

ケヤキの腋芽と芽生えの組織培養

伊藤理恵⁽¹⁾・近藤禎二⁽¹⁾

Rie ITO and Teiji KONDO

Tissue Culture of Axillary Buds and Seedlings of *Zelkova serrata*

要旨：ケヤキ (*Zelkova serrata* Makino) について腋芽培養と芽生えの培養を行った。

腋芽培養では窒素成分を半分にしたMS培地にBAPを1 μ Mもしくは5 μ M添加した系で培養を行った。その結果、外植体当たりの発芽した芽の数は5 μ Mの方が多かったが、生じたシュートをIBAを添加した発根培地に移植すると、1 μ Mで培養して生じたシュートの方で、高い発根率が得られた。

芽生えの培養では腋芽培養と同じ培地にBAPを1 μ Mまたは5 μ M、もしくはゼアチンを1 μ Mまたは5 μ M添加した。その結果、外植体当たりの発生したシュート数は5 μ M BAPが最も多かったが、シュートは細く、発根には至らなかった。一方5 μ Mのゼアチンにおいて、発根可能なシュートが最も多く形成された。

Summary

Tissue culture of axillary buds and seedlings of Zelkova serrata Makino was carried out. Axillary buds were cultured on a modified MS medium (half strength of nitrogenous components) containing 1 μ M or 5 μ M BAP. As a result, more buds sprouted out in one explant on the medium containing 5 μ M BAP. When the shoots were transferred to a rooting medium (half strength of modified MS medium with IBA), the highest rooting rate was seen in the shoots sprouted on the medium containing 1 μ M BAP.

For seedlings, the same medium as axillary bud culture was used. The medium contained BAP (1,5 μ M) or zeatine (1,5 μ M). 5 μ M BAP formed many shoots, but they were weak and showed poor root-forming ability. On the other hand, many shoots with rooting ability were cultured on the medium containing 5 μ M zeatine.

(1) 林木育種センター National. For. Tree. Breed. Center

1 はじめに

ケヤキ (*Zelkova serrata* Makino) はニレ科の落葉広葉樹であり、日本の代表的な有用広葉樹の一つである。材は色沢・材質ともに優れており、建築材や家具材等に用いられ、特に、心材が赤褐色を呈するアカケヤキ (ホンケヤキ) や秀李のあるものなど、材質によっては非常に高価なものがある。近年、材価が高いことや資源量が減少しつつあることから、造林技術・育種技術の向上が必要とされており、優良なクローンの増殖技術の開発が望まれている。ケヤキはさし木が困難であるため、組織培養を用いた増殖法の確立は造林や育種を進めていく上で重要であると考えられる。

ケヤキの組織培養の試みは多くの研究機関で実施されており、中でも腋芽培養は不定芽の培養と比較すると遺伝的に安定であり、優良クローンの増殖法として有効な方法と考えられ、研究例は多い^{3) 4) 5) 9) 11)}。ケヤキは培養を継続するとカルスの褐変に伴い苗条が枯死することから、これを防ぐための培地添加物についても研究例がある^{4) 21)}。また、発根・順化の条件も検討されており、カルス化すると順化段階で腐れがはいる。このため、インドール酪酸 (IBA) 浸漬処理後のシュートを、Durzan & Lopushanski (DL) 培地¹⁾の全構成成分を半分にした培地を添加した、パーミキュライトと鹿沼土の混合用土で培養を行ったとき、カルス形成は押さえられ高い順化率が得られている¹⁷⁾。

一方、不定芽の培養では、カルスを経た場合は遺伝的変異性が大きいと言われており、その変異性を利用した育種や、腋芽培養より増殖効率の高い大量増殖の可能性がひらける。しかし、ケヤキでは不定芽の観察例^{2) 14)}はあるが、カルスの褐変後に枯死していた。これについて検討した結果、富田らはフェニル尿素系のサイトカイニン的一种であるN-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) を単独で高濃度添加した時、葉外植体より不定芽が得られ、順化個体も得られた^{15) 16)}。これまでの報告では、ケヤキの不定芽形成にオーキシン添加は効果がないか、または阻害的な場合が多く^{13) 14) 15) 16)}、ベンジルアミノプリン (BAP) での不定芽形成及び発根の例はあるが⁸⁾、不定芽形成にはBAPよりCPPUの方が有効である^{13) 15)}。しかし、CPPUを用いても、シュートのガラス化や枯死のため、発根・順化は困難であり^{13) 16)}、培養条件の改善が期待される。

ケヤキの組織培養は成木を材料にしたものが多いが、反応性の高い芽生えの培養で得た知見が成木の培養を行う上で参考になると考えられる。また、ケヤキの結実は隔年性であり貯蔵性も低い。選抜個体または交配等により得られた少数の種子からの迅速な大量増殖には組織培養が有効であると考えられる。芽生えの培養は研究例^{18) 20)}が少ないため、基礎的なデータを蓄積する必要があると思われる。

今回はケヤキの腋芽培養と芽生えの培養の試験を行った結果をまとめ、報告する。

2 腋芽培養⁹⁾

2.1 材料と方法

1987年5月中旬旬林木育種センター構内のケヤキ (約7年生、樹高2.5m) から当年枝を採取し、腋芽を1個含む2cmの小片にし、70%エタノールで3分間、さらにTween80を数滴入れた次亜塩素酸ナトリ

ウム水溶液（有効塩素濃度、約1%）で10分間攪拌しながら滅菌した。次に、滅菌水でよくすすぎ、試験管内の培地に植え込んだ。初代培養はMurashige & Skoog (MS) 培地¹²⁾の窒素分であるNH₄NO₃とKNO₃の濃度を半分にしたMS改変培地（1/2 NMS培地）¹⁹⁾を用い、BAPを1 μM, 5 μMの2種類の濃度で添加し、各濃度50本ずつ外植体を植え込んだ。ショ糖は30 g/l, 寒天は8 g/l加えた。植え込み3週間後に伸長したシュートを数え、BAPを5 μM含む1/2 NMS培地に植え継いだ。その際、1 cm以上のびたシュートを発根培地に移した。発根培地は1/2 NMS培地の構成成分を半分にし、寒天を6 g/l加えたもので、IBAを5 μM含む。また、継代培養2カ月後に伸長したシュートを、発根培地に移した（Table 3 2回目）。培養条件は、1日16時間日長、2,500 lux, 25°Cとした。

2. 2 結果と考察

Table 1 に示したように、1 μMで23個（46%）、5 μMで14個（28%）の外植体に雑菌が生じた。雑菌が生じなかったもので腋芽から発芽したのは、1 μMで15個（56%）、5 μMで23個（64%）で、5 μMの方がやや多かった。植え込んだ各腋芽部から発芽した芽の数は（Table 2）、1 μMでは1～2個、平均1.3個であり、腋芽のみあるいは腋芽と副芽が発芽した。5 μMでは、2～4個、平均2.5個の芽が発芽し、腋芽・副芽のほか不定芽が生じた。クヌギの腋芽培養でも、BAP濃度が高くなると不定芽が生じることが報告されており^{6) 10)}、本試験でも同じ傾向を示した。

Table 1. 初代培養により発芽した腋芽の数

Number of axillary buds sprouting out in primary culture

| BAP濃度 Concentration of BAP | 植え込み個数 Number of inoculated explants | 雑菌汚染個数 Number of contaminated explants | 残存個数 Number of survival explants | 発芽個数 Number of sprouted explants | 発芽個体/残存個体 (%) Percentage of sprouted explants |
|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1 μM | 50 | 23 | 27 | 15 | 56 |
| 5 μM | 50 | 14 | 36 | 23 | 64 |

Table 2. 腋芽当たりの発芽した芽の数

Number of buds sprouting out per axillary buds

| BAP濃度 Concentration of BAP | 発芽した芽の数 Number of buds sprouted | | | | 計 Total |
|-------------------------------|------------------------------------|-----|----|---|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 μM | 10* | 5 | 0 | 0 | 15 |
| 5 μM | 0 | 10* | 8* | 5 | 23 |

* : 発芽した芽の中でシュートを形成したものは発根培地に移植した。
The buds formed shoots were transplanted to rooting medium.

植え込んでから3週間後に、1 cm以上に伸長したシュートは、1 μ Mでは4本、5 μ Mでは5本あり、1 μ Mのシュートは5 μ Mのものに比べて太く、長い傾向を示した。これらを発根培地に移したところ、1 μ Mの2本が発根したが5 μ Mでは発根が認められなかった (Table 3 1回目)。5 μ Mでシュートが発根しなかったのは、シュートが細かったことによるものと考えられ、発根培地への2回目の移植では、移植したシュートの大きさを1回目に比べ大きくしたところ発根率が向上した (Table 3)。

以上のことから、今回用いた材料については、初代培養はBAPを1 μ Mで行い、腋芽から太いシュートを形成させ、発根培地に移す方法が、より早く苗を得る方法として適当であると考えられた。

3 芽生えの培養⁷⁾

3. 1 材料と方法

1990年11月下旬に林木育種センター長野事業場において採集されたケヤキ種子を実験室内でパーミキュライトをいれたプラントベッドに播種し、8週間後、本葉が4枚出た時期の芽生えを外植体として用いた。

芽生えの地上部を採取し、70%エタノールに30秒間、Tween80を数滴加えた3%の過酸化水素水に5分間浸漬し攪拌下滅菌した。これを滅菌水で三回洗浄後、葉の大部分と胚軸の下端を切り捨て、上胚軸と本葉の葉柄部分をつけた芽生えを調整し、培地30mlの入った200ml容の培養瓶に植え付けた。

培地は1/2 NMS培地を用い、ショ糖を30 g/lと寒天を8 g/l加え、pHを5.7に調整し、それに、BAPを1 μ Mまたは5 μ M、もしくはゼアチンを1 μ Mまたは5 μ M、それぞれ添加した4処理区で4週間、培養実験を行った。発根・順化試験は以下の実験系で行った。4週間培養して生じたシュートを切り取り、200 μ Mの濃度のIBAに2時間浸漬した後、パーミキュライトと鹿沼土を等量混合したものを培地支持体とし、構成成分を半分にしたDL液体培地を加えた培地に植え付け、8週間培養した。さらに発根した植物体を上記の混合土の入ったビニールポットに移しビニールをかけ、徐々に穴をあけ順化を行った。培養条件は、16時間日長、3,000lux、25°Cの人工照明室内で行った。

3. 2 結果と考察

培養4週間後の結果は、Table 4 に示したように、シュート本数の平均では、BAPの方がゼアチンで培養したものより多くなり、BAP、ゼアチンともに1 μ Mより5 μ Mの方がシュートの本数が多くなった。BAP 1 μ Mより5 μ Mの方が、発芽した芽の数の平均で約1.7倍多くなっており、成木の腋芽培養での約1.9倍⁹⁾と類似した結果が得られたことは興味深い。特に、BAP 5 μ Mでは最高15本、

Table 3. シュートの発根率
Rooting percentage of the shoots

| 初代培養の BAP濃度 Conc. of BAP of primary culture | 1回目 (%) First time | 2回目 (%) Second time |
|---------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 μ M | 2 / 4 (50) | — |
| 5 μ M | 0 / 5 (0) | 2 / 12 (17) |

Table 4. ケヤキ芽生えからのシュート形成に及ぼすBAPとZeatinの効果
Effect of BAP and zeatin on shoot formation
from seedling explants of *Zelkova serrata*

| サイトカイニンの濃度 Concentration of cytokinin | 供試数 (個) Number of explants | 生存数 (%) Percentage of survived explants | シュートの本数/外植体 (本) Number of shoots / explant | 1 cm以上のシュート / 外植体 (本) Number of shoots over 1cm / explant | 最長シュートの長さの平均 (cm) Mean length of the longest shoots in each explant |
|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| BAP 1 μ M | 32 | 91 | 4.1 | 1.1 | 1.67 |
| 5 μ M | 32 | 81 | 7.1 | 0.9 | 0.95 |
| Zeatin 1 μ M | 32 | 84 | 1.8 | 1.3 | 1.84 |
| 5 μ M | 32 | 88 | 3.8 | 2.8 | 2.66 |

平均7.1本のシュートが生じたが、シュートは脆弱で、葉・茎ともに小さく発根までには至らなかった。

一方、ゼアチンの方はBAPと比較して、シュート本数は少ないが、葉は大きく茎は太く、最長のシュート長は長い傾向があり、発根、順化が可能であると確認されている1 cm以上のシュート本数が多くなっていた。また、ゼアチン5 μ Mで培養した場合は、1 cm以上のシュート本数は平均2.8本、最長のシュートの長さでは平均2.66 cmと最高値を示し、一部を発根・順化させており、本試験の処理区では植物体の再生の点で最も良い培養条件であるといえる。

今後、より高濃度のゼアチンを添加した培養や継代培養条件の検討などの培養条件の改良によって、発根可能なシュート本数の増加が期待される。

芽生えの培養では様々な外植体の調整法が考えられるが、ケヤキの種子の滅菌は困難であるため²⁰⁾、無菌種子の調整は良策ではない。また、芽生えの茎頂培養の例¹⁸⁾と比較すると、本試験の外植体の調整法は簡便であるが、同様の培養条件下で同等の増殖率が得られており、実際の増殖法として有効であると思われる。

4 引用文献

- 1) DURZAN, D. J., S. M. LOPUSHANSKI: Can. J. For. Res., 5: 273-277 (1975)
- 2) 原口雅人: 樹齢800年生アカケヤキの萌芽枝取り木の節間培養, 42回日林関東支論, 61~62 (1991)
- 3) 原口雅人: 樹齢800年生アカケヤキの萌芽枝からの植物体再生, 42回日林関東支論, 63~64 (1991)
- 4) 原口雅人: ケヤキ腋芽培養での継代培地の添加物が及ぼす影響, 43回日林関東支論, 81~82 (1992)
- 5) 引田裕之: 組織培養によるケヤキ成木からの幼植物体再生, 41回日林関東支論, 63~64 (1989)
- 6) IDE, Y. & YAMAMOTO, S.: J. Jpn. For. Soc., 68, 472~474, 1986
- 7) 伊藤理恵・近藤禎二: ケヤキ芽生えの組織培養, 林木の育種特別号, 40~42 (1993)
- 8) 河合昌孝: BAPによるケヤキ葉片からの不定芽形成, 2回日林関西支論, 113~116 (1993)
- 9) 九島宏道・近藤禎二・古越隆信: 98回日林論: 453~454 (1987)

- 10) 近藤禎二・鈴木賢一・九島宏道：ケヤキの腋芽培養，39回日林関東支論，101～102(1987)
- 11) 増淵 充・木下 勲：ケヤキ成木の腋芽培養における培地の検討，43回日林関東支論，73～74 (1992)
- 12) MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid grown and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497(1962)
- 13) 大塚和人・脇田陽一・横田信三・吉沢伸夫・出井利長：ケヤキカルスからの不定芽形成に及ぼすホルクロルフエニユロン添加濃度の影響，43回木材学会要旨集, 476 (1993)
- 14) 酒谷昌孝・天野孝之：組織培養によるケヤキ (*Zelkova serrata*) 増殖の試み，38回日林関西支講，239～241(1987)
- 15) 富田正徳，近藤禎二：ケヤキの葉外植体からの不定芽形成，植物組織培養，**8**，28～30 (1991)
- 16) 富田正徳：ケヤキの葉外植体からの植物体再生，植物組織培養，**8**，201～205 (1991)
- 17) 富田正徳：ケヤキ培養苗の発根および順化の諸条件，植物組織培養，**9**，34～38 (1992)
- 18) 富田正徳：ケヤキ茎頂培養に及ぼすサイトカイニンの種類と濃度の影響，植物組織培養，**10** (1)，67～70 (1993)
- 19) VIETEZ, A.M., VIETEZ, M.L.: *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*, *Scientia Horticulturae* **18**, 343-351(1982/83)
- 20) WANG, Y.N., C.H. CHIANG, L.Y. CHANG : The microcutting of *Zelkova serrata*, *Quart. J. Expt. Forest, NTU* **5** (1), 13-24 (1991)
- 21) 吉川 章：ケヤキ冬芽を用いた組織培養による増殖の試み，39回日林関西支講，221～224 (1988)