

## 有用林床植物の改良と増殖に関する研究

昭和63年度～平成4年度 (単県)

平 山 一 木  
竹 内 英 男  
中 山 学

### 要 旨

タラノキ4品種(蔵王1号、蔵王2号、駒みどり、改良駒みどり)を用い、組織培養による大量増殖を検討した。その結果、蔵王1号、蔵王2号、駒みどりでは、葉柄の切口から誘導したカルスを再分化培地に植え代えることにより、植物体を再生することができた。材料は水さしにより萌芽させた枝の葉柄を用い、表面殺菌を70%エタノールと有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で行うことにより、雑菌による汚染はほとんどなかった。初代培養には無機塩の濃度を2分の1にしたMS培地に、BAPと2,4-Dをそれぞれ1.0mg/l<sup>2</sup>加えた培地が適しており、そこで誘導されたカルスを再分化用の培地(初代培地と同じ培地にホルモンを加えない培地)に植え代えることにより植物体を再生することができた。そして、カルスから再生した植物体は根を良く洗い、寒天をおとし、パーミキュライトを入れた鉢へ植え代え、最初のうちはピーカーをかぶせ湿度を保つことにより容易に順化することができた。

### I. はじめに

近年、食生活の多様化や、自然食指向により山菜の需要が増加している。また、山菜は栽培期間が短いことから、林家の短期収入源の拡大に役立つと考えられる。林内空間を有効に利用し、山村経済の振興に寄与することを目的として、有用林床植物の優良種を選抜し、バイオテクノロジーを利用した優良個体の大量増殖法の確立について検討した。ここでは、組織培養によるタラノキの増殖試験の結果を報告する。

### II. 材料及び方法

#### 1. 材料の調整

愛知県林業センター苗畑内に植栽されているタラノキ4品種(蔵王1号、蔵王2号、駒みどり、改良駒みどり)の先端部約30cmを材料とした。それらは、3月に各品種5~20本を伐り冷蔵庫で保存しておき、実験を行う2~3週間前に恒温器内へ水さしし、その萌芽枝の葉柄を用いた。

表面殺菌は70%エタノールで1分、ツイン20を添加した有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で3~5分行った。表面殺菌後、クリーンベンチ内で滅菌水ですすぎ、滅菌る紙上で5mm程度の長さになり斜面培地の表面に横に置いた。

#### 2. 初代培養

初代培養にはカルスを誘導するために、無機塩

濃度を2分の1にしたMS培地 (Murashige and Skoog) にシヨ糖 3%、寒天 0.8%を加えた培地を基本培地 (以下1/2 MS培地という) とし、植物ホルモンとしてBAP (ベンジルアミノプリン) を0.1~1.0mg/ℓ、2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) を0.5~5.0mg/ℓ加えた。培養用の試験管は直径25mmで長さ12cmのものを使い、培地の滅菌はオートクレーブにより、121°Cで20分を行った。なお、基本培地の組成を表-1に示した。

### 3. 継代及び再分化培養

葉柄を初代培地へ植え付け後、40日から50日で植え代えを行なった。初代培養で誘導されたカルスを継代用の培地と再分化用の培地、2つの培地へ植え代えた。その際に、試験管1本ごとにカルスの重量を測定した。継代用の培地はカルスを誘導させた培地と同じ培地、そして再分化用の培地には初代培養と同じ基本培地に、植物ホルモンを何も加えない培地を用いた。

表-1 培養に用いた培地の組成

組成	1/2 MS (mg/ℓ)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	220
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	13.9
Na <sub>2</sub> -EDTA	18.7
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0125
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.125
KI	0.415
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1
ニコチン酸	0.5
塩酸ピリドキシン	0.5
塩酸チアミン	0.1
イノシトール	100
L-グルタミン	2
シヨ糖	30,000
寒天	8,000

## III. 結果と考察

### 1. 初代培養

1/2 MS培地に、植物ホルモンとしてBAPを0.1, 1.0mg/ℓの2水準、2,4-Dを0.5, 1.0, 5.0mg/ℓ加えた計6通りの培地で初代培養を行った。植え付けた葉柄の採取位置は、付け根から第2節目までを葉柄下部、それより上を葉柄上部、そして小葉部の三つにわけた。そして、培地に加える植物ホルモンの濃度及び葉柄の採取位置によるカルス形成について、その重量の平均値を品種ごとに比較した。

蔵王1号についての結果を図-1に示した。培地に加える植物ホルモンの濃度について検討してみると、BAPは0.1mg/ℓの時よりも1.0mg/ℓの時の方がカルスの形成は良好であった。2,4-Dは5.0mg/ℓと高濃度加えた場合には、カルスはほとんど形成されなかった。カルスの形成が良好であったのはBAPと2,4-Dの組合せが1.0と0.5の時であったが、この時の採取位置によるカルス形成を比較すると、葉柄上部と葉柄下部を用いた場合は同じくらいであり、小葉部を用いた場合はそれよりも劣っていた。

蔵王2号についての結果を図-2に示した。培地に加える植物ホルモンの濃度について検討してみると、蔵王1号の場合と同じくBAPは0.1mg/ℓの時よりも1.0mg/ℓの時の方がカルスの形成は良好で、2,4-Dは5.0mg/ℓと高濃度加えた場合には、カルスはほとんど形成されなかった。カルスの形成が良好であったのはBAPと2,4-Dの組合せが1.0と0.5の時及び1.0と1.0の時であったが、この時の採取位置によるカルス形成を比較すると、葉柄上部と葉柄下部を用いた場合は、どちらがよいとは言えなかったが、小葉部を用いた場合はどちらよりも劣っていた。このように、

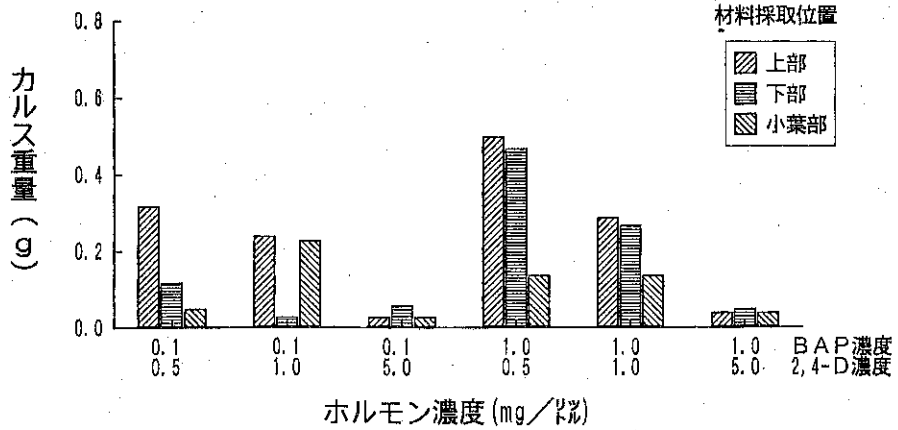


図-1 蔵王1号のホルモン濃度及び採取位置別カルス重量

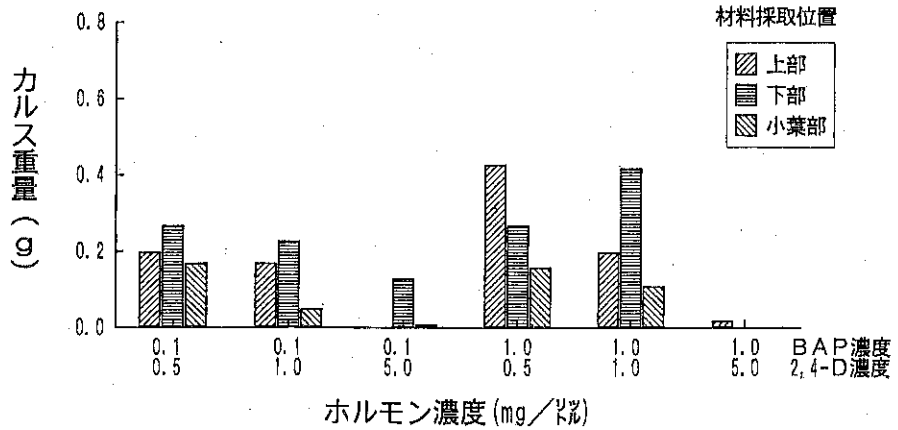


図-2 蔵王2号のホルモン濃度及び採取位置別カルス重量

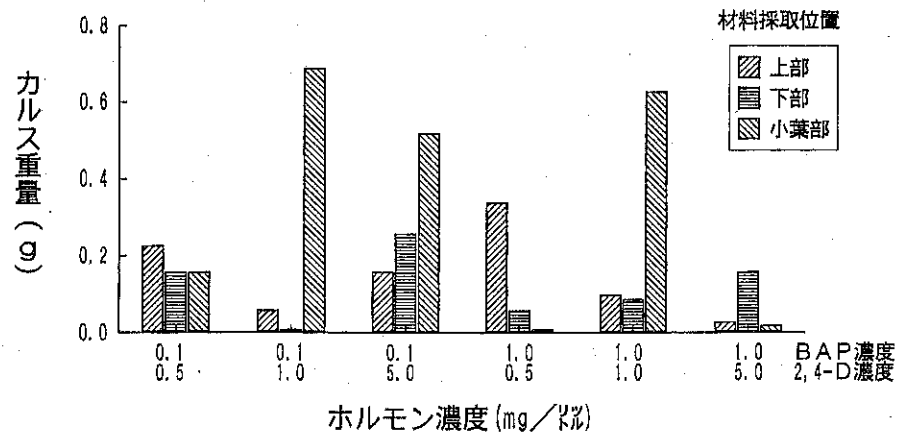


図-3 駒みどりのホルモン濃度及び採取位置別カルス重量

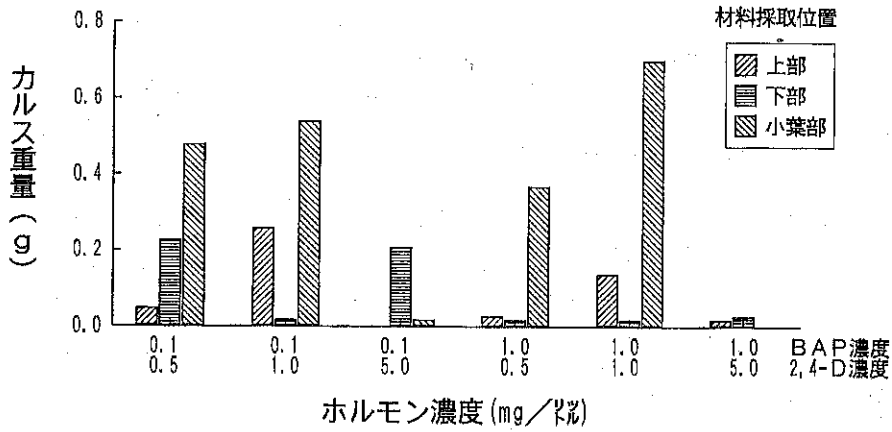


図-4 改良駒みどりのホルモン濃度及び採取位置別カルス重量

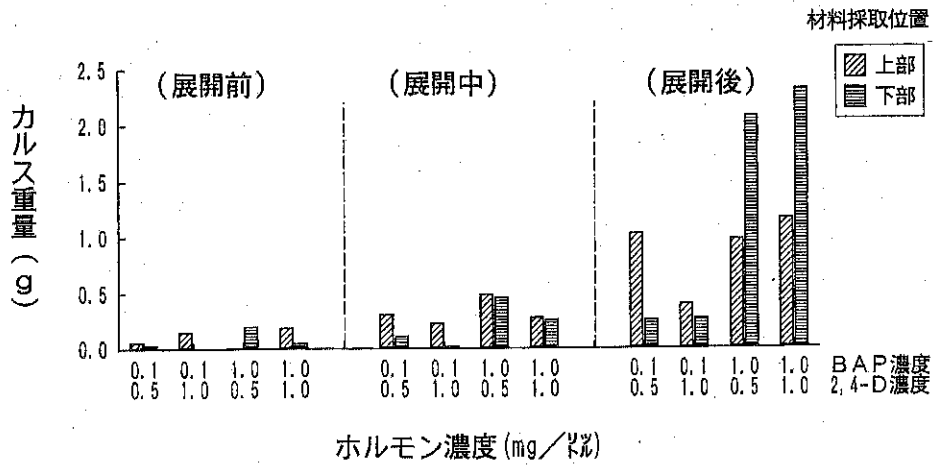


図-5 蔵王1号の材料採取ステージによるカルス重量の違い

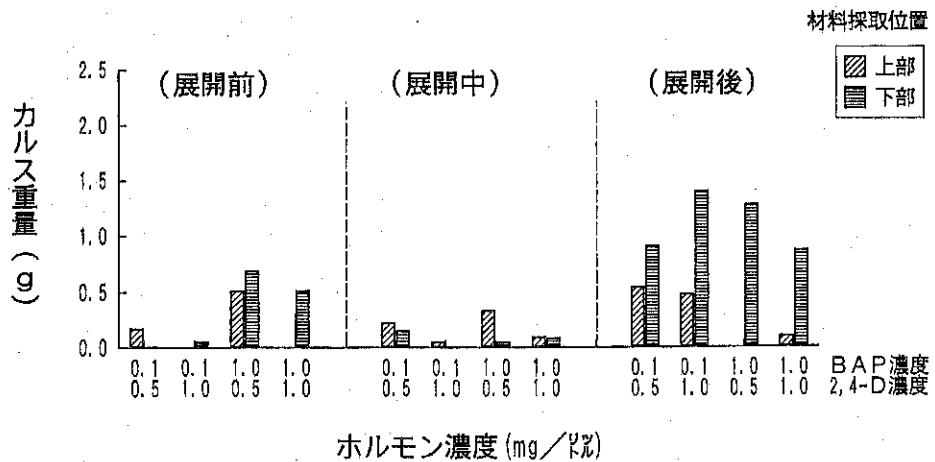


図-6 駒みどりの材料採取ステージによるカルス重量の違い

蔵王2号は蔵王1号と同じような傾向を示した。蔵王1号と蔵王2号は親木の外形もよく似ているが、カルスの形成についてもよく似た傾向を示した。

駒みどりについての結果を図-3に示した。この場合、ホルモン濃度によるカルス形成の違いはあり、採取位置による違いもあるが、カルスの形成に最適なホルモン濃度の組合せ、カルスの形成に適した葉柄の採取位置をはっきりさせることはできなかった。しかし、蔵王1号・蔵王2号の場合と比較すると2,4-Dを5.0mg/ℓと高濃度で加えたときでも、BAP 0.1mg/ℓとの組合せではかなりカルスの形成は良好であった。そして、小葉部を用いた時の方が、葉柄上部あるいは下部を用いたときよりもカルスの形成は良好であった。

改良駒みどりについての結果を図-4に示した。培地に加える植物ホルモンの濃度について検討してみると、BAPが1.0mg/ℓの時よりも0.1mg/ℓの時の方が良好で、2,4-Dが5.0mg/ℓ入るとほとんどカルスは形成しなかった。そして、葉柄の採取位置では、小葉部を用いたときが非常に良く、葉柄上部及び下部を用いた場合あまりカルスの形成は良くなかった。

このように品種によりカルス形成にもそれぞれ特徴があることがわかった。

次に、蔵王1号と駒みどりをを用い、材料の採取ステージがカルスの形成に及ぼす影響について検討した。材料のステージは、芽がふき始めたばかりの葉が展開する前と、完全に展開する直前の展開中と、完全に展開した後の3段階で比較した。なお、培地は、1/2MS培地にBAPを0.1, 1.0mg/ℓの2水準及び2,4-Dを0.5, 1.0mg/ℓの2水準加えた計4通りの培地を使った。それぞれ形成されたカルスの重量の平均を図-5, 図

-6に示した。蔵王1号の場合(図-5)、材料の採取段階は展開後、展開前、展開中の順でカルスの形成は良好で、展開後の材料を用いた場合が一番良かった。駒みどりの場合(図-6)、材料の採取段階は展開後、展開中、展開前の順でカルスの形成は良好で、蔵王1号の場合と同じく展開後の材料を用いた場合が一番良かった。

以上のことから、形成されるカルスの量だけで判断すると、蔵王1号、蔵王2号では葉柄の上部あるいは下部を用い、1/2MS培地に植物ホルモンをBAPを1.0mg/ℓと2,4-Dを0.5~1.0mg/ℓ加えた培地がよく、駒みどり、改良駒みどりでは小葉部の葉柄を用い、1/2MS培地に植物ホルモンとしてBAPを0.1~1.0mg/ℓと2,4-Dを1.0mg/ℓ加えた培地がよいと言える。そして、材料は葉が完全に展開した段階で採取することが望ましい。しかしこのことは、どの培地、どの位置から採取した葉柄からも同じカルスができるとした場合であるので、以下に述べる再分化能とも関連させて初代培養に適した培地、あるいは葉柄の採取位置、材料の採取ステージ等を検討する必要がある。

## 2. 継代及び再分化培養

初代培養で、カルスが少しでも形成されたものについてはすべて継代用の培地と再分化用の培地に植え代えた。その結果、誘導されたカルスを再分化培地、すなわちホルモンフリーの1/2MS培地へ植え代えることにより、蔵王1号で128個体中26個体、蔵王2号で57個体中18個体、駒みどりで108個体中2個体が、カルスから植物体が再生した。ある程度の個体が再分化した蔵王1号および蔵王2号で、初代培養でカルスを誘導したときの、培地に加える植物ホルモンの濃度、材料の採取位置、材料の採取ステージ等の諸条件と再分

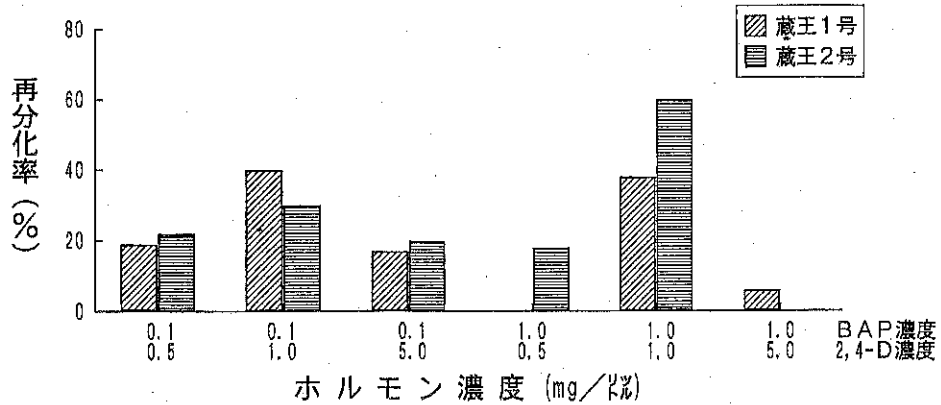


図-7 蔵王1号と蔵王2号の初代培養の時のホルモン濃度別再分化率

化率との関係について検討した。

図-7に蔵王1号および蔵王2号の初代培養時のホルモン濃度と、その時誘導されたカルスを再分化培地へ移したときの再分化率を示した。蔵王1号では、BAPを1.0mg/l、2,4-Dを0.5mg/lの組合せで加えた培地から誘導されたカルスからは再分化個体は得られなかったが、それ以外の培地で誘導されたカルスからはすべて植物体が再生してきた。中でもBAPを0.1mg/lと2,4-Dを1.0mg/lあるいはBAPを1.0mg/lと2,4-Dを1.0mg/l加えた培地で誘導されたカルスからの再分化率がよく、40%と38%であった。蔵王2号では、BAP 1.0mg/lと2,4-D 5.0mg/lの組合せの時以外は全ての培地で誘導されたカルスから植物体が再生してきた。中でもBAPを1.0mg/lと2,4-Dを1.0mg/l加えた培地から誘導されたカルスからの再分化率が60%と最もよく、次に良かったのは、BAP 0.1mg/lと2,4-D 1.0mg/lの時で再分化率は30%であった。カルスの誘導から再分化までを考えると、ある程度のカルスが初代培養で誘導され、そしてそれを再分化培地に移したときに効率的にカルスから植物体が再分化することが重要である。再分化と、1.

の初代培養でのカルス誘導と合わせて検討すると、蔵王1号および蔵王2号の場合、1/2MSを基本培地とした時は、初代培養の培地に加える植物ホルモンは、BAPを1.0mg/lと2,4-Dを1.0mg/lが適していると言える。

次に初代培養での材料採取位置（葉柄上部、葉柄下部、小葉部）と、そのカルスを再分化培地へ移したときの再分化能との関係について、蔵王1号の場合と蔵王2号の場合と合わせて検討した。その結果は図-8のとおりで、どの採取位置から採取したものでも、その後の再分化率は20~30%でほとんど違いはなかった。蔵王1号、蔵王2号ではカルスの形成では葉柄上部と葉柄下部がよく、小葉部はそれよりも劣っていたが、再分化に関してはあまり違いはないので、通常は葉柄上部及び下部を利用し、あまり材料が用意できないときは小葉部までも使えば良いと考えられる。

材料の採取ステージと、そのカルスを再分化培地へ移したときの再分化能との関係について、同じく蔵王1号の場合と蔵王2号の場合を合わせて検討した。その結果は図-9のとおりで、どのステージで採取したものも、その後の再分化率は20~30%であまり違いはなかった。初代培養でのカ

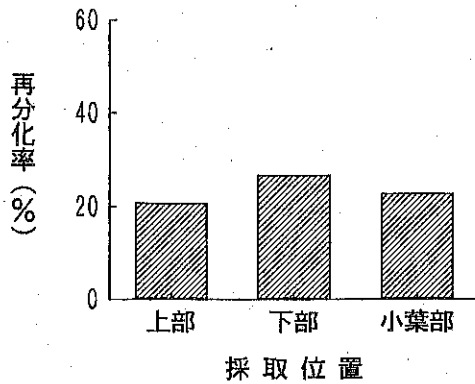


図-8 初代培養時の材料採取位置と再分化率の関係

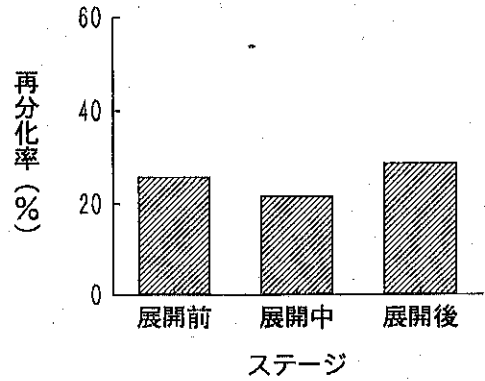


図-9 初代培養時の材料採取ステージと再分化率の関係

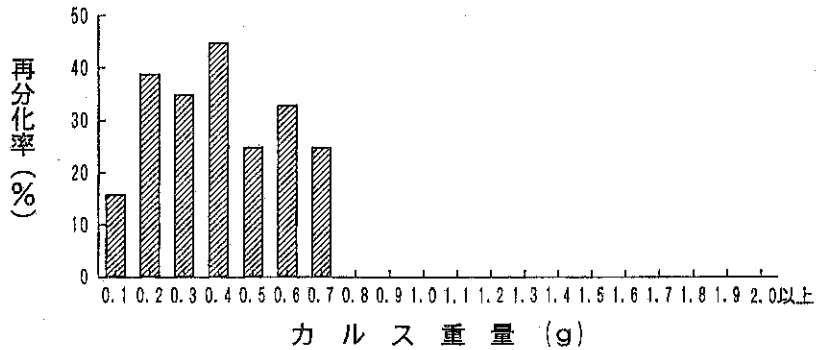


図-10 初代培養でのカルス重量と再分化率の関係

ルスの形成では展開後の材料を使うのが最も良かったが、これは同時に雑菌による汚染も増加すると思われる。再分化に関してはあまり違いはないので、ステージのことはあまり気にしないで、材料が充分得られる程度に展開してから、あまり遅くならない段階で材料を採取することが望ましい。

最後に初代培養でのカルス重量と、そのカルスを再分化培地へ植え代えたときの再分化率を比較してみた。その結果は図-10のとおりで、初代培養で0.8g以上カルスのできたカルスから再分化したものは1個体もなかった。初代培養でできたカルスの重量分布は非常にかたよっており、ほとんどのカルスは0.5g以下で0.8g以上のもの

は全体の1割程度しか占めていないので、はっきりとは言えないが、あまり増殖が良好なカルスは再分化能を持たないのかもしれない。

以上のことをまとめると、蔵王1号、蔵王2号では、水さし木からの萌芽枝の葉柄を、初代培地に植え付け、その後誘導されたカルスを再分化培地へ植え代えることにより、植物体を再生することができた。その場合、植え付ける葉柄は、萌芽枝がちょうど展開した程度の時に採取するのがよい。植え付ける部位は葉柄上部・下部がよく、材料が足りないときは小葉部を使ってもよい。初代培養は1/2MS培地にBAPと2,4-Dをそれぞれ1.0mg/l添加した培地を用い、再分化培地にはホルモンフリーの同じく1/2MS培地がよい。

今回は、蔵王1号と蔵王2号では、実験全体の20～30%で再分化個体が得られたが、駒みどりと改良駒みどりではほとんど再分化した個体はなかった。初代培地に加えるホルモン濃度の幅をもう少し広げて実験を行ない、駒みどり及び改良駒みどりについても、初代培地のホルモン条件を究明する必要がある。

また、今回再分化培地へ植え代える際に継代培地にも植え代えたが、継代培地へ植え代え、そこで増殖させたカルスからも再分化培地へ植え代えることにより、植物体を再生させることができた。この方法では、少しのカルスからでもたくさんの植物体を再生させることが可能で、ほぼ無限に近い増殖率が期待できる。この方法は、大量増殖には非常に有効な手段である。しかし、カルスからの培養では同時に変異が多いことも知られており、そのことについても今後検討する必要がある。

### 3. 順化について

再分化培地で再生した植物体については、試験管から取り出し、寒天をよく洗い流しパーミキュライトを入れた鉢に植えた。そして最初はピカをかぶせ湿度を保つことにより容易に順化することができた。

## IV. 参考文献

1. 藤島勇：タラノメ，114pp，農文協，東京，1981
2. 貝守昇：バイオテクノロジー利用による「タラノキ」の大量増殖，農業および園芸61，75～77，1986
3. 小山真澄：カルスからの不定胚形成によるタラノキの増殖，第23回林業技術シンポジウム，11～17，1990
4. 小山真澄：トゲナシタラノキの組織培養，

林木の育種 163，4～7，1992

5. Murashige, T. and Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15 : 437～497, 1962

### 普及指導上の留意点

タラノキは、水さしにより萌芽させた枝の葉柄を寒天上に植え付け、その切口から誘導されたカルスを培養し、植物体を大量に増殖できることが可能になった。この方法ではほぼ無限に近い増殖率が期待できる。しかし、同時にこのカルス培養では、変異がおこりやすいことが知られており、再生した植物体の変異について確認する必要がある。