

8. 稀少植物増殖試験

(1) アカシデ種子組織培養試験（培地条件の検討）

佐藤晶春

〔目的〕

日の出町大久野の幸神神社にある国指定天然記念物のシダレアカシデは、老齡等のため衰退しつつあるので、組織培養技術等により後継樹の増殖と保存技術を開発し、貴重な遺伝資源の保存を目指す。しかし、これまでシダレアカシデやアカシデについては組織培養例がなく、*Carpinus betulus* L.（以下、*C. betulus*）による培養例が見られるのみである。そこで、シダレアカシデ増殖への基礎データを得ることを目的として、*C. betulus*の培養例を基に、多量の試料が入手できるアカシデの種子を使い、シュート増殖に適した培地条件の検討を行う。

〔方法〕

1. 材料の調整と培養方法

農林水産省森林総合研究所貯蔵（茨城県新治郡千代田町千代田試験地採取）の1995年産種子を約1日水に浸したあと、塩化ベンザルコニウム 0.1%溶液で10分間攪拌し水道水で洗浄した。次に、エタノール70%溶液で3分間攪拌し1回滅菌水で洗浄後、次亜塩素酸ナトリウム2%溶液で15分間攪拌し4回滅菌水で洗浄した。その後、滅菌したメスで種子を切断して種皮をむき、胚を培地へ置床した。36日後、生長したシュートから根を切り取り継代した。

2. 培地と培養条件

初代の培地は、*C. betulus*の培養で使われたWPM培地とBTM培地とした。それらへシュート増殖に効果があると考えた植物ホルモンのBAP(6-ベンジルアミノプリン)を、各0.2, 1.0, 5.0, 10.0mg/l添加した8培地を用い、試料数は各培地10本ずつの計80本とした。2代目は初代培養の結果からWPM培地にBAPを0.5mg/l添加した培地を用いた。これらの培地にはショ糖2%、寒天0.8%を加え、18×180mmの試験管に分注し、オートクレーブを用いて121℃15分間高圧滅菌した。なお、寒天添加前にWPM培地はpH5.4にBTM培地はpH5.8に調整した。これらの培地はすべて、25℃、16時間日長の恒温条件で培養した。

3. 調査方法

初代培養開始29日後に材料の殺菌方法の判定のためにコンタミネーション数を測定し、シュート増殖の判定のためにシュート形成本数と葉数を測定した。そして、2代目培養32日後に同じく葉数を測定した。

〔結果〕

初代培養開始29日後の培養状態の一例を写真-1, 2に示す。

コンタミネーションは80本中9本となり、11.3%の発生率となった。これに加えて、反応の無いものや枯死したものは11本あり、2代目の培地に移したものは60本となった。なお、BTM(BAP10.0 mg/l)培地はほとんどがコンタミネーションを生じたため2代目の培地に移植できなかった。培養物本体には影響がほとんど無かったが、多くの培地でバクテリアと思われる同心円状の薄い白濁が見られた。材料の殺菌や調整過程での汚染が考えられるため、今後検討の必要がある。

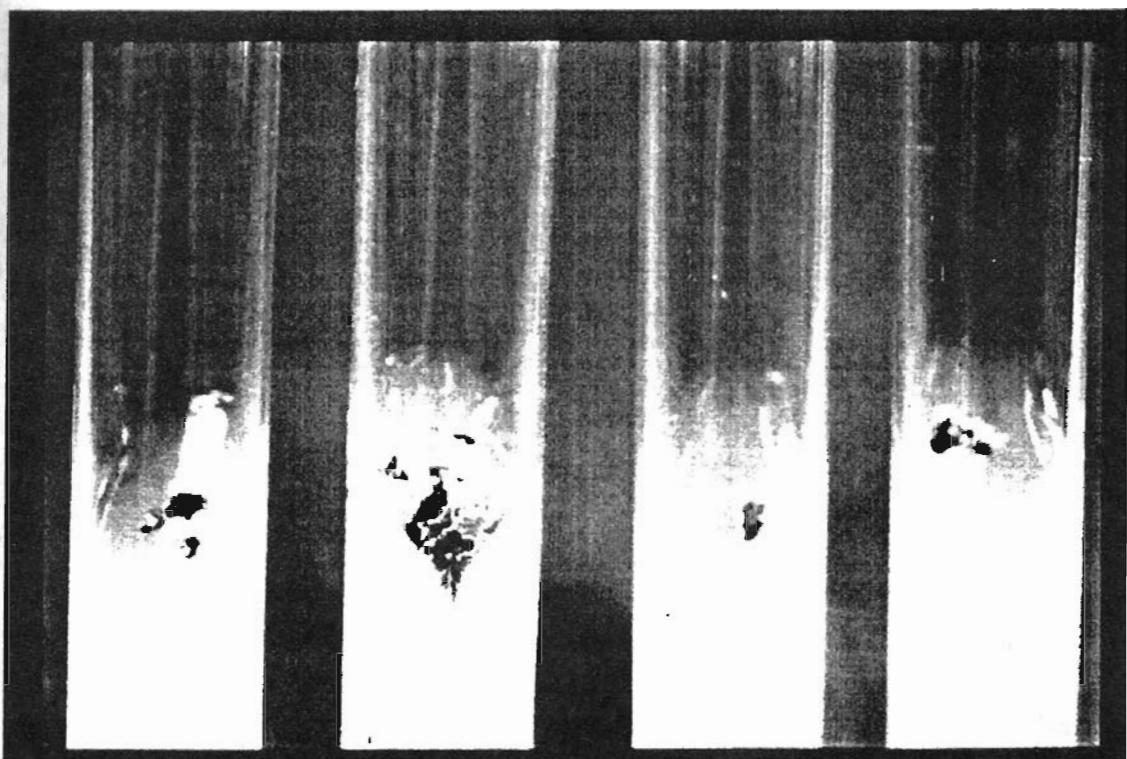


写真-1 初代培養 29 日後の状態 (WPM 培地)
(左から BAP0.2,1.0,5.0,10.0mg/L)

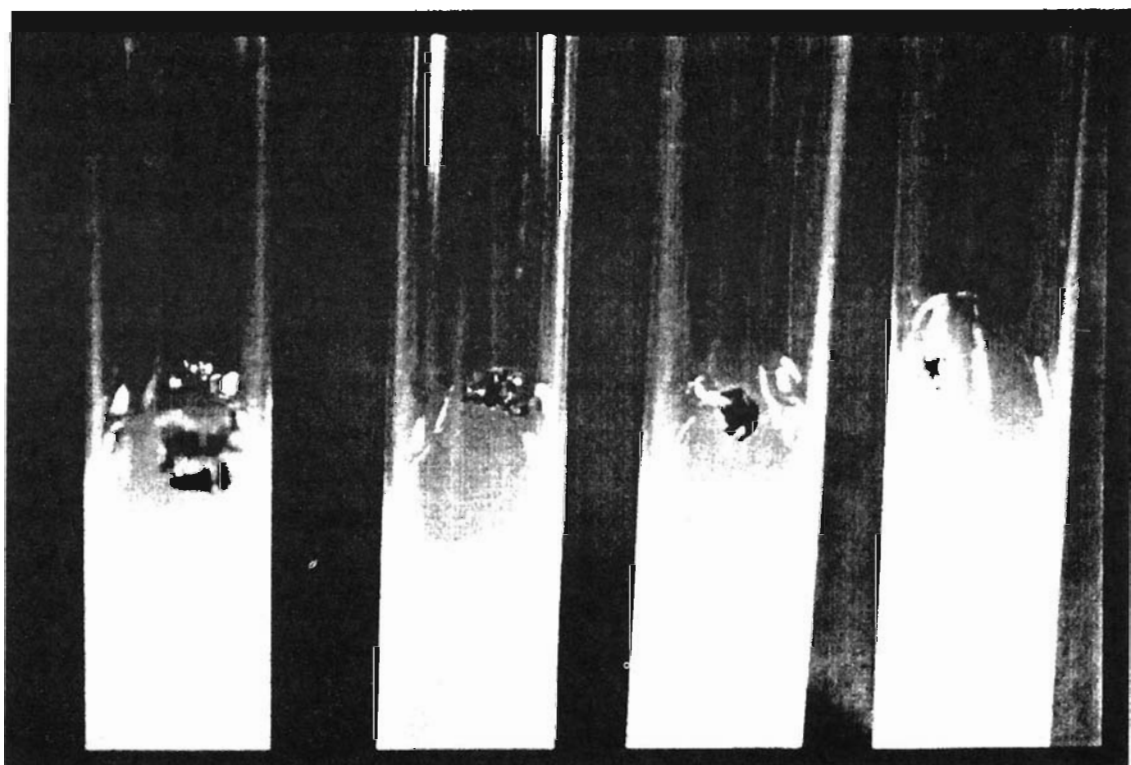


写真-2 初代培養 29 日後の状態 (BTM 培地)
(左から BAP0.2,1.0,5.0,10.0mg/L)

図-1に29日後の各培地でシュートが形成された試験管の本数を示す。

第一に BAPの効果について検討してみた所、BAPが低濃度の培地においてシュートの形成が多く、高濃度になるにつれ低くなった。さらに、シュートの形態も差が見られ、高濃度になるほど茎や根が太く短くなる傾向があった。

次に培地成分の比較であるが、WPM培地も BTM培地も大きな差は見られなかった。しかし、BAP低濃度の時に WPM培地ではすべてがシュートを形成していた。

図-2では、同じく29日後の各培地の葉数の比較を示す。葉数については、WPM培地と BTM培地で BAP濃度により逆の傾向が見られた。WPM培地では BAPが低濃度時に葉数は少ないものが多く、高濃度では葉を付けているもののほとんどが4枚以上のものとなった。

BTM培地では BAP低濃度でも複数枚の葉を付けるものが多く、BAP高濃度では葉が少ない傾向となった。両培地ともに葉の大きさは BAPが高濃度になると小さくなる傾向が見られた。

ここまでの結果から次のように考察した。WPM培地と BTM培地では大きな差は現れなかったが、シュート形成本数から見ると WPM培地の方が若干有効であると考えられた。BAPの効果については、シュートの形成本数、形態や葉の大きさから 0.2～1.0mg/ℓ程度の低濃度が適していると考えられた。

そこで、シュートの増殖を目指し初代培養36日後 WPM(BAP0.5mg/ℓ)培地にすべてを移植した。2代目培養32日後に生長状態を調べたところ、葉数は増えているものの、シュートの伸長生長はあまり見られなかった。

図-3に2代目培養32日後の葉の増加数を示す。継代したほとんどの培地で複数枚の増加が見られ、葉のなかったものからも葉の展開が見られた。初代培地による違いは、葉の増加数についてはほとんど見られなかった。

以上の結果から、今回用いた培地における最適条件を検討すると、低濃度の BAPを添加した WPM培地が適していると考えられた。しかし、殺菌過程やシュートの伸長生長において良好な結果が得られなかったため、今後シュート増殖等を図る上でこれらの課題を検討する必要がある。

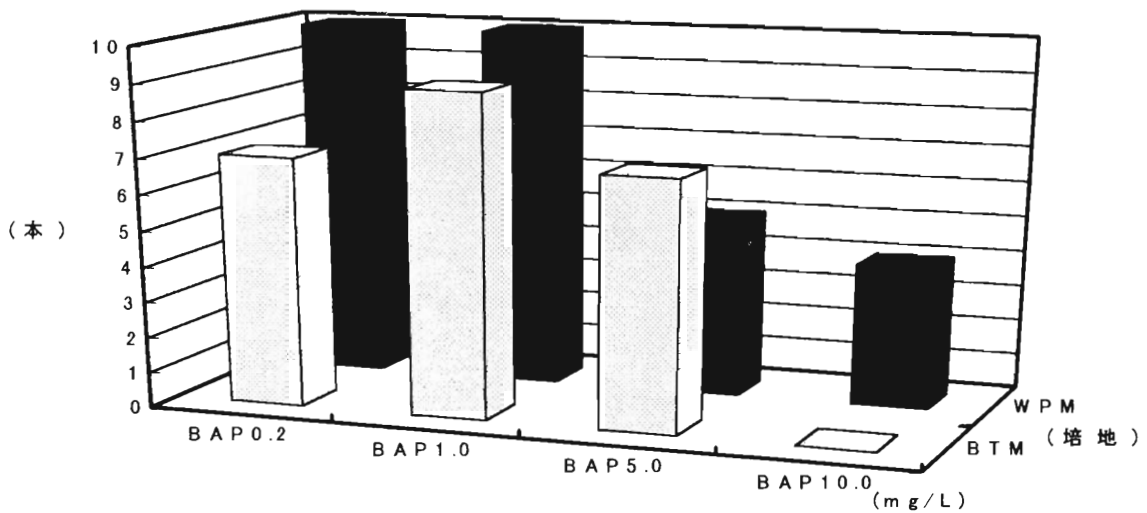


図 - 1 初代培養 29日後におけるシュート形成本数

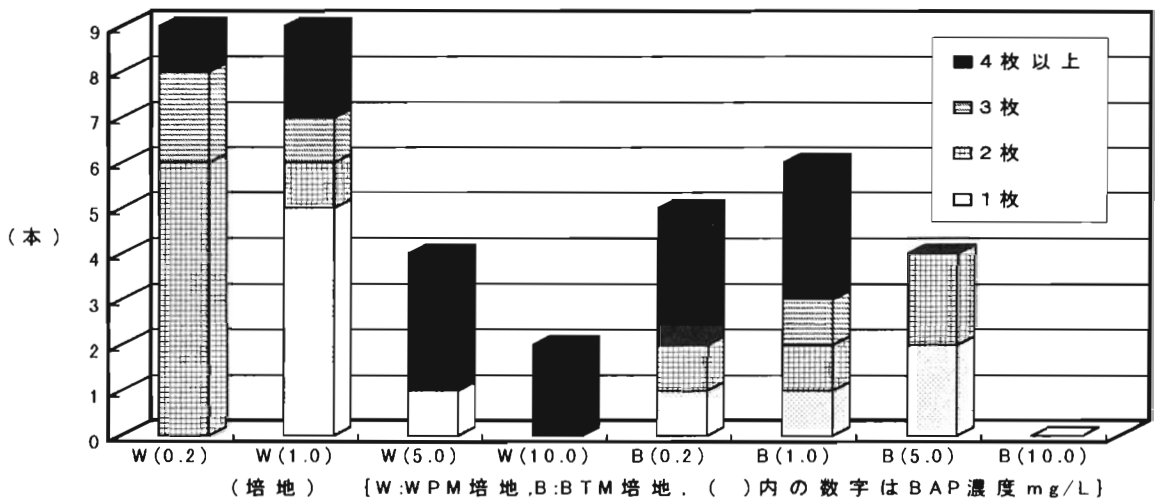


図 - 2 初代培養 29日後における葉数の比較

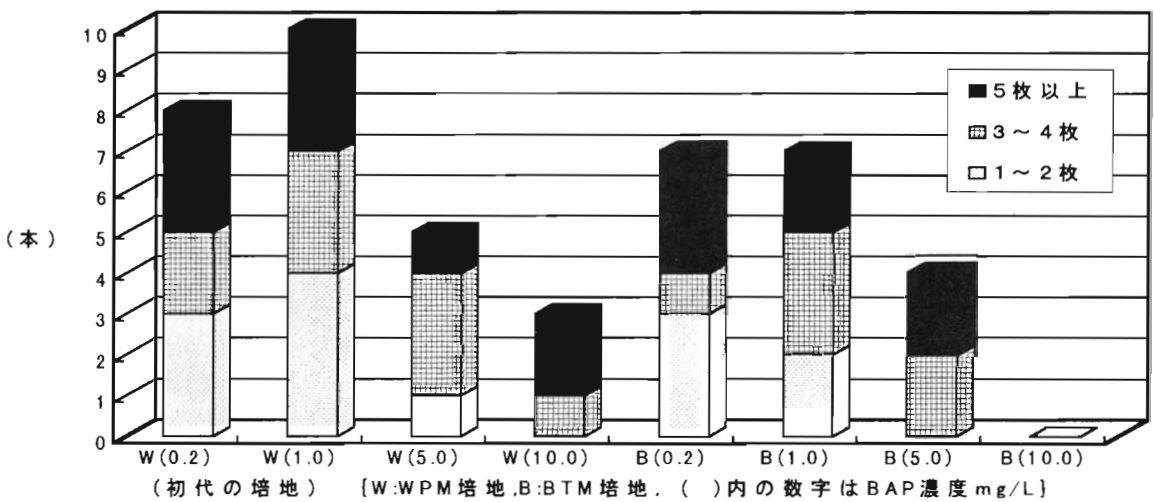


図 - 3 2代目培養 32日後の葉の増加数の比較