葉面積 (mm <sup>2</sup> )	枯損率 (%)
0	36.7	9.5	2.2	27.1	0
0.1	33.0	11.0	1.3	24.9	0
1.0	24.5	9.5	1.4	21.3	0
10.0	17.0	11.3	1.2	25.5	0

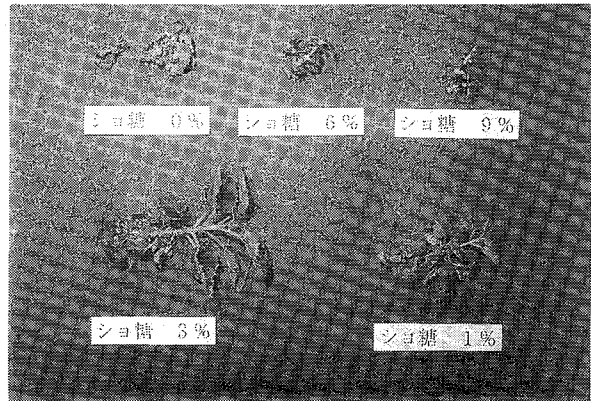


写真-9 ショ糖濃度別キリ成長状況

表-12 マンニトール濃度と成長量(2ヶ月培養)

濃度 (%)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	茎数 (本)	葉面積 (mm <sup>2</sup> )	枯損率 (%)
0	36.7	10.5	2.2	27.1	0
3	12.0	3.5	2.0	7.8	91.6
6	—	—	—	—	100
9	—	—	—	—	100

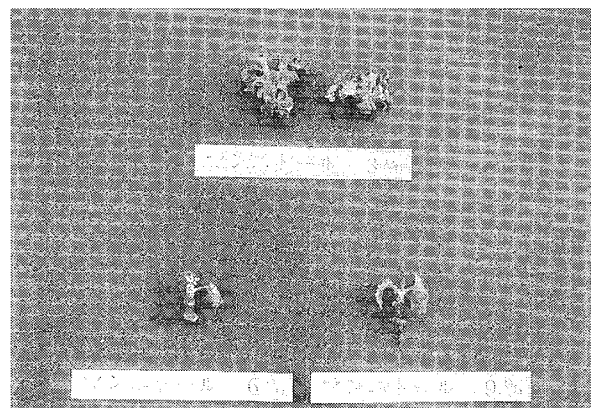


写真-10 マンニトール濃度別キリ成長状況

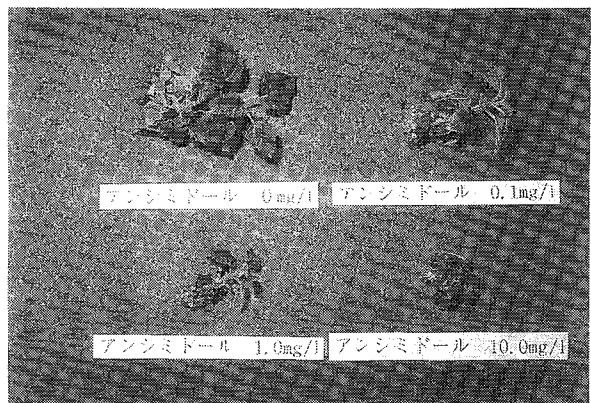


写真-11 アンシミドール濃度別キリ成長状況

ことから、節間伸長が抑制されたために小さくなったものとだと考えられた。生存率はすべての試験区で100%であった。写-11にアンシミドール濃度別の写真を示した。節間伸長が抑制されている状況がわかる。

(2) 保存期間別試験

保存条件と生存率の関係を図-1に示した。培養温度の試験区から見ていくと、5ヶ月後までは生存率100%、6ヶ月後で83.3%、7ヶ月後で極端に下がり38.9%となった。8ヶ月後には1個体の生存となり、9ヶ月後にはすべて枯死した。アンシミドールをみると3ヶ月後までは100%、4ヶ月後では94.4%であったが5ヶ月後には38.9%となり5ヶ月も10日をすぎるとすべて枯死してしました。最後にシヨ糖の試験区を見ると、4ヶ月目まではアンシミドールの試験区と同じだったが5ヶ月後の生存率が72.2%、6ヶ月後では27.8%となり7ヶ月後にはすべて枯死した。70%の生存率を実用化のラインと考えると、培養温度5℃の試験区では5℃の状態でも6ヶ月間、22℃の培養室に移してから2ヶ月程度生存するので8ヶ月間の保存が可能となった。シヨ糖濃度6%の試験区では5ヶ月間の保存が可能であった。この方法では5℃での培養室を必要とせず通常の培養室で保存可能である。アンシミドールの試験区では通常の培養室で4ヶ月間の保存が可能であった。すべての試験区で培養中に変異が生じている可能性もありこの点を更に検討する必要がある。

(3) 低温条件下でのシヨ糖濃度別試験

糖濃度の違いによる保存期間の変化を図-2に示した。シヨ糖濃度1%の試験区では4ヶ月後には生存率が60%になり、5ヶ月後には生存率が0%になった。3及び9%の試験区では7ヶ月後には50%をきり8ヶ月後には20%を下回った。これに対し、6%の試験区では8ヶ月まで70%台の生存率を示した。このことから、シヨ糖濃度を6%にすると5℃の状態でも8ヶ月間、22℃の培養室に

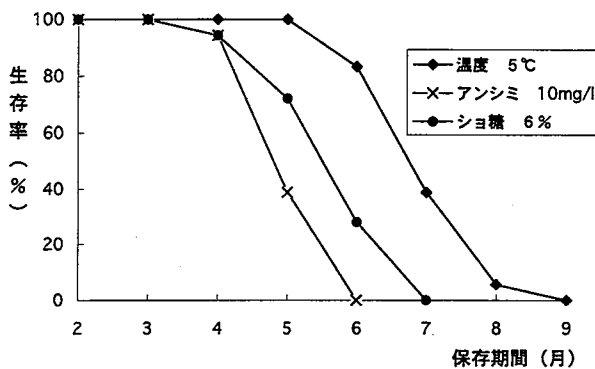


図-1 保存条件と生存率の関係

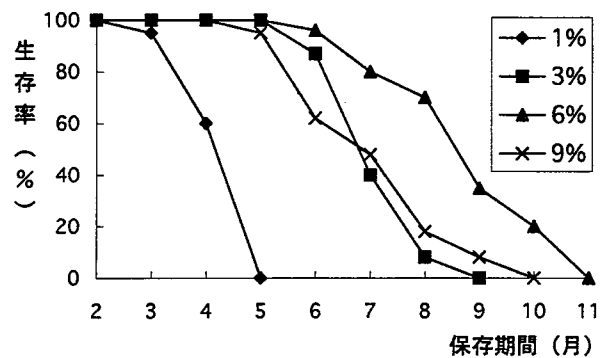


図-2 糖濃度の違いによる保存期間の変化

移してから2ヶ月程度生存するので約10ヶ月間の保存が可能となった。

3. キリのカルス誘導と植物体再生

(1) カルスの誘導

表-14、15に4ヶ月後の、カルス誘導の結果を示した。根、茎共にシヨ糖50g/ℓ、2,4-D0.2mg/ℓ添加することにより、高頻度で白色カルス(写真-12)が得られた。ABAを添加した試験区ではすべての試験区でカルス形成はできず、ABA添加の有効性は確かめられなかった。

(2) カルスからの再生

表-16、17に2ヶ月後の再生結果を示した。H9、10年の2年間共に、ホルモン無添加の試験区では発根のみであったが、BAP 2 mg/ℓの試験区からは、根から誘導したカルスで1個体ずつではあるがシュートの形成及び発根が確認された。

表-14 植物ホルモン及びシヨ糖濃度別カルス形成状況(茎)

		シヨ糖(g/ℓ)					
		25			50		
		2,4-D(mg/ℓ)					
		0	0.2	2.0	0	0.2	2.0
ABA(mg/ℓ)	0	S(5/12)	W(2/12)	N	S(3/12)	W(9/12)	N
	5	N	N	N	N	N	N
	10	N	N	N	N	N	N

G: : 緑色カルス; W: 白色カルス; S: シュート; N: 変化なし  
(形成数/供試個体数)

表-15 植物ホルモン及びシヨ糖濃度別カルス形成状況(根)

		シヨ糖(g/ℓ)					
		25			50		
		2,4-D(mg/ℓ)					
		0	0.2	2.0	0	0.2	2.0
ABA(mg/ℓ)	0	S(2/12)	W(1/12)	N	S(2/12)	W(12/12)	N
	5	N	N	N	N	N	N
	10	N	N	N	N	N	N

G: 緑色カルス; W: 白色カルス; S: シュート; N: 変化なし  
(形成数/供試個体数)



写真-12 キリ根より誘導された白色カルス

表-16 カルスからの植物体再生状況(H9)

		BAP(mg/ℓ)	
		0	2
茎	R(1/10)	N	
根	R(3/10)	SR(1/10)	

S: シュート; R: 発根; N: 変化なし  
(形成数/供試個体数)

表-17 カルスからの植物体再生状況(H10)

		BAP(mg/ℓ)	
		0	2
茎	R(2/10)	N	
根	R(2/10)	SR(1/10)	

S: シュート; R: 発根; N: 変化なし  
(形成数/供試個体数)

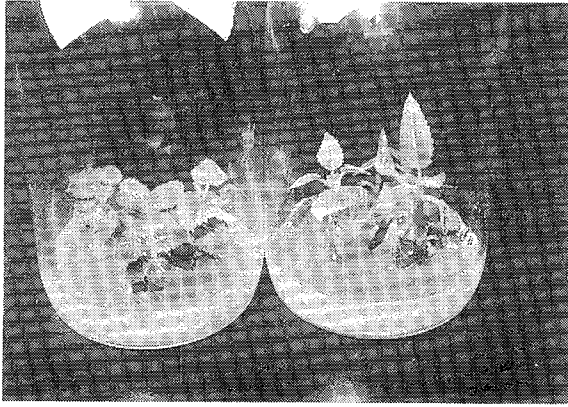


写真-13 カルスを誘導した植物体とカルスより誘導された植物体  
 左：カルスを誘導した植物体（元親）  
 右：カルスより誘導された植物体

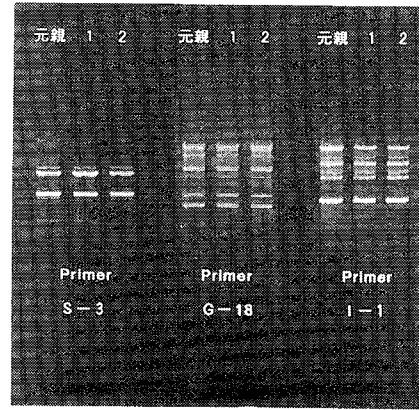


写真-14 RAPD 分析の一部

### (3) カルスからの再生個体の変異の確認

写-13のとおり形態的に違う個体が得られた。10プライマーのRAPD分析を行ったところ、バンドパターンに違いは見られなかった。RAPD分析の一部を写真-14に示した。

## IV 参 考 文 献

- 1) T. Murashige : Front. Plant Tissue Cult.(T. A. Thorpe(ed.))Intn. ASSOC. Plant Tissue Cult. (Univ. Calgary, Alberta, Canada) : 15~26, 1978
- 2) 古川・青野ほか：キリ胴枯れ性病害抵抗性の検定法、福島県林業試験場研究報告。投稿中
- 3) CHALUPA, V. : Clonal propagation of broad-leaved forest trees in vitro Commun. Inst. Forest 12:255~271, 1981
- 4) MURASHIGH, T., and SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physion. Plant. 15 : 473~497, 1962
- 5) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. : Rapid isolation of high molecular weigh plantDNA. Nucleic Acids Res. 8 : 4321-4325, 1980
- 6) WILLIAMS, J. G., KUBELIK. A. R. LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acids Res. 18 : 6351-6535, 1990