

優良木からの種苗増殖技術の開発

1991年度～1995年度 (国補・システム)

平 山 一 木
竹 内 英 男

要 旨

老齢なため従来の方法(挿し木、接ぎ木)ではクローン増殖が困難で、しかも保存・増殖が望まれている樹木の増殖に取り組んだ。

材料の若返りを図るため、六本スギ(鳳来町:樹齢約1300年)及び瑞龍寺シダレ桜(稲武町:樹齢約350年)の挿し木を行った。その結果、六本スギでは996本中約4%の36本、瑞龍寺シダレ桜については288本中9%の26本の発根苗を得ることができた。

また、六本スギ、瑞龍寺シダレ桜、竜洞院シダレ桜(東栄町:樹齢約250年)の組織培養による増殖に取り組んだ。その結果、初代培養では、六本スギについては、当年枝を材料とし、ホルモン無添加の濃度2分の1のMS培地、瑞龍寺シダレ桜については、腋芽を材料とし、濃度2分の1のMS培地にホルモンとしてBAPを1.0mg/l, IBAを0.1mg/l, GA₃を0.5mg/l加えた培地、竜洞院シダレ桜については同じく腋芽を材料とし、濃度2分の1のMS培地にホルモンとしてBAPを1.0mg/l, IBAを0.1mg/l, GA₃を5.0mg/l加えた培地が有効であることがわかった。しかし、これら3つの樹木について初代培養に引き続き発根条件を検討したが、どれも発根個体を得るには至らなかった。

I. 目 的

本県では六本スギ、傘スギ、天然記念物のサクラ等、遺伝資源として確保するとともに保存しなければならない樹木が相当数ある。これらの樹木はいずれも老齢であり、早急に子孫を残さなければならないが、従来の増殖法(挿し木、接ぎ木)によるクローン増殖は非常に困難である。そこで、組織培養により、これら優良木の増殖法を確立する。

II. 材 料

1. スギ

鳳来町(鳳来寺山)にある樹齢1300年以上の六本スギ。

2. サクラ

東栄町(竜洞院)にある樹齢約250年のシダレ桜、及び稲武町(瑞龍寺)にある樹齢約350年のシダレ桜。

III. 方 法

1. 成木の幼若化方法の検討

(1) 六本スギ

挿し木及び接ぎ木を行った。挿し木は本センター温室内で切り口をオキシベロン（粉末あるいは液体）で処理してから行った。接ぎ木は本センター苗畑内のスギを台木として芽接ぎを行った。接ぎ穂には、採取後冷蔵庫に保存しておいた枝の先端部分と、採取後恒温器内で水挿しし、伸長させた枝の先端部分の2種類を使った。

(2) 瑞龍寺シダレ桜

6月に稲武町（瑞龍寺）のシダレ桜の挿し木試験を行った。採取した材料を一日浸水処理した後、挿し穂を約15cmに調製して当センター温室内で緑枝挿しを行った。また、挿し付けの際に粉末のオキシベロンにより処理した。

2. 効率的な大量増殖技術の開発

(1) スギ老齡木

挿し木、継代挿し木、接ぎ木により幼若化したと思われる六本スギの当年枝を用いた。

初代培養では、基本培地は、2分の1のMS培地、2分の1の粉末（市販）MS培地、液体肥料（ハイポネックス）の1000倍培地の3つとした。植物ホルモンは、BAP（6-ベンジルアミノプリン）+NAA（ α -ナフタレン酢酸）添加、IBA（3-インドール酪酸）単独添加、あるいはホルモン無添加とした。当年枝を7月上旬に採取し、先端部あるいは中部を1.5cm程度に切り、試験管に植え付けた。表面殺菌は70%エタノールで2分間、その後有効塩素濃度2%の次亜塩素酸ナトリウムで約10分間行った。

また、発根培養にはNAA単独添加、ホルモン無添加の培地を用いた。

用いた植物ホルモンは0.1mg/lの濃度で添加した。またIBAの浸漬処理も行った。

(2) サクラ老齡木

栄養枝あるいは萌芽枝の腋芽及び冬芽を用いた。初代培養には2分の1MS培地あるいはMS培地を基本培地とし、ホルモンとしてBAPとIBA

とGA₃（ジベレリン）を数種類の濃度で加えて用いた。材料の枝は腋芽の場合5月下旬に、冬芽の場合は2月に採取し、表面殺菌後、試験管培地に植え付けた。表面殺菌は70%エタノールで2分間、有効塩素濃度1%次亜塩素酸ナトリウムで10分間行った。試験管に植え付け後1カ月で、シュート伸長量を調査し、植え替え可能なものについては発根培地へ植え代えた。発根培地は4分の1MS培地にIAA 0.5mg/lあるいはIBAを1.0mg/l加えた培地を用いた。

3. 種苗の外環境順化促進技術の開発

継代培養あるいは発根培養での試験管培地の中の支持体を寒天からパーミキュライトに変更し、発根の促進、および順化促進を検討した。

また、不定芽から増殖した幼植物体を試験管から直接植木鉢に植え付け、外環境での発根、順化の効率化を検討した。

IV. 結果と考察

1. 成木の幼若化方法の検討

(1) スギ老齡木

ア 接ぎ木

スギ老齡木の接ぎ木は合計二十数本行なったが、成功したものは1本だけであった。実験数が少なかったこと、時期が少し遅かったこと、材料が老齡であること等の理由が考えられる。

イ 挿し木

挿し木の結果は表-1に示すとおりで、材料が老齡木であったため、発根率は2~9%と低かった。その中では孫枝を用いオキシベロンの液で処理したものが発根率が高かった。全体では、996本中36本（約4%）の発根苗を得ることができた。

また、今回の挿し木を行った個体とは違う個体であるが、同じく老齡木から、継代挿し木を行った例を表-2に示した。発根率は36~83%であり、今回の場合よりもかなり高かった。個体差も考え

られるが、継代して挿し木を行うことにより、発根率が上がることも推測される。接ぎ木および挿し木によって得られた苗木の枝条を材料とし、組織培養を行なう。

(2) サクラ老齢木

挿し木試験は、挿し床の殺菌処理の違いおよび枝の種類による違いについて比較した。なお、萌芽枝は数本しか採取できなかったため、挿し床の殺菌処理による比較は栄養枝によるものしかできなかった。

結果は表-3に示した。ベンレートにより殺菌

処理した挿し床の方が、2年枝の場合も当年枝の場合もともにわずかではあるが発根率が高かった。また、栄養枝と萌芽枝を比較すると、萌芽枝の方が2年枝、当年枝ともに少し発根率は低くなっているが、萌芽枝の実験数が少ないこと及び他の例よりみて再度検討したい。そしてすべての条件で2年枝よりも当年枝の方が発根率が高かった。最も発根率が高かったのは、ベンレート処理した挿し床で普通枝の当年枝を挿し付けたときで発根率は25%だった。全体では288本中9%の26本の挿し木発根苗が得られた。

表-1 六本スギ挿し木結果

クローン	区分	処理	挿付本数	生存本数	生存率 (%)	発根本数				発根率 (%)
						多	中	小	計	
六本スギ	孫枝	サハロン粉	359	14	4	2	5	2	9	3
		サハロン粉	159	9	6	3	3	2	8	5
		サハロン液	150	17	11	3	7	4	14	9
		サハロン粉	328	5	2	1	3	1	5	2
合計			996					36	4	

表-2 六本スギ継代挿し木結果

クローン	区分	挿付本数	生存本数	生存率 (%)	発根本数				発根率 (%)
					多	中	少	計	
六本スギ	No.1太	70	37	53	16	14	3	33	47
六本スギ	No.1細	165	91	55	32	38	12	82	50
六本スギ	No.3太	82	63	77	29	21	9	59	72
六本スギ	No.3細	101	45	45	13	16	7	36	36
六本スギ	No.4太	24	21	88	14	4	2	20	83
六本スギ	No.4細	68	33	49	13	14	2	29	43
六本スギ	No.5細	123	54	44	20	21	9	50	41
六本スギ	No.5太	41	29	71	18	7	2	27	66

表-3 瑞龍寺シダレ桜挿し木試験結果

挿し床処理	枝の種類	挿付け本数	発根本数	発根率 (%)
ベンレート	栄養枝 2年枝	100	6	6
ベンレート	栄養枝 当年枝	24	6	25
ベンレート	萌芽枝 2年枝	11	0	0
ベンレート	萌芽枝 当年枝	37	8	22
-	栄養枝 2年枝	92	1	1
-	栄養枝 当年枝	24	5	21
合計		288	26	9

2. 効率的な大量増殖技術の開発

(1) スギ老齡木

ア 初代培養

六本スギを挿し木、継代挿し木及び接ぎ木し、その結果得られた材料の当年枝を、初代培養に用いた。表-4 にそれぞれの材料及びホルモンの有無ごとに初代培養における不定芽発生率を示した。

基本培地は2分の1のMS培地、2分の1の粉末(市販)MS培地、液体肥料の1000倍培地の3種類を用いたが、ホルモン添加の有無による不定芽発生率の違いは明確でなかった。しかし、IBAを加えることによって、BAP+NAA添加及び無添加に比べて、明らかに不定芽の発生は抑制された。また、材料間の比較をすると、基本培地及びホルモンによる影響はよく似た傾向を示すが、全体的には、継代挿し木が最もよく、次に挿し木、接ぎ木の順により結果となった。

ここで不定芽の発生と言っても、写真-1の様に非常に多くの不定芽が発生するものや、あるいは写真-2の様に一つの不定芽が長く伸長するものもあつたりするので、不定芽が発生したものについて、不定芽の発生数、不定芽からのシュート伸長量を比較した。表-5に1シュートあたりの平均不定芽数を材料ごとに基本培地及びホルモンの違いについて示した。この場合も基本培地、ホルモンによる影響はまちまちであったが、ホルモンフリーの方がよい傾向にあった。また、IBA

添加により不定芽の発生は抑制される傾向であったが、発生する時は多く発生した。

次に、表-6により不定芽からの平均シュート長で比較した。基本培地で比較すると、不定芽発生率が低いIBA添加のものを除けば、挿し木、継代挿し木とも同じ様な傾向で、2分の1MS培地が最もよく、次に市販の粉末培地、液体肥料培地の順であった。接ぎ木ではあまり違いはなかった。

またホルモン条件については、挿し木についてはホルモンフリーが最もよく、継代挿し木と接ぎ木では液体肥料培地をのぞいてはホルモンを加えた方がよかった。

以上のことより、初代培養にはホルモンフリーの2分の1MS培地を用いることが有効であると思われる。しかし、市販の粉末の培地や液体肥料を薄めた培地でも成績は少し落ちるが、培養作業の簡略化や、順化後の成長によっては、有効なものになり得る。植物体再生までの過程の中で検討を重ね、トータルで考える必要がある。

イ 継代培養

不定芽から伸長したシュートを用いて継代培養を繰り返し、その増殖率について比較した。継代培地にはホルモンフリーの2分の1MS培地を使用した。その結果は表-7に示したが、増殖率は1.3~1.9倍と少しの変動はあるものの、4回の継代では増殖率へはあまり影響はないと考えられる。

表-4 六本スギの初代培養における不定芽発生率 (%)

基本培地	ホルモン	材 料		
		挿し木	継代挿し木	接ぎ木
1/2MS	BAP, NAA	40.0	50.0	23.8
	IBA	0.0	8.3	0.0
	フリー	40.0	80.0	0.0
1/2MS(市販)	BAP, NAA	29.6	46.7	9.5
	IBA	0.0	8.3	0.0
	フリー	60.0	40.0	0.0
液体肥料	BAP, NAA	26.7	40.0	28.6
	IBA	0.0	4.8	10.0
	フリー	80.0	40.0	0.0

表-5 六本スギの初代培養における平均不定芽数

基本培地	ホルモン	材 料		
		挿し木	継代挿し木	接ぎ木
1/2MS	BAP, NAA	3.8	2.9	3.6
	IBA	0.0	3.0	0.0
	フリー	7.5	3.0	0.0
1/2MS(市販)	BAP, NAA	3.1	3.6	5.0
	IBA	0.0	10.0	0.0
	フリー	4.0	4.0	0.0
液体肥料	BAP, NAA	3.1	2.1	3.3
	IBA	0.0	3.0	6.0
	フリー	4.3	2.5	0.0

表-6 六本スギの初代培養における平均シュート長 (mm)

基本培地	ホルモン	材 料		
		挿し木	継代挿し木	接ぎ木
1/2MS	BAP, NAA	10.6	18.5	4.0
	IBA	—	7.0	—
	フリー	28.0	10.8	—
1/2MS(市販)	BAP, NAA	6.5	12.9	5.0
	IBA	—	26.0	—
	フリー	8.7	6.5	—
液体肥料	BAP, NAA	5.5	5.3	5.8
	IBA	—	5.0	15.0
	フリー	6.8	9.0	—

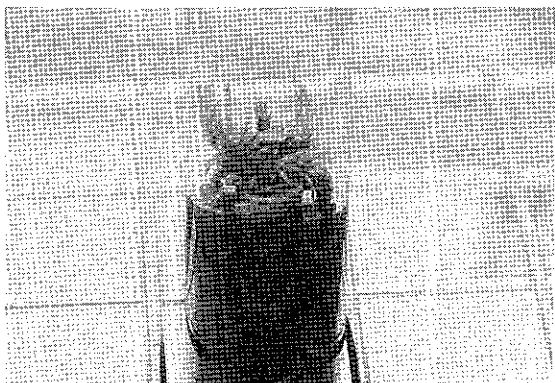


写真-1 多くの不定芽が発生した六本スギ

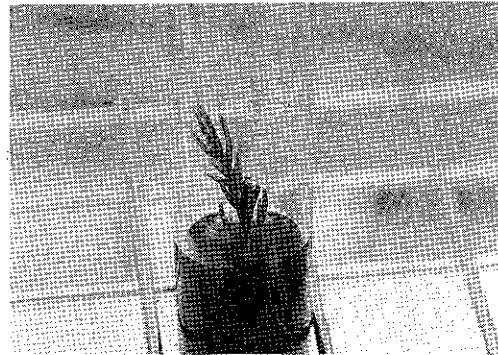


写真-2 一つの不定芽が長く伸ばした六本スギ

表-7 六本スギにおける継代回数と増殖率の関係

継代回数	増殖率
1回	1.5
2回	1.6
3回	1.3
4回	1.9

継代培養と同時に、不定芽から伸ばしたシュートの発根について検討した。基本培地の濃度、ホルモン条件の改良、IBA浸漬処理、活性炭培地、

暗黒処理等、様々な方法を検討したが、発根までにはいたらなかった。さらに発根条件の検討が必要である。

(2) サクラ老齢木

ア 冬芽の培養

冬芽の培養結果を表-8、9に示した。表-8の東栄町のサクラについては萌芽枝と栄養枝を用いたが、それらをシュートの伸長本数の合計と比較すると、8本と5本であまり差は見られない

が、シュートそのものは、萌芽枝を用いた場合の方が明らかに良好であった。また、冬芽が少し展開した段階で植えたものは表面殺菌の際の傷みはげしく、カルスができるものが多くあった。基本培地及びホルモンがシュートの伸長に及ぼす影響の検討まではいたらなかった。

表-9の稲武町のサクラについては、未展開の

段階で植えたものは供試数が少なくあまり参考にはならないが、少し展開した段階で植えた方がシュートの形成はよかった。この場合も東栄町のサクラの場合と同じように展開後植えたものはカルスができるものが多く、培地及びホルモンの影響まではわからなかった。

表-8 東栄町シダレ桜の冬芽培養結果

基本培地	ホルモン (mg/l)			区分	ステージ	供試数	汚染	枯死	変なし	シュート	カルス
	BAP	IBA	GA								
1/2MS	1.0	0.0	0.5	萌芽枝	未展開	7	2	3	0	2	0
1/2MS	1.0	0.0	5.0	"	"	7	4	2	1	0	0
1/2MS	1.0	0.1	0.5	"	"	7	3	3	0	1	0
1/2MS	1.0	0.1	5.0	"	"	7	1	4	0	2	0
MS	1.0	0.0	0.5	"	"	7	3	3	0	1	0
MS	1.0	0.0	5.0	"	"	7	3	3	0	1	0
MS	1.0	0.1	0.5	"	"	7	4	2	0	1	0
MS	1.0	0.1	5.0	"	"	7	3	2	0	0	2
1/2MS	1.0	0.0	0.5	栄養枝	展開	6	2	0	0	1	3
1/2MS	1.0	0.0	5.0	"	"	6	0	0	2	0	4
1/2MS	1.0	0.1	0.5	"	"	6	2	0	0	0	4
1/2MS	1.0	0.1	5.0	"	"	6	0	0	0	2	4
MS	1.0	0.0	0.5	"	"	6	1	1	0	0	4
MS	1.0	0.0	5.0	"	"	6	0	0	1	1	4
MS	1.0	0.1	0.5	"	"	6	1	0	0	1	4
MS	1.0	0.1	5.0	"	"	6	2	0	0	0	4

表-9 稲武町シダレ桜の冬芽培養結果

基本培地	ホルモン (mg/l)			区分	ステージ	供試数	汚染	枯死	変なし	シュート	カルス
	BAP	IBA	GA								
1/2MS	1.0	0.0	0.5	栄養枝	未展開	3	0	3	0	0	0
1/2MS	1.0	0.0	5.0	"	"	3	0	1	0	0	2
1/2MS	1.0	0.1	0.5	"	"	3	0	1	0	0	2
1/2MS	1.0	0.1	5.0	"	"	3	0	3	0	0	0
MS	1.0	0.0	0.5	"	"	3	0	2	0	0	1
MS	1.0	0.0	5.0	"	"	3	0	3	0	0	0
MS	1.0	0.1	0.5	"	"	3	0	3	0	0	0
MS	1.0	0.1	5.0	"	"	3	0	3	0	0	0
1/2MS	1.0	0.0	0.5	"	展開	8	0	0	1	4	3
1/2MS	1.0	0.0	5.0	"	"	8	0	0	2	2	4
1/2MS	1.0	0.1	0.5	"	"	8	0	0	1	6	1
1/2MS	1.0	0.1	5.0	"	"	8	0	0	3	2	3
MS	1.0	0.0	0.5	"	"	8	0	0	2	4	2
MS	1.0	0.0	5.0	"	"	8	0	0	1	4	3
MS	1.0	0.1	0.5	"	"	8	0	0	2	5	1
MS	1.0	0.1	5.0	"	"	9	0	0	8	1	0

イ 腋芽の培養

次に、腋芽を用いたときの培養結果をシュートの伸長量で比較し、表-10、11に示した。表-10の東栄町のサクラは萌芽枝と栄養枝を用いたが、萌芽枝を用いる方が良好であった。ホルモン条件については、IBAの効果はあまりはっきりしなかった。GA₃は0.5mg/lよりも5.0mg

/l加える方が良かった。培養1カ月後のシュートの平均伸長量が最大のものは、萌芽枝を材料として、ホルモン条件はBAPを1.0mg/l、IBAを0.1mg/l、GA₃を5.0mg/l加えた時で、14.1mmであった。

表-11の稲武町のサクラについては栄養枝だけを材料とした。その結果、培養1カ月後のシュ

表-10 東栄町シダレ桜の腋芽培養結果

枝の種類	基本培地	ホルモン(mg/l)			植付 本数	シュート伸長量(mm)		
		BAP	IBA	GA3		MAX	MIN	AVE
萌芽枝	1/2MS	1.0	0.0	0.5	20	12.0	2.0	5.9
萌芽枝	1/2MS	1.0	0.0	5.0	20	30.0	1.0	12.0
萌芽枝	1/2MS	1.0	0.1	0.5	20	6.0	1.0	4.2
萌芽枝	1/2MS	1.0	0.1	5.0	20	28.0	3.0	14.1
栄養枝	1/2MS	1.0	0.0	0.5	14	5.0	2.0	3.7
栄養枝	1/2MS	1.0	0.0	5.0	14	3.0	1.0	2.0
栄養枝	1/2MS	1.0	0.1	0.5	14	6.0	1.0	3.2
栄養枝	1/2MS	1.0	0.1	5.0	14	2.0	1.0	1.0

表-11 稲武町シダレ桜の腋芽培養結果

枝の種類	基本培地	ホルモン(mg/l)			植付 本数	シュート伸長量(mm)		
		BAP	IBA	GA3		MAX	MIN	AVE
栄養枝	1/2MS	1.0	0.0	0.5	18	7.0	3.0	4.2
栄養枝	1/2MS	1.0	0.0	5.0	18	6.0	1.0	3.0
栄養枝	1/2MS	1.0	0.1	0.5	18	17.0	3.0	8.5
栄養枝	1/2MS	1.0	0.1	5.0	18	9.0	3.0	6.1

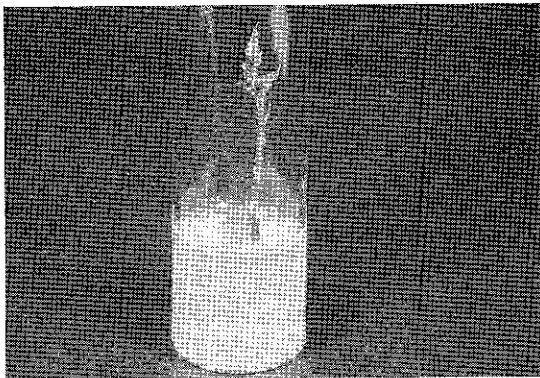


写真-3 シダレ桜腋芽からのシュート

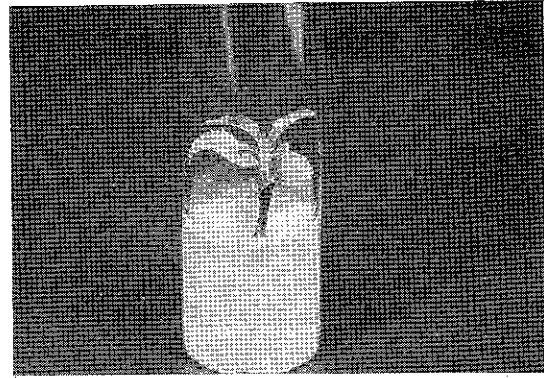


写真-4 シダレ桜腋芽からのシュート

ートの平均伸長量が最大のものは、ホルモン条件はBAPを1.0mg/l, IBAを0.1mg/l, GA₃を0.5mg/l加えた時で8.5mmであった。

その後、東栄町シダレ桜、稲武町シダレ桜ともに伸長したシュートを、発根培地へ植え替えたが、発根したものはなかった。暗黒処理や早い周期での植え替え等を検討する必要がある。

以上の結果から、東栄町、稲武町のシダレ桜ともに、腋芽を用いる方が効率的に増殖が進められると思われる。

3. 種苗の外環境順化促進技術の開発

スギ老齢木の組織培養について、発根の促進及び環境順化の効率化のために、発根培養での支持体を検討した。その結果、支持体を寒天からバーミキュライトに変えることによって、発根を促進することにはならなかった。しかし、寒天を用いた時と同様に不定芽の増殖、伸長がみられた(写真-5)。このことから、支持体にバーミキュライトを使うことは、植え替え作業のかわりに液体培地の補給ですむため、初代培養あるいは継代培

養の作業の効率化がはかられることがわかった。

また、発根していない組織を直接外環境にだすことにより、発根順化の過程の簡略化を検討したが、発根するものはなかった。しかし、将来、試験管内での発根条件が明らかになれば、このような直接外環境へ出す方法でもうまくいく可能性があるように思われる。



写真-5 パーミキュライトを支持体とした培地でのシュートの伸長