

ワカマツの組織培養

近藤 禎二・岡村政則

Teiji KONDO and Masanori OKAMURA

Tissue Culture of Wakamatsu (*Pinus thunbergii* × *P. massoniana*)

Summary

The interspecific hybrid between *Pinus thunbergii* and *P. massoniana* is called wakamatsu. This hybrid is resistant to pine wood nematode. Mass propagation with the aid of tissue culture has been demanded because of the species limited seed production. In a mature embryo culture, the whole embryo was more suited as an explant than a cotyledon. GRESSHOFF and DOY medium was most suitable for inducing adventitious buds and growing the culture. BAP (6-benzylaminopurine) was added to the primary culture medium. The culture was subcultured to the BAP free media once a month. RISSE and WHITE medium supplemented with 10 μ M IBA was suitable for rooting. The rooting percentage was over 90%.

要旨：ワカマツの胚を用いた培養では、わずかに成長した子葉を外植体として用いるよりも、胚全体を用いる方が適当だった。LP改変培地、SH培地、GD改変培地のうちでは、GD改変培地が、不定芽の分化、培養物の成長において優れていた。初代培養の培地には、6-ベンジルアミノプリン（BAP）を5 μ M添加した。継代培養では、BAPを添加しない培地に植え替え、1カ月おきに数回植え替えた。発根は、RW改変培地に、3-インドール酪酸を10 μ M添加した培地を用いることで、90%以上の発根率を得た。

1 は じ め に

クロマツとタイワンアカマツ（*Pinus massoniana*、中国名：馬尾松）との雑種は、通称和華松（以下ワカマツとする）と呼ばれ³⁾、材線虫病に抵抗性があることから⁸⁾、事業用の苗の生産が進められている。しかしながら、雑種を作るためには、花粉を中国から輸入し、人工受粉する必要がある。また、雑種種子が入った球果では、クロマツの種内交配に比べて、球果中の充実した種子の割合が低くなるなど⁸⁾、種子生産上の問題点がある。そこで、組織培養による苗木生産が期待された。ワカマツは雑種の種子を出発点として苗木が生産されることから、雑種種子を用いた培養系の確立を試みた。

2 不定芽の分化⁶⁾

2. 1 材料と方法

クロマツ精英樹鹿島1号を雌親にし、タイワンアカマツを雄親にした雄種種子を用いた。種子の滅菌は、7%過酸化水素水でマグネチックスターラーで攪拌しながら15分間滅菌し、その後1晩滅菌水に浸漬した後、再度7%過酸化水素水でマグネチックスターラーで攪拌しながら15分間滅菌し、クリーンベンチに持ち込んだ後、滅菌水で3回すすいだ。胚の摘出は、クリーンベンチの中で、実体顕微鏡で観察しながら、メスとピンセットを用いて行った。培養は、胚全体を培養する方法と、子葉のみを培養する方法を用いた¹⁾。胚全体を培養する方法では、無菌的に摘出した胚を培地にそのまま植え込み、子葉のみを培養する方法では、無菌的に摘出した胚を、培地上で1週間培養し、子葉が大きくなったところで、子葉のみ切り取って培地に植え込んだ。培地は、ラジアータマツで用いられているLP改変培地（以下LP培地という²⁾およびSH培地⁷⁾を用い、6-ベンジルアミノプリン（BAP）を、0、1、5、25、50 μ Mの濃度で培地に添加した。培養は、9cmシャーレで行い、各処理1シャーレとし、1シャーレ当たり5胚あるいは5胚分の子葉を植え込んだ。培養室の条件は、室温25℃、蛍光灯による3000lux、16時間日長の照明であった。

2. 2 結果と考察

胚全体を用いた培養における、LP改変培地での胚の生存数及び芽の分化数を表1に示した。処理区

表1 胚全体を用いた培養（LP培地）

BAP濃度 (μ M)	供試 胚数	異常 胚数	正常 胚数	生存 胚数	分化した芽の数	胚当たり平均 芽分化数
0	5	1	4	4	1, 1, 1, 1	1.0
1	5	3	2	1	11	11.0
5	5	1	4	3	15, 11, 9	11.7
25	5	0	5	4	6, 6, 5, 5	5.5
50	5	0	5	5	12, 4, 3, 3, 2	4.8

ごとに5胚を植え込んだが、培養後においても白色の胚が多かった。BAP 1 μ Mおよび5 μ Mで芽がよく分化し、25 μ Mでは芽の数が少なく、大きさも小さくなり、50 μ Mでも芽が小さく、胚が部分的に褐変した。SH培地での結果を表2に示した。5 μ Mで芽が最も分化し、50 μ Mでは胚が枯死した。

表2 胚全体を用いた培養（SH培地）

BAP濃度 (μ M)	供試 胚数	異常 胚数	正常 胚数	生存 胚数	分化した芽の数	胚当たり平均 芽分化数
0	5	0	5	5	1, 1, 1, 1, 1	1.0
1	5	1	4	4	6, 6, 4, 3	4.8
5	5	0	5	4	11 10, 6, 6	8.3
25	5	1	4	3	7, 6, 5	6.0
50	5	1	4	0	—	—

子葉のみの培養では、1個の胚から7～9個の子葉がとれた。LP培地での子葉の生存数と芽の分化数を表3に示した。BAP 1 μ Mで芽がよく分化し、BAPの濃度が高くなるに従い、分化する芽の数

表3 子葉を用いた培養 (LP培地)

BAP濃度 (μ M)	供試 胚数	異常 胚数	正常 胚数	子葉総数	生存子葉数 (%)	芽を分化した子葉数
1	5	2	3	25	10 (40)	5 (20)
5	5	3	2	17	9 (53)	3 (8)
25	5	1	4	30	2 (7)	2 (7)
50	5	2	3	21	0 (0)	0 (0)

が少なくなり、50 μ Mでは、植え込んだすべての子葉が枯死した。子葉から分化した芽は、子葉の先端近くで1個～数個形成されたが、小さいために切り分けるまでには至らなかった。SH培地での結果を、表4に示した。1 μ Mで最もよく芽を分化し、25 μ M以上では枯死した。LP培地より高い割合で芽を

表4 子葉を用いた培養 (SH培地)

BAP濃度 (μ M)	供試 胚数	異常 胚数	正常 胚数	子葉総数	生存子葉数 (%)	芽を分化した子葉数
1	5	0	5	40	21 (53)	17 (43)
5	5	2	3	24	5 (21)	5 (21)
25	5	2	3	23	0 (0)	0 (0)
50	5	2	3	22	0 (0)	0 (0)

分化したが、LP培地の場合と同様に、形成される芽が小さく、その後の成長も良くなかった。

ワカマツの種子を材料にした培養では、子葉を用いた場合は、分化した芽が小さく、その後の成長も良くないことから、胚全体を用いた方が適当であると考えられる。ラジアータマツでは、子葉を用いた培養が成功しているが^{1,2)}、今回の結果から判断するとワカマツでは適当でないと考えられた。

培地のBAP濃度は、5 μ Mで最も芽の分化が多かった。アカマツの胚培養では、1～5 μ Mが適当であり⁴⁾、ラジアータマツでは5 ppm (約22 μ M) が適当であるとされているが⁷⁾、ワカマツでは、アカマツよりやや濃い濃度が適当であると考えられた。

3 植物体の育成⁶⁾

3. 1 材料と方法

岡山県林試において、1984年に交配されたワカマツの種子を用いた。培地には、初代培養の条件の検討に用いたSH培地に加え、GD改変培地 (GD培地という)⁹⁾も用いた。SH培地及びGD培地に、ショ糖をそれぞれ30g/ℓ, 20g/ℓ, 寒天をそれぞれ4.5g/ℓ, 7g/ℓ加え、オートクレーブ前にpHを5.7に調整した。種子は、両培地とも15粒ずつ用い、種子の滅菌法、胚の摘出法、培養室の条件は、不定芽の分化の場合と同じである。初代培養では、培地にBAPを5 μ Mの濃度で加え、約1ヵ月培養し、継代培養

では、BAPを添加しない同じ組成の培地に、約1カ月間隔で4回植え替え、培養物を成長させた。継代培養の過程で大きくなった芽の塊は切り分けた。継代培養後に2 cm以上に伸長したシュートは多数あり、このうちの一部を発根培地に移した。発根培地は、RW改変培地⁹⁾に、3-インドール酪酸(I BA)を $10\mu\text{M}$ 添加したものであった。この培地で3週間培養し、発根しなかったシュートについては、再度作成した同じ培地に植え替え、さらに3週間培養した。発根し、再生した植物体は、液肥のハイポネックス(ハイポネックス社)の1,000倍液を含ませたフョーライト(フョーライト株式会社)を培土として入れたプラスチック容器に、根から寒天培地を丁寧に取り除いた後、移した。

3. 2 結果と考察

GD培地を用いた培養では、初代培養で15粒の種子から胚を摘出し、植え込んだが(写真1.), そのうち2胚が枯死し、13胚が生存した。シュート塊の分割は、ある程度以上大きくなった塊を肉眼で適宜判断して切り分けたが、分割したシュート塊のそれぞれに1~2本のシュート及び複数の芽が含まれていた(写真2.). 各胚から分割したシュート塊の数は、1個から24個まであり、平均11.5個だった。これらシュート塊から2 cm

表5 発根培地での発根率

	種子No.	
	1	2
供試シュート数	20	8
第1回発根数	17	4
第2回発根数	2	3
発根数計	19	7
発根率(%)	95	88

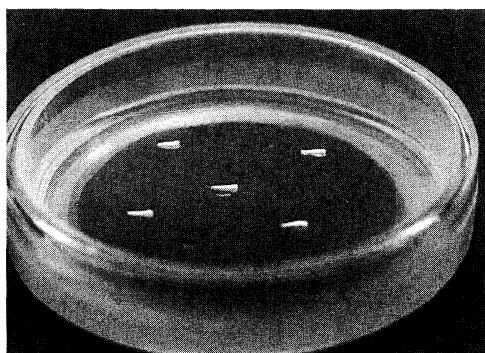


写真1. 培地に植え込んだワカマツの胚

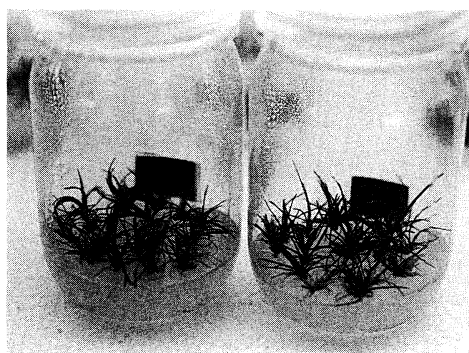


写真2. 切り分けたワカマツのシュート塊

以上のシュートを発根培地に移したところ、No.1の種子由来の20本のシュートでは、第1回目の発根培地で17本、第2回目の培地で2本が発根した(写真3.). No.2の種子由来の8本のシュートでは、第1回目に4本、第2回目に3本が発根した。発根率は、No.1の種子由来のシュートで95%, No.2の種子由来のシュートで88%と高かった。発根し、再生した植物体は、プラスチック容器に移した後(写真4), 培養室に1カ月おいたが枯死したものはなかった。

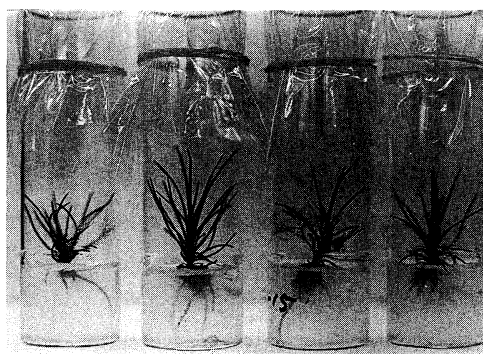


写真3. ワカマツのシュートからの発根

増殖率は、No. 1 の種子で、約半年間で約20倍だった。No. 9 の種子ではシュート塊の分割数が少なかったが、その他の種子においては、継代培養をさらに1～2代繰り返すことで、No. 1 の種子と同程度の増殖率が期待できると考えられた。この増殖率は、大量増殖という観点から見るとそれほど高くない。培地についても、ラジータマツで用いられているSH培地で継代培養すると、培養物の成長が悪く成ることから、培地の改良及び他の植物ホルモンの検討が今後必要である。

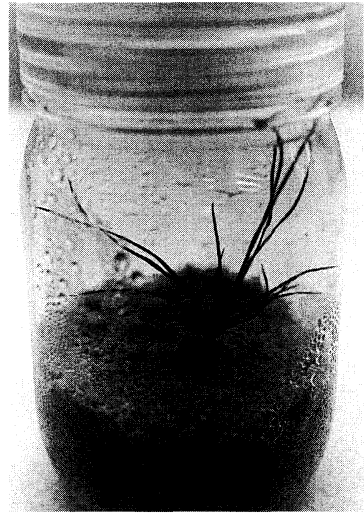


写真4. 再生した植物体の順化

引用文献

- 1) AITKEN, J., HORGAN, K. J. and THORPE, T. A. : Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*, Can. J. For. Res., 11, 112-117 (1981)
- 2) AITKEN-CHRISTIE, J. and THORPE, T.A. : Clonal propagation Gymnosperms, In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants 1", 82-95, Academic Press, New York (1984)
- 3) 古越隆信 : 和華松の生いたち, 林木の育種, 138, 13-14 (1986)
- 4) 近藤禎二・九島宏道 : アカマツの胚培養, 林木の育種, 特別号, 24-26 (1987)
- 5) 近藤禎二・九島宏道・古越隆信 : 和華松(クロマツ×タイワンアカマツ)の胚培養(I) - 不定芽の分化 -, 98回日林論, 457-458 (1987)
- 6) 近藤禎二・九島宏道 : 和華松(クロマツ×タイワンアカマツ)の胚培養(II) - 植物体の再生 -, 99回日林論, 451-452 (1988)
- 7) RILLY, K. and WASHER, J. : Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plantlet formation from embryonic tissue, N. Z. J. For. Sci., 7, 199-206 (1977)
- 8) 佐々木研・古越隆信 : クロマツとタイワンアカマツ (*P. massoniana*) およびフクシュウマツ (*P. tabulaeformis*) の種間交雑, 87回日林論, 183-184 (1976)
- 9) SOMMER, H. E., BROWN, C. L. and KORMANIK, P. P. : Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* MILL.) tissue culture in vitro, Bot. Gaz., 136, 196-200 (1975)