

# 若い実生の冬芽培養によるイタヤカエデ幼植物体の再生

山本茂弘<sup>1)</sup>・山田晋也<sup>1)</sup>・片井秀幸<sup>1)</sup>・袴田哲司<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 農林技術研究所森林・林業研究センター

## *In vitro* Plantlet Regeneration from Winter Buds of Juvenile Seedlings of Itayakaede (*Acer mono* var. *marmoratum* f. *dissectum*)

Shigehiro Yamamoto<sup>1)</sup>, Shinya Yamada<sup>1)</sup>, Hideyuki Katai<sup>1)</sup> and Tetsuji Hakamata<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Forestry and Forest Products Research Center/Shizuoka Res.Inst.of Agric.and For.

### Abstract

Painted maple (*Acer mono* var. *marmoratum* f. *dissectum*) is one of the valuable tree species providing timber and other benefits. However, the techniques of clonal and seed propagation are difficult, so we studied the conditions of plantlet regeneration by tissue culture using winter buds from 2-years-old juvenile seedlings. As the results of this study, the suitable conditions about the primary culture medium, the combination and concentration of plant hormones to add, the rooting medium, the acclimatization of plantlets to the outdoors, and the possibility of subculture were revealed.

The following points were recognized in this study.

1. For the elongation of shoots that will be able to root easily from winter buds, it seemed that WPM medium with 0.5 mg/L of BAP (6-benzylaminopurine) were suitable. And the addition of 0.5 mg/L of GA<sub>3</sub> (gibberellin A<sub>3</sub>) was suitable for the sprouting of leaves.
2. It seemed that 1/2MS medium was suitable for rooting medium with vermiculite as a support material used for the rooting medium in order to raise the rooting ratio.
3. With an easy planting method and humidity management we were able to perform acclimatization of the plantlets easily in about two weeks.
4. It seemed that WPM medium with 0.5 mg/L of BAP (6-benzylaminopurine) and 0.5 mg/L of GA<sub>3</sub> (gibberellin A<sub>3</sub>) were suitable for the subculture to elongate the shoots. It also seemed that these shoots promoted an increase in the rooting ratio.

キーワード：イタヤカエデ, 冬芽, 組織培養, 伸長, 発根

## I 緒 言

イタヤカエデは、樹高 25m に達し、材は器具、農具、家具、楽器、彫刻などに用いられるほか庭園木等さまざまな用途に利用される代表的な有用広葉樹のひとつである<sup>2)</sup>。しかし、挿し木が困難で、種子の結実には年による豊凶があり、さらに種子の長期貯蔵技術が確立されていない<sup>4)</sup>。そのため、優良個体・系統の安定的増殖技術の確立が求められている。

本研究では、組織培養によるイタヤカエデの増殖技術の確立を目指した。組織培養によるカエデ類の植物体再生例はほとんど知られていない。ここでは、将来選抜が予想される優良個体の汎用的なクローン増殖技術の確立のための知見を得るため、遺伝的背景が異なり、組織培養が比較的容易と考えられる複数の若い実生の冬芽を材料とし、冬芽からのシュートの伸長に適した植物ホルモンの種類と濃度及び培地組成、並びにシュートの発根に適した培地組成、発根培地支持体について検討した。また、

安定的な増殖のための培養容器内での継代培養の可能性についても検討した。

## II 材料及び方法

### 1. 冬芽からのシュート伸長

#### (1) 伸長培地に添加する植物ホルモンの検討

材料の実生苗は、静岡県川根本町の大札山（標高1374m）の山頂付近に自生するイタヤカエデ（胸高直径20cm, 樹高10m）から、2005年10月に採種し、2006年3月に播種後、口径10.5cmのポットで育苗した。そして、2008年1月31日、約1mほどに成長した苗木15個体から冬芽を付けた軸を切り取り、表面殺菌処理のため、70%エタノールをハンドスプレーで滴る程度に噴霧した。表面が乾燥してから、滅菌したピンセットで表面の芽鱗をすべて剥がした冬芽をメスで切り取り外植体とした。

冬芽の培養に適した植物ホルモンの検討のため、0.25, 0.5mg/Lの2段階の濃度の6-ベンジルアミノプリン(BAP)と0, 0.25, 0.5mg/Lの3段階のジベレリンA<sub>3</sub>(GA<sub>3</sub>)を組み合わせ添加した6種類の伸長培地を用意した。そして、外植体を各個体2個ずつ計30個挿し付けた。このとき、個体差のみならず、冬芽の着生位置により伸長の仕方が異なること<sup>3)</sup>が予想されるため、各培地に挿しつける冬芽の着生していた位置が偏らないように差し付けた。培地の基本組成は、Woody Plant Medium培地(WPM培地)<sup>5)</sup>を用いた。WPM培地の組成を表1に示す。

#### (2) 伸長培地の種類の検討

材料の実生苗は、前出と同様に養成し、2008年3月19日に4個体から冬芽を付けた軸を切り取り、同様に表面殺菌後、外植体の調整を行った。

冬芽の培養に適した培地の検討のため、BAP, GA<sub>3</sub>ともに0.5mg/Lを添加したMurashige Skoog培地<sup>6)</sup>の無機塩類を1/2の濃度に改変したもの(1/2MS培地)、WPM培地、Broadleaved tree Medium培地(BTM培地)<sup>1)</sup>に外植体を各個体4~5個ずつ計19個を挿し付けた。各培地の組成を表1に示す。

### 2. シュートの発根

#### (1) 発根培地の種類の検討

発根に適した培地の検討のため、3-インドール酪酸(IBA)0.5 mg/Lと1-ナフタレン酢酸(NAA)0.02 mg/Lを添加した1/2MS培地及びWPM培地を用意した。この発根培地の支持体には寒天の代わりにパーミキュライト10mLを用いた。

そして、1. (1) 冬芽の伸長に対する植物ホルモンの

検討試験において、養開始約71日後、長さ10mm以上のシュートを切り取り、各培地に12本ずつ挿し付けた。このとき、前歴となる初代培養の植物ホルモンの組合せや培地の種類及びシュートの大きさや特定の個体が、偏らないように挿し付けた。

#### (2) 発根培地支持体の検討

発根培地には、IBA 0.5 mg/LとNAA 0.02 mg/Lを添加した1/2MS培地を用いた。発根培地の支持体には、寒天(0.8%)、パーミキュライト(10mL)を用いた。それぞれ寒天培地、パーミキュライト培地と呼ぶ。

そして、1. (2) 伸長培地の種類の検討試験において、培養開始55日後、長さ10mm以上のシュートを切り取り、培地の前歴や大きさ、個体が偏らないように各培地に16本ずつ挿し付けた。

### 3. 継代培養

1. (2) 伸長培地の種類の検討試験において、培養開始55日後に、発根試験用シュートの切り取りの有無に関わらず、外植体基部付近のカルスや枯死した枝葉を切り取りBAP, GA<sub>3</sub>ともに0.5mg/Lを添加した同じ種類の培地に継代シュートを再度伸長させた。

さらに、継代培養から数えて44日後、再び、10mm以

表1 各培地の基本組成 (mg/L)

組 成	培 地		
	1/2MS	WPM	BTM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	400	165
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			240
KNO <sub>3</sub>	950		190
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990	860
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	220	96	44
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O		556	640
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	185	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	170	270
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	13.9	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA <sup>1)</sup>	18.65	37.3	37.3
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	11.15	22.3	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.3	8.6	8.6
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0125		0.02
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0125	0.25	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.125	0.25	0.25
KI	0.415		0.15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1	6.2	6.2
ニコチン酸	0.5	0.5	0.5
塩酸ピリドキシン	0.5	0.5	0.5
塩酸チアミン	0.1	1.0	1
ミオイノシトール	100	100	100
L-グリシン	2	2	2
L-グルタミン			2
ショ糖	20,000	20,000	20,000
寒天	8,000	8,000	8,000

1) エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム。

上に伸長したシュートをバーミキュライトを支持体とする発根培地 (IBA 0.5 mg/L と NAA 0.02 mg/L を添加した 1/2MS 培地) に挿しつけた。

以上の培養には口径 25 mm, 長さ 150 mm のガラス試験管を用い, 培地 10 mL (バーミキュライト培地では寒天を含まない培地液量 10mL) を注いだ後, 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。培地の pH は 5.8 に調整した。培養条件は, 蛍光灯照明による約 5000 Lx, 16 時間日長, 室温約 25°C に保ち管理した。

### III 結果及び考察

#### 1. 冬芽からのシュート伸長

##### (1) 伸長培地に添加する植物ホルモンの検討

外植体挿し付け後約 1 週間で冬芽が膨らみ, 葉が開き, やがてシュートの伸長が始まった。各植物ホルモンの組合せごとの, 培養開始から 51 日後の伸長状況を写真 1 及び図 1 に示す。雑菌による汚染率は約 2% と低かった。長さ 10mm 以上のシュートの伸長した外植体数は各組み合わせごとに 0~6 本 (外植体当たり 0~0.20 本) であった。シュート長及び葉数について, BAP 濃度と GA<sub>3</sub>濃度の二元配置の分散分析を行った結果, 葉数に BAP 濃度間で 5% 水準の有意な差が認められた他は, 差は認められなかった (表 2)。シュート長及び葉数の平均値は, BAP 濃度が 0.25mg/L の場合は, GA<sub>3</sub>濃度が高まるにつれて増加した。この BAP 濃度では GA<sub>3</sub>濃度が 0.25mg/L 以下ではシュートの伸長する外植体はほとんどなかった。BAP 濃度が 0.5mg/L の場合は GA<sub>3</sub>濃度による大きな違いは見られなかった (図 1)。GA<sub>3</sub>濃度が 0.5mg/L の場合は葉が比較的大きく展開した (写真 1)。シュートの伸長, 葉数及び葉の展開の状況から, 本試験の範囲内では, 伸長培地に添加する植物ホルモンとして, BAP を 0.25 又は 0.5 mg/L と GA<sub>3</sub>を 0.5 mg/L の濃度の組合せが適していると思われる。

##### (2) 伸長培地の種類の検討

培養開始から 49 日後の伸長状況を 図 2 に示す。雑菌による汚染率は約 2% と低かった。

長さ 10mm 以上のシュートの伸長した外植体数は各培地ごとに 9~15 本 (外植体当たり 0.50~0.79 本) となり, WPM 培地で多かった。シュート長及び葉数について, 伸長培地の種類の一元配置の分散分析を行った結果, シュート長, 葉数とも伸長培地間に 1% 水準で有意な差が認められた (表 3)。シュート長の平均値は, WPM 培地で他の培地より大きかった。葉の枚数は培地による大きな違いは見られなかった。本試験の範囲内では, 伸長培

地の培地の種類として, WPM 培地が適していると思われる。

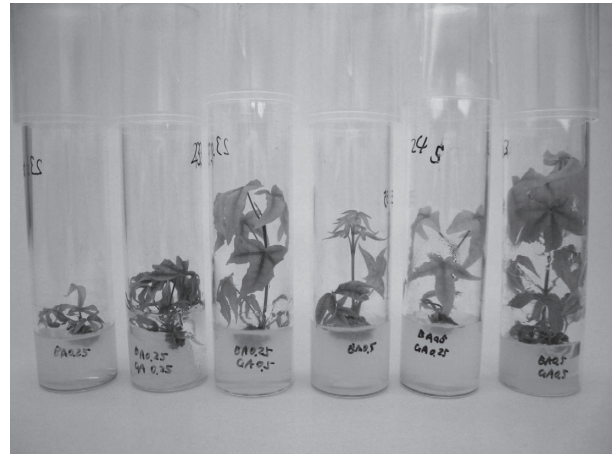
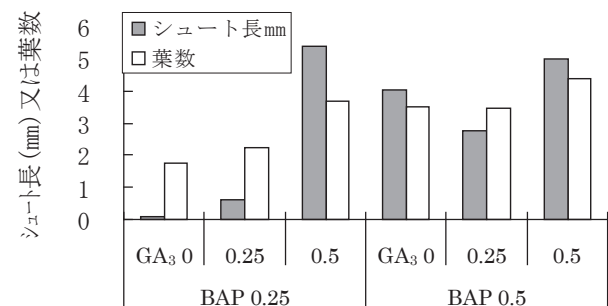


写真 1 外植体からのシュート伸長 (51 日後)

左側 3 本は BAP 0.25mg/L, 右側 3 本は BAP 0.5mg/L  
各 BAP 濃度とも左から GA<sub>3</sub> 0, 0.25, 0.5mg/L



植物ホルモンの組合せと濃度 (mg/L)

図 1 伸長培地に添加した植物ホルモンの組合せとシュート長及び葉数 (51 日後)

表 2 伸長培地に添加した植物ホルモンとシュート長, 葉数別の二元配置分散分析の結果

	要因	平方和	自由度	平均平方	F 値
シュート長	合計	14270.0	175		
	BAP 濃度	149.1	1	149.1	1.871 ns
	GA <sub>3</sub> 濃度	436.0	2	218.0	2.735 ns
	交互作用	136.0	2	68.0	0.854 ns
	誤差	13548.8	170	79.7	
葉数	合計	1962.7	172		
	BAP 濃度	60.7	1	60.6	5.540 *
	GA <sub>3</sub> 濃度	65.6	2	32.8	2.994 ns
	交互作用	7.7	2	3.9	0.353 ns
	誤差	1828.7	167	11.0	

ns : 有意な差はない, \* : 5% 水準で有意な差がある

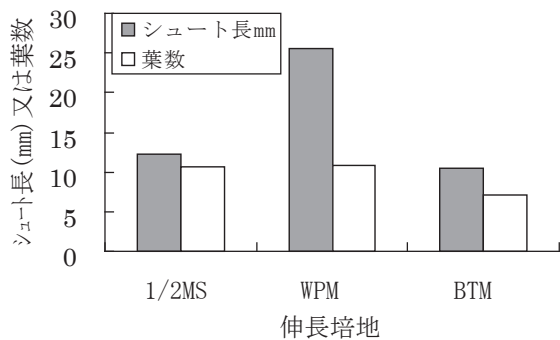


図2 伸長培地の種類とシュート長及び葉数(49日後)  
異なる英文字間には有意な差がある (Scheffe's test,  $p < 0.05$ )

表3 伸長培地の種類とシュート長、葉数別の一元配置分散分析の結果

要因	平方和	自由度	平均平方	F値	
合計	12517.6	55			
シュート長	培地	2528.4	2	1264.2	6.708 **
	誤差	9989.1	53	188.5	
合計	797.6	55			
葉数	培地	170.4	2	85.2	7.200 **
	誤差	627.2	53	11.8	

\*\* : 1%水準で有意な差がある。

## 2. シュートの発根

### (1) 発根培地の種類の検討

発根培地に挿しつけて約2週間後から発根が始まり、60日以後は発根するシュートは見られなかった。

60日後の培地ごとの発根率を図3に示す。発根率は1/2MS培地が67%, WPM培地が58%と前者でやや高かった。発根培地の種類は1/2MS培地のほうが適していると思われる。

ここで、前歴となる伸長培地の植物ホルモンの組合せごとに、発根して再生した幼植物体の外植体1本当りの本数を図4に示す。この幼植物体数は、伸長培地のBAP濃度が0.25mg/Lでは0.03~0.07本と少なかった。一方、BAP濃度が0.5mg/Lであった場合、0.14~0.17本であり、GA<sub>3</sub>濃度に関わらず多かった。このことから、幼植物体を多く得るには、伸長培地のBAP濃度が0.5mg/Lが適することがうかがわれる。

### (2) 発根培地支持体の検討

発根培地に挿しつけて43日以後は発根するシュートは見られなかった。

43日後の培地支持体ごとの発根率を図5に示す。発根率は寒天培地が50%, パーミキュライト培地が69%と後者で高かった。発根した幼植物体の根は、寒天培地では細根が少なく軟弱で、基部切り口に径1cm前後のカルスができることが多いのに対し、パーミキュライト培地ではカルスはあまり発達せず比較的細根が多かった(写

真2)。

寒天培地よりパーミキュライト培地で発根率や根の状態が良いことはクヌギ<sup>8)</sup>、ケヤキ<sup>7)</sup>、ジゾウカンバ<sup>9)</sup>などで報告例があり、多くの樹種で利用できる可能性がある。

ここで、前歴となる伸長培地の培地の種類ごとに、発根して再生した幼植物体の外植体1本当りの本数を図6に示す。この幼植物体数は0.21~0.47本で、1/2MS培地で少なくWPM培地で多かった。このことから、幼植物体を多く得るには、伸長培地にWPM培地を用いるのが適することがうかがわれる。

幼植物体は、試験管から取り出し、水道水で根を軽く洗い流し、赤玉土、パーミキュライト及びピートモスを3:1:1の容積比で混合した用土を用い、口径75mmのビニールポットに植え付けた。そして、チャック付きのポリ袋に入れて密閉し、約5000Lx、16時間日長、室温25°Cの条件下に7日間置いた。その後、ポリ袋の口を開けて周囲湿度約70%の状態に7日間経過後、約50%遮光した屋外の網室内に移し、ミストかん水による管理を行うことで容易に順化できた(写真3)。

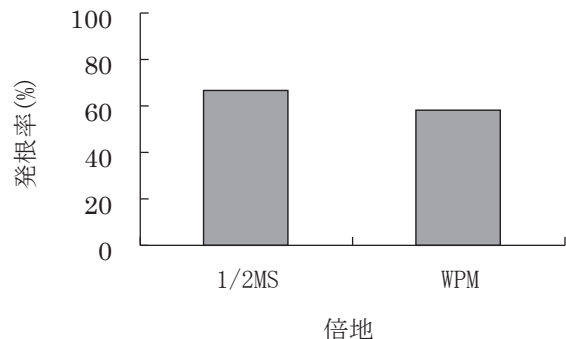


図3 発根培地の種類とシュートの発根率(60日後)

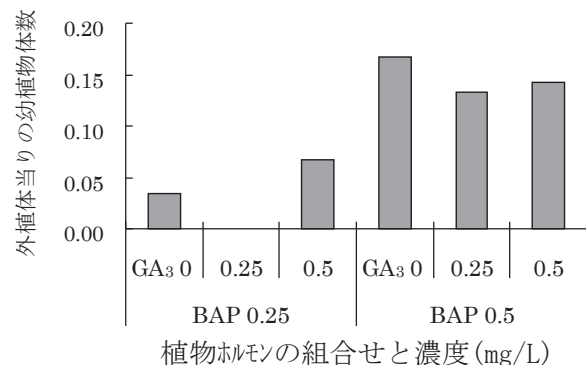


図4 伸長培地に添加した植物ホルモンの組合せと外植体当りの幼植物体数



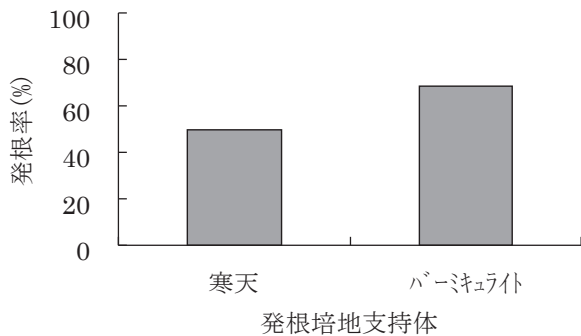


図5 発根培地支持体とシュートの発根率 (43日後)



写真2 発根培地支持体と幼植物体 (43日後)

左寒天, 右バーミキュライトを支持体とする培地での発根状況

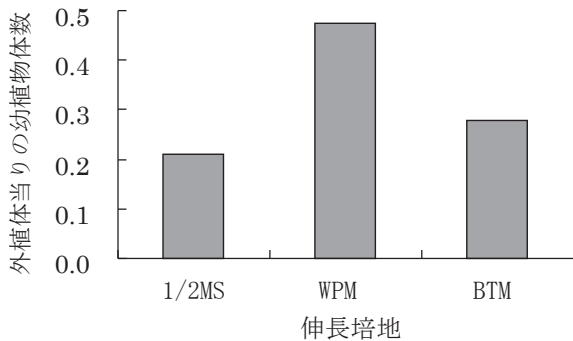


図6 伸長培地の種類と外植体当たりの幼植物体数



写真3 順化後の幼植物体

### 3. 継代培養

伸長培地の種類の検討試験において, 培養 (初代培養) 開始から 55 日後に, 各培地の外植体を伸長培地として適すると思われる BAP 及び GA<sub>3</sub> ともに 0.5mg/L を添加した WPM 培地に継代 (継代培養) したところ, 腋芽又は頂芽から新たなシュートが伸長した。

継代培養 44 日後, 長さ 10mm 以上のシュートの伸長した外植体数は各培地ごとに 2 ~ 9 本 (外植体当たり 0.11 ~ 0.50 本) であった。初代培養から数えて 99 日後の各初代培地の種類ごとの初代・継代培養をとおして得られた長さ 10mm 以上のシュート数は, 外植体当たり 0.63 ~ 1.21 本であり, 1/2MS 培地で少なく, WPM 培地で多かった。

継代培養 44 日後, 10mm 以上に伸長したシュートは, バーミキュライトを支持体とする発根培地に挿し付け発根させた。発根培地挿しつけ 34 日後, 差し付けシュート 20 本のうち 18 本が発根 (発根率 90%) した。初代培養ではバーミキュライト培地での発根率は 69% であったので継代培養により発根性が向上する可能性があると思われる。

初代培養, 継代培養により得られた外植体 1 本当たりの幼植物体数を図 7 に示す。累計の幼植物体数は, 外植体当たり 0.26 本 ~ 0.89 本となった。1/2MS 培地では少なく, 初代・継代培養の培地としては適さないものと思われる。累計の幼植物体数でみると, WPM 培地で最も多く初代・継代培地として適していると思われるが BTM 培地との差は少なかった。

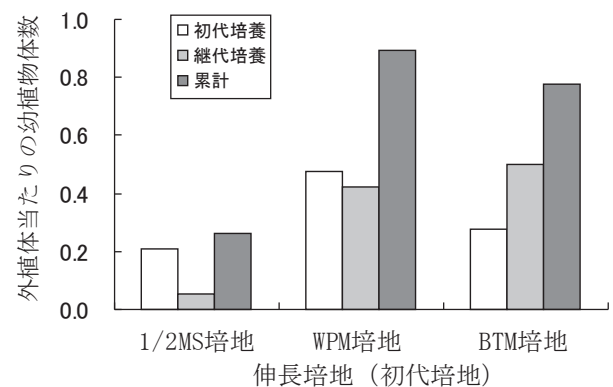


図7 初代・継代培養後の外植体当たりのシュート数

### 4. まとめ

本研究から, イタヤカエデ実生の冬芽を用いた組織培養によるクローン増殖について, シュートを多く得るため及びそれらが発根させて幼植物体を多く得るには, BAP を 0.5mg/L 添加した WPM 培地が適するものと思われた。

また、発根培地には、パーミキュライトを培地支持体とする1/2MS培地を用いることでシュートの発根性が高まると考えられた。幼植物体の順化は容易であった。さらに、継代培養によりシュートの再伸長が可能であり、並びにシュートの発根が高まることがうかがわれたことから、組織培養による効率的な苗木生産の可能性が示唆された。造林等に用いる場合、産地の明確な優良個体のクローン苗の汎用性のある安定的生産技術の確立が必要である。この目的を達成するためには、今後、様々な場所から遺伝的背景の異なる多くの個体を集めて、十分な遺伝的なばらつきを持った、実生のみならず成木集団を材料として、同様の試験結果が得られるか検証する必要がある。

#### IV 摘 要

増殖の難しい有用広葉樹であるイタヤカエデについて、若い実生の冬芽を用いた組織培養によるクローン増殖に適した、伸長培地に添加する植物ホルモン・培地の種類及び発根培地及び発根培地支持体の種類について検討した。また、より安定的な増殖のため、培養容器内での継代培養の可能性を検討した。その結果次のことがわかった。

- 1 冬芽の伸長と発根率の向上のためには、BAPを0.5mg/L添加したWPM培地が適し、さらにGA<sub>3</sub>を0.5mg/L添加することで葉の展開が促進されると思われた。
- 2 発根性を高めるためには、発根培地支持体としてパーミキュライトを用いた1/2MS培地が適していると思われた。
- 3 幼植物体の順化については、簡単な鉢上げ操作や湿度の調整などにより、約2週間で容易に行うことができた。
- 4 外植体の継代培養は、BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加したWPM培地で可能であると思われた。継代培

養によりシュートの発根性が高まることがうかがわれた。

#### 引用文献

- 1) Chalupa, V. (1984): *In vitro* Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia Plant.* (Praha). 26, 374 ~ 377.
- 2) 林弥栄 (1969): 有用樹木図説 林木編, 472pp, 誠文堂新光社, 東京.
- 3) 井出雄二・山本茂弘 (1991): ウダイカンバとダケカンバの冬芽の培養による植物体再生—培養開始時期および冬芽の枝上での位置の影響. 東大農学部演習林報告 85, 27 ~ 42.
- 4) 勝田 柁・森徳典・横山敏孝 (1998): 日本の樹木種子 (広葉樹編), 410pp, (社) 林木育種協会, 東京.
- 5) Lloyd, G. and McCown, B. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Inc. Proc. Int. Prant Prop. Soc.* 30, 421 ~ 427.
- 6) Murashige, T. and Skoog, S. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 15, 473 ~ 497.
- 7) 山本茂弘・袴田哲司 (2004): 静岡県産ケヤキ精英樹の選抜と組織培養によるクローン増殖. 静林技セ研報 32, 1 ~ 13.
- 8) 山本茂弘・近藤晃・井出雄二 (1991) クヌギ実生の組織培養における発根および順化の諸条件—発根培地の支持体の違いとアンシミドールの添加が発根と順化に及ぼす影響—. 日林誌 73, 225 ~ 231.
- 9) 山本茂弘・山田晋也・片井秀幸・袴田哲司 (2008): 冬芽培養によるジズウカンバ幼植物体の再生. 静農林技研報 1, 71 ~ 78.