

組織培養による優良個体の増殖技術の開発

— 組織培養による林木の増殖 —

(県単課題 昭和61年～平成5年度)

研 究 員 小 野 武 彦

専 門 技 術 員 大 竹 清 美

(現：福島県林業振興課専門技術員)

研 究 員 鈴 木 修

(現：福島県南会津林業事務所改良普及技師)

研 究 員 古 川 成 治

研 究 員 壽 田 智 久

目 次

要 旨	76
I 緒 言	76
II 材料と方法	77
1 サクラの茎頂培養法の検討	78
2 ブナの茎頂培養法の検討	81
3 スギの茎頂培養法の検討	82
4 ヒノキの苗条原基誘導法の検討	82
III 結果と考察	
1 サクラの茎頂培養法の検討	83
2 ブナの茎頂培養法の検討	90
3 スギの茎頂培養法の検討	91
4 ヒノキの苗条原基誘導法の検討	92
IV まとめ	95
V 引用文献	96

要 旨

樹木の増殖方法の一手法として、組織培養による増殖の可能性を検討した。対象とした樹木は、サクラ、ブナ、スギ、ヒノキである。

タキノザクラ及びモニワザクラの当年生枝から冬芽及び腋芽（葉の付根にある芽）を採取し、植物生長調整物質を含んだ改変MS培地で培養することにより植物体を再生できた。シュートの伸長にはBAPが必要であり、継代培養ではBAP $4 \mu\text{M}$ の添加で増殖効率が最高値を示した。IBA $10 \mu\text{M}$ を含む培地で5日間培養後、ホルモンフリー培地へ移し発根させることができた。また、ホルモンフリー培地の支持体にはパーミキュライトとゲルライト $0.2 - 0.6 \text{ g/l}$ を組み合わせたものが適していた。発根した幼植物体は、ガラス室等で馴化したのち苗畑へ移植することができた。馴化中 4°C の温度条件下で管理した個体は、苗畑に移植すると早い成長を示した。

ブナの腋芽を、BAP $1 \mu\text{M}$ を含んだ改変MS培地で培養することにより試験管内でシュートを伸長させることができた。シュートを伸長させるには適期に材料を採取する必要がある、今回の試験では5月が良好であった。

スギ成木の葉枝部分の腋芽は、BAP $1 \mu\text{M}$ を含んだWS培地で培養したところ試験管内でシュートを伸長させることができた。また、継代培養において伸長したシュートから腋芽を展開させるには、BAP $10 \mu\text{M}$ の添加が有効であった。

ヒノキの枝より切り出した茎葉先端部を種々の培地で培養し苗条原基集塊を誘導した。誘導に適した培地は、BAP $1 \mu\text{M}$ とNAA $0.1 \mu\text{M}$ 及びBAP $10 \mu\text{M}$ とNAA $0.1 \mu\text{M}$ を含むMS寒天培地であった。

また、これにGA₃を組み合わせて培養した場合、原基集塊の直径、茎葉の分化に効果がみられた。苗条原基集塊を分割し培養した場合、2週間目から膨脹し始め、中央に緑色の葉原基が多数発生した。さらに、分割して継代すると4週間で茎葉を分化した。特に、BAP $10 \mu\text{M}$ とNAA $0.1 \mu\text{M}$ を含んだ培地で培養した葉原基は、多芽体 (multipul shoot) を形成した。

I 緒 言

組織培養による増殖では、現在までに48種の裸子植物、185種の被子植物、13種の単子葉植物で組織培養によるクローン増殖の可能性が報告されている¹⁾。本研究では、サクラ2品種 (*Prunus takinoensis* T. Kawasaki 及び *Prunus moniwana* T. Kawasaki)、ブナ (*Fagus crenata*)、スギ (*Cryptomeria japonica*)、及びヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) について成木から採取した茎頂組織を材料に組織培養による植物体再生を試みた。

サクラは日本人が最も慣れ親しんできた花木であり、名木、古木といわれる記念樹や公園の緑化木として各地に植栽されている。サクラは一般に接木によって増殖されているが、用いた台木の種類によって形態や色等の僅かな変異は免れない²⁾とされ、穂木と台木の接木親和性の問題から、活着して数年後に樹勢の衰弱、枯死、あるいは、二次的に病虫害に侵されること³⁾が報告されている。一方、サクラ属では組織培養技術の応用により多くの品種で幼植物体を得られている^{4), 5), 6), 7)}。そこで、

増殖率の向上、自根苗の作出を目的に組織培養による増殖を試みた。

また、ブナは保水性・耐雪性等の各種環境保全機能に優れていることなどから近年環境保全の面で高い評価を得ている。しかし、ブナ・ミズナラを主とする落葉広葉樹林は、昭和30年頃からパルプ産業の原料として伐採された。その伐採跡地は、スギの植栽やそのまま放置されたり林業以外の目的で利用され、その占有面積は大幅に減少している。福島県の民有林において、1971年には3,917 haあったブナ天然林は1990年には2,815 haに減少し20年間で約30%減少している^{8), 9)}。これまで利用価値が少なかったためブナの育種については基礎資料が少ない。しかし、年々ブナ林が減少していることから、その育種材料の確保が急務となってきている。そこで、ブナ増殖法の一手法として茎頂培養法による増殖の可能性を検討した。

スギは林業上最も重要な樹種であり、古くから実生及び挿し木による苗木生産を行っている。しかし苗木生産には、自然条件が大きく左右することや育種母材の維持管理に広大な面積が必要であるなどの問題点も少なくない。これらの欠点を補うための増殖法として、組織培養技術の利用（組織・器官培養法）が考えられる。そこで、スギ成木（採穂台木）の枝葉部分の腋芽を培養して、増殖に有効な培地条件について検討した。

また、ヒノキはスギと同様、最も重要な造林樹種であるが比較的挿し木の難しい樹種と言われている。一般に着花結実の年による豊凶差が大きく結実性も高くないため、わずかな母材料から遺伝的に均質な材料を大量に、しかも確実に生産できる組織培養の技術を利用した増殖法の確立が望まれる。これまでヒノキ成木からの組織培養による増殖は、1本の枝葉を無菌的に発根させたもの¹⁰⁾、無菌小枝葉の生育条件を検索したもの¹¹⁾、1本の枝葉より20本以上のシュートを発生させたもの¹²⁾が報告されている。しかし大量増殖につながる苗条原基を形成した例はヒノキ属ではまだない。そこで、本報告ではヒノキの増殖法として苗条原基法が応用可能かどうか検討した。

なお、本研究の一部は日本林学会東北支部大会で発表したものである。

II 材料と方法

培地の組成と培地の調整

本研究で使用した基本培地およびMS培地の成分組成を表-1に掲げる。MS 1培地とMS 2培地及びMS 3培地は、MS培地の成分組成の一部を変更したものである。主な変更点として、MS 1の場合は、MS培地に含まれる硝酸アンモニウム (NH_4NO_3) と硝酸カリウム (KNO_3) の量を1/2に減じた。MS 2の場合は、MS 1に含まれる無機塩類の量をすべて1/2に減じた培地である。また、MS 3培地は、MS培地に含まれる全ての成分を1/2にした培地である。

培地中に添加する炭水化物源にはショ糖を用い、所定の濃度で使用した。植物ホルモンには、サイトカイニンとして6-ベンジルアミノプリン (BAP) や trans-ゼアチン (Zeatin)、オーキシジンとして α -ナフチル酢酸 (NAA) およびインドール酪酸 (IBA) を用いた。また、ジベレリン (GA_3) も使用した。

培地の調整は、成分をいくつかのグループに分け調合しておいたストック溶液をそれぞれ規定量だけ蒸留水に溶かして調整する方法を用いた。マグネチックスタラーを使いストック溶液を規定量溶か

した後、蒸留水を加え所定量にし、1規定あるいは0.1規定の水酸化ナトリウム(NaOH)溶液および塩酸(HCl)を用いて、水素イオン濃度(pH)を5.6-5.8に調整した。pH調整後、寒天やゲルライトを必要量加え30-50分ほど湯煎したのち、培養器に適量ずつ分注し家庭用のアルミホイルで蓋をした。蓋をした培地はオートクレーブに入れ、121℃、1.2気圧で15-17分間高圧蒸気滅菌し実験に供した。

表-1 培養に用いた培地の組成 (mg/l)

成分 Composition		MS ⁽¹⁾	MS1 ⁽²⁾	MS2 ⁽³⁾	MS3 ⁽⁴⁾	WPM ⁽⁵⁾	WS ⁽⁶⁾	IS ⁽⁷⁾
無機成分	硝酸カリウム KNO ₃	1,900	950	475	950		170	170
	硝酸アンモニウム NH ₄ NO ₃	1,650	825	412.5	825	400	50	680
	リン酸1カリウム KH ₂ PO ₄	170	170	85	85	170		80
	リン酸1ナトリウム NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O						45	
	塩化カリウム KCl						140	140
	硫酸マグネシウム MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	185	185	370	1,654	370
	塩化カルシウム CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	220	220	96		
	硝酸カルシウム Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O					556	611	710
	エチレンジアミン4酢酸ナトリウム Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	18.65	18.65	37.3		
	エチレンジアミン4酢酸鉄 Fe-EDTA						5.5	5.6
	硫酸カリウム K ₂ SO ₄					990		
	硫酸第一鉄 FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.3	27.3	13.65	13.65	27.8		
	硫酸マンガン MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	11.15	11.15	22.3	14	8
	硫酸亜鉛 ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	4.3	4.3	8.6	5.7	9
	硫酸ナトリウム Na ₂ SO ₄						425	
	ホウ酸 H ₃ BO ₃	6.2	6.2	3.1	3.1	6.2	3.2	3.2
	硫酸銅 CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.0125	0.0125	0.25		0.25
	モリブデン酸ナトリウム Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.125	0.125	0.25		0.25
塩化コバルト CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.0125	0.0125				
ヨウ化カリウム KI	0.83	0.83	0.415	0.415		1.6	0.8	
有機成分	ミオイノシトール myo-Inositol	100	100	100	50	100	10	100
	塩酸チアミン Thiamine HCl	0.1	0.1	0.1	0.05	1		0.1
	塩酸ピリドキシン Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.1	0.1
	ニコチン酸 Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5		0.8
	グリシン Glycine	2	2	2	1	2		
	sym-ジフェニル尿素 sym-Diphenylurea							3
	尿素 Urea							10
	フマル酸 Fumaric acid							1
	アスコルビン酸 Ascorbic acid							1
	L-リジン L-Lysine							100
	L-チロシン L-Tyrosine							10
ショ糖 Sucrose	30,000	30,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	

1) MS培地 MURASHIGE and SKOOG's medium (Murashige and Skoog, 1962)

2) MS 改変培地-1 modified MS1

3) MS 改変培地-2 modified MS2

4) MS 改変培地-3 modified MS3

5) WPM培地 Woody plant medium (Lloyd and McCown, 1980)

6) WS培地 WOLTER and SKOOG's medium (Wolter and Skoog, 1966)

7) IS培地 IDE and SAITO'S medium (Saito and Ide, 1985)

1 サクラの茎頂培養法の検討

(1) 初代培養

① 材料

タキノザクラ (*Prunus takinoensis* T. Kawasaki) 及びモニワザクラ (*Prunus moniwana* T. Kawasaki) を用いた¹³⁾。いずれも福島県飯坂町茂庭地区に自生している。3月中旬および6月上旬に当年生枝を採取した。

② 殺菌及び植付操作

採取した枝を茎頂組織を含んだ長さ約3 cmの小片に調整したのち、マグネチックスタラーを用いて殺菌した。殺菌は、茎頂組織の形態（冬芽／腋芽）に応じて2種類の方法で行った。

(a) 冬芽培養

70%エタノール溶液を染み込ませた脱脂綿で枝表面についた汚れを拭き取り、冬芽1-2個を含む長さ約3 cmの小片に調整した。小片は、1%オスパン溶液で10分間、次いで0.3%塩化第2水銀溶液で10分間、さらに有効塩素濃度3%のアンチホルミン溶液で10分間表面殺菌を行った。殺菌はマグネチックスタラーで攪拌しながら行い、各殺菌溶液に移る間には70%エタノール溶液に30秒ずつ浸漬を行った。殺菌の終了した小片はクリーンベンチにて滅菌水で3回洗浄したのち滅菌濾紙上で風乾、滅菌済み小型ピンセットにて冬芽表面の鱗片葉を取り除き葉原基を含む成長点を露出させた。これを滅菌済みメスを使って茎軸より切除し、25×150 mm平底試験管に15mlずつ分注、常法によりオートクレーブした培地に置床した。培地には、BAP (1, 5, 10 μ M) とIBA (0.5 μ M) を組み合わせて添加した3水準のMS 1培地（蒸留水 1,000 ml当たり、Sucrose 30 g, 0.2% Gelrite または0.8% Ager を含む）を用いた。

(b) 腋芽培養

採取した当年性枝を葉柄の一部をつけて長さ約3-4 cmの小片に切り揃え、1%オスパン溶液で15分間、次いで70%エタノール溶液で1分間、さらに有効塩素濃度2%のアンチホルミン溶液で5-8分間それぞれマグネチックスタラー上で攪拌しながら表面殺菌を行った。クリーンベンチ内で小片を滅菌水で3回洗浄後、滅菌濾紙上で風乾した。滅菌済みメスにて殺菌の際痛んだ組織両端を切り戻し、約15mlの培地が入った25×150 mm平底試験管に小片の1/2が埋まる程度挿しつけた。培地には、BAP (0, 1, 5, 10 μ M) とIBA (0.5 μ M) を組み合わせて添加した4水準のMS 1培地（Sucrose 30 g / 1, 0.8% Ager を含む）を用いた。

③ 培養条件

培養は25±1℃、16時間日長、約5,000 luxの蛍光灯照明下で行い、培養開始から30日間後の残存本数、発芽本数及びシュート長などを調査した。

(2) 継代培養

① 材料

2-(1)により得られたタキノザクラのシュート（冬芽由来）をMS 1培地（BAP 5 μ M, IBA 0.05 μ M, Sucrose 30 g / 1, 0.8% Ager を含む）で数回継代し、発生したシュートを実験に供した。シュートは1 cm以上に伸長したものを使用した。

② 培地及び培養条件

MS 1培地にBAPを様々な濃度で添加し培養した。即ち、BAPの濃度は、9水準（0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 5, 8, 10 μ M）で添加し、すべてにNAA 0.1 μ Mを組み合わせて添加した。培養には寒天培地 100 mlずつを分注した300 ml培養フラスコを用い、1処理区当たり10本（培養フラスコ1個に5本）ずつ培地に置床した。なお、培養は25℃、16時間日長、約5,000 luxの蛍光灯照明下で行い、培養開始30日目に発生したシュートの本数及び長さを調査した。

(3) Vitrification の防止試験

① 材 料

2-(1)において得られたモニワザクラのシュート(冬芽由来)をMS 1培地(BAP 1.0 mg/l、IBA 0.1 mg/l、Sucrose 30 g/l、0.3% Gelriteを含む)にて継代、伸長したシュート先端を約1 cmの大きさに調整して供試材料とした。

② 培地及び培養条件

Vitrification の発生防止を目的にサイトカイニン、培地支持素材、及び閉栓の種類について検討を行った。サイトカイニンの検討では、BAP 1.0 mg/l及びZeatin 1.0 mg/lとIBA 0.1 mg/lを組み合わせて添加したMS 1培地で培養を行った。培地支持素材および閉栓の検討では、BAP 1.0 mg/l、IBA 0.1 mg/lを含むMS 1培地に3種類の培地支持素材(Gelrite 2.0 g/l、寒天 10 g/l、AVF 5.4 g/l)を組み合わせて添加し3処理区を設定した。また、アルミホイルまたはサンキャップシートをMS 1培地の蓋に使用した。培地は100 ccずつ300 ml培養フラスコに分注し、温度25°C、約6,000 lx、16時間日長の下で培養を行った。各処理区の供試茎頂数は10本とし、培養開始から21日目にシュート数、シュート長およびVitrification発生葉数を調査した。

(4) 発 根

① 材 料

2-(2)(3)から発生したモニワザクラ及びタキノザクラのシュートを使用した。

② 培地及び発根処理

1 cmの長さに調整したタキノザクラのシュートをホルモンフリーのWPM培地で培養した。培地支持素材には寒天(8 g/l)およびパーミキュライトを用意した。パーミキュライトは121°C、1.2気圧で1時間滅菌したのち200 ml培養フラスコに18-20 gずつ入れ、これに液体培地約80 mlを分注し試験に供した。また、IBA 10 μMを添加したWPM培地でシュートを7日間培養したのち培地に挿し付ける処理区も設定した。各処理区の供試本数は10本とし、温度25±1°C、16時間日長、約5,000 luxの蛍光灯照明下で培養を行った。

さらに、植体をIBA 10 μMを含むMS 2培地で5日間培養した植体を、ホルモンフリー培地に植え付ける試験を行った。培地には、ショ糖20 g/lを添加したMS 2培地にパーミキュライト及びゲルライトを組合せて実験に使用した。即ち、タキノザクラでは、所定量のパーミキュライトにゲルライト(0.2, 0.6, 1.0, 2.0 g/l)を添加し4処理区を設定した。また、モニワザクラではパーミキュライト+ゲルライト(0.2, 0.6, 1.0 g/l)の3処理区他に、対称区としてゲルライト3.5 g/l区を設定した。各処理区の供試本数は10本、培養は22±1°C、13時間日長、約5,500 luxの蛍光灯照明下、培養期間約30日で行った。

(5) 馴 化

① 材 料

2-(4)において得られたモニワザクラおよびタキノザクラの幼植物体を用いた。

② 馴化方法

幼植物体の根に付着したパーミキュライトや寒天を水道水で丁寧に洗い流した。馴化に供した個体

は根の長さを5 cm程度に切り揃え、滅菌済みパーミキュライトを用土に直径6 cmのビニールポットに植え付けた。これらは幼苗は透明な蓋のついた家庭用の洗い物籠に20個体ずつ入れ、滅菌水をビニールポットの底約1 cmが浸るまで注水し、蓋をしたまま馴化室(22°C、約5,500 lux、13時間日長、湿度約70%)に10日間放置した。その後、徐々に蓋を開け20日目には取り外した。14日目からは週に1回液肥(ハイポネックス1,000倍希釈液)を与えた。馴化は、表-2に示した管理下で行い、健全に生育した幼苗を平成6年4月6日に苗畑へ移植した。移植後は10-14日置きに冠水を行い、42日後および132日後に活着本数、得苗本数及び苗高を調査した。

表-2 組織培養苗の馴化方法

試験区	供試材料	管理方法と日数			
		馴化室 ¹⁾	低温室 ²⁾	温室 ³⁾	計(日数)
温室管理区 A	モニワザクラ	67	—	72	139
低温管理区	〃	33	49	9	91
温室管理区 B	タキノザクラ	17	—	58	75
恒温管理区	〃	66	—	9	75

1) … 22°C、13時間日長、約5,500 luxの蛍光灯照明下、湿度約70%

2) … 4°C、10時間日長、約3,000 luxの蛍光灯照明下、湿度約60%

3) … 13~33°C、屋外ガラス室

2 ブナの茎頂培養法の検討

(1) 初代培養

① 材料

当林業試験場構内に植栽されている樹高7.8 m、胸高直径8 cm、樹齢17年生のブナ(*Fagus crenata*)の樹冠を構成している枝から当年生枝を採取した。採取は、天候の影響を考え、晴天が3日以上続いた後に行った。

② 殺菌方法

腋芽を含む長さ約3~4 cmの茎軸の部分を切り取って外植体とした。外植体は、1%オスバン溶液で10分間、70%エタノール溶液に1分間、次いで有効塩素濃度1%のアンチホルミンで5-10分間表面殺菌処理を行った。殺菌の終わった外植体をクリーンベンチ内に持ち込み、滅菌水で3回洗浄したのち風乾し、殺菌によって痛んだ部分を滅菌済みメスを用いて切除し約2 cmに切り揃えて実験に供した。

③ 培地及び培養条件

WS培地およびMS3培地を用いた。これにショ糖20 g/lを加え、BAPを5水準(0, 1, 5, 10, 20 μM)の濃度で添加した。培地は25×150 mmの平底試験管に約15 mlずつ分注し、121°Cで15分間オートクレーブにて滅菌を行ったものを試験に使用した。各処理区の供試本数は10本とした。

培養は、温度25±1°C、16時間日長、約5,000 luxの蛍光灯照明下で行った。培養開始から27日目に培養中のものと同じ組成の新しい培地に継代し54日間培養を行った。培養終了後、シュート長及びシュート本数を調査した。

3 スギの茎頂培養法の検討

① 材料の調整

供試材料は、当場の採穂台木より採取した枝葉を70%エタノール溶液に3分間浸漬後、10%アンチホルミンの5倍希釈液で10分間表面殺菌処理を行った。その後、滅菌水で3回洗浄し、クリーンベンチ内で風乾した。風乾した枝葉は、長さ2-3cmに切り揃えて培養材料とした。

② 培地及び培養条件

基本培地は、スギの培養に適するWS培地を用いた。これにBAP 2水準(1, 10 μ M)とNAA 2水準(0, 0.01 μ M)を組み合わせた4種類の培地を用いた。培養材料は各培地に25本ずつ1cm程度挿し付けた。培地は18×180mmの試験管に12mlずつ分注し、温度25±1℃、16時間照明(約5,000 lux)の条件下で培養を行った。

培養開始から30日間の腋芽の発生状況を調査した。また、腋芽の発生した培養材料を初代培養と同一成分の培地に移植して60日後に伸長した腋芽数を調査した。さらに、20mm以上に伸長した腋芽(シュート)を切り取り、BAP(1, 10 μ M)とNAA(0.01, 0.1 μ M)を組み合わせて添加した4種類の寒天培地に再移植(分芽処理)した。30日間培養後シュートに発生した腋芽数を調査した。

4 ヒノキの苗条原基誘導法の検討

(1) 初代培養

① 材料

当試験場のヒノキ精英樹クローン集植園にある、安達1号及び福島1号から茎葉を採取した。採取は昭和63年6月29日に行った。

② 殺菌方法

外植体は頂芽を含め長さ約3~4cmに切り分け、70%エタノール溶液に3分間、次いで有効塩素濃度1%のアンチホルミンで10分間表面殺菌処理を行い、約2cmに切り揃えて用意した寒天培地に置床した。

③ 培地及び培養条件

MS3、WS、WPM、IS培地の4種類の培地を用いた。これらにショ糖20g/1を加え、BAPを3水準(1, 10, 20 μ M)の濃度で、またNAAを2水準(.0, 0.01 μ M)の濃度で組み合わせて添加した。培地に寒天(8g/1)を添加後、湯煎し16×140mmの試験管に約10mlずつ分注した。1処理区当たりの供試本数は10本とし、温度25±1℃、16時間日長、約3,000 luxの蛍光灯照明下で培養した。なお、継代は20日間を目安に4回行い、培養開始から107日後の生存数及び成長状況を調査した。

(2) 苗条原基の誘導

① 材料

供試材料は、昭和63年5月に当場のヒノキクローン集植園に植栽してある精英樹(東白川1号、15年生)の枝先端部より採取した茎葉を用いた。採取した茎葉は、4-(1)で述べた手法に従って培養を行った。培地にはBAP 1 μ Mを添加したMS培地を用い、18×180mmの試験管に約12mlずつ分注した後、培養材料を約1cm程度挿しつけ約50日間培養して茎葉を伸長させた。

② 培地及び培養条件

苗条原基の誘導には、BAP (0, 0.01, 0.1, 1 μ M) と NAA (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M) を合わせ25通りの培地を調整した。調整した培地は25×150 mmの植物培養用試験管に約20mlずつ分注して実験に供した。(2)–①で新しく成長した葉頭(約5 mm)を、用意した培地中に全体が埋まるように挿し付けた。1処理区の供試本数は5本とし、1回継代して約80日後の形態を調査した。なお、培養は全て温度25±1℃、16時間照明(約3,000 lux)の条件下で実施した。

(3) 苗条原基の増殖

① 材料

4–(2)で誘導した苗条原基(2–3 mm)を同組成培地で数回継代して増殖を行った。実験には直径12–14mmの集塊に成長した苗条原基を用いた。

② 培地及び培養条件

基本培地にはMS培地を用い、ショ糖20 g/l、寒天0.8 g/lを加えpH5.8に調整した。試験にはGA₃の4水準(0, 0.01, 0.1, 1 μ M)、BAPの3水準(0, 0.1, 1 μ M)、及びNAAの3水準(0, 0.1, 1 μ M)を組み合わせて添加した36種類の培地を用いた。培養はすべて温度25±1℃、16時間照明(約3,000 lux)の蛍光灯照明下で実施した。培養から40日目に原基集塊の直径、茎葉分化数、茎葉伸長量、新に発生した苗条原基数について調査を行った。

(4) 苗条原基の苗化

① 材料

4–(3)で用いた苗条原基集塊(12–14mm)を供試した。

② 培地及び培養条件

MS培地にBAP(1, 10 μ M)とNAA(0, 0.01 μ M)を組み合わせて4種類の培地を調整し、40×130 mmの植物培養用試験管および100 mlの培養フラスコに約40mlずつ分注して苗化培地とした。苗条原基集塊を直径5–10mmに分割して用意した苗化培地に静置し苗条原基集塊の変化を調査した。なお、培養はすべて温度25±1℃、16時間日長、約3,000 luxの蛍光灯照明下で実施した。

III 結果と考察

I サクラの茎頂培養法の検討

(1) 初代培養

① 冬芽培養

培養開始20日目に雑菌による汚染状況を調査した結果、供試個体の35%が雑菌に汚染された。汚染を免れた植体では置床後2–3日目に葉原基がふくらみはじめ、培養開始2週間目には、ほとんどの植体からシュートの伸長が観察できた。しかし、同時期から図–1のように葉の透明化や成長点の奇形などVitrificationの症状を示す培養物が現れ、培養60日目にはガラス化を起こした全個体で成長が停止したか褐変死した。これらは供試個体の約14%を占めた。

培養開始から60日目の生育状況を表–3に示す。タキノザクラでは、培地に置床した30個体中2個体だけが生存し、10 μ M添加区では全て枯死した。生存個体からは、正常な葉が展開し5–7 cmの

シュートが得られたが、残存本数が2本であるためBAP濃度の影響について検討できなかった。一方、モニワザクラの場合、BAP 1 μ M添加区ではシュートの伸長は見られるものの葉の先端が壊死する個体が見られた。また、BAP 5 μ M添加区では健全なシュートが生育し、腋芽から多数の芽を分化する個体が多数見られた。供試個体の56%から継代可能なシュートが得られた。

② 腋芽培養

培養開始14日目に雑菌汚染状況を調査した結果、供試した160個体中86個体が雑菌に汚染され、残存本数は全体の46%であった。今後、殺菌の方法と処理時間についてさらに検討を行う必要がある。

培地に置床した小片は、培養5日目には腋芽が膨らみはじめるものが見られた。培養開始から30日目には、図-2に示したようにシュートを伸長させ葉を展開する個体もみられた。しかし、このような個体は残存本数の30%に過ぎず、他の個体ではシュートの伸長はまったく見られなかった。

培養開始25日目のシュートの伸長及び葉の展開状況を表-4に示した。



図-1 正常に伸長したシュート(左)と Vitivificationの発生したシュート(右)

表-3 初代培養における殺菌状況とBAP濃度の影響(培養開始60日目)

品 種	BAP 濃度 (μ M)	供試本数 (本)	雑菌汚染本数(本)	ガラス化数(本)	残存本数(本)	正常な葉を展開した本数(本)
タキノザクラ	1	10	4	5	1	1
〃	5	10	6	3	1	1
〃	10	10	8	2	0	0
モニワザクラ	1	50	12	3	35	26
〃	5	50	15	5	30	20

注) 1. 培地には、NAA 0.5 μ Mを共通に添加した。
2. 供試材料には、冬芽を用いた。



図-2 腋芽培養におけるシュートの伸長(30日目)

表-4 初代培養における BAP 濃度の影響 (培養開始25日目)

品 種	BAP 濃度 (μM)	供試本数 (本)	残存本数 (本)	シュートの伸長した外植体率 (%)	平均シュート長 (mm)	展開葉数 (枚)	最大展開葉長 (mm)
タキノザクラ	0	20	9	22	4	4	28
〃	1	20	14	29	4	8	21
〃	5	20	8	25	3.5	6	26
〃	10	20	7	57	3.5	10	21
モニワザクラ	0	20	11	0	0	0	0
〃	1	20	8	50	4	21	23
〃	5	20	5	40	3	2	4
〃	10	20	12	33	4.3	15	16

注) 1. 培地には、MAA 0.5 μM を共通に添加した。
2. 供試材料には、腋芽を用いた。

モニワザクラの BAP 0 μM 添加区でシュートが伸長しなかった以外は、シュート本数は 2-4 本、平均シュート長が 3-4 mm と明確な差はみられなかった。今回の試験では、採取した枝の長さや位置などの条件が様々である

ためシュートの伸長にばらつきが大きく、定量的に培地の適否をとらえることは困難である。しかし、シュートの伸長した本数や葉の展開状況から、タキノザクラでは BAP 10 μM 添加区、モニワザクラでは 1 μM 添加区が比較的有効であるように思われる。

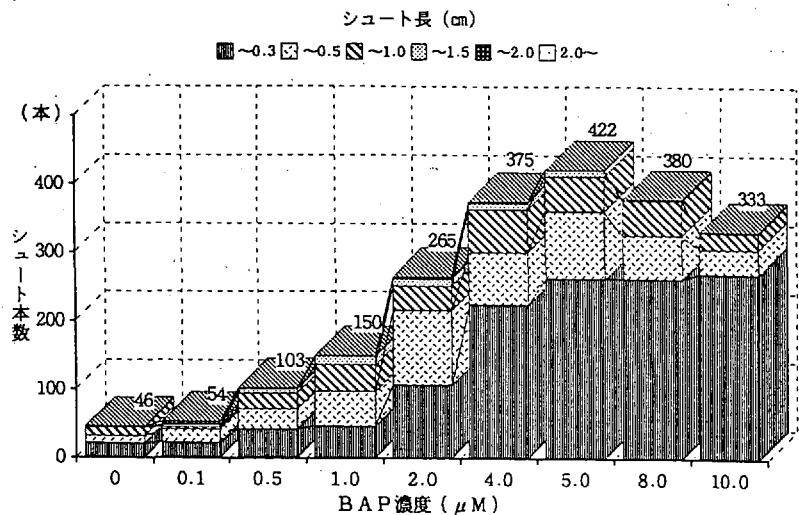


図-3 継代培養における BAP 濃度の影響 (30日目)

(2) 継代培養

継代培養における BAP の添加濃度とシュート本数並びにシュート長の関係については、ナラノヤエザクラ (*Prunus leveilleana* Koehne cv. *antiqua*) で行った結果が報告されている²⁾。今回、同様な方法で検討を行ったが、その結果を図-3 に示した。

BAP 濃度が 0 μM では供試した植体の伸長や腋芽か



図-4 継代培養におけるシュートの生育状況

らの発芽はほとんどみられなかった。0.1、0.5 μM と低濃度の場合、供試個体の伸長はみられるがシュート発生本数は少なく、葉の先端が黄変する個体もみられた。1.0、2.0、4.0 μM の場合、黄変するような個体はなく（図-4）、シュートの伸長および発生本数は低濃度の場合に比べ増加する傾向を示した。

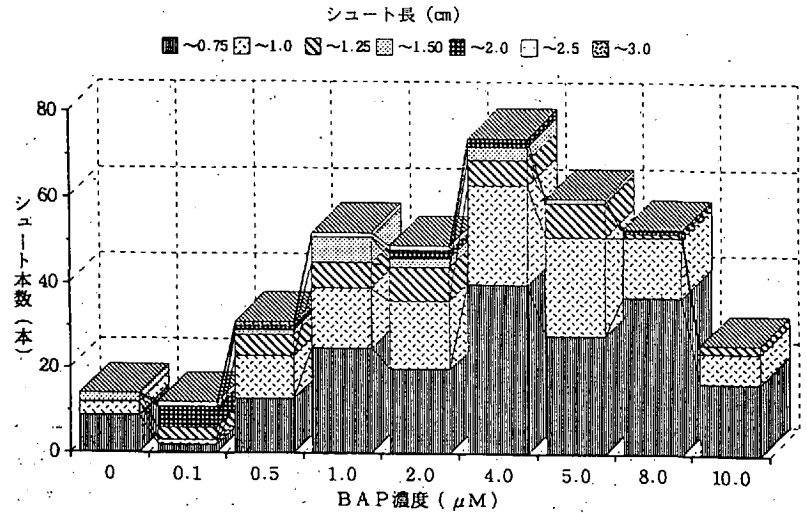


図-5 5 mm以上に伸長したシュート本数(30日目)

5.0; 8.0; 10.0 μM と高濃度になるにつれ、発生したシュート数は4.0 μM に比べ減少する傾向が認められた。一方、分割できないような3 mm未満のシュートについてはBAPの濃度が高くなるにつれて増加する傾向を示し、10 μM では発生本数の81%を占めた。以上のことから、シュートの伸長、増殖にはBAPの添加が必要であり、高濃度になるにつれ伸長より分枝の方に作用するとして酒谷らの報告²⁾と同様の傾向を示した。また、シュートの分割の際には5 mm以上に伸長した植体が操作上必要なことから、長さ5 mm以上の発生本数が最大値を示した4 μM が適当と考えられた(図-5)。

(3) Vitrificationの防止試験

Vitrificationは、培養物の葉や茎に透明化や形態異常が発生し、成長阻害を起こすため試験管内増殖を行う場合の障害となる。そこで、Vitrificationを生じたシュートの葉を顕微鏡(KEYENCE VH-6100)により観察し、気孔細胞の変化を調査した。その結果を図-6に示す。屋外で生育している葉及び試験管内で増殖された正常な葉では気孔が規則的に配列し周辺細胞との境界が鮮明である。一方、Vitrificationを起こした葉では、気孔の並び方に異常がみられ開口したままで巨大化する傾向がみられた。

次に、Vitrificationの発生頻度について調査し

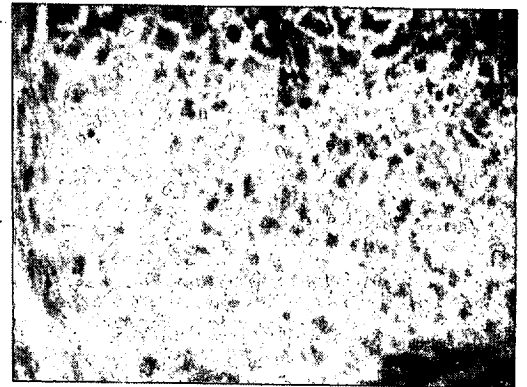


図-6 A 屋外から採取したもの

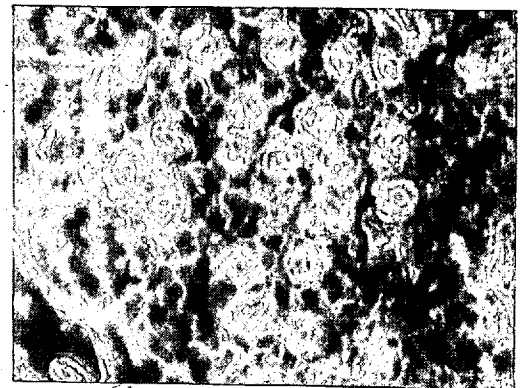


図-6 B 試験管内で増殖した健全なシュート



図-6 C 試験管内でVitrification化したシュート

た結果を図-7に示した。サイトカイニンの種類による Vitrification の発生を比較すると、BAP が36%、Zeatin が32%とほとんど変化がなかった。また、培地支持素材の種類別による発生の比較では、Gelrite 2 g / 1 + AVF 5.4 g / 1 添加区で発生率が6%と最も低く、次いで Gelrite 2 g / 1 + 寒天 10 g / 1 の36%、さらに Gelrite 2 g / 1 添加区では66%と高い値を示した。閉栓がアルミホイルの場合発生率は35%であった。一方通気性のあるサンキャップシートを用いた場合発生率は20%と Vitrification の発生は減少した。Vitrification の原因として、培地に添加するサイトカイニンの種類や濃度、培養器中の相対湿度が高いことなどが報告されている^{14), 15), 16), 17)}。今

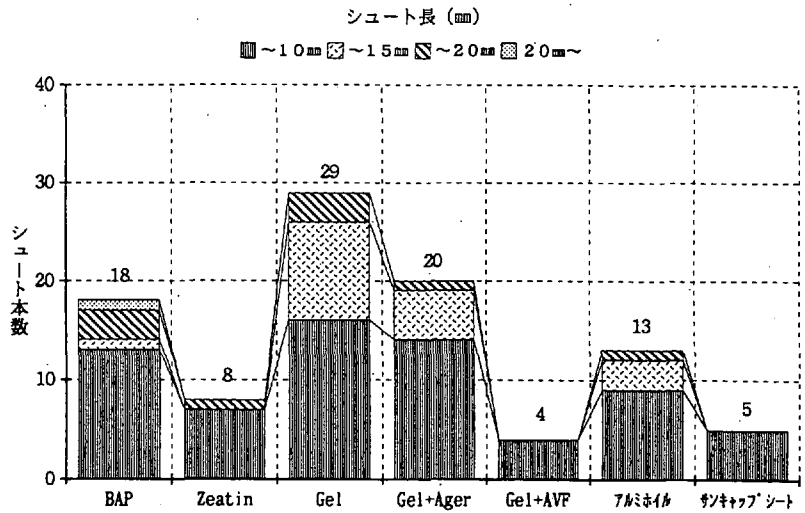


図-7 Vitrification の発生に及ぼすサイトカイニン、培地支持素材及び閉栓の影響 (21日目)

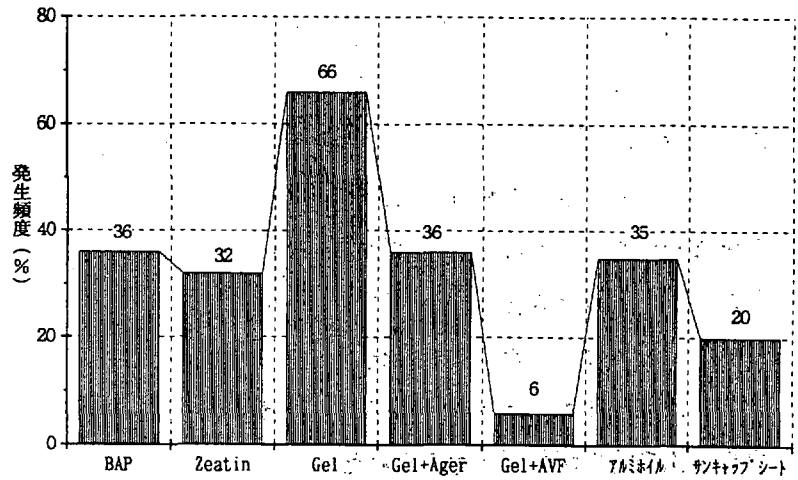


図-8 Vitrification 防止試験において発生した長さ5mm以上のシュート本数 (21日目)

回の実験からも、培養器中の相対湿度が高いときに Vitrification が起こりやすい傾向を示した。

以上の結果、Vitrification の発生防止には、閉栓としてサンキャップシートを使用すること、また、培地支持素材として Gelrite 2 g / 1 と AVF 5.4 g / 1 を組み合わせて添加することで効果が認められた。しかし、今回の試験からサイトカイニンの種類による Vitrification 発生の影響は認められなかった。

培養した植体から発生した5mm以上のシュート本数を図-8に示した。シュート本数は、Zeatin の8本に比べBAPは18本で良好な値を示した。また、Gelrite 2 g / 1 添加区の29本、Gelrite 2 g / 1 + 寒天 10 g / 1 添加区の20本と比較して、Gelrite 2 g / 1 + AVF 5.4 g / 1 添加区では4本と減少する傾向が認められAVFの添加がシュートの発生を抑制することがわかった。今後増殖を行う場合、添加するBAPの濃度を検討する必要がある。さらにアルミホイルとサンキャップシートを比較したが、アルミホイル13本に対しサンキャップシートでは5本と減少した。また、サンキャップシートを用いた場合、培養器中の相対湿度が低下するため培地の乾燥化が早い。したがって継代培

養を行う場合、継代間隔を短縮するなどの対応策が必要と思われる。

(4) 発根

前培養 (IBA 10 μM を添加したWPM培地でシュートを7日間培養したのちホルモンフリー培地に挿し付ける

処理) と根数、根長の関係を表-5に示した。発根率は全ての処理区で100%を示した。根長は、寒天培地に比較してパーミキュライト培地で長くなる傾向を示した。前培養は寒天培地において発根本数を増加させたが、パーミキュライト培地では効果は認められなかった。また、発根状態を図-9に示した。寒天培地では、根が細く短く、細根も少ない。一方、パーミキュライト培地では、根が長く太くまた堅いため切れにくく、細根も多数発生した。しかしガラス化が同時に発生する個体も多く見られた。したがって、発根培地の支持体にはパーミキュライトが有効であるが、ガラス化の防止が必要と考えられた。

そこで、ゲルライトとパーミキュライトを組合せて添加した培地を作成し、植体を挿し付けた。その結果を表-6に示す。全ての処理区において発根率は100%を示した。モニ

表-5 発根における前培養及び培地支持素材の影響

培地支持素材	平均植体長 (cm)	発根率 (%)	平均発根本数 (本)	平均根長 (cm)
寒天 8g/1	1.07	100	3.4	1.5
パーミキュライト	1.37	100	10.0	5.3
前培養+寒天 8g/1	0.91	100	6.9	2.2
前培養+パーミキュライト	1.48	100	6.9	6.1

注) 1. 前培養では、IBA 10 μM を添加した WPM 培地で 7 日間培養した植体を発根培地に植え付けた。
2. 供試材料には、タキノザクラを用いた。



図-9 発根状況 (28日目)

①②: 寒天培地
③④: パーミキュライト培地

表-6 シュートの発根に及ぼす培地支持素材の影響

品 種	培地支持素材	集計本数 (本)	発根率 (%)	平均発根本数 (本)	平均細根本数 (本)	平均根長 (cm)
モニワザクラ	ゲルライト 3.5g/1	10	100	5.0	5.0	5.37
	パーミキュライト+ゲルライト 1.0g/1	9	100	7.4	25.3	7.33
	パーミキュライト+ゲルライト 0.6g/1	8	100	10.9	29.5	7.50
	パーミキュライト+ゲルライト 0.2g/1	9	100	9.3	26.1	5.66
タキノザクラ	パーミキュライト+ゲルライト 2.0g/1	10	100	13.9	17.2	3.55
	パーミキュライト+ゲルライト 1.0g/1	10	100	13.5	30.6	5.56
	パーミキュライト+ゲルライト 0.6g/1	10	100	17.8	45.0	5.43
	パーミキュライト+ゲルライト 0.2g/1	10	100	18.9	42.4	5.49

注) モニワザクラは培養開始から38日目、タキノザクラは培養開始から32日目に調査を行った。

ワザクラでは培養中雑菌に汚染されたものがあり、これらの培地では細根の未発達等が観察されたため集計からは除外した。また、平均根長、平均細根数、及び平均発根本数はパーミキュライト+ゲルライト 0.6 mg/1 添加区で最も高い値を示した。また、タキノザクラでもパーミキュライト+Gelrite 0.2-0.6 g/1 添加区で良好な値を示した。しかし、ガラス化は多くの個体で観察された。今後、これらの培地で発根処理をする場合には、2-(3)で述べた方法も含めて防止方法を検討する必要がある。

表-7 馴化方法別のサクラ幼苗の生育状況

試験区	調査日数 (日)	供試本数 (本)	生存本数 (本)	生存率 (%)	伸長本数 (本)	平均苗高 (cm)
温室管理区 A	42 日目	47	46	97.9	32 (69.6)*	1.0
	132 日目	"	39	82.9	39 (82.9)	80.1
低温管理区	42 日目	16	10	62.5	10 (62.5)	4.3
	132 日目	"	10	62.5	10 (62.5)	101.6
温室管理区 B	42 日目	26	16	61.5	0 (0.0)	-
	132 日目	"	0	0.0	0 (0.0)	-
恒温管理区	42 日目	12	2	16.7	0 (0.0)	-
	132 日目	"	2	16.7	2 (16.7)	5.5

* () 内は%を示す。

(5) 馴化

管理条件別に馴化した個体を苗畑に移植し、馴化から42日目及び132日目の生存率と苗高について調査を行った。その結果を表-7に示す。モニワザクラの場合、42日目の調査では温室管理区Aで約70%の幼苗からの茎葉の伸長がみられた。低温管理区では移植から1週間以内に茎葉の伸長が認められ、その茎葉に異



図-10 苗畑で成長するモニワザクラ (64日目)

常はみられなかった。また、132日目の調査では、温室管理区Aの生存率が82.9%と高く、次いで低温管理区も62.6%を示した。苗高は、低温管理区でよく伸長し最高値は130cmに達するものが見られた(図-10)。タキノザクラの場合、42日目の調査では温室管理区Bで61.5%の生存率を示したのに比べ、恒温管理区では16.7%と低い値を示した。また、132日目の調査では、生存率が0-16.7%と低くシュートの伸長した個体は2個体しかみられなかった。材料の違いが生存率に関係しているかは判断できないが、今後、管理期間等の再検討が必要である。以上の結果から、モニワザクラにおいて幼植物体の馴化が可能であることが明らかとなった。特に4℃で管理した個体は土壌馴化後の成長が早いことがわかった。タキノザクラについては今後、馴化条件の検討が必要と思われる。

2 ブナの茎頂培養法の検討

討

(1) 初代培養

材料の採取は平成4年5月、6月、8月に行った。培養開始から15日目の殺菌状況は表-8に示したように採取日によって異なった。5月に採取したものは、雑菌混入率が0%であったのに対し、6月、8月の両日に採取したものは雑菌混入率が約80%と高い値を示した。これは、気温が高く多湿になると雑菌の活動が活発化すること、また、枝の表面が硬化するために表皮内にバクテリアが残存することなどが殺菌を困難にさせていると考えられる。したがって、野外から材料を採取する場合、材料を適期に採取することが殺菌を効率よく行う最も有効な手段であり、今回の試験では5月が適期と考えられた。

6月及び8月に採取した個体からは腋芽を伸長する個体が全くみられず、5月に採取した個体のみで観察されたので、以後の調査は5月採取分について実施した。培養開始から54日目の平均シュート長、5mm以上に伸長したシュートの発生率を図-11、12に示した。培養開始1週間目頃から腋芽が膨らみはじめ、20日目には1cm以上の長さに成長し、大きく葉を展開する個体も観察された(図-13)。WS培地、MS3培地の両方から腋芽の伸長がみられたが、腋芽が最もよく伸長し、且つ5mm以上のシュートの発生割合が最も高かったのは、BAP 1 μ Mを添加したMS3培地であった。WS培地

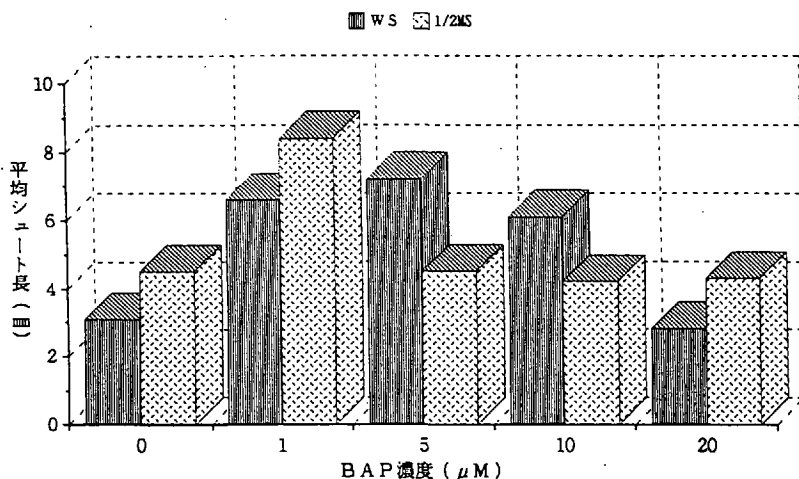


図-11 初代培養において伸長したシュートの長さ (54日目)

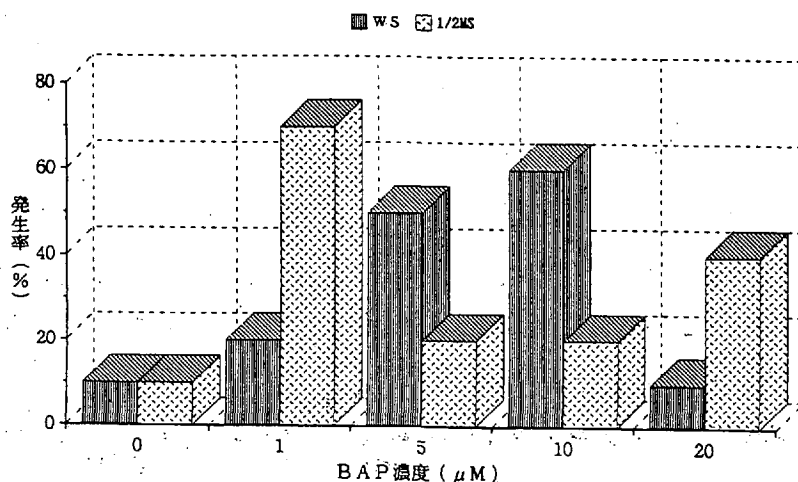


図-12 初代培養において5mm以上に伸長した腋芽の発生率 (54日目)

表-8 ブナ腋芽の殺菌状況 (培養開始15日目)

植体採取日	調査日	供試本数	雑菌混入数	枯死数	生存数
5/12	5/27	166 (100)*	0 (0)	29 (18)	137 (82)
6/16	7/1	78 (100)	62 (80)	0 (0)	16 (20)
8/29	9/13	93 (100)	78 (84)	0 (0)	15 (16)

* () 内の数値は%を示す。

で培養したものは、シュートの茎軸が細く貧弱なものが多くみられ、また、培養40日を経過した頃からシュートや葉の先端が褐変するものがみられた。以上の結果、ブナの初代培養では、材料を5月中旬に採取すること。また、BAP 1 μM を添加したMS 3培地で培養する方法が適当であると考えられる。

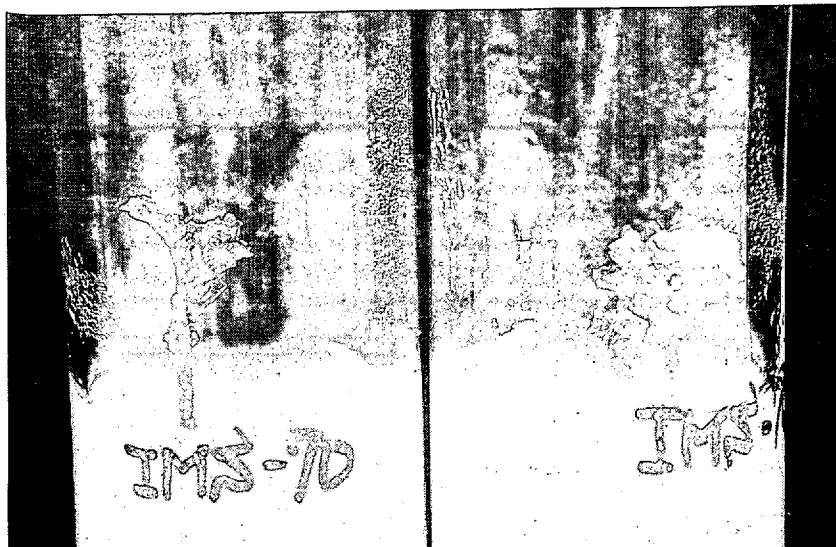


図-13 腋芽培養におけるシュートの伸長(20日目)

3 スギの茎頂培養法の検討

(1) 初代培養

初代培養における腋芽の発生状況を観察した。BAPを10 μM 添加した培地では、培養開始14日目頃から、他の培地では20日目頃から数個の腋芽が膨脹して肉眼で確認できるようになった。石川¹⁸⁾は、スギの胚軸培養ではBAP 1.0 - 5.0 mg/l (4.4 μM - 22 μM) の濃度において不定芽の形成促進に効果があることを報告している。本試験における腋芽の発生にも同程度のBAP濃度が効果的であった。NAAについては、スギのカルス形成には有効であるという報告^{19) 20)}がある。しかし、腋芽の発生にはNAAの影響は明らかにできなかった。

表-9 スギ腋芽の伸長状況

ホルモン濃度 BAP-NAA (μM)	供試腋芽 本数 (本)	伸長腋芽の大きさとその本数(本)	
		20 mm未満	20 mm以上
1-0	25	8 (32)*	17 (68)
1-0.01	25	9 (45)	11 (55)
10-0	25	20 (100)	0 (0)
10-0.01	25	21 (95)	1 (5)

* () 内は%を示す。

(2) 継代培養

継代培養から60日後の腋芽の伸長状況を表-9に示した。腋芽の伸長に効果のあったBAP濃度は1 μM であり、10 μM では阻害的であった。NAAは腋芽の伸長に影響しなかったが、BAP 1 μM とNAA 0.01 μM の培地では発根したものが認められた。また、BAP 1 μM の培地では、20mm未満の腋芽も培養を続けると順次20mm以上に伸



図-14 多数のシュートを発生させたスギ

長するものが多かった(図-14)。

(3) 分芽処理

培地に挿し付けたシュートから展開した腋芽数を調査した結果を表-10に示した。展開腋芽の数はBAP濃度に大きく影響を受けた。BAP 10 μMの培地ではNAA濃度に関係なく10-40個の腋芽が展開した。一方、BAP 1 μMの培地では1-7個と展開腋芽が少なく、伸長するシュートが多かった。以上のことから、BAP適性濃度は材料の生育段階に応じて異なることが認められた。即ち、腋芽の伸長、展開の行程つまり継代培養と分芽処理を繰り返すことにより試験管内においてクローンの増殖が可能となった。

表-10 分芽処理によるスギ茎葉からの展開腋芽数

ホルモン濃度 BAP-NAA (μM)	供試シュート 本数 (本)	シュート1本当たり展開腋芽数
		平均値/展開腋芽数の範囲 (本)
1-0.01	7	2/0-6
1-0.1	7	3/0-7
10-0.01	7	23/10-40
10-0.1	7	24/12-40

4 ヒノキの苗条原基誘導法の検討

(1) 初代培養

培養開始から107日後の生存数及び成長状況を表-11に示した。安達1号は、IS培地で最も成長が良く、生存率も高い。BAP 1 μM添加区で成長が良く、また、BAP 10 μM添加区では深い緑色を帯びた分芽が多く発生した。しかし、BAP 20 μMの濃度においては植体が葉害によって褐変枯死するもの多くみられた。福島1号では、MS3培地とWS培地で生存数が多い。WPM培地では植体の先端部が褐変しやすく、IS培地においては枯死する傾向が顕著である。また、BAP 20 μMの濃度においては全ての植体が枯死した。安達1号に比べ、ホルモン感受性が低く新たな茎葉の伸長はみられなかった。以上の結果から、初代培養には双方のクローンから平均して生長し、生存率も高いMS3培地にBAP 1

表-11 ヒノキ初代培養における培地とBAP濃度の影響(107日後)

基本培地		1/2 MS	WS	WPM	IS	計	
BAP-NAA (μM)	クローン					小計	大計
1-0	安達 1	1	3	3	4	11	14
	福島 1	2	0	1	0	3	
1-0.01	安達 1	2	3	1	3	9	15
	福島 1	2	3	1	0	6	
10-0	安達 1	2	3	2	5	12	16
	福島 1	2	1	1	0	4	
10-0.01	安達 1	3	2	3	3	11	15
	福島 1	1	2	1	0	4	
100-0	安達 1	0	0	1	0	1	1
	福島 1	0	0	0	0	0	
計	安達 1	8	11	10	15	44	61
	福島 1	7	6	4	0	17	
	計	15	17	14	15	61	

μM の添加が適切であると考えられる。

(2) 苗条原基の誘導

植物の大量増殖のために苗条原基を作成する場合は、一般に成長点を液体培養^{22) 23)}で行うことが普通である。しかし、井出²¹⁾はシラカンバの葉柄及び茎軸から寒天培地で作成しており培養材料及び部位さらに培地の形態にはとらわれないようである。苗条原基集塊が作出されたのは表-12に示すように13、18番目の培地であり(図-15)、ポプラ、ユーカリ²²⁾の場合及びヒノキの幼苗から不定芽を作出したホルモン条件²⁴⁾と類似していた。ホルモン濃度が比較的低い培地においては変化がないか、葉頭の伸長のみが認められた。NAA濃度が1 μM以上の培地ではカルスのみが形成され、カルスの形成にはNAAの影響が大きいことを意味している。また、BAP 100 μMの濃度では、枯死する結果となり葉害によるものと思われる。その他の培地では早生分枝が誘導された。早生分枝は、葉頭上部より新しく生長する部分が多芽多枝の状態となり、鱗状葉も大きく形成された(図-16)。しかし、苗条原基に比べるとその増殖率は小さい。苗条原基の発生頻度は、13番地目の

表-12 ヒノキ苗条原基誘導におけるホルモン濃度と培養結果

(μM)

BAP NAA	0	0.1	1	10	100
	0	1 S 5/5	6 S 5/5	11 B 5/5	16 B 5/5
0.01	2 S 5/5	7 S 5/5	12 B 5/5	17 B 5/5	22 D 5/5
0.1	3 C 5/5	8 S 2/5 C 3/5	13 B 4/5 SP 1/5	18 B 3/5 SP 2/5	23 D 5/5
1	4 C 5/5	9 C 5/5	14 C 5/5	19 C 5/5	24 D 5/5
10	5 C 5/5	10 C 5/5	15 C 5/5	20 C 5/5	25 D 5/5

注) 1. 成長した茎葉数/植え付けた茎葉数
2. S: 伸長, B: 早生分枝, SP: 苗条原基, C: カルス, D: 枯死

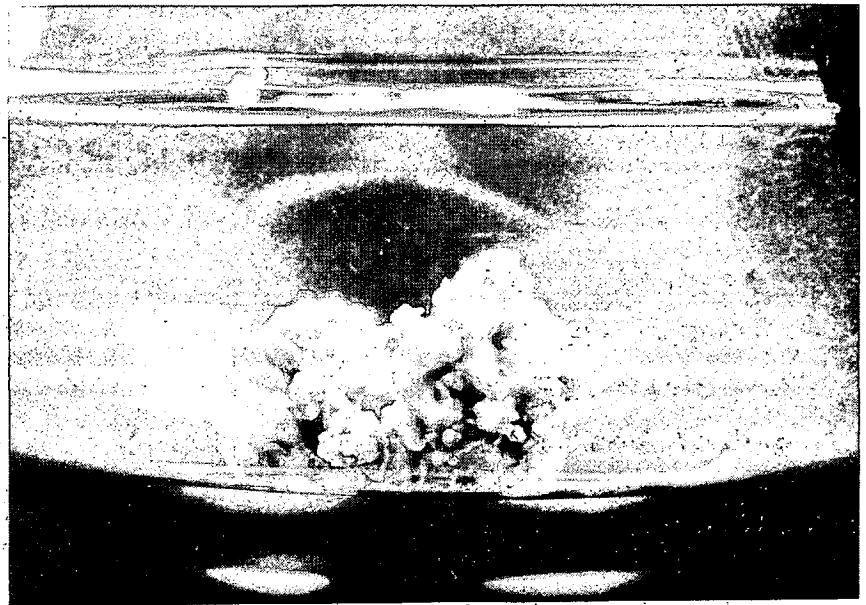


図-15 液体培地で培養中の苗条原基



図-16 誘動された苗条原基(左)と早生分枝(右)

培地では20%、18番目の培地では40%であり早生分枝やカルスに比べて高いとは言えないが、ヒノキの増殖に苗条原基の可能性が示された意義は大きいと考えられる。

(3) 苗条原基の増殖

ホルモン濃度別、調査項目別に調査した結果を表-13に示した。ホルモン濃度が原基集塊の大きさに及ぼす影響はNAA 0.01 < GA₃ 0.01 < BAP 0.1 μMの順に大きいことがわかった。したがって、ホルモンの組合せを行う場合はこの組合せが最適であり、実際の測定結果もこの組合せが21.5 mmで最高値を示している。

2 mm以上に分化したシュート数を調査した結果、BAP 0.1 < GA₃ 1.0 < NAA 0.1 μMの順に影響が大きい。最高値はこの組合せの34本であった。茎葉分化数にはNAA濃度の影響が顕著に現れ、BAPよりもGA₃の濃度と相互作用をなして効果を増していると考えられる。

茎葉の伸長にはBAP濃度が大きく影響している。BAPは1.0 μMが適しており最高値はBAP 1.0 μM + NAA 0.01 μMの4.5 mmであった。これは伸長とともに茎葉の展開も大きく、4-(2)の結果と同様であった。

新たに発生した苗条原基はBAPとGA₃の影響が大きくBAP 1.0 + GA₃ 0.1 μMで最高6個発生した。NAA 0 μMで多く発生した結果は4-(2)の結果と相違しているがNAAの添加培地でも発生しており、今後さらに検討する必要がある。

以上の結果から、GA₃はクヌギ²⁵⁾、コナラ²⁶⁾の場合と同様に茎葉の伸長を除き効果のあることがわかった。苗条原基法によるヒノキの増殖ではその発達段階及び目的に応じたホルモンの調整が必要である。また、ヒノキのシュート形成にはZeatinが有効である¹²⁾との報告もあり、今後その組合せ効果についても検討を行いたい。

(4) 苗条原基の苗化

分割し苗化培養した苗条原

表-13 ヒノキ苗条原基の増殖における植物ホルモン濃度の影響

ホルモン濃度 (μM)	原基直径 (mm)	茎葉分化数 (本)	伸長量 (mm)	新苗条原基 (個)	
GA	0	17.6	17.4	3.2	4
	0.01	18.3	17.1	3.3	6
	0.1	16.9	17.3	3.1	8
	1	17.2	20.1	3.2	4
BAP	0	17.3	16.2	3.1	6
	0.1	18.4	19.4	3.0	4
	1	16.8	18.4	3.4	12
NAA	0	17.0	15.5	3.0	13
	0.01	18.2	17.9	3.3	5
	0.1	17.3	20.5	3.2	4
平均 (計)	17.5	18.0	3.2	22	



図-17 分割し培地上に置床した苗条原基 (2週間)

基集塊は2週間頃から膨脹し始め中央に緑色の葉原基が多数発生した(図-17)。さらに、分割して継代すると4週間で茎葉を分化し、小植物体に成長した(図-18、19)。特にBAP $10\mu\text{M}$ +NAA $0.01\mu\text{M}$ を添加した培地で培養した葉原基は、多芽体(multipul shoot)を形成した。このことは、さらに効率的な増殖方法を検討する上で注目すべき結果である。しかし、膨脹した集塊の分割操作の際に葉原基が2-3個の小片に分割されたものは成長、増殖せず変化しないものや黒変枯死するものがあった。したがって分割操作を慎重に5-6個の集塊として分割し、正確な植え付けを行う必要がある。

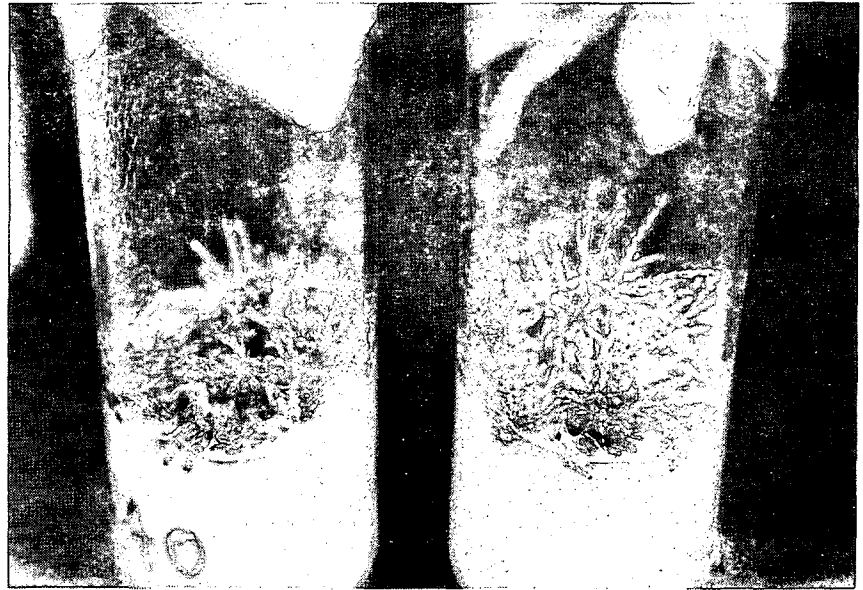


図-18 茎葉を伸長させた苗条原基(4週間目)



図-19 馴化した苗

IV まとめ

今回の試験結果をまとめると以下ようになる。

- (1)タキノザクラの継代培養において、シュートの伸長・増殖にはBAPの添加が必要であり、BAPの添加が高濃度になるにつれ伸長より分岐の方に作用する傾向を示した。また、長さ5mm以上のシュート発生本数は、BAP $4\mu\text{M}$ 添加区で最大値を示した。
- (2)モニワザクラの継代培養においてVitrificationを起こした葉は、正常な葉と比べ気孔の形や並べ方に異常がみられた。また、培地を通気性のあるサンキャップシートを用いて蓋をすることや、培地支持素材にGelrite $2\text{g}/1$ とAVF $5.4\text{g}/1$ を組み合わせることで発生防止に効果が認められた。
- (3)サクラのシュートを発根させる場合、発根処理をした処理区で根の伸長が図られた。また、発根処理後にパーミキュライトとゲルライトを組み合わせることで添加した改変MS培地で培養した場合、細根の発達した健全な幼植物体が得られた。
- (4)モニワザクラ幼植物体を土壌馴化できた。馴化条件別にみると、温度 4°C で50日間管理した個体で

土壌馴化後の発芽、成長が早い。

(5)ブナの初代培養では、材料の採取は5月が適期と考えられた。また、BAP $1 \mu\text{M}$ を添加した改良MS培地でシュートの伸長がみられた。しかし、継代途中で褐変枯死する個体が多く幼植物体は得られなかった。

(6)スギの継代培養では、シュートの伸長にはBAP $1 \mu\text{M}$ を添加したWS培地が適していた。また、シュートから新たな腋芽を展開させるにはBAP $10 \mu\text{M}$ の添加が有効であった。

(7)無菌的に伸長させたヒノキ茎葉を、BAPとNAAを添加したMS培地で培養することで苗条原基が誘導できた。さらに苗条原基はGA₃を含んだ培地で培養した場合、原基集塊の直径や茎葉の分化に効果が認められた。

(8)分割したヒノキ苗条原基はBAP及びNAAを含んだMS培地に継代した結果、葉原基に成長した。やがて葉原基からは多数の茎葉が発生し、一部には多芽体を形成するものがみられた。

V 引用文献

- 1) 斎藤 明: 林木育種とバイオテクノロジー, 研究ジャーナル, 13: 43-49, 1990
- 2) 酒谷昌孝, 天野孝之: 組織培養によるナラノヤエザクラ (*Prunus leveilleana* Koehne cv. *antiqua*) の増殖, 奈良林試研報, 17: 26-31, 1987
- 3) 寺田正男, 浅野政行: サクラの接木親和性と品種間差異, 日林関東支論, 40: 69-72, 1988
- 4) 酒谷昌孝, 天野孝之: サクラ (*Prunus*) の組織培養による増殖, 奈良県林試林業資料, 2: 20-22, 1987
- 5) 原口雅人: カバザクラ 850年生老木の腋芽培養, 日林関東支論, 41: 61-62, 1989
- 6) 千木 容: 組織培養によるサクラ亜属の幼植物体再生の効率化 (I) - 培地と固形化剤の検討, 日林学会中部講集, 37: 31-34, 1989
- 7) 千木 容: 組織培養によるサクラ亜属の幼植物体再生の効率化 (II) - 腋芽培養による大量増殖 -, 100回日林論: 513-514, 1989
- 8) 福島県農地林務部: 昭和47年福島県林業統計書: 43, 1971
- 9) 福島県農地林務部: 平成3年福島県林業統計書: 43, 1990
- 10) Ide, Y. and Yamamoto, S.: Adventitious root formation on in vitro micro-cuttings of Hinoki, 日林誌, 68: 296-298, 1986
- 11) 井出雄二, 山本茂弘: ヒノキの試験管内微小サシキにおける小枝葉の伸長, 97回日林論: 443-444, 1986
- 12) 石井克明, 吉岡寿, 瀧尻富士雄: ヒノキ成木よりの組織培養による個体の増殖, 100回日林論: 523-524, 1989
- 13) 日本のサクラの種・品種マニュアル: 16 p. (財)日本花の会, 1984
- 14) Boraman, C. H. and Vogelmann, T. C.: Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*, Physiol. Plant., 61: 505-512, 1984

- 15) Bottcher, I. , Zoglauer, K. and Goring, H. : Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro, *Physiol. Plant.* , 72 : 560 - 564, 1988
- 16) 齋藤朋子, 金子康子, 松島 久 : Vitrification と de-vitrification に関する研究, 第11回植物組織培養シンポジウム講演要旨集 : 108, 1989
- 17) 平田哲也, 香西 護, 戸田義宏 : カリンの組織培養に関する研究 (II) - 組織培養における vitrification について -, 103 回日林論 : 501 - 502, 1992
- 18) 石川広隆 : 組織培養を用いた材木の不定器官の発生促進に関する研究, 林試研報 343 : 119 - 153, 1987
- 19) 佐藤 亮 : スギ・クロマツの胚培養に用いる培地の検索, 日林誌60 : 81 - 86, 1978
- 20) 佐藤 亮 : スギ稚苗の組織片からの不定芽の誘導による幼植物体の再生, 日林誌68 : 389 - 392, 1986
- 21) 井出雄二 : シラカンバの組織培養によるクローン大量増殖法に関する研究, 静岡県林試研報16 : 1 - 56, 1987
- 22) 伊藤一弥 : 木本生植物およびプロトプラスト培養への苗条原基の応用, 組織培養13 : 292 - 295, 1987
- 23) 田中隆荘, 谷口研至 : 成長点培養 (山岡康之・岡田吉美編 : 植物バイオテクノロジー), 東京化学同人, 16-24, 1986
- 24) Ishii Katsuaki : In vitro plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedling of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*), *Plant Cell Tissue and Organ culture* 7 : 247 - 255, 1988
- 25) 原口雅人 : クヌギにおける 2 次不定胚の形成と発芽条件の検討, 100 回日林論 : 499 - 500, 1989
- 26) 引田裕之・斎藤 明 : コナラ稚苗の上胚軸片からの幼植物体の再生, 99 回日林論 : 465 - 466, 1988