

組織培養による優良固体の増殖技術の開発

— 組織培養によるキリ優良系統の増殖 —

(県単課題 昭和61年～平成5年度)

研究員 穴戸 一 浩

林産部長 青野 茂

研究員 白田 康之

(現：いわき林業事務所 改良普及技師)

要 旨：

キリの組織培養による増殖と馴化苗の作成について検討した。これにより以下のような点について明らかとなった。

1. MS培地を用いた茎頂培養では、培養温度は20～25℃が増殖に適していた。培地に添加する植物ホルモン濃度については、BA単用の場合5.0 mg/1、BAとNAAを用いた場合、BA 4.0 mg/1 + NAA 0～0.2 mg/1 添加区でよく早生分枝化し増殖率が高くなった。
2. 大量増殖方法として苗条原基及び多芽体の形成を試みた。苗条原基については形成条件が解明されなかった。また液体培地での培養ではガラス化が起りやすく培養を困難にした。多芽体についてはBAの添加濃度を高くすることで形成され、BA 50mg/1 添加区で最もよく誘導された。
3. 増殖したキリについて、NAA 0～0.2 mg/1 かつBAがそれ以下の添加濃度の組み合わせでよく発根し、発根したキリは根長16mm程度で馴化するのが最も活着率が高かった。また発根培地を用いない挿し木法については、NAA処理濃度0.1 mg/1の時馴化率が最も高かった。このようにして得た馴化苗を苗畑に移植する時期については、10℃以下の低温の影響を受けなくなる5月下旬以降が適当であった。

I はじめに

キリ (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) は生長の早い落葉性高木で、材は軽くて狂いが少なく湿気を通さないため家具・器具材として用いられる。福島県には会津地方を中心に桐加工品などの産地があり、同地域では古くから栽培も盛んである。¹⁾

桐栽培の安定化を図るには優良系統の選抜と増殖が必要である。しかし選抜した個体の増殖には問題も多い。キリは普通分根によって苗を作るが、各種病害の伝染経路になりやすくまた増殖の効率も大きくない。そこで大量増殖と無病苗の作成を行うため、組織培養による増殖方法の確立が必要となる。また培養により大量の無病苗が得られれば、各種病害抵抗性の検定も可能になると考えられる。そこでこの研究では、まず組織培養及び大量増殖方法の確立をめざし、ついで組織培養からの馴化苗作成や苗畑への移植などに関する試験、及び組織培養苗を用いた抵抗性早期検定方法の開発を行った。

II 実験方法

1 組織培養及び大量増殖方法の確立

(1) 初代培養方法の検討

組織培養の材料として、会津地域を中心に収集・選抜してきた胴枯れ性病害抵抗性優良系統候補木²⁾から7系統を用い、培養に適する条件について調べた。まず添加するホルモンの異なる2種類の培地で初代培養を行った。

培地はBA (ベンジルアデニン) 5.0 mg/l を添加したLS (Linsmaier and Skoog) 培地と、IBA (インドール酪酸) 0.1 mg/l を添加した1/2 LS 培地の2種類とした。ホルモン及びサッカロース30 g/l 添加後 pH 5.6~5.8 に調整し、ゲル化剤として寒天 9 g/l を加え、加熱融解後それぞれ試験管 (長さ18cm、直径18mm) に10ml 1分注し、高圧滅菌を行った。

供試する材料としてキリの枝先部分を採取した。殺菌方法は、まず葉などの余分なものを全て除去し、先端部分を2~3cmにいったん切そろえた。ついでエタノール (70%程度) で5秒、アンチホルミン (次亜塩素酸ナトリウム) の20倍希釈液 (有効塩素1%程度) で約5分間処理し、滅菌水で2回水洗した。その後無菌的に茎頂部を0.5~1.0mmに切り出し培地上に置床した。培養は25℃陽光補光付恒温器内で行った。殺菌の不足などから起こる雑菌汚染については移植から6日後、培養組織の生存率については22、45、78日後に調査した。また、生存した個体について、2種類の培地でさらに培養を試みた。培地はLS-BA 5.0 mg/l 培地と、1/2 LS-NAA (α -ナフタレン酢酸) 5.0 mg/l 培地とした。

(2) 温度別培養試験

組織培養を利用した苗の増殖において、その利便性から系統を常に継代培養して保有しておくことが都合がよいのだが、労力的な負担が大きい場合が多い。通常植物は生長適温から離れるほど成長量は低下し、ある温度からは成長が停止し、枯死あるいは休眠する。組織培養でも培養時の温度は増殖率に影響を及ぼすことが知られている。低温での培養が成長を抑制し、培地中の栄養成分の消費を抑えて培養期間を延長することが考えられ、これにより継代培養を減らすことで省力化が期待できる。そこで低温での温度別培養試験を実施した。

培養には温度勾配恒温器を使用し、培養温度は5、10、15、20、25℃の5段階に設定した。培地はBA 5 mg/l 添加したMS培地を用い、500 ml容量の培養瓶に約40ml分注した。培養組織は、シュート先端部分を茎頂を含め5 mm程度の長さに切り取ったものを使用し、個数は各区11本とした。調査は21、30、46、63、76日後の5回行い、増殖率と枯死率、及び30日後以降はシュート長も測定した。

(3) 培地組成の改変 (培地中のP含量の改変)

培地組成を改変し、キリ培養に適する培地組成を見いだす。MS培地の場合、N (窒素)・K (カリウム) の割合に対してP (リン) の割合が少ないのでPの量を増やし増殖率を調査した。対照区はKH₂PO₄ (リン酸カリウム) 添加濃度を基準量の170 mg/l とし、5倍区は850 mg/l、10倍区は1,700 mg/l とした。供試したキリは13系統で、シュート先端部分5 mm程度を切り取り、供試数は各区2個ずつとした。培養は22℃の培養室内で14時間照明で40日間行い、形成されるシュート数の平均を算出し増殖率とした。

(4) ホルモン濃度別増殖試験

増殖率の高くなるホルモン濃度について検討した。

試験①ではBAについて、3.0～7.0 mg/1まで5段階の濃度で培地に添加した。材料としてあらかじめ培養しておいたキリ4系統を供試した。

試験②ではBAとNAAについて、BA 2.0、4.0 mg/1とNAA 0、0.02、0.2、2.0、4.0 mg/1を組み合わせた8通りの濃度で添加した。あらかじめ培養しておいたキリのシュート先端5 mm程度の部分を用い、供試数は各9本づつとした。培養は22℃の培養室内で14時間照明で30日間行った。

(5) 苗条原基誘導試験

組織培養における大量増殖の方法には幾つかあるが、苗条原基を用いる方法は培養中の変異が少ない点から系統保持に都合が良いとされている。そこでキリの優良系統の大量増殖への利用を検討するため、培地のホルモン濃度を変えた液体回転培養により苗条原基の作成を試みた。MS液体培地に対し、添加するホルモンBA・NAAの各濃度は25盤目法により調整した。使用した回転培養器のサイズ(ディスク径65cm)により、試験は2度に分けて行った。供試した系統は継代培養により保存しているもので、このため1回目では「渡部1号」を、2回目では「No.5」を用いた。いずれもシュート先端部分を茎頂を含め2 mm程度の長さに切って植え付けた。供試数は各区5個とした。培養は21℃、約6,000 luxの16時間照明とし、回転培養器で2回転/分の回転培養を30日間行い、培養後の形態を調査した。

(6) 多芽体形成試験

キリの組織培養において、液体培地を用いた培養では、組織のガラス化が起りやすく、増殖の妨げとなりやすい。そこで大量増殖の手法として、固体培地上での多芽体形成について検討した。試験(5)ではBAについて4.0 mg/1を添加濃度の上限としたので、この試験では3段階のBA濃度(2、10、50 mg/1)について各2通りの糖濃度(サッカロース30、60 mg/1)の培地を作成した。供試した系統はあらかじめ培養しておいた「渡部1」と「青木」の2系統で、シュート先端部分を茎頂を含め5 mm程度の長さに切り取り移植した。培養は22℃の培養室内において、約3,000 luxで16時間照明として60日間行った。

2 馴化苗の作成方法

(1) 発根培地のオーキシン類の影響の検討

組織培養に用いられるホルモンで、オーキシン類は成長量に影響を与えるだけでなく、組織の脱分化や発根を誘導することが知られている。キリの培養において使用するオーキシンの種類により発根程度の違いを把握するために、3種類のオーキシンを添加した培地での培養を行った。

基本培地として1/2 LS培地を用いオーキシン類としてIBA、NAA、2-4-D(2-4,ジクロロ酢酸)の3種類を各0.1 mg/1添加した。また、それぞれ培養組織の排出する物質の影響を小さくするため活性炭末1%を添加した区をもうけた。使用した系統は「佐々木1」及びニホンギリの1年生実生苗の2種類である。殺菌・組織の切り取りなどは常法で行った。供試個数は各区とも5個、発根数の調査は9日後と93日後の2度行った。

(2) 発根程度別土壌馴化

組織培養により増殖したシュートは茎葉部分のみなので、普通発根させてから育苗ポットなどに移植して外環境に馴らしてふく。増殖したシュートを発根させ馴化苗を作る過程で、シュートの発根程度による馴化率について調べた。

同程度に成長したシュートを発根用培地に移植し、発根した個体について根長別に3段階に分け土壌馴化を行った。馴化は黒色ビニールポットに用土として滅菌済みのパーミキュライト、粉碎水苔を1:1に配合した物を入れ、植え付け後は透明フタ付き水切りカゴを馴化箱として用い、25℃恒温室内で24時間照明で管理した。

(3) 挿し木法による土壌馴化試験

増殖したシュートへの発根操作として、一般には増殖用の培地とはホルモン組成等の異なる発根用の培地に移植し発根を促す。しかしこの操作は発根培地への移植及び育苗ポットへの移植に係る手間と、毛根部分の培地寒天の付着による腐敗や移植操作時に根を痛めやすいなど、様々な問題を持つ。そこで発根培地に移植せず、切り分けたシュートを挿し穂として直接馴化用土に挿し付け、発根と同時に馴化する方法について検討した。

挿し床として黒色ビニールポットに滅菌パーライトをいれたものを用意し、挿し穂となるシュートは頂芽部分から2cm程度のものとした。挿し付け後は透明フタ付きの水切りカゴに入れ、発根促進剤として5段階の濃度に調整したNAA希釈液に、底が3cm程度浸るようにした。管理は25℃24時間照明とし、NAA希釈液は発根の程度から17日後に除去した。

(4) 時間別土壌馴化試験

馴化苗は作成後しばらくは環境変化の小さい室内などで管理し、徐々に外に出して慣れさせ、その後苗畑などに定植する。苗畑に移植するのに適する時期について把握するため、移植時期別の馴化苗の得苗率と生長量を調べた。

試験①では移植時期別の得苗率と生長量を調べた。また試験②では系統ごとの得苗率と生長量を比較した。

①: 実施時期は桐の萌芽が始まる5月上旬から6月上旬までの4回とした。実施日と供試個数については表-11のとおりである。馴化苗は、滅菌パーミキュライトを入れたビニールポットで作成し、苗畑への移植1週間前から日陰地で外気に馴らした物を使用した。移植時の苗木の大きさは5~8cm程度であった。苗畑は黒色のポリエチレンシートでマルチし、植え付けは1×1.2m間隔とした。生長量調査は11月7日に行った。

②: 実施時期は5月中旬から7月中旬までの3回とした。5月17日移植分の苗は2月26日及び3月15日に培養室から温室に移し管理したもので、6月9日と7月11日移植分の苗は移植前1週間程度外気に慣らしたただけのものである。供試したのは10系統で、植え付け方法などは①と同様に実施した。

3 組織培養苗を用いた抵抗性早期検定方法の開発

(1) 桐枯れ性病害抵抗性の早期検定方法の検討1

桐枯れ性病害を起こす加害菌には、腐らん病を起こすバルサ菌 (*Valsa paulowniae*) とフォモプシス桐がれ病を起こすディアポルテ菌 (*Diaporthe paulowniae*) とがある。野菜の育種などでは、

病原菌が産出する毒素等の化学物質に対する抵抗性を持つ系統を選抜するのに、病原菌の培養濾液が多く用いられている。そこで、キリでも病害抵抗性の検定方法として培養濾液を用いることが可能であるか検討する。

試験にはバルサ菌の不完全世代 (*Cytophama paulowniae*) を用い、選抜剤として 1/2 MS 液体培地で14日間培養した後の培養濾液を用いた。培地の滅菌方法と選抜剤の添加方法は表-13のとおりである。培養組織はシュート先端部分を茎頂を含め5 mm程度の長さに切り取ったものを使用し、移植後は16時間照明の培養室内で、20日間培養し状態を調べた。

試験①：培地として、1/2 MS 培地にゲル化剤は寒天を用い、照度は約 3,000 lux とした。

試験②：MS 培地にゲル化剤はジェランガムを用い、照度は約 6,000 lux とした。

(2) 桐枯れ性病害抵抗性の早期検定方法の検討 2

桐枯れ性病害の検定方法として、病徴のないキリ樹体への、病原菌の接種試験が行われている。これは主に山行き苗等を用いて行われているが、苗数の確保や苗の育成に時間がかかることなどが問題となる。そこで、組織培養により増殖した系統の検定を早期に行うためには、接種試験に供試できる状態、つまり病徴を発現できる木質化した皮層を持つ苗にする必要がある。馴化したばかりの苗では樹皮が木質化していないため、短期間に年経過させるために低温による休眠処理を試みた。

馴化室内で作成した馴化苗を使用し、徐々に温度を下げ、最終的に休眠の処理条件は 5℃ + 暗黒 (+ 給水) で1カ月間行い、その後再成長させるのに馴化室 (24℃程度、約 3,000 lux の13時間照明) に戻した。

III 結果と考察

1 組織培養及び大量増殖方法の確立

(1) 初代培養方法の検討

雑菌による汚染数、及び培養組織の生存数については表-1の通りであった。「長谷川2」と「酒

表-1 初代培養方法の検討

培地及びホルモン 添加濃度	系統名	供試数 (個)	汚染数 6日後	生存数(個)		
				22日後	45日後	78日後
LS培地 BA 5.0 mg/1	佐々木1	5	0	5	4	0
	渡部1	8	0	5	4	-
	渡部2	5	0	5	1	1
	小林	5	0	4	1	0
	長谷川2	5	2	3	0	-
	青木	5	0	4	1	0
	酒井	5	0	5	5	4
1/2 LS培地 NAA 5.0 mg/1	佐々木1	5	0	5	2	2
	渡部1	5	0	4	1	0
	渡部2	5	0	5	5	2
	小林	5	0	5	4	2
	長谷川2	4	2	2	1	0
	青木	5	1	5	1	0
	酒井	10	4	3	3	3

井」にやや汚染が多かった。また生存数の変化については系統間に差が見られたが、生長・増殖したものは希であった。

初代培養としては、一部の系統に殺菌不良があったが、全体として汚染は少なく生存率も高かったことから、殺菌条件はほぼ適当であったと考えられる。また生存数の変化から初代培養はあまり長期間継続はできないようであった。初代培養は環境の激変であるため生長や増殖が抑制されてしまうことがあり、キリの場合も早めに増殖用培地に移す方が良いと考えられた。

(2) 温度別培養試験

調査結果は表-2のとおりである。培養1カ月後では、5℃と10℃で増殖がみられず、15℃以上では温度が高くなるにしたがって増殖率が高まり、シュート長も大きくなった。また枯死数が多くなったのは5℃で46日後以降、25℃では63日後以降であった。原因として5℃区では低温障害、25℃区では培地の消耗によるものと思われた。10、15、20℃では63日後から枯死が現れその後徐々に増えるが、76日後でも3区の枯死数に差が見られなかった。この培地での継代間隔は2カ月程度を目安とすることが示された。

培養温度について、この試験区では10、15、20℃の間で増殖率や苗高の変化ほど培養期間に対する差が出ていないことから、培養温度の変化は増殖率の調節には効果があるが、培養期間の延長には必ずしも結びつかないといえるようである。

表-2 温度別培養試験

温度℃	21日後		30日後		46日後		63日後		76日後		
	増殖率	枯死	増殖率	枯死	増殖率	枯死	増殖率	枯死	増殖率	枯死	
5	1.0	0	1.0	0	1.0	6	1.0	8	1.0	10	
10	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.1	2	1.2	3	
15	1.3	0	1.6	0	1.8	0	2.2	1	2.3	3	
20	2.8	0	2.9	0	3.7	0	5.1	1	5.1	3	
25	4.0	0	4.3	0	5.5	0	4.4	5	2.6	6	
	温度℃		苗高 cm								
	5		0.5		0.5		0.5		0.5		
	10		0.6		0.8		0.7		1.2		
	15		1.0		1.2		1.6		2.0		
	20		1.5		1.7		2.2		2.4		
	25		3.1		3.9		3.9		3.3		

(3) 培地組成の改変（培地中のP含量の改変）

調査結果は表-3のとおりである。Pの量による増殖率について、供試した系統により増殖の程度は異なりその関連ははっきりしなかった。全系統の平均では、対照区に比べ増量区は増殖率がやや低かった。

この結果から、MS培地については特にP増量の必要はないことが示された。この研究の期間中、実験に供するためMS培地において長期間の継代培養を行ってきたが特に生長が不良になることもなく、MS培地はキリ増殖に適する培地の1つであると思われる。

(4) ホルモン濃度別増殖試験

調査結果は表-4、5のとおりである。BA単独の場合、増殖本数が多いのは系統による差がありBA 4.0~6.0 mg/1の範囲であった。平均で最もよく増殖したのはBA 5.0 mg/1区であった。またBA・NAA混用の場合、出現した形態は早生分枝、伸長、カルスの3形態であった。BAについては、2.0 mg/1に比べ4.0 mg/1は伸長するものが少なく早生分枝化するものが多くなった。またNAAについては濃

表-3 培地組成の改変

系統名	5倍	10倍	対照区	平均
宮城2号	5.0	5.5	4.0	4.8
小林	2.5	3.5	3.0	3.0
青木1号	9.0	6.0	4.5	6.5
青木2号	5.0	8.0	10.0	8.0
渡部1号	6.5	4.0	4.5	4.8
渡部2号	3.0	7.0	10.0	6.7
佐々木2号	3.5	2.5	4.5	3.5
佐々木3号	6.5	6.5	6.0	6.3
高橋	4.5	3.5	7.5	5.2
西会津	6.0	5.0	10.0	7.0
酒井	6.5	5.5	7.0	6.3
二瓶	12.0	5.5	11.5	9.7
長谷川1号	1.5	3.0	4.5	3.0
平均	5.5	5.5	6.7	-

度が高くなるにしたがってカルス化する割合が高くなり、NAA 4.0 mg/1の区では100%がカルス化した。早生分枝の割合からBA 4.0 mg/1・NAA 0~0.2 mg/1が増殖には適していた。

茎頂培養に適するホルモン濃度については、この試験で設定した区の場合BA 5.0 mg/1が最も増殖に適していたが、試験6ではBA 10 mg/1添加区でも良く早生分枝化していることから、キリの場合BAについては最適値よりかなり高い添加濃度でも増殖をそれほど阻害しないと思われた。

(5) 苗条原基誘導試験

培養後の形態については表-6のとおりである。苗条原基はどの区からも形成されなかった。培養した個体はガラス化するものが多く、特に早生分枝はその程度が著しかった。ガラス化した組織を継代用の固体培地に移植したところ、ほとんど生長が見られず、そのまま枯死した。

大量増殖方法として取り組んだ苗条原基誘導であったが、設定したホルモン濃度等に問題があったと推察され、この

試験では形成が見られなかった。使用する植物ホルモンの種類・添加濃度を変えてさらに実験を行うことも考えられるが、液体培地を用いて行う回転培養または振とう培養ではガラス化が高い頻度でおこり、これを回避することがまず必要であると考えられる。キリは寒天培地上でもしばしばガラス化することから、培養環境の影響を受けやすいようである。

表-4 ホルモン濃度別増殖試験 ①

系統名	BA 濃度 (mg/1)					平均
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	
宮城2号	8.0	9.0	8.5	6.5	4.0	7.2
西会津	5.5	7.0	4.5	6.5	5.5	5.8
佐々木1号	8.0	9.0	12.0	11.0	8.0	9.6
小林	5.0	7.0	10.0	8.0	5.5	7.1
平均	6.6	8.0	8.8	8.0	5.8	-

表-5 ホルモン濃度別増殖試験 ②

BA濃度 (mg/1)	NAA濃度 (mg/1)	早生分枝	伸長	カルス	枯死
2.0	0.2	4	5	0	0
2.0	2.0	0	3	6	0
2.0	4.0	0	0	9	0
4.0	0	6	2	0	1
4.0	0.02	6	1	2	0
4.0	0.2	7	0	2	0
4.0	2.0	0	1	8	0
4.0	4.0	0	0	9	0

表-6 苗条原基誘導試験

培地 No	BA濃度 (mg/1)	NAA濃度 (mg/1)	カルス	※1	早生分枝	※2	発根	枯死
1	0	0			1	1		3
2	0	0.02			3	2		
3	0	0.2				5		
4	0	2.0	2	3				
5	0	4.0	5					
6	0.02	0			4	1		
7	0.02	0.02			1	4		
8	0.02	0.2	3		2	3		
9	0.02	2.0	5		1		1	
10	0.02	4.0						
11	0.2	0			5			
12	0.2	0.02			5			
13	0.2	0.2				5		
14	0.2	2.0						
15	0.2	4.0						
16	2.0	0			5			
17	2.0	0.02			5			
18	2.0	0.2			5			
19	2.0	2.0		5				
20	2.0	4.0		5				
21	4.0	0			5			
22	4.0	0.02			5			
23	4.0	0.2			5			
24	4.0	2.0		5				
25	4.0	4.0		5				

※1 カルスと早生分枝の中間的形態

※2 早生分枝と発根の中間的形態

(6) 多芽体形成試験

培養後の形態については表-7、8のとおりである。系統によるBAの感受性に差が見られた。高濃度のBAによりキリは伸長を抑制され、BA50mg/1添加区では両系統とも芽がほとんど伸長せず多芽状の形態となる物が多く見られた。表中BまたはCの形態となった個体では、芽数が20以上のものが多く見られた。多芽となった個体を分割して継代培養の培地に移植したところ、正常に伸長を開始し早生分枝化した。

多芽体の形成については容易であったが、増殖に利用するにはBA濃度について若干調整する必要があると思われる。多芽体の芽数(20以上)は試験3の茎頂培養での増殖率(最大5.5倍)をかなり上回った。しかしキリの場合早生分枝は伸長すると多数の葉と腋芽を持ち、対葉毎の節間で分割・移植すると頂芽優勢が打破されて速やかに生長を開始し、

表-7 多芽体形成試験(系統 渡部1)

試験区	A	B	C	D
B 2-S3	7			3
-S6	6			4
B 10-S3	10			0
-S6	6	1		3
B 50-S3		2	2	6
-S6			7	3

表-8 多芽体形成試験(系統 青木1)

試験区	A	B	C	D
B 2-S3	14			1
-S6	9			5
B 10-S3	4	9		1
-S6	10	1		4
B 50-S3		5	8	2
-S6			11	4

※B(BA)数字はmg/1、S(サッカロース)数字は3が30g/1、6が60g/1

※供試個数は表-6が各区10個、表-7が各区15個(B2-S6のみ14個)

※培養形態は以下のとおり

A-伸長(シュート数は1~7、シュートは主に徒長する)

B-分枝(シュート数は8~29、多数のシュートを形成する)C-多芽(シュートはほとんど伸長せず、数だけ増加する)

D-枯死(調査時に枯死していたもの)

増殖すると再び早生分枝化する。キリの増殖方法の検討は、増殖率だけでなく増殖の安全性や労力なども考慮する必要があると思われる。

2 馴化苗の作成方法

(1) 発根培地のオーキシン類の影響の検討

発根数の調査結果は表-9のとおりである。この試験では発根がみられたのは全てニホンギリであった。オーキシン別の発根状態については、IBAとNAAの差はみられなかったが、2,4-Dはカルス化がすすみ発根が遅れた。活性炭の使用については、添加した区では発根率が極端に低下し、活性炭添加の必要はないと考えられた。

ここで発根がニホンギリでしか見られなかったのは、添加するホルモンの濃度設定が実験に供試した系統にとって適切でなかったと考えられる。発根に適する条件については、「Ⅲ-5 苗条原基誘導」の結果(表-6)を参考にできる

と思われる。その場合発根はNAA 0~0.2 mg/lでBAがそれ以下の添加濃度の組み合わせの区でよく見られた。NAA濃度が高いとカルス化しやすく、またBA濃度が高いと早生分枝化しやすい。ただしこれはシュート先端部を液体培養した時の結果で、普通に固体培養上で発根操作を行う場合はある程度伸長したものをを用いるため、かなり条件が異なることもありうる。

表-9 発根培地のオーキシン類の影響

オーキシン	活性炭	系統名	供試個数	発根数(個)	
				9日後	93日後
IBA 0.1 mg/l	無添加	佐々木 1 ニホンギリ	5 5	0 2	0 5
	添加	佐々木 1 ニホンギリ	5 5	0 0	0 1
NAA 0.1 mg/l	無添加	佐々木 1 ニホンギリ	5 5	0 4	0 4
	添加	佐々木 1 ニホンギリ	5 5	0 0	0 0
2,4-D 0.1 mg/l	無添加	佐々木 1 ニホンギリ	5 5	0 0	0 5

(2) 発根程度別土壌馴化

発根程度別の土壌馴化率は表-10のとおりである。馴化率が高かったのは根長 1.5 cm程度のもので 100%であった。5 mm以下のものが馴化率が悪かったのは、苗長の小さい物が多かったためと思われる。また根長が 3 cmを越えるものは毛根の量が多くなり、根についた培地寒天が十分に落とせなかったために腐敗が生じやすく枯死が増加した。

馴化苗の作成という点では、根をある程度を伸長させた方が馴化しやすく、適当な長さ(この試験では 16.6 mm区)ではすべて活着し、枯損等が生じていない。しかし発根培地でしばらく(27日間)培養しており、発根培地の作成や移植の手間等がかかるのが難点である。

表-10 発根程度別土壌馴化

試験区	実施時期	根長 (cm)	苗長 (cm)	供試数 (個)	馴化数 (個)	馴化率 (%)
発根初期	12日後	4.6	3.3	8	2	25
中期	27日後	16.6	9.6	7	7	100
後期	43日後	33.0	16.0	6	3	50

(3) 挿し木法による土壤馴化試験

各区の土壤馴化率は表-11のとおりである。馴化率で最も高かったのはNAA 0.1 mg/1区で75%であった。馴化率が最低となったのは5.0 mg/1区であるが、これはNAA濃度が高すぎ茎葉の成長が抑制されたためと思われる。NAA無添加区でも55%の馴化率であり、キリの場合挿し木法での発根は比較的容易であるといえる。

この挿し木法では、馴化率こそ最大75%であったが、労力的にはかなり軽減される上、培地の付着などが少なくポット内での腐敗などの事故も少なくなると考えられる。先の発根培地を用いる方法と比べ長短があるので一概には評価できないが、馴化に供する苗数に余裕がある場合には有効であるといえる。

表-11 挿し木法による土壤馴化

NAA濃度 (mg/1)	供試数 (個)	生存数(個)				馴化率 (%)
		17日後	28日後	33日後	53日後	
0	20	18	18	16	11	55
0.1	20	17	17	17	15	75
0.5	20	17	17	14	10	50
1.0	20	19	19	16	11	55
5.0	20	20	20	3	0	0

(4) 時期別土壤馴化試験

得苗率及び生長量の調査結果は表-12、13のとおりである。

試験①：5月上旬移植区では移植後10日程度で全て枯死してしまい得苗率が0になった。これは移植後最低気温が5℃前後の日が5日あり寒さの影響だと思われる。また、5月中旬移植区でも5℃前後の日が5日あり1本枯死した。5月下旬以降は最低気温が10℃を越えるようになり活着率は100%であった。苗畑への移植はキリの萌芽が始まる時期より若干遅い5月下旬以降が適当であると思われる。

試験②：では5月17日移植区で枯死するものが多かった。温室に移した時期が2月と3月だったため、温度と日長の不足から落葉が見られ、

苗畑移植後まもなく枯れるものが多かった。最終的な得苗率は36.8～100%で平均63.5%であった。5月17日移植分を除けば得苗率は若干高くなる。

表-12 時期別土壤馴化 ①

馴化時期	馴化数	得苗数	得苗率 (%)	樹高 (cm)	根本直径 (cm)
5月上旬	5	0	0	—	—
” 中旬	5	4	80	162.3	3.8
” 下旬	5	5	100	75.2	2.0
6月上旬	5	5	100	101.0	2.6

表-13 時期別土壤馴化 ②

系 統	土 壤 馴 化 数				合計 (個)	得苗数 (個)	得苗率 (%)	樹 高 (cm)	根本直径 (cm)
	5月 17日	6月 9日	7月 11日						
佐々木 1	4	11	4	19	7	36.8	95.1	2.4	
佐々木 2	13	3	4	20	11	55.0	125.9	3.2	
長谷川 1	4	1	0	5	5	100.0	60.6	1.7	
長谷川 2	11	2	5	18	9	50.0	78.3	2.3	
青木 1	8	8	0	16	8	50.0	97.8	2.4	
青木 2	4	12	5	21	16	76.2	94.4	2.8	
宮城 2	7	4	10	21	11	52.4	73.1	2.4	
小林	4	11	0	15	18	53.3	85.3	2.5	
小二瓶	5	6	10	21	12	57.1	36.1	1.2	
酒井	1	21	0	22	16	72.7	79.1	2.2	

これらの結果から、作成した馴化苗を苗畑に移す時期については、最低気温による制限があるといえるようである。この試験では5月中旬以降に活着率は急に上昇しており、安全性を考えるならば移植時期は遅くした方が良くであろう。ただし馴化苗はやや小型であることが多いため、生長期間を長くとりたい場合があることも考えられる。目安として野外のキリ萌芽時期などは参考になると思われる。また系統別の得苗率に大きなばらつきが見られたが、その後の生長量の大小とは必ずしも一致していない。得苗率の差が生じた要因は不明であるが、馴化苗の状態や温度感受性などが系統ごとに違っているためではないかと思われた。

3 組織培養苗を用いた抵抗性早期検定方法の開発

(1) 桐枯れ性病害抵抗性の早期検定方法の検討 1

試験①の結果は、表-14のとおりである。試験区1では培地が固化せず移植を行えなかった。これは選抜剤として添加した培養濾液のpHが2.5まで低下していたためと思われる。また、試験②ではどの区もコントロールと大差無かった。この試験では、主に培地pHが影響を及ぼしたと考えられる。

表-14 桐枯れ性病害抵抗性の早期検定方法の検討

試験区	培地組成及び滅菌方法	試験結果
1	1/2 MS 培地25ml + 培養濾液25ml その後オートクレーブ滅菌	— (培地固化せず)
2	オートクレーブ滅菌済み 1/2 MS 培地25ml + 濾過滅菌済み培養濾液25ml	葉が褐変し落葉、枯死 (両系統とも6/6)
3	1/2 MS 培地50ml オートクレーブ滅菌 (対照)	発根を伴って正常に生育 (両系統とも6/6)
4	MS 培地25ml + 培養濾液25ml pH 5.8 調整後オートクレーブ滅菌	発根を伴って正常に生育 (5/5)
5	オートクレーブ滅菌済み MS 培地25ml + 濾過滅菌済み pH 5.8 調整培養濾液25ml	発根を伴って正常に生育 (5/5)
6	MS 培地50ml オートクレーブ滅菌 (対照)	発根を伴って正常に生育 (5/5)

(2) 桐枯れ性病害抵抗性の早期検定方法の検討 2

休眠によりポット苗の樹皮は木質化した。しかし1回目休眠後の成長開始及び成長期間にばらつきがあり、2回目休眠に移行する時期がそろわなかった。接種試験は休眠中の木質樹皮に対して行うため、2回目休眠までの管理を徹底する必要があると考えられる。また2回目の生長停止期以後には、根際からの萌芽と主茎の枯死が多く見られた。これは接種試験の障害になることも考えられた。

IV まとめ

キリの増殖方法について茎頂の培養を中心に考えてきた。増殖について固体培地上での培養では、通常の茎頂培養方法の場合、試験中の早生分枝数の増加率は最大で培養1カ月に8.8倍であった。これは理論上半年で46万倍以上になることを示している。またシュート先端だけでなくすべての節間腋芽を分割・培養すればさらに大きな増殖が期待できる。さらに増殖の程度は分割・移植後の培養初期の方が旺盛なので、培養・移植の間隔を短くすることで全体として増殖率を高くできると考えられる。これに対し多芽体の形成・利用では、小芽の増加数から単純に計算すると年間で数千万倍となる。これは値としてはどちらも大きなものである。ただし実際には培養にかかる労力の問題があり、増殖方

法としては枯死率が低く移植操作などの容易な茎頂培養法は選択しやすいといえる。

また、発根操作については発根培地を用いる方法と直接挿し木法との2通りを検討した。挿し木法は簡便さなどの利点もあるが、発根培地を使用するのに比べてやや馴化率が劣るため、馴化時の枯死による損失をどの程度許容できるかによって使い分ければよいと思われた。

胴枯れ性病害抵抗性の選抜については、試験(1)の結果では枯死の要因が pH にあると考えられ、培養濾液の添加方法については差が現れていない。胴枯れ性病害のメカニズムについては依然不明な部分も多く、試験1では菌体の培養濾液をそのまま選抜剤として用いたが、これが適当であるかどうかについては、試験方法とともになお検討を要する。さらに樹体接種方法については休眠処理の活用を図ったが、馴化苗の管理が不十分だったため接種を行えなかった。ポット苗は生長に伴い植えかえを行う必要があることから、あまり長期間の維持管理を行うことは労力的な負担にもなる。今後休眠処理についての検討には、これらの点も考慮する必要がある。

V 終わりに

キリの組織培養に関しては、茎頂培養を利用することで容易に増殖し、発根・馴化でも効率の良い条件が見いだされ、クローン苗の増殖生産方法としてはほぼ確立したと思われる。ただし通常の茎頂培養以外の大量増殖方法については、決め手となる方法を見いだせなかった。キリは形質や培養時の特性といった系統間の差があり、増殖についてもこの系統毎の性質を保持することは重要と考えられる。そのためこの研究では変異の起こる可能性の高い組織培養手法については未検討である。しかし将来、増殖法やあるいは育種的な手法として必要が生じることも考えられ、その際には改めて検討することになると考えられる。

その場合病害抵抗性の早期選抜は現在以上に必要性を増すと考えられるが、この研究では抵抗性の早期検定方法を確立できなかったため、優良系統の早期選抜は実現しなかった。今のところ優良系統の選抜は圃場において行うことになり、それだけ期間を要することになる。今後キリの増殖や育種の検討において、同時に取り組むべき課題になると考えられる。

引用文献：

- 1) 農地林務部：会津桐の沿革 6. 1954
- 2) 青野茂ほか：桐樹の体質劣化の解明に関する研究(II)

福島県林業試験場研究報告第24号 171～179.
1991

付表-1 培地組成表

要 素	L S 培地	M S 培地
KNO ₃	1900	(mg/1)
NH ₄ NO ₃	1650	
KH ₂ PO ₄	170	
CaCl ₂ ・2H ₂ O	440	
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370	
		※多量要素
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27.8	
Na ₂ ・EDTA	37.3	
MnSO ₄ ・4H ₂ O	22.3	
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8.6	
H ₃ BO ₃	6.2	
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025	
Na ₂ Mo ₇ ・2H ₂ O	0.25	
KI	0.83	
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.025	
ミオイノシトール	100	100
塩酸チアミン	0.4	0.1
ピリドキシン		0.5
ニコチン酸		0.5
グリシン		2.0

※1 1/2 L S 及び 1/2 M S 培地は多量要素の添加量が 1/2