

# 組織培養による樹木の保存技術の確立 —サクラの組織培養と凍結保存方法の開発—

藤原直哉

Development of Cherry Tree Preservation Technology by Tissue Culuture.

Naoya Fujiwara

## 要 旨

**組織培養による樹木の保存技術の開発 岡山県林試研報18 : 25~32, 2002** 稀少樹木の保存と培養方法の開発を目的として、県内の天然記念物のサクラの茎頂培養を行い、培養方法の開発とクローン植物体の再生を行った。また、葉片の液体培養を行い、微量のカルスが広範囲のホルモン条件で形成された。特に高濃度のNAAを含んだ培地ではカルスから不定根の形成が認められたが、その他の培地では多くの場合葉片が褐変した。オオシマザクラ系の「御衣黄」の葉片の、切断面はカルスが形成され、不定根が発生した。凍結保存試験では、ソメイヨシノ成木の冬芽から茎頂を摘出し、凍結防護剤で前処理して液体窒素に保存した。これらを解凍したところ、いずれの処理区でも組織は生存し、葉が展開した。生存率は、プログラムフリーザーを用いた場合に最も高く、不定芽の再生状態も良好であり苗に成長した。

キーワード：組織培養、天然記念物、サクラ、保存、液体窒素

## I はじめに

林業試験場では、天然記念物など稀少なサクラの後継樹の養苗を進めている。エドヒガンやヤマザクラの老齢木の中には、天然記念物に指定されたものもあるが、枯損が危惧されるため保存や後継樹の育成の要望も強い。こうした背景のもとに、親木の損傷が最も少ない組織培養法を用いて、クローン苗の作出や保存技術の開発を行った。

数種類ある植物の組織培養法のうち、茎頂を外植体とした方法は、最も安定したものとして多くの樹木で行われている。サクラについては、基本的な茎頂培養法は既に開発されている（酒谷ら 1987）。これらの手法を基に組織培養を実施し、表-1のサクラについて手法の改良を試みた。

細胞培養の応用技術には形質転換植物の再生が考えられ、樹木でも育種法の一つとして、カルスを経由した再分化系の開発が求められる。既にマメザクラのプロトプラストからの根の分化について、NAAとBAの効果も報告されている（脇田ら 1997）。

また根頭がんしゅ病の病原菌、*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn は形質転換を目的とした遺伝子導入法に広く利用されている。特にアグロバクテリウム法は直接導入法と比べ再現性が高く、ポプラを始め、幾つかの樹木でも形質転換に成功している（大澤 1994）。

「四季桜」の発根処理中に茎、葉柄、葉脈にカルスや、不定根の形成が観察されたため、葉片についても細胞培養と再生条件を検索した。そのため本実験では、アグロバクテリウム法に適したカルス経由の再生系の開発を目的とし、サクラ葉片に与えるオーキシンの影響を調べるため、供試材料とし

て勝山町の通称「四季桜」の茎頂由来のクローン苗の葉片を用いた。

さらに稀少樹木の保存と培養の通年化为目的に、ソメイヨシノの茎頂を液体窒素中に保存した後、植物体を再生することに成功したので、その方法について以下に述べる。

なお実験に当たり、熱帯林森林樹木 (Maruyama et al. 1996)、ヤマザクラ (Niinoら 1997)、ミズメ (三樹 1996) の植物体の再生例の報告を参考にした。

なお、本研究はH.9~13に実施された単県研究課題「組織培養による樹木の保存技術の確立」により行ったものである。

## II 材料と方法

### 1. 茎頂培養

樹木の組織培養法には、①春先に成長した萌芽枝を外植体に用いる方法 ②冬芽を用いる方法がある。①の方法は殺菌が困難であったので、②の方法を用いた。

#### 1) 外植体の調整

外植体として、表-1のサクラ20個体の冬芽を供試した。冬芽の採取に際しては、テングス病や成長の悪い枝、日陰の枝を避け、充実した冬芽が形成されている枝先端部分を選定した。また、コンタミネーションを最小限に抑えるため、降雨、着雪時の採取は避け、晴天が2日以上続き、空中湿度が低く乾燥した日に穂枝を採取するよう留意した。採取した穂枝はあらかじめ培養室で数日間水に浸した後に試験に供した。

穂枝には粉じんが付着していることが多いため、15~20cmの長さに切断した後、脱イオン水を溜めた超音波洗浄機で10分間洗浄した。次に、柔らかいスポンジを用いて、薄めの中

性洗剤で洗浄した後、頂芽と側芽（葉芽）の付いた枝を1.0～1.5 cmの長さに調整し、滅菌水中に1時間程度保存した。

## 2) 表面殺菌

クリーンベンチ内で、金属製の茶漉しに入れた冬芽を、①70%エタノールに3分間、②滅菌水、③次亜塩素酸カルシウム飽和溶液のろ液にそれぞれ10分間浸漬した。なお浸漬中は、マグネチックスターラーで攪拌した。その後さらに滅菌水に3回浸漬し、洗浄した。

## 3) 茎頂の摘出

次に冬芽を滅菌したろ紙の上に置き、数分間風乾させ、表面が十分乾燥した後、実体顕微鏡下で茎頂を摘出した。

## 4) 初代培養

摘出した茎頂は、植物培養用の試験管に10mlずつ分注した初代培養用WPM（Wood Plant Medium）培地に植え付けた。植物ホルモンとしては、BA 1.0mg/lを添加した。容器には通気フィルター付きのキャップを被せた。培養条件は、気温24℃、照度4,000LUX、16時間日長に調整した。

## 5) 増殖培養

健全な茎頂の展開を確認して増殖用培地（BA 0.5mg/l、IBA 0.1mg/l、GA 3 3.0mg/lを添加）に移植し、1ヶ月間を目安に継代培養を行った。茎頂が成長し、腋芽が形成されると、さらに分割して増殖用培地へ植え付け、培養した。

## 6) 発根促進処理

茎頂を含む培養物が2～3 cmに成長してくると、発根処理を行った。培地支持体には通常寒天を用いた外、移植時のダメージを軽減するため、フロリアライトと液体培地を組み合わせ用いた。発根促進剤にはIBA 2.0mg/lを用い、移植は茎頂を含む地上部を培地支持体に挿して行った。

移植後、発根促進処理として培養条件を24℃、暗黒下に変更して培養した。この条件下で、5日以上経過すると培養物の基部から不定根が発生した。不定根が伸長してくると発根処理を中止した。根の成長量は測定していないが、目測では根の量が多いほど後の順化が良好であった。

## 7) 育成処理（順化の前処理）

不定芽を維持するためには、健全な根株部を成長させる必要があり、順化の前処理では培養物が十分な大きさに成長するまで、無糖のWPM液体培地で培養し、育成した。順化前でも培養物は、光合成を行う能力を備えており、糖の添加はコンタミネーションの発生を招きやすいので、無糖の培地を使用した。培地支持体にはフロリアライトまたは、水苔とバーミキュライトを混合したジフィーポットを使用した。培養容器にはアグリポットを用いた。

## 8) 順化

樹木の組織培養を行う際には、順化過程での枯損率によって成否が大きく左右される。順化については光などの条件が

安定し、外環境が植物の生育に適した春期に行った。気温は、18～24℃前後、湿度は60%以上とした。

順化の手順は、まず育成処理の終了時から、クローン苗を容器ごと培養室から順化室に移動し、活性を観察しながらアグリポットの通気孔を外した。室内では日光の直射を避け、特に気温の上昇と乾燥に注意した。10日程度経過すると容器の上部を開放し、徐々に外気に当たった。葉が萎れたり、先端から枯損するようであれば容器を閉じた。この頃から、液体肥料としてHYPONEX 1000倍液を与えたが、糸状菌が繁殖してきたときには、殺菌剤としてベノミル水和剤を液体肥料に3000倍濃度に調整して混入した。

クローン苗は室内環境に順化した後、細根を切断しないように注意しながら培養容器から取り出し、園芸用培土を入れたポットに植え替えた。ポットは順化室から温室内に移動し、底面かん水を行いながら温室内の環境に慣れさせた。急激な乾燥を避けるため、大きめのプラスチック製のコップを反転させて、クローン苗を被覆した。数週間観察を続け、苗が健全な状態を保つことを確認しながらコップを外し、さらに2～3週間様子を見た。

温室内の苗の成長を確認して、ポット苗を屋外に移し、自然環境下に置いた。この状態で順調に成長することを確認して、秋期及び3月中旬に苗畑に移植し、施肥・病害虫の防除などの管理を行いながら育苗をした。

## 9) 病害虫

苗畑へ定植後、モンクロシャチホコ（*Phalera flavescens*）の幼虫による葉部の食害を受けたため、DDVP 500倍液を噴霧して防除を行った。「菊桜」は葉害のため、翌日には葉部が赤変して3～5日後脱落したが、半月後には新葉が展開した。スミチオンは、濃度に関わらず効果が認められなかった。

また、「御衣黄」はコガネムシ類あるいはヨトウガの幼虫と思われる根系の食害を受け、育成途中で枯死した。

## 2. 細胞培養

材料には、岡山県真庭郡勝山町指定天然記念物の通称「四季桜」（ヒガンザクラ系、種は不明）の茎頂由来のクローン苗を通気孔のある培養容器で3ヶ月間培養室内（気温 24℃、照度4,000LUX、16時間日長）で育成し、発生した葉を用いた。育成にはWPM培地を使用し、単一の個体を供試した（写真-3）。



写真-3 材料に用いたクローン苗

1998年2月16日に葉片を切除し、少量の滅菌水を入れたシャーレ内で、葉脈を含め3mm角の断片に切断した。操作はクリーンベンチ内で行った。これらの葉片を添加オーキシンとしてNAAとIBA, IBAとIAA, 2,4-DとIBAを0~10μMの濃度で組み合わせたMS液体培地で6ヶ月間振とう培養(気温24℃, 100r.p.m., 暗黒下)した。培地は全量で1mlに調整し、培養容器には5ml容量の管瓶を用いた。

また不定芽の発生を促すため、添加ホルモンを2,4-DとBA, IAAとBAを0~10μMの濃度で組み合わせ、同様に培養し、倒立顕微鏡で培地中の葉片の変化を観察した。

以上の実験を2回繰り返した。

形成されたカルスは培地ごと駒込ピペットで吸引し、ホルモンフリーのMS液体培地10mlに注入し、希釈した。カルスを含んだホルモンフリーのMS液体培地200μlを培地の濃度、糖の種類を変えた液体培地10ml(表-2)にそれぞれ分注し、明条件下(4,000LUX)と暗黒条件下で60日間振とう培養(100r.p.m.)した。培養容器は100ml容量の三角フラスコを用い、1処理5反復とした。

同様にWPM培地で育成したオオシマザクラ系の「御衣黄」、エドヒガンの「醍醐桜」の葉片について、高濃度のオーキシンとして、NAA 100μMを含むMS寒天培地に挿し付け、明条件下で3個体ずつ30日間培養した。その後カルスの増殖が確認された試料はホルモンフリーの1/2MS培地に移し、さらに30日間培養した。

表-2 組織培養の条件

	基本培地	糖	ホルモン	光条件
増殖	MS	ショ糖 30g/l (FW:342.30)	NAA 100μM + IBA 0.1μM	4,000LUX、16時間日長
	"	"	"	暗黒下
	MS	ショ糖 30g/l	ホルモンフリー	4,000LUX、16時間日長
	"	"	"	暗黒下
分化	"	マルトース 30g/l (FW:361.31)	"	4,000LUX、16時間日長
	"	"	"	暗黒下
	1/2MS	"	"	4,000LUX、16時間日長
	"	"	"	暗黒下

### 3. 凍結保存技術の確立

樹木については、組織中の糖脂質、燐脂質が季節によって著しく変動する影響を受けて耐凍性も変動することが確認されている(吉田 1970)。またこれまで行われた多くの報告では、冬芽の茎頂を材料に用いることで凍結保存に成功している。このため、平成12年2月16日~同19日に農林水産省森林総合研究所内のソメイヨシノ(*Prunus yedoensis* M.)成木の充実した頂芽を採取し、実験に供した。

採取した枝条を水道水で希釈した中性洗剤に浸したスポンジで丁寧に洗浄し、表面に付着する付着物を洗浄した。その後中性洗剤を水道水で洗い流した。次に剪定鋏で頂芽を切り取り、滅菌水の中に5~15分間保存した。

外植体の表面殺菌は、冬芽を70%エタノールに3分間浸漬した後、滅菌水で1回洗浄した。次に5%過酸化水素水に5分間浸漬後、滅菌水で3回洗浄した。浸漬、洗浄処理には、マグネチックスターラーを使用した。

次にピンセットで冬芽の鱗片を剥ぎ、茎頂を露出させ、メスで摘出した。茎頂は数量が揃うまで、少量の滅菌水に入れて5~60分間保存した。冬芽は適宜滅菌したろ紙の上に置き、余分な水分を吸い取らせ、表面を乾燥させた。これらの操作はクリーンベンチ内で行い、使用した実験器具等は全て滅菌したものである。

凍結保存方法については、①簡易凍結保存法、②プログラム・フリーザーを利用した緩速凍結予備保存法(酒井 1992)、③直接凍結保存法を実施した。

簡易凍結保存法では、最初に凍結防護剤による前処理を行った。滅菌水中から充実した茎頂を60個選別し、ろ紙の上に置いて水分を吸い取らせた。この茎頂を2個ずつ1.5ml容量のクライオチューブ(アシスト製、リング付き)30本に投入した。次に凍結防護剤(表-4)をパスツールピペットで擦り切りまで充填した。この時、保存中の液体窒素の浸入を軽減するため、クライオチューブの締め付け部にシリコングリースを少量馴染ませ使用した。

表-4 凍結防護剤の組成(体積比)

基本培地	WPM培地
15%	シュクロース
2%	ポリエチレングリコール
25%	グリセロール
13%	ジメチル硫酸塩

\* 凍結防護剤はフィルター滅菌した。

反応時間はそれぞれ、5、15、30分間の3段階に区分して室温条件下に静置した。

前処理後、ピペットで凍結防護剤を廃棄し、試料が浸る程度の少量の凍結防護剤と交換した。凍結保存は、クライオチューブの蓋を密閉した後、ケーンに固定し、デュワー瓶の液体窒素の気層に静置した。液体窒素中の保存期間は、それぞれ15時間程度(12~18時間)とした。

クライオチューブを完全に液体窒素中に浸漬すると、内部に液体窒素が浸入し、解凍時に急激な膨張を起こして爆発する危険性がある。液体窒素の補充を含め、取り扱いには注意が必要であるため、気層に静置するのが望ましい。

プログラム・フリーザーを用いた緩速凍結予備保存法では、植物成長点細胞冷却プログラムを使用し、茎頂を前処理後15℃から-40℃まで、0.5℃/min.の冷却速度で110分間処理した(図-1)。

冷媒にはメタノールを用い、チューブをバスに浸漬して凍結させた。プログラム終了後チューブを取り出し、液体窒素の気層に保存した。

比較試験として、別の個体から鱗片の付いたままの冬芽を表面殺菌し、凍結防護剤による前処理を行わず、そのまま液体窒素の気層で凍結した場合の生存率を調べた。

解凍処理は、あらかじめ37℃に調整した水道水に、デュワー瓶から取り出したケーンを3~4秒間浸漬して行った。チュー

ブ内の凍結防護剤が融けたのを確認し、クライオチューブをケーンから外して100%エタノールに浸漬して、クリーンベンチ内に持ち運んだ。その後、エタノールからチューブを取り出し、エタノールが蒸発してから、凍結防護剤をピペットで吸い出して除去した。

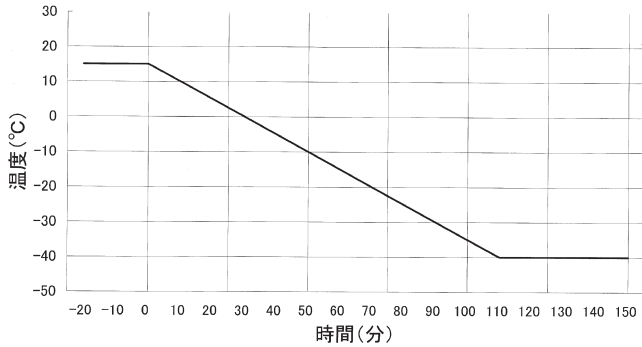


図-1 植物成長点冷却プログラム

通常、浸透圧を高めた状態の組織を、再生用培地へ移植すると、組織から培地へ液体の流出が起こり、浸透圧が急激に変化して組織の損傷を起こす。浸透圧の急激な変化を緩和するため、後処理としてチューブに高濃度シヨ糖培地(表-5)を擦り切りまで分注し、静置した。15分経過後、高濃度シヨ糖培地を除去し、解凍した莖頂を取り出してろ紙の上に置いた。莖頂は、高濃度シヨ糖培地を組織から徐々に取り除く目的で、表面にろ紙を敷いた再生用寒天培地(表-6)に置き、定法により培養した(気温24°C, 4000Lux, 16時間日長)。

表-5 高濃度シヨ糖培地の組成(体積比)

基本培地	WPM培地
	40%シヨ糖
	PH 5.4

\* オートクレーブで滅菌する。(121°C, 10分間)

表-6 再生用培地の組成

基本培地	WPM培地
BAP	0.5 mg/l
IBA	0.1 mg/l
GA	2.0 mg/l
シヨ糖	20.0 g/l
寒天	10.0 g/l
PH	5.4

さらに2日後以降、コンタミネーションしていない個体を試験管へ分注した寒天培地に移植した。そして以降2ヶ月間肉眼観察を行い、莖頂の生存と再生、伸長、発根を確認した。

### III. 結果と考察

#### 1. 莖頂培養

試験を行った樹木とその結果を表-1に示す。ヤマザクラの「黒岩の山桜」, 「榎合の桜」, オオシマザクラの「菊桜」, ヒガンザクラ系の「四季桜」の4個体について莖頂から苗木に育成することに成功した。県指定天然記念物「黒岩の山桜」を写真-1, 写真-2に示す。

傾向として、エドヒガン系のサクラの培養が困難であり、ヤマザクラは成功事例ができた。エドヒガン系のサクラは初代培養の段階の莖頂が展開して伸長を始めるころに基部から徐々に褐変し、数ヶ月以内に枯死してしまった。まれに1.5~2.0cm程度に伸長する個体もあったが、それ以上の成長や増殖が起こらなかった。また、発根も極めて困難であった。

これは、樹木の組織培養の全般的な問題であり、抗酸化剤や活性炭の培地への添加が試みられているが、成果を上げていない。これは、植物ホルモンの感受性が、品種、系統、個体によって大きく異なり、品種や系統の幅が広い樹木については、個体によって培養特性も異なるものと考えられる。

写真-1 黒岩の山桜・親木



写真-2 同・クローン苗



#### 2. 細胞培養

四季桜について、置床後60日間培養した時の観察結果を表-3に示す。

カルスの発生は培養10日目から植物ホルモンの広範囲の組

表-1 サクラの組織培養結果一覧

名 称	所 在 地	展開	伸長	増殖	発根	順化	鉢上	定植	備 考
たてかわさくら 堅皮桜 (エドヒガン)	勝田郡勝田町馬形	○	△	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.39, 4, 1)
きくぎくら 菊桜 (キクザクラ)	勝田郡奈義町上町川	○	○	△	○	△	△	○	町指定天然記念物 (S.54, 1, 1)
だいごさくら 醍醐桜 (エドヒガン)	真庭郡落合町別所	○	△	×	×	×	×	×	県指定天然記念物 (S.47,12, 9)
くろいわのやまざくら 黒岩の山桜 (ヤマザクラ)	〃 川上村東茅部黒岩	○	○	○	○	△	○	○	県指定天然記念物 (S.31, 4,17)
いわぎくら 岩桜 (ヤマザクラ)	〃 〃 堂の前	○	○	○	○	△	×	×	村指定天然記念物 (S.51, 5, 4)
こうじろのしきざくら 神代の四季桜 (ヒガンザクラの一種)	〃 勝山町神代	○	○	○	○	○	○	○	町指定天然記念物 (S.42, 4, 6)
さくらもとじのおおざくら 桜本寺の大桜 (エドヒガン)	〃 〃 後谷	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.42, 4, 6)
いらいわねのおおざくら 岩井畝の大桜 (エドヒガン)	〃 〃 岩井畝	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.50, 5,12)
しきざくら 四季桜 (エドヒガン)	苫田郡富村東谷出合奥	○	△	△	△	×	×	×	村指定天然記念物 (S.48, 4, 1)
ひあいのさくら 樋合の桜 (ヤマザクラ)	〃 上斎原村樋合	○	△	△	△	△	○	○	村指定天然記念物 (S.63, 7,28)
おそのさくら 尾所の桜 (ヤマザクラ)	〃 阿波村尾所墓原	○	○	○	○	△	×	×	県指定天然記念物 (H. 8, 4, 2)
えんつうじいっほんざくら 円通寺一本桜 (エドヒガン)	〃 鏡野町寺和田円通寺	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.56, 4, 1)
そうどうのさくら 宗堂の桜 (不明種)	赤磐郡瀬戸町宗堂	○	△	△	○	×	×	×	町指定天然記念物 (S.31, 4,17)
おわらのいっほんざくら 尾原の一本桜 (エドヒガン)	御津郡加茂川町尾原	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.48, 6, 1)
やまそらさくら 山空桜 (不明種)	〃 御津町中泉	○	△	△	△	×	×	×	町指定天然記念物 (S.32, 6, 5)
おおやまざくら 大山桜 (オオヤマザクラ)	児島郡灘崎町奥迫川	○	○	○	○	△	△	×	町指定天然記念物 (H. 4, 2,15)
すずおのしだれざくら 鈴尾のしだれ桜 (不明種)	上房郡有漢町鈴尾	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.56,12, 7)
さくらのき 桜の木 (エドヒガン)	〃 北房町上水田 井戸鐘乳穴神社	○	×	×	×	×	×	×	町指定天然記念物 (S.52,12,19)
ぎょいこう 御衣黄 (改良名 ギョイコウ)	阿哲郡哲西町矢神	○	○	△	○	○	○	×	町指定天然記念物 (H. 5, 3,30)
しだれざくら しだれ桜 (イトザクラ)	〃 〃 神代	○	○	△	△	△	△	△	町指定天然記念物 (S.53, 9,11)

凡例 ○: 容易 △: 可能 ×: 困難

み合わせで始まり、徐々に肥大した。NAAを使用した場合、広範囲の組み合わせでカルスが形成された。特にNAAとIBAの組み合わせで反応が大きく、不定根が形成された。NAAの濃度が高くなるに従って、カルスの形成や不定根の形成は早まる傾向にあった。また、NAA単体でも同様に反応し(写真-4)、最初に葉脈、次に葉肉部から不定根が発生した。液体培地中に浮遊しているカルスは、ほぼ透明で、5mm程度のカルス塊に成長すると淡黄色を呈した。形状は楕円形、棒状またはこれらの変形が多く、分裂面も形成された(写真-5)。細胞は形状が揃わず、大きさも不揃いである。このことからDNAや代謝系の異常を起し、細胞が不安定な状態にあることが推測された。

形成された不定根を観察したところ、培養容器内で3cm程度に成長し、中心柱と根毛が確認された(写真-6)。

形成された不定根は、観察された構造から、器官として正常な機能を有していると思われる。

IAAとBA, IAAとIBA, 2,4-DとBAの組み合わせでは、カルスが形成されても培養を開始して50日前後から葉片が褐変し、それ以上の増殖や分化は起こらなかった。褐変は培養中緩慢に起こるため、葉片を用いた場合、組織の代謝を阻害する方向に働いている可能性が高い。培養の材料に葉片を用いたことも、結果がばらつくことの間接的な原因となったと思われる。しかし、最も顕著に反応したNAAとIBAの組み合わせのほか、2,4-DとIBAの組み合わせでカルスの形成状態は良好であった。

植物ホルモンの作用は内生ホルモンと外生ホルモンの総和で影響を及ぼすとされ、それぞれの濃度の作用形態は、最適型、飽和型、直線型の3タイプに分けられる。オーキシンは最適型の作用を示すとされ、不足しても過剰に与えても効果

を示さない。この中で、ホルモン濃度の他に感受性の違いがあり、濃度と感受性のバランスからホルモン作用が調節されるとされている(保尊 1998)。サイトカイニンとして、BAを組み合わせた試験区は分化も起こらず、カルスの形成状態も不良であった。

光条件や培地の濃度を変えた場合、カルスからの分化は起こらず、培養条件による増殖や分化の差は確認されなかった。培地にマルトースを加えた場合には、全てのカルスが褐変した。

アスパラガスの培養では、マルトースを用いることでエンブリオジェニックカルスから充実した胚様体を得ている(佐賀県 1997)。この時マルトースは、0.1Mの濃度で使用されている。サッカロースと分子量の差が少ないこと、マルトースを使用した全ての試験区で葉片の褐変が起こったことから、何らかのマルトース特有の阻害要因が存在すると思われる、サクラ葉片の培養には数倍に希釈して用いるか、使用しないほうが良い。

その他にも、培養細胞をオーキシンを含む培地からホルモンフリーの培地に移すと、単細胞やカルスは、継代培養中に僅かな変化で増殖を停止したり、褐変を起こすことがある。

表-3 植物ホルモンの影響

NAA(μM)		IBA(μM)	
0	1	0	1
-	-	-	-
C+	C+	C+	C+
R++	R++	R++	R++

IAA(μM)		BA(μM)	
0	1	0	1
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+
-	-	-	-

IAA(μM)		IBA(μM)	
0	1	0	1
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+
C++	C+	C+	C+

2,4-D(μM)		BA(μM)	
0	1	0	1
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+

2,4-D(μM)		IBA(μM)	
0	1	0	1
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+
C+	C+	C+	C+

凡例  
 C +: カルス形成 小  
 C ++: カルス形成 中  
 C +++: カルス形成 大  
  
 R +: 不定根形成 小  
 R ++: 不定根形成 中  
 R +++: 不定根形成 大  
  
 ■: 枯死  
 基本培地: MS培地

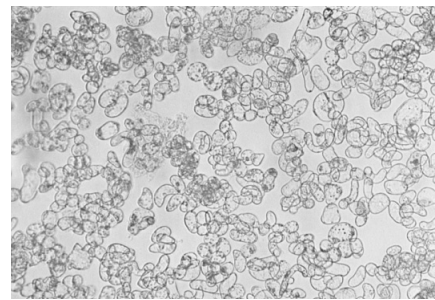


写真-4 浮遊する細胞

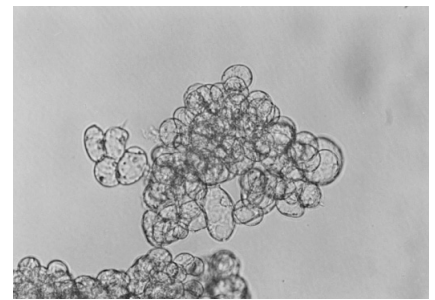


写真-5 分裂するカルス

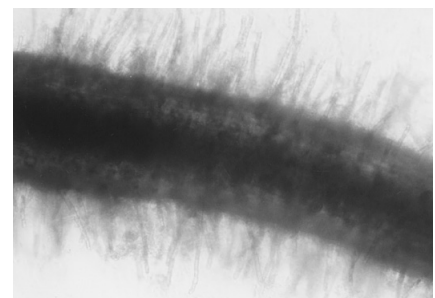


写真-6 不定根の構造

例えば、ニンジンの細胞培養では、培養が長期間に及んだり、アンモニア態窒素の濃度が高いと培養細胞の分化能が低下することが知られている。そのため、安定した培養系の開発をするためには、培地の塩濃度や水素イオン濃度、光条件を検索しなければならない。

「御衣黄」については培養を開始して3日目から切断面にカルスを生じ、7日目にはカルスから発根した。不定根は旺盛に分岐し、淡い赤色を呈した。これは通常の継代培養中には見られない現象である。ホルモンフリーの1/2MS培地上に移したカルスは、不定根が発達したが、不定芽は発生しなかった。

「醍醐桜」については少量のカルスを生じたが、その後褐変した。

不定観察から判断するためには、①細胞質の内容物が密に詰まった小さな細胞から成る細胞塊から形成されていること②子葉と根の極性が形態的に明らかであることなどの特徴から分別される。さらに、内性のABAが不定胚形成の能力の獲得に深く関与していることや、不定胚を形成する能力を持つ細胞株と形成能の無い細胞株を比較すると、培地中に分泌、蓄積される蛋白質の種類が異なることも示されている(野村 1995)。不定胚の誘導には、多くの要因が考えられるため、こうした諸条件を明らかにする必要がある、これが今後の課題である。

### 3. 凍結保存技術の確立

前処理を行わないで直接凍結を行った場合、解凍した全個体の組織は褐色に変化し、生存や再生は確認されなかった。ヤナギの枝では直接凍結が成功しているが(酒井 1992)、サクラでは成功しなかった。解凍後、培養したサクラの茎頂の観察結果を表-7, 表-8, 写真-7に示す。

表-7 40日後の観察結果

前処理方法	供試数	汚染数	残数	生存数	生存率	再生数	再生率
Program							
Freezer	60	22	38	29	76.3%	5	13.2%
5分	60	40	20	4	20.0%	0	0.0%
15分	60	30	30	15	50.0%	0	0.0%
30分	60	17	43	20	46.5%	2	4.7%

表-8 70日後の観察結果

前処理方法	供試数	汚染数	残数	生存数	生存率	再生数	再生率
Program							
Freezer	60	22	38	29	76.3%	6	15.8%
5分	60	40	20	4	20.0%	0	0.0%
15分	60	30	30	15	50.0%	0	0.0%
30分	60	17	43	20	46.5%	8	18.6%

40日後、茎頂はいずれの試験区でも生存していたが、プログラム・フリーザーを使用した緩速凍結保存試験では、生存率が76.3%と最も高かった。また、簡易凍結保存法と比較してもその後の再生率は13.2%と高く、その状態も良好であった。これはMaruyamaらが行った熱帯早生樹*Guazuma crinita* Mart.の茎頂の凍結保存試験と同様に、緩速凍結保存法が有効性であった結果を示している。また簡易凍結保存法では、凍結防護剤を30分間処理した試験区で4.7%の再生が確認さ

れた。前処理時間の短い5分の試験区では生存率は20%と低下し、植物体の再生は確認されなかった。再生状態の外観上の特徴では、簡易凍結保存法の5分と30分では、展開した葉の変形、成長点の生育停止などの相違点が確認された。

70日後の再生率は30分間の簡易凍結保存法が18.6%と最も高い数値を示し、緩速凍結保存法の15.8%を上回った。

簡易凍結保存法では凍結防護剤の処理時間が長いほど再生率が高く、プログラム・フリーザーを用いた緩速凍結予備保存法でさらに生存率が高い数値を示したことの理由について、明解な解答は得られていないが、幾らかの指針がある。

凍結傷害と耐凍性に関する研究で、凍結障害は従来から細胞膜の構造的・機能的な損傷に起因していることが知られていたが、低温顕微鏡や電子顕微鏡を用いた細胞の凍結・融解過程が観察された。結果凍結が進むに連れて細胞内の水分が細胞外に移動し、細胞間隙で氷晶が形成され、細胞は脱水され収縮することが確認されている。この時細胞膜の半透性が失われ、無機イオンやアミノ酸などの電解質も漏出するとされている(吉田 1999)。凍結防護剤は組織の脱水と、主に細胞膜の保護を目的に調整されたものである。前述の現象を軽減するには一定の反応時間を必要とするが、試料の大きさや密度、状態によって変化することが予想される。再生率を向上させるには、それぞれ試料に合わせて適切な浸漬時間を明確にしなければならない。さらにこの記述の中で、吉田は他に温帯に生育する植物の細胞壁、液胞等の構造や性質の季節的な変化を挙げ、これらの多様な防御機構によって耐凍性が獲得されるとも述べている。今回材料に用いたソメイヨシノの冬芽は、自然状態でこれらの能力を獲得している器官と思われる。



写真-7 再生した不定芽

しかし、再生した葉に萎縮が起こることや、過半数の茎頂の成長点が伸長しないことなど大きな課題も残る。この原因について、扱う組織や器官の構造によって、凍結防護剤が均一に浸透しない可能性も否定できない。浸透の程度が不均一になった結果、脱水不良や凍結防護剤の浸透不足等により、葉原基に局所的な凍結と細胞破壊が起こり、再生する過程で萎縮が発生したとも考えられる。同様に成長点の構造についても、細胞密度が高く、複雑である特徴が挙げられる。そのため、供試した個体によって組織への浸透の度合いが異なり、不十分な個体が凍結による破壊を受けたと思われる。

凍結防護剤の浸透性を高めるため、従来法の改良点として

考えられるのは、①凍結防護剤へ展着剤を配合する②遠心・加圧処理や陰圧下に置く ③処理時間を長くするなどの方法があり、これらは現在ディープフリーザー（-85℃）の試験によって長期間継続して実施しているところである。

その後、再生した不定芽を培養し、クローン苗を得ることに成功した。

#### IV. 結 論

これまで樹木の保存を目的として、①茎頂培養によるクローン苗の作出に取り組み、稀少樹木の現地保存を図った。②葉片の細胞培養を行い、細胞の増殖と不定根の誘導条件を検索した。また、③茎頂の凍結保存を行い、液体窒素中での保存技術を開発した。これらの研究により、岡山県内に自生する4品種の天然記念物のサクラについては、クローン苗を作り出すための技術的な手法と目安を明らかにした。また緊急の事態に備え、器官の一部を保存することを可能にした。

茎頂培養を中心とした組織培養技術については、現在世界的に見てもパルプ用材に利用する樹種を除いては、ごく一部の樹種で適用できるようになったに過ぎない。こうした中で、本研究でヤマザクラ、キクザクラ、及びヒガンザクラ系の1種2品種について技術を確立することが出来た。今後とも地域からの要望に応じて、この技術を応用して対応したい。

細胞培養については、カルスの形成と不定根の形成に、植物ホルモンとしてNAAの効果が顕著であった。特にオオシマザクラ系の「御衣黄」の反応が高く、エドヒガン系の「醍醐桜」の反応は低かった。培養に用いた個体により、カルスと不定根の形成状態が異なったことから、植物ホルモンに対する感受性は系統や個体によっても異なる可能性が高い。不定芽の形成や不定胚の誘導には、基本培地、ホルモン剤の種類、組み合わせ、培養環境等について詳細な実験と検討を加える必要がある。

凍結保存技術について、解凍後40日経過した時の生存率は本実験では液体窒素中の保存時間を15時間程度と短期間に設定したが、実用性を検証するには、5年あるいは10年以上経過後に解凍して、再生を確認する必要がある。さらに、プログラム・フリーザーや液体窒素の補充を含め、凍結保存方法の簡略化や実用性の向上が求められる。この点について緩速凍結保存用容器や超低温フリーザーの利用を検討する必要がある。

筆者はソメイヨシノの冬芽を材料に用いた凍結保存を行い、クローン苗を得ることが出来た。しかし、培養苗由来の組織を凍結保存したものの再生はできなかった。

冬芽は自然状態で、秋期から冬季に形成される環境耐性の器官で、気温の低下や乾燥など、環境の変化に対する様々な適応能力を持っている。再生率がさらに向上すれば、冬季に集中的に試料を採取し、ストックすることで組織培養実験の通年化や運搬の省力化も可能である。冬芽に限らず休眠芽を材料に用いれば、他種でも凍結保存は可能と思われる。

現在のところ培養苗の凍結保存は、長期間短日・低温下でハードニングを行って培養物の休眠を誘導し、耐凍性を獲得する方法が一般的であるが、成功例は少ない。

樹木に関するバイオテクノロジーは多極化し、①樹木の遺伝子配列の解明、②形質転換を目的とした遺伝子組み換え技

術の開発など、分子生物学的な手法を軸に置いた研究課題が新たに展開されている。

また新しい動向として、アカマツ、カラマツ、など針葉樹の胚培養が可能になってきている。

胚培養技術は、種子の胚を培養するオールドバイテクであるが、単一の胚から誘導されたクローンの変異が起こることから、選抜された純粋な素材から多様な特性を引き出す可能性を持っている。今後は、胚培養技術を用いた針葉樹の培養に取り組み、現在行われている育種技術と組み合わせることにより、優良な材質の安定化や病害虫に対する耐性の向上に取り組みたい。

#### 引用文献

- 保尊隆享 (1998) : 図解植物ホルモン : 20のQ&A. 植物ホルモンのシグナル伝達, 13pp.秀潤社.東京.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K. and Sakai, A (1996) Cryopreservation Approach for the Germplasm Conservation of the Tropical Forest Tree Species:*Cedrela odorata* L.,*Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don., Plant Cell and Molecular Biology Letters 13 (3) : 297~310.
- 三樹陽一郎 (1996) : 液体窒素温度で冷却させたミズメ腋芽の生存について, 日林九支論集49:65~663
- 野村港二 (1995) : 不定胚形成機構. 植物の形を決める分子機構,130~136, 秀潤社.東京.
- 大澤章 (1994) : 図集・植物バイテクの基礎知識,農山漁村文化協会.東京.
- 酒井昭 (1992) : 植物培養細胞・組織・胚の超低温保存, 化学と生物30 (7) : 441~448.
- 酒谷昌孝 (1987) : 組織培養によるナラノヤエザクラ (*Prunus leveilleana* Koehne cv.antiqua) の増殖. 奈良県林業試験場研究報告 NO.17, : 26~31.
- 周藤靖雄 (1988) : サクラ根頭がんしゅ病. 作物病害事典, 813pp,全国農村教育協会.東京.
- Takao Niino,Kazuo Tashiro,Mitsuteru Suzuki,Susumu Ohuchi,Jun Magoshi,Tomoya Akihama (1997) Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. Scientia Horticulturae 70 (1997) : 155~163.
- 脇田陽一・笹本浜子・千木容・横山敏孝 (1997) マメザクラ葉肉プロトプラストからのコロニー形成及び分化.第108回日本林学会大会講演要旨集,187pp.
- 吉田静夫 (1970) : 樹木の耐凍性と脂質の変動, 凍結・乾燥と細胞障害, 134pp.,東京大学出版会, 東京 : 119~131.
- 吉田静夫 (1999) : 極限温度に対する生理応答, 植物の環境応答,216pp.,秀潤社,東京 : 32~34.