

ヒノキの組織培養

岡村政則・千田雅一・近藤禎二

Masanori OKAMURA, Masaichi SENDA and Teiji KONDO

Tissue Culture of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*)

要旨: ヒノキの芽生えから不定芽を誘導するための培養条件を明らかにするために、芽生えを子葉、幼芽、胚軸の3つに分割して、シャーレ内で培養した。培地には、1/2MS培地にBAPとNAAとを、0, 0.1, 1, 10, 20 μ Mの5段階ずつ組み合わせて添加した。その結果、不定芽が特に多く形成されたのは、BAPが1 μ M~10 μ M, NAAが0.1 μ M~10 μ Mの間であった。不定芽の形成が見られた器官は子葉と幼芽で、胚軸には形成されなかった。不定芽形成の見られなかった外植体のほとんどがカルス化した。

また、ヒノキの芽生えから無菌条件下で培養した不定芽をカプセル化して人工種子的取り扱いを試みた。カプセル化のための培地は1/2MS培地に、アルギン酸ナトリウムを加え、さらに、IBAを0, 5, 25 μ Mの3段階の濃度で添加した溶液を用いた。ゲル化は、ビンセットを用い、不定芽を、この溶液とともに、塩化カルシウム溶液中に落として行った。カプセル化した不定芽は早いもので、10日目頃から芽の伸長が、20日目頃から根の伸長が始まった。4カ月後の順化を行う段階で、発根状態などを調査した結果、発根率については、系統間、IBA処理間、根の状態と、苗長についてはIBA処理間において有意差が認められた。

1 はじめに

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) は林業上、重要な樹種であり、精英樹1,047本、気象害抵抗性候補木1,326本等が選抜され、それらのクローンで造成された採種園から種子が生産されている。しかし、ヒノキの結実率は年により豊凶差があるため、安定した優良種苗の供給が望まれている。そのため、効率よく増殖するための手段として、組織培養による増殖技術の開発が進められている。

ヒノキの組織培養については、芽生え、幼木及び成木を材料として研究が進められている。

石川¹⁰⁾は芽生えを材料としてWS培地で不定芽形成を試みて、BAP添加で効果が認められている。天野ら²⁾はヒノキ芽生えの子葉をBAPを添加したMS培地で増殖したのち、基本培地を5倍に希釈したホルモン・フリー培地で87%の発根率を得ている。また、天野ら³⁾は芽生えの子葉、幼芽、胚軸を用いてMS培地上で不定芽形成を試みたところ、子葉からの分化がほとんどで、幼芽からは少なく、特に胚軸からはきわめてまれであったことを報告している。これに対し、富田ら¹⁷⁾は同様に芽生えの子葉、幼芽、胚軸を用いてBAPを添加したMS培地等により培養し、いずれの部位から不定芽が形成されたとの報告をしている¹⁵⁾。また、不定芽の形成程度は子葉、胚軸、幼芽の順であったが、12週目からは胚軸、幼芽、子葉の順になり¹⁶⁾、さらに増殖したシュートを用いて発根性の試験を行った結果、1/5 MS培地を用いた場合、IBA処理より無処理の発根が良好だったと報告している。ISHII⁷⁾は芽生えを、BAP等を添加したCD培地により増殖し、芽生え1本から、1年半で100本の植物体を得たことを報告している。

芽生え以外を材料とした培養例としては、井出ら⁶⁾は試験管内微小さし木における採種母樹の樹齢の影

響について調べ、3年生から25年生までの枝のさし木では、一般のさし木と同様に母樹の樹齢が高いほど発根率は低下することを報告している。

山本ら¹⁹⁾は幼齡木や成木の小枝葉をWS培地等で培養し、伸長に及ぼす影響について調べ、適したホルモン濃度を明らかにしている。石井ら⁹⁾はヒノキの芽生え及び成木の葉条からBAP等を添加した1/2 MS培地等から誘導したカルスを培養することにより根を分化させた。天野ら¹⁾は5年生ヒノキの葉条及び15年生ヒノキの鱗片葉をWS培地で培養することで発根苗を得ている。その際、根形成に Gellum Gumが良好であり、活性炭で発根が抑制されたと報告している。天野⁴⁾は15～16年生の葉条を用いた場合、BAPを添加したMS培地などにより、腋芽を経由して発根苗条を得ることが可能となったことを報告している。石井ら⁸⁾は13、14年生の葉条をBAP、NAA等を添加したCD培地などで培養しシュートを形成させ、発根個体を得られたことを報告している。

今回行った芽生えを使用しての増殖試験は、大量増殖という観点の他に、交雑F₁のクローン化という育種上の意義がある。本報告では、芽生えから不定芽を誘導するための、植物ホルモンと器官について、より詳細に検討した。

また、優良個体を効率よく増殖する手段として、シラカンバの幼植物体の腋芽をアルギン酸ゲルでカプセル化することによって無菌、非無菌条件下で人工種子の取り扱いを行うことが試みられている^{11,12)}。この方法を、ヒノキの不定芽に適用できないかと考え、無菌条件下でカプセル化して、IBA濃度別の発根の効果を検討するとともに、発根した苗を順化させたので、併せてその結果を報告する。なお、本試験を行うに当たり、ご指導を頂いた森林総合研究所、生物機能開発部生物工学科、木下 勲 博士に厚くお礼申し上げる。

2 ヒノキ芽生えからの不定芽の誘導

2.1 材料と方法

実験に用いたヒノキの種子は林木育種センター構内のクローン集植所に植栽されている樹齢26～28年生のヒノキ精英樹、額田10号、西川17号から1991年11月に球果を採取し、それを室内で自然乾燥して採種した。精選した種子は、紙袋に入れ、播種時まで冷蔵庫に貯蔵した。1,000粒重は額田10号が2.2g、西川17号が2.0gであった。

播種床はパーミキュライトを入れたプラントベッドを用い、これを室内に置いた。播種後13日で発芽し、発芽率は額田10号が4%、西川17号が2%であった。

植え付けには播種後51日目の芽生えを使用した。芽生えは次の順序で殺菌した。まず、70%エタノールをスプレーし、6%過酸化水素水にいれ、スターラーを用いて15分間攪拌した後、滅菌水ですすぎ、芽生えを子葉(約10mm)、幼芽(約5mm)、胚軸(約10mm)に分割し、外植体とした。

培地は窒素を半分にしたMS培地¹⁸⁾を基本培地として用いた。

この培地にサイトカイニンとして6-ベンジルアミノプリン(BAP)、オーキシンとして α -ナフタレン酢酸(NAA)を添加した。BAP及びNAAの濃度は、それぞれ 0, 0.1, 1, 10, 20 μ Mの5通りとし、それらを組み合わせて25通りの処理区を設けた。さらに、3%のショ糖を加え、pH5.7に調整し、

0.8%の寒天を加え、温浴で溶かした後、オートクレーブで滅菌し、シャーレに分注した。

1処理区2個のシャーレを用い、シャーレ1個に同一家系の2個体ずつの分割した外植体を置床した。したがって、各クローン50個体ずつ、計100個体の芽生えを供試した。なお、子葉はすべて向軸側を培地につくように置床した。培養は25℃、16時間日長、照度3,000luxの条件で行った。

形成させた不定芽の評価は、不定芽の数を肉眼で数え、さらに直径をmm単位で計り、直径×数の値を5段階に指数化し、不定芽の量とした。

2.2 結果と考察

培養中、雑菌が多数発生した。そのため、額田10号については、25処理区のうち11処理区が、西川17号については、12処理区の観察が継続できなかった。結局、両家系ともそろったのは6処理区、一方のみあるのが15処理区、両方とも無いのが4処理区となった。

不定芽形成に要する日数は全体の平均で約39日であった。処理区間では、ほとんど差がなかった。ただし、乳頭状の器官の形成を経て不定芽となったものは、50～80日と不定芽形成までに時間がかかった。

不定芽は7処理区で形成され (Table 1.)、形成されなかったほとんどの外植体はカルス化した。不定芽の形成にはホルモン濃度によって差が見られ、1シャーレ当たりの不定芽の量が最も多かった処理区の上位3つを挙げるとBAP 1 μ MとNAA 10 μ M区 (Photo. 1-a.)、BAP 10 μ MとNAA 1 μ M区 (Photo. 1-b,c)、BAP 10 μ MとNAA 0.1 μ M区であり、この3通りの組合せは、不定芽の形成量が他の組合せに比べ格段に多かった (Table 1.)。

Table 1. 処理区、器官毎の不定芽形成量 (指数)
Growth of the adventitious buds (index)

植物ホルモン 濃 度	BAP (μ M)									
	0		0.1		1		10		20	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
NAA (μ M)	0	—	—	N	—	N C	—	0 2	—	—
	0.1	C	—	C	—	1 3	2 4	3 4	N	—
	1	—	C	C	C	N	—	2 4	4 5	0 2
	10	—	—	—	C	4 5	—	—	—	4 1
	20	C	—	C	C	C	—	C	C	N

数字：上段が子葉，下段が幼芽にそれぞれ形成された不定芽の量の指数

Number of upper growth of the adventitious buds from cotyledon (index)

Number of lower growth of the adventitious buds from plumule (index)

—：雑菌発生
contamination

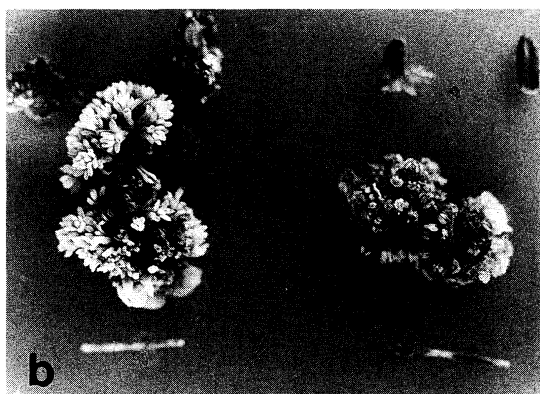
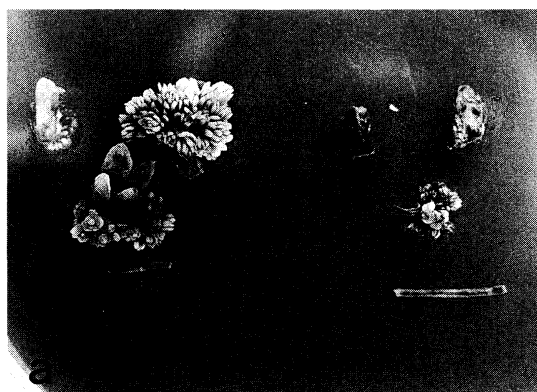
C：カルス化のみ
callus induced only

N：変化なし
no elongation

S1：額田10号
Nukata 10

S2：西川17号
Nishikawa 17

a : 額田10号 BAP $1\mu\text{M}$ NAA $10\mu\text{M}$ 処理区
Nukata10 BAP $1\mu\text{M}$ NAA $10\mu\text{M}$
treatment



b : 西川17号 BAP $10\mu\text{M}$ NAA $1\mu\text{M}$ 処理区
Nishikawa17 BAP $10\mu\text{M}$ NAA $1\mu\text{M}$
treatment

c : 額田10号 BAP $10\mu\text{M}$ NAA $1\mu\text{M}$ 処理区
Nukata10 BAP $10\mu\text{M}$ NAA $1\mu\text{M}$
treatment

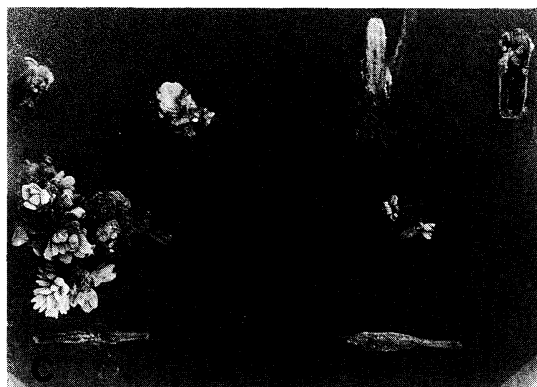


Photo. 1. 子葉及び幼芽より誘導された不定芽
Adventitious buds from Cotyledons and Plumules

ヒノキの不定芽発生に適するホルモン濃度として、ISHII⁷⁾はCD培地ではBAP 10 μ M, NAA 0.027 μ Mの組合せが適当であるとしており、本試験もこれに近い結果を示した。また、天野と酒谷³⁾は、MS培地ではBAPのみを使用して培養した結果、子葉からの不定芽の形成が最も多かったBAPの濃度は0.5mg/ ℓ (2.22 μ M)であり、さらに、いったん形成された不定芽、不定芽原基が、時間が経過してもカルス化しない濃度として0.25mg/ ℓ (1.11 μ M)及び0.12mg/ ℓ (0.53 μ M)を挙げている。本試験では、BAP 1 μ M区及び10 μ M区でも不定芽が多く形成され、20 μ M区でも不定芽の形成があったが、置床後11週を過ぎて、不定芽がカルス化したものはBAP 10 μ M, NAA 1 μ M区の1個体であった。また、BAP単独よりも、NAAと併用した方が不定芽をより多く誘導できたことから、両者を併用した方がより高率に不定芽を誘導できると考えられる。

器官ごとの不定芽形成について比較すると、今回の実験においては、胚軸から不定芽は形成されなかった。子葉、幼芽から形成された不定芽の数はほぼ同じであったが、幼芽の方が大きかった。

子葉において不定芽が形成された個体では、幼芽でもすべて不定芽が形成された(16個体中、11個体)。

一方、幼芽には不定芽が形成されたものの、子葉には形成されなかった個体があった(16個体中5個体)。

以上、今回の試験結果からは、不定芽の誘導には胚軸でなく、子葉、幼芽を使うのが適当であるが、どちらがより効率的であるかについては、今後検討する必要がある。

なお、ホルモン濃度と不定芽形成量の関係は、子葉、幼芽とも同じ傾向であったので、子葉、幼芽のホルモンに対する反応の傾向は同じと考えられた。

子葉の不定芽形成と背腹性については、不定芽が形成された子葉の13個のうち培地に接する側(向軸側)に形成された子葉の数は10個であった。また、子葉に形成された不定芽のうち、培地に接する側(向軸側)の方がより多く形成した。

ヒノキの子葉の不定芽形成には背腹性があり、向軸側を上にした方が不定芽をより効率的に誘導できると報告されている³⁾。本試験では、これと逆に向軸側を下にしたが、向軸側により多くの不定芽が形成されたことから、今後は向軸側を上にする方がよいと考えられた。

供試数が十分ではないが、ヒノキの芽生えの不定芽形成に適したホルモン濃度及び器官はわかりかけてきた。今後は培養条件を絞り込み、諸条件を詳細に検討していきたい。また、家系間の差についても調査を行っていきたい。

3 カプセル化したヒノキ不定芽からの発根

3.1 材料と方法

カプセル化の材料としたヒノキの不定芽は、精英樹の南多摩5号、揖斐2号、加茂3号、中津川2号、恵那3号の自然交配種子の芽生えの部位別不定芽形成能力の系統間差について試験したもののなかで、胚軸から増殖したものを使用した¹⁶⁾。この材料が採取できるまでの増殖方法は、芽生えの胚軸をMS培地¹⁴⁾にベンジルアミノプリン(BAP) 1 μ Mを添加した培地で1カ月間初代培養¹⁶⁾、15カ月間同じ培地で1ヶ月間隔で継代培養した後、MS基本培地の窒素成分を半分にした培地¹⁸⁾で1ヶ月間隔で10カ月間継代

培養をした。培養物の針葉形態には幼形葉型と成葉型が見られたので、2種類に区分して試験した。不定芽のカプセル化には、包埋するアルギン酸ナトリウム溶液と、それをゲル化する塩化カルシウム溶液を使用した。アルギン酸ナトリウム溶液は、MS基本培地の窒素成分を半分にした培地から塩化カルシウムを除いたものに、ショ糖30g/ℓと、アルギン酸ナトリウム25g/ℓを加え、発根を促進するために、インドール酪酸（IBA）を0, 5, 25 μ M添加した3種類の溶液とした。ゲル化する塩化カルシウム溶液は、不定芽の包埋に用いたものと同じ培地に塩化カルシウム14g/ℓを含むものである。カプセル化の操作は、不定芽を含む長さ5~6mmの長さに切った針葉の先端部を、アルギン酸ナトリウム溶液に入れてかき混ぜた後、ピンセットを用いて、1芽ずつ溶液とともにさみ、塩化カルシウム溶液の中に落とすことでゲル化させた（Photo. 2.）。得られた直径6~8mmのカプセルを、寒天で固めたMS基本培地の窒素を半分にした培地に、カプセルと同じ濃度のIBAを添加した培養びんの中に置床した。

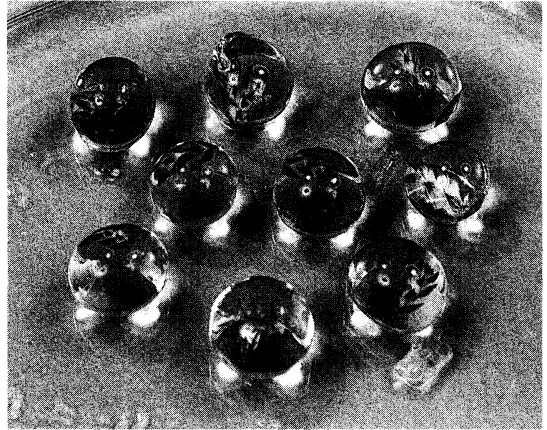


Photo. 2. カプセル化したヒノキの不定芽

Encapsulated adventitious buds of Hinoki,
Chamaecyparis obtusa.

また、このカプセル化の方法と比較するために、MS培地の窒素を半分にした培地に、IBAを0, 5, 25 μ M濃度のIBAを添加した培養びんに、長さ7~8mmの不定芽を用いて直接さし木を行った。これらを25℃、約2,500

luxの16時間日長下で培養した。これらはすべて無菌条件下で操作した。4カ月を経過した時点で培養を打ち切り、びんから取り出し、根に付着した寒天を洗い落として発根状態を調査した。調査は、根が5mm以上伸長した個体を発根とみなし、根の状態については表2の欄外に示した1~5の指数で評価した。順化は、パーミキュライトとピートモスとパーライトを等量混合し、滅菌した容器に植え込んで行った。

3.2 結果と考察

カプセル化した不定芽からは、培地置床後10日目頃から芽の伸長が始まり（Photo. 3.）、根の伸長は20日目頃から始まった（Photo. 4.）。その後は漸次、芽及び根の伸長が見られ、カプセルから外に出た。これらの中には、1個のカプセルより数本の芽が伸長している個体が見られた。芽のみが伸長した個体の中には、3カ月を過ぎた時点で根が出始める個体があった。置床後、4カ月を経過し、培養を打ち切る時点ではPhoto. 5. のとおり生育した。この、順化を開始する時点で未発根の個体でも、生存あるいは芽が伸長している個体が多く、枯死した個体は置床した全数の3.6%であった。発根状態を調査した結果、Table 2. のとおりとなった。発根率は、系統間やIBAの濃度により差が見られ、最も高かったのは、幼形葉型を用いたIBA25 μ M区における南多摩5号の80.0%であった。また、25 μ M区ではどの系統も幼形葉型、成葉型ともに発根率が高かったが、0, 5 μ M区に比べて根が短いものが多く、苗長においても、同様に短かった。平均値を用いた分散分析では、発根率においては、系統間に1%, 針

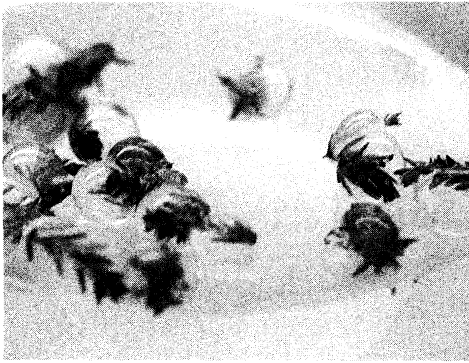


Photo. 3. カプセル化した不定芽からのシュートの伸長
Shoot elongation from the encapsulated
adventitious buds.

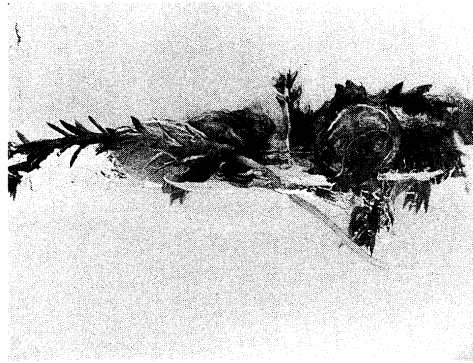


Photo. 4. カプセル化した不定芽からの発根
Rooting from the encapsulated
adventitious buds.

葉の形態、IBA処理間には5%水準の有意差が認められた。根の状態と苗長については、IBA処理間において5%水準の有意差が認められた。不定芽をさし木した結果をカプセル化した材料と比較すると、Table 3.のとおり発根率ではさし木の方がやや高い傾向が見られた。根の状態と平均苗長については、明らかな差は見られなかった。さし木とカプセル化の方法を比較すると、カプセル化の方が処理が簡便であるのでカプセル化の方法に改良を加えて実用化する必要がある。発根状態の調査が終わったものは、順化のための用土に植え付けた。この時点で1個のカプセルから芽の多く出たものは1芽を残して剪定した。

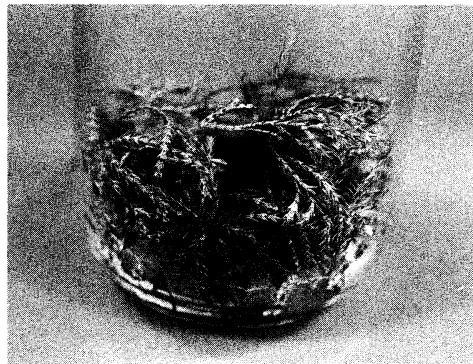


Photo. 5. カプセル化した不定芽から再生された苗
Regeneration of the plantlets from the
encapsulated adventitious buds.

た。順化の途中でカビが発生し、根腐れをした個体があり、発根した個体全体の順化率は66.1%であった。以上のように、不定芽をカプセル化することにより増殖が可能になったことが明らかとなった。今回は針葉の先端部だけを使用した。針葉の中間部も使用することにより、多くの材料を得ることが可能ではないかと考えられる。発根率は、今回以上に長期間置床しておくことにより、向上が期待できるが、実用化のためには、短期間にそろって発根させる技術の開発が必要である。IBA濃度についても発根率の高かった25 μ M区は、濃度が高すぎて、根や芽の伸長が劣る傾向にあったので詳細に検討する必要がある。また、今回は無菌状態で寒天培地上にカプセルを置床したため、植え替えて順化を行わねばならなかった。今後はより簡便に非無菌状態で多量に増殖する方法を検討したい。

Table 2. カプセル化した不定芽からの発根と生育状態
Rooting and growth of the encapsulated adventitious buds

IBA 濃度 IBA concentrations (μ M)	系 統 名 Designations	幼形葉型 Juvenile from leaf					成 葉 型 Adult from leaf				
		供 試 数 No. of explants	発 根 数 No. of explants rooted	発 根 率 Rooting percentages (%)	根の状態の 平均指数 Average rooting indexes	平均苗長 Average shoot lengths (mm)	供 試 数 No. of explants	発 根 数 No. of explants rooted	発 根 率 Rooting percentages (%)	根の状態の 平均指数 Average rooting indexes	平均苗長 Average shoot lengths (mm)
0	南多摩 5	30	13	43.3	3.5	25.5	14	7	50.0	4.0	34.9
	Minamitama 5	45	30	66.7	3.9	25.8	45	22	48.9	3.3	25.8
	根 変 2	45	25	55.6	3.6	30.3	21	12	57.1	3.3	27.8
	加 茂 3	30	9	30.0	4.0	31.6	10	2	20.0	4.5	18.5
	Kamo 3										
	中津川 2										
5	Nakatsugawa2										
	平 均			51.3	3.8	27.9			47.8	3.4	27.5
	Mean										
	南多摩 5	30	14	46.7	2.5	26.9	14	1	7.1	4.0	47.0
	Minamitama 5	45	31	68.9	2.9	23.6	45	21	46.7	3.3	26.0
	根 変 2	45	26	57.8	3.5	29.9	21	12	57.1	2.7	25.1
2.5	加 茂 3	30	7	23.3	3.0	23.4	10	1	10.0	3.0	23.0
	Kamo 3										
	中津川 2										
	Nakatsugawa2										
	平 均			52.0	3.0	26.3			38.9	3.1	26.2
	Mean										
25	南多摩 5	30	24	80.0	2.0	14.6	14	4	28.6	2.8	20.0
	Minamitama 5	45	34	75.6	2.4	15.9	45	28	62.3	2.3	19.2
	根 変 2	45	30	66.7	2.1	20.5	21	14	66.7	3.0	30.3
	加 茂 3	30	16	53.3	1.2	12.5	10	4	40.0	1.8	23.0
	Kamo 3										
	中津川 2										
25	Nakatsugawa2										
	平 均			69.3	2.0	16.4			55.6	2.5	22.7
	Mean										

指数 根の状態
Index State of rooting
5 : 5cm以上が3本以上
More than 3 roots longer than 5 cm.
4 : 5cm以上が1~2本
one to two roots longer than 5 cm
3 : 1~5cmが3本以上
More than 3 roots to 5 cm long.
2 : 1~5cmが1~2本
one to two roots to 5cm long.
1 : 0.5~1cmが1本以上
More than a roots 0.5 to 1cm long.

Table 3. カプセル化した不定芽とさし木した不定芽の発根と生育状態
Rooting and growth of the encapsulated adventitious buds and cutting adventitious buds

IBA 濃度 1BA concentrations (μ M)	系統名 Designations	材 料 Material	幼形葉型 Juvenile from leaf					成 葉 型 Adult from leaf				
			供 試 数 Na. of explants	発 根 数 Na. of explants rooted	発 根 率 Rooting percentages (%)	根の状態の 平均指数 Average rooting indexes	平均苗長 Average shoot lengths (mm)	供 試 数 Na. of explants	発 根 数 Na. of explants rooted	発 根 率 Rooting percentages (%)	根の状態の 平均指数 Average rooting indexes	平均苗長 Average shoot lengths (mm)
0	南多摩 5 Minamitama5	カプセル	15	6	40.0	3.0	21.8	5	3	60.0	3.3	25.0
		さし木 cutting	15	11	73.3	4.1	26.7	5	2	40.0	3.5	21.5
	恵 那 3 Ena3	カプセル	15	6	40.0	3.8	31.5	5	3	60.0	5.0	27.0
		さし木 cutting	15	11	73.3	4.3	27.7	5	3	60.0	2.7	26.0
	中津川 2 Nakatsugawa2	カプセル	15	5	33.3	4.0	26.5	5	1	20.0	4.0	23.0
		さし木 cutting	15	8	53.3	4.5	30.0	5	2	40.0	4.0	25.0
5	南多摩 5 Minamitama5	カプセル	15	6	40.0	2.8	25.5	5	2	40.0	3.5	28.5
		さし木 cutting	15	10	66.7	1.7	20.5	5	3	60.0	2.0	20.7
	恵 那 3 Ena3	カプセル	15	5	33.3	3.6	24.2	5	2	40.0	5.0	48.5
		さし木 cutting	15	3	20.0	3.0	27.0	5	2	40.0	4.5	34.5
	中津川 2 Nakatsugawa2	カプセル	15	4	26.7	3.5	21.0	5	1	20.0	5.0	49.0
		さし木 cutting	15	8	53.3	2.5	20.1	5	1	20.0	5.0	45.0
25	南多摩 5 Minamitama5	カプセル	15	7	46.7	2.3	15.8	5	2	40.0	3.0	20.0
		さし木 cutting	15	5	33.3	2.0	12.2	5	3	60.0	3.0	20.7
	恵 那 3 Ena3	カプセル	15	6	40.0	2.8	18.5	5	1	20.0	2.0	24.0
		さし木 cutting	15	8	53.3	1.4	11.8	5	1	20.0	5.0	38.0
	中津川 2 Nakatsugawa2	カプセル	15	6	40.0	1.8	12.7	5	1	20.0	2.0	10.0
		さし木 cutting	15	5	33.3	2.0	14.8	5	1	20.0	5.0	37.0

指数 根の状態
Index State of rooting
5 : 5cm以上が3本以上
 More than 3 roots longer than 5 cm.
4 : 5cm以上が1～2本
 one to two roots longer than 5 cm
3 : 1～5cmが3本以上
 More than 3 roots to 5 cm long.
2 : 1～5cmが1～2本
 one two roots to 5cm long.
1 : 0.5～1cmが1本以上
 More than a roots 0.5 to 1cm long.

引用文献

- 1) 天野孝之・酒谷昌孝：ヒノキの葉条培養による増殖，奈良県林試研報16, 31～33, 1986
- 2) 天野孝之・酒谷昌孝：ヒノキの組織培養による大量増殖—子葉を用いた場合—，38回日林関西支講，235～238, (1987)
- 3) 天野孝之・酒谷昌孝：ヒノキの組織培養による大量増殖Ⅰ—子葉を用いた場合—，奈良県林試研報17, 19～25, (1988)
- 4) 天野孝之：ヒノキの組織培養による大量増殖Ⅱ—15～16年生葉条を用いた場合—，39回日林関西支講，249～252, (1988)
- 5) 井出雄二・山本茂弘：ヒノキの試験管内微小さし木における活性炭及びNADP添加の効果，35回日林中支論，5～7, (1987)
- 6) 井出雄二・風間康雄・山本茂弘：ヒノキの試験管内微小さしきにおける採穂母樹の年齢の影響，99回日林論，469～470, (1988)
- 7) ISHII, Katsuaki: In vitro plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedlings of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 7, 247～255, (1986)
- 8) 石井克明・吉岡 寿・龍尻富士雄：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)
- 9) 石井克明・田端雅進：ヒノキ科4種のカルス培養とヒノキのカルスからの根の分化，101回日林論，483～484, (1990)
- 10) 石川広隆：組織培養法を用いた林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)
- 11) 木下 勲・斉藤 明：アルギン酸ゲルで包埋したシラカンバ腋芽の無菌条件下での発芽，41回日林関東支論，65～67, (1989)
- 12) 木下 勲・斉藤明：アルギン酸ゲルで包埋したシラカンバ腋芽の非無菌条件下での発芽，41回日林関東支論，69～70, (1989)
- 13) KINOSHITA, I and SAITO, A: Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds, J. Jpn. For. Soc., 72, 166～170, (1990)
- 14) MURASIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, Physiol. Plant, 15, 437～497, (1962)
- 15) 富田正徳・富田浩二：ヒノキ稚苗の部位別不定芽形成能力と培養条件，42回日林中支論，87～88, (1994)
- 16) 富田正徳・富田浩二：ヒノキ稚苗の部位別不定芽形成能力の系統間差異，42回日林中支論，89～90, (1994)
- 17) 富田正徳・富田浩二：ヒノキの実生胚軸組織由来シュートからの発根の系統間差異と発根条件，42回日林中支論，91～92, (1994)

- 18) VIEITEZ, A.M. and VIEITEZ, M.L. : *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated in vitro. *Scientia Horticulturae*, **18**, 343~351, (1982)
- 19) 山本茂弘・井出雄二 : ヒノキの試験管内微小さし木における小枝葉の伸長及びカルスの形成, 静岡林試研報 **14**, 45~54, (1987)

Summary

Cotyledon, Plumule and hypocotyl of the germinated seedling of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) were cultured to induce adventitious buds. They were cultured on the half strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0, 0.1, 1, 10, 20 μ M 6-benzylamino-purine (BAP) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA). The adventitious buds were well induced in the combination of 1-10 μ M BAP and 0.1-10 μ M NAA. They were induced from the cotyledon

and the plumule instead of the hypocotyl. The explants which did not form adventitious buds formed calli.

The adventitious buds were encapsulated to produce synthetic seeds. The medium of the beads was the half strength MS medium supplemented with 0, 5, 25 μ M indole-3-butyric acid.

The adventitious buds coated with sodium alginate solution were picked up with forceps and dropped into modified MS medium containing 1.4% calcium chloride to make beads. Shoot elongation started after 10 days of culture and root formation started after 20 days. There were significant differences among families or IBA concentrations in rooting percentages. There were also significant differences among IBA concentrations in root growth or shoot length.