

## キリの組織培養によるクローン苗の生産(第1報)

技 師 菅 原 誠 司 ※  
主任専門研究員 平 野 潤

### 要 旨

- 1 組織培養手法(バイオテクノロジー)を用いて養成したキリ苗はてんぐ巢病などの病気を持たず、しかも優良な親木の性質をそのまま受け継いでいると考えられる。この手法による苗木養成法がほぼ確立した。
- 2 組織培養において、LS基本培地(植物組織培養に用いられる培地の1種)から塩酸チアミンを除き、ショ糖の濃度を2%とすることで効率的な苗木生産ができる。
- 3 発根培地を使わずに、直接シュート(培養中の茎葉)を培養土に挿し木することで十分な発根が得られた。この直挿し法を用いることで発根と順化が同時平行的にでき、苗木生産期間の短縮・鉢上げ後の枯死本数の低下が期待できる。

### 1 はじめに

実生繁殖では、てんぐ巢病が種子伝染しないことを利用して無病苗を供給できるが、親木の性質をそのまま受け継ぐとは限らない。一方、親木のクローンである分根苗は親木の優良な形質を受け継ぐが、てんぐ巢病等に感染している可能性がある。しかし組織培養苗では、これらの繁殖法のそれぞれの短所を補うことができる。すなわち組織培養苗は、全身病であるてんぐ巢病等の病気に冒されていない伸長中の成長点を培養して得られるので、てんぐ巢病などの病気を持たない。また、栄養繁殖であることから親木の性質をそのまま受け継ぐことができる。

当场では、キリてんぐ巢病あるいは腐らん病防除対策の一つとして、優良系統の無病苗生産をめざし、組織培養の研究を行っている。組織培養による苗木の大量増殖を図る場合、生産効率の良い培地の検索、培養期間短縮方法の検討、得苗率の向上等が研究目標となる。ここではキリ苗木の培養の試験結果を報告する。

---

※ 現 林産振興課

## 2 キリの組織培養の手順

培養に用いる培地には、植物を育てるため、各種のミネラルやビタミン、植物成長調節物質（以下便宜的に「植物ホルモン」と呼ぶ）及び糖（炭素源）が含まれる。一般に広く用いられる培地としてLINSMAIER&SKOOG寒天培地（表-1、以下「LS培地」と略記する）があり、今回のキリの培養にこれを基本として用いた。

キリは、培地に含まれる植物ホルモンの一種であるBA（ベンジルアデニン）によって、腋芽を形成する。この腋芽が伸長して、シュート（培養中の茎葉）となる。このように腋芽がシュートとなるので、1本のシュートは培養によって複数のシュートの集合体（以下、「株」と呼ぶ）となる。このシュートを切り分けることによって、シュートを増やすことができる（図-1）。これらをその後に発根させることでキリ苗が得られる。キリの増殖培養の様子を写真-1に示した。

表-1 増殖用LINSMAIER & SKOOG培地の組成

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650	
$\text{KNO}_3$	1,900	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	
KI	0.83	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	
塩酸チアミン	0.4	
イノシトール	100	
ベンジルアデニン	1	
ショ糖	30,000	(mg/l)
pH	5.7 ~ 5.8	

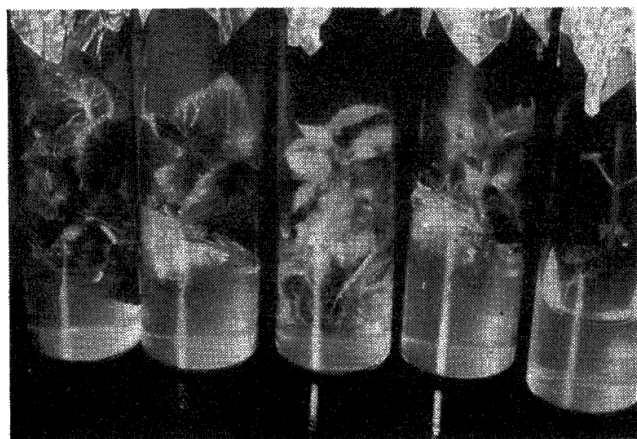


写真-1 キリシュート増殖の様子

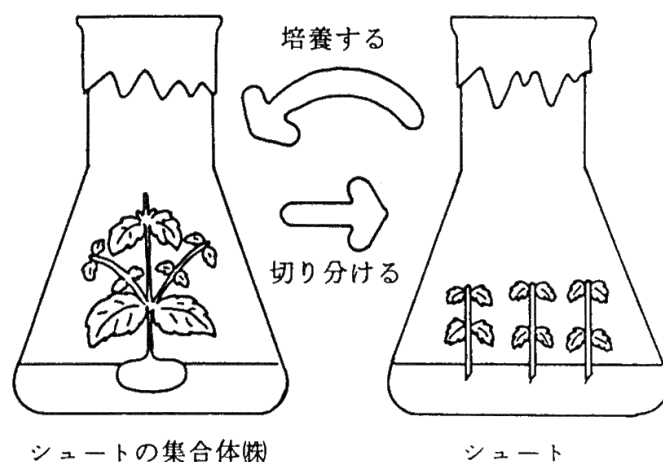


図-1 シュートの増殖操作

### 3 キリの増殖培養

#### (1) 塩酸チアミンの効果

塩酸チアミンはビタミンの一種である。植物の組織培養に広く用いられているが、キリの培養での必要性を検討した。

用いたキリは岩手大学農学部附属植物園内に植栽されている材料採取当時約10年生のものである。

このキリから材料を採取して、植物ホルモンの一種であるBA1mg/lを添加したLS培地で増殖継代した。

なおLS培地には0.4mg/lの濃度で塩酸チアミンが含まれている(表-1)。

塩酸チアミン濃度を変えた4種類の培地(0、0.1、0.4、1.0mg試験区)でキリのシュート(培養中の茎葉)の増殖率等を調べた。

供試シュートは1cmに調整した。培地毎の供試シュート総数は20本である。これを40mlの培地をいれたフラスコに4本ずつ挿しつけた。培養は25℃、3,000~4,000 LUXの24時間照明で行った。培養期間を30日とした。

結果を図-2に示す。塩酸チアミンの濃度の違いによるシュート数や、シュート長の違いは認められなかった。このことから、キリの増殖培養において、塩酸チアミンは必要ではないことがわかった。

#### (2) 糖の効果

糖は炭素源として組織培養に広く用いられているが、キリの培養に適した糖と、その濃度を検討した。用いたキリは岩手県の大迫町に生育する材料採取当時30~35年生のものであり、塩酸チアミンを除いたLS培地で増殖継代した後に実験に用いた。

試験は、3種類の糖(ショ糖、麦芽糖、ブドウ糖)と3種類の濃度(1、2、3%)の組み合わせによる9種類の改変LS培地で、キリのシュート数等を調べた。

供試本数、植え付け方法および培養条件は、前記の試験とほぼ同様である。なお培養期間は31日

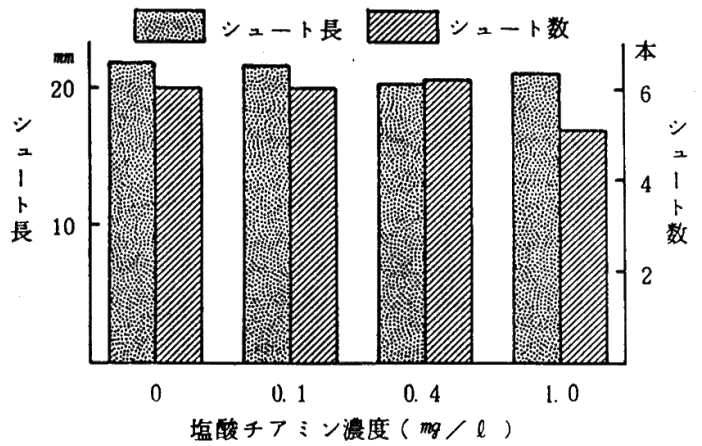


図-2 塩酸チアミン濃度の効果

表-2 糖の種類と濃度のキリへの効果

糖濃度	シュート数 (本)	シュートと葉芽数 (本)	生重 (mg)
S 1%	2.2	2.7	750
S 2%	5.3	7.6	1950
S 3%	4.0	6.0	1450
M 1%	3.6	5.5	840
M 2%	5.8	8.0	2060
M 3%	4.9	6.6	1590
G 1%	2.9	4.0	1140
G 2%	3.1	3.7	1380
G 3%	2.1	2.6	870

※ S…ショ糖、M…麦芽糖、G…ブドウ糖

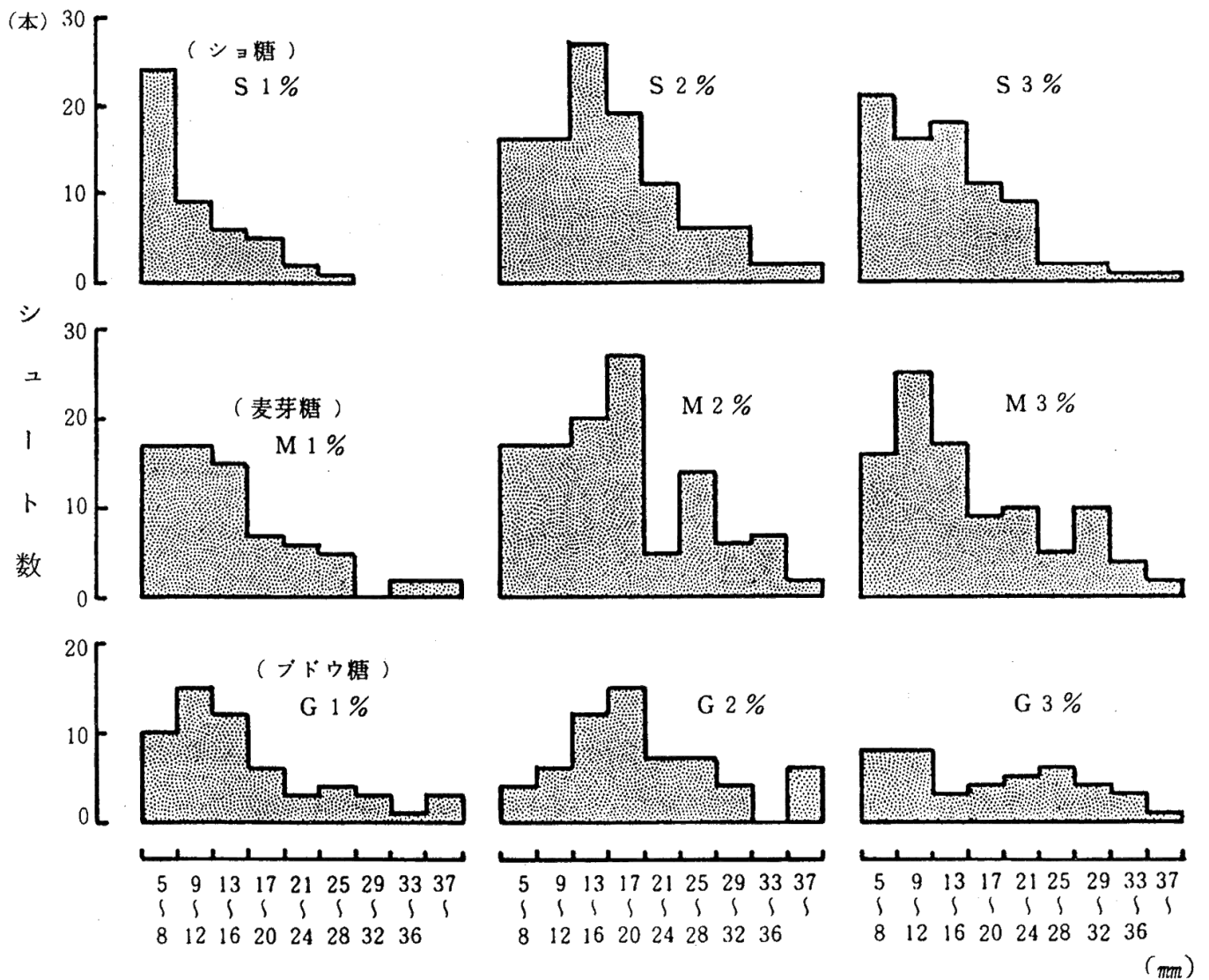


図-3 シュート長分布

とした。

結果を表-2、図-3に示す。どの糖の場合も2%の濃度が他の濃度よりシュート数、シュート+葉芽数、生重量のいずれも優れていた。しかし、ブドウ糖はショ糖や麦芽糖より劣っていた。シュート長は長いほど節も多いと考えられるので増殖に有利であるが、糖を1%および3%にした場合には5~8mmまたは9~12mmの長さのシュートが一番多かった。しかし、2%の場合には13~16mmあるいは17~20mmの長さのシュートが多く得られた。

培養中の枯死やガラス状化の結果を表-3に示す。ガラス状化とは、シュートが柔軟性を失

表-3 枯死率及びガラス状化率

糖濃度	枯死率 (%)	ガラス状化率 (%)
S 1%	34.8	20.0
S 2%	7.1	15.0
S 3%	12.2	0
M 1%	2.7	100.0
M 2%	0	85.0
M 3%	0	65.0
G 1%	10.9	50.0
G 2%	10.3	0
G 3%	23.6	15.0

※ 枯死率はシュート単位、ガラス状化率は株単位

※ S…ショ糖、M…麦芽糖、G…ブドウ糖

い、脆く固く透き通ってきてしばしば茎が膨大する現象である。ガラス状化が起きるとシュートの増殖率が低下するうえ、取り扱いも難しくなるのでその後の増殖培養に支障がでると考えられる。

麦芽糖で培養した場合にはガラス状化が高率で発生するので、麦芽糖はキリの増殖培養にはあまり適していないと思われる。一方、シュートの枯死はショ糖1%及びブドウ糖3%の場合に多かったので、これらの培地もキリの増殖培養には適していないと思われる。

以上のことから、キリの増殖培養にはショ糖2%が適していると思われる。

#### 4 キリの発根操作

一般に組織培養では、植物ホルモンをかえた培地（発根培地）に移植して発根させる。この方法でできた苗は、鉢に植えるときに寒天を洗い落すが、細根に絡んだ寒天はなかなか落ちずに、鉢上げ後のカビなどの汚染の元となりやすい。また寒天を落とす際に根を傷めやすい。そこで、発根培地を使わずにシュートを直接挿し木して、発根させられれば良いのではないかと考え、以下の試験を行った。

組織培養で増やしたシュートを2.5 cm程度に調整し挿し穂として用いた。挿し穂は、挿しつけ時まで水に浸しておいた。

予め乾熱滅菌（125℃、10分）しておいたバークミキュライトと細かく砕いたミズゴケの等量混合物を、発泡スチロール製の容器（51×25×10 cm）に4～5 cmの深さに敷き適度に湿らせて挿し床とした。

挿しつけは、切口を1%粉末のインドール酪酸（発根を促進する植物ホルモンの一つ、以下「IBA」と略記する）で処理したもの20本と無処理の20本とし、約5 cm間隔（1列4本）で、1.0～1.5 cmの深さに挿しつけた。挿しつけ後は水を噴霧し、ポリエチレンシートで上面を封じ、研究室内に25日間（最高25℃、最低9℃、昼間の明るさ1,000～1,600 LUX）培養し、その後20℃、2,200～2,600 LUXの連続照明条件下で育成後、掘り出して発根率及び苗高、節数の調査を行った。

処理毎の発根率、苗高、節数について表-4に示した。IBA処理の有無に関わらず、発根率、苗高、節数に大きな違いが認められなかった。このことから、IBA処理は発根操作に必要なでない

表-4 IBA（インドール酪酸）処理と無処理の直挿しの比較

試験区\項目	発根率(%)	苗高(cm)	節数(個)
IBA1%粉末	75	3.5±1.4	4.7±0.7
無処理	95	4.0±1.4	5.0±0.6

※ 平均値±標準偏差

表-5 直挿し期間と活着の関係

	活着(%)	生存(%)	枯死(%)
1カ月後	80	17	3
2カ月後	84	6	10

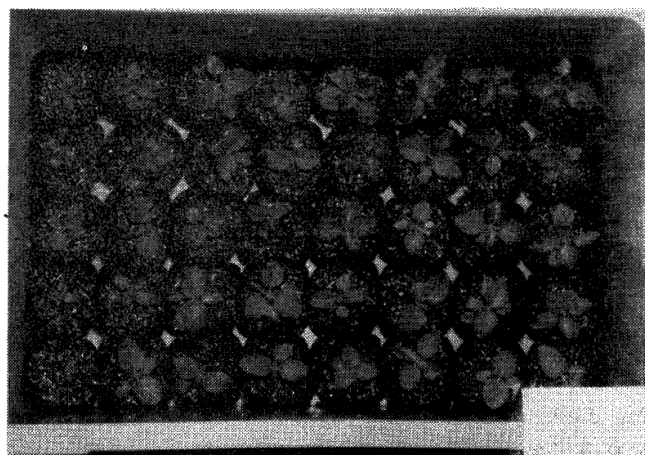


写真-2 順化中のキリ苗

と考えられる。

次に活着に要する期間を調べるために組織培養シュートの時期別活着調査を行った。

挿し穂及び用土、挿し床、挿しつけ方法は前記の試験とほぼ同じであり、150本を供試した。挿しつけ後は同様に、ポリエチレンシートで封じ、20℃、2,200～2,600 LUXの連続照明条件下で育成し、活着率、発根、苗高等の調査を行った。

挿しつけ1カ月後と2カ月後の活着状況を表-5に示した。表内の活着は新葉を展開して伸長し、成苗の見込みのあるもの、生存は生きてはいるが成苗の疑わしいものとして区別した。

この結果、2カ月後には若干活着率が高まったものの、活着については約1カ月で決まると思われる。根系の状況についてみると、直挿しによる根は細根を多く有していた。細根が多いほど活着が良くなると考えられ、寒天培地で発根させた場合のように、寒天の洗い残しによる枯死も少ないと思われる。以上のことから、組織培養の直挿しは充分実用的であり、発根培地を用いる場合に比べて、発根と順化（幼植物体を外気に馴らすこと）が同時にでき苗生産期間の短縮・鉢上げ後の枯死脱落本数の低下等につながると思われる。活着後、ビニールポットに移したキリ苗を写真-2に示す。

## 5 おわりに

以上述べてきたことから、組織培養によるキリ苗の生産に目途がついたと考える。なお培養期間中は組織培養の特徴から、てんぐ巣病等には感染していないと考えられる。しかし山出しの前に苗畑で各種病害に感染する可能性があるので、今後山出し前に罹病検定を行う必要があると思われる。

## 6 引用文献

- 1) 岩手県林業試験場成果報告 第11号, P27~32, (1978)南館昌:キリの実生苗養成——発芽後のポリ被覆法とそのまきつけ量——
- 2) 農業及び園芸 55:P1216~1222, (1980)石原愛也:果樹の茎頂培養と繁殖への利用(2)
- 3) 岩手県林業試験場成果報告 第15号, P17~28, (1982)高村尚武・作山健・南館昌:キリてんぐ巣病の発病と環境
- 4) 日林東北支誌 38:P90~91, (1986)平野潤・菅原誠司・永野正造:キリ組織培養シュートを用いた挿し木
- 5) 日林東北支誌 38:P94~95, (1986)菅原誠司・平野潤・永野正造:キリの組織培養に関する研究(Ⅱ)——シュート増殖に及ぼす塩酸チアミン濃度の影響——
- 6) 日林東北支誌 40:P75~76, (1988)——・——:同上(Ⅳ)——シュート増殖に及ぼす糖濃度の影響——