

ハゼノキの組織培養

戸田忠雄⁽¹⁾・西村慶二⁽²⁾・山手廣太⁽³⁾

Tadao TODA, Keiji NISHIMURA and Hirota YAMATE
Tissue culture of *Rhus saccidanea* L. (Hazenoki)

要旨：外植体として無菌的に発芽させた無菌発芽苗の胚軸と子葉付き胚軸の2種類を用いた。無菌発芽苗は種子を30~40%硫酸に60分浸漬し、70%エタノール、2%の次亜塩素酸ナトリウム、0.25%塩化第二水銀で滅菌処理して寒天培地で育成した。初代培養はIAA0.5mg/ℓ及び1.0mg/ℓ、及びIAA + ZEATIN1.0mg/ℓを添加したWPM培地において、子葉付き胚軸で100%のシュート形成率であった。初代培養における外植体当りのシュート数は2~3本と少なかった。発根培養は初代培養で得られたシュートを外植体に用い、IAA1.0mg/ℓ添加したWPM培地で76.9%の発根率を示し、NAA及びIBAの濃度を高めると発根率は高くなる傾向にあった。順化は幼植体を鉢植えした後ピーカーをかぶせたA区で80%の成功率であった。床替苗の移植30日目の生育は34cm、60日目は53cmと順調に生育した。組織培養の材料を育成するため、ガラス室において成木から萌芽枝の発生を試み、幹さし法で平均2.6本、埋幹法で3.5本の萌芽枝が得られた。これらを外植体に用いた初代培養では93%と高い汚染率が認められた。

1 はじめに

ハゼノキ (*Rhus succedanea* L. var. *japonica* Engl.) はウルシ科の植物で、中国、台湾、インド、マレーシア等に分布する⁴⁾。ハゼの果実からは和蠟燭、びん付けの原料となる木蠟が古くから作られており、栽培の歴史も古く、約300年前から行われていたという説がある²⁾。木蠟は大正時代まで農山村の副産物として重要な現金収入源であったが、電灯の普及や石油を原料とする木蠟代替品の出現によって、その需要が著しく減少した。昭和10年代に政府の奨励もあって一時は増加傾向を示し、昭和20年代には2,400トン⁷⁾あった生産量は今では300トンまで落込んでいる。しかし、最近になって天然品の特性が注目されたことに加えて、用途再開発の研究が進められ、再び木蠟の価値が見直されている。木蠟の化学成分は「日本酸」と称されるジカルボン酸を含有し、素材的に粘靱性が優れているといわれている²⁾。こうした特性を活かして化粧品、文房具、医薬品、金属研磨材、OA機器関連等用途は多様であり、海外でもジャパンワックスとして高く評価されている (Photo. 1. 2.)。現在輸出を含めた木蠟の年間需要量は約4,000トンと見込まれているが、これをまかなうだけの量には達していない。こうした生産量増大の阻害要因として次のことが考えられる。①採種個体が老樹で樹高も高く樹型が乱れている。②採種業者の高齢化とあいまって種子採取が困難となっている。③品種によって隔年結果性が高く、生産量が不安定である。④栽培品種のつぎ木活着率が低く、苗が高価である。

(1) 九州育種場

(2) 林木育種センター

(3) 元九州育種場



Photo. 1. ハゼノキの果実
Fruits of *Rhus saccedanea*



Photo. 2. 木蠟から作られる製品
Manufactures made from wax of *Rhus saccedanea* fruits

ハゼノキの栽培は主に温暖な西日本沿岸部の無霜地帯で行われており、特に九州、四国及び紀伊半島に集中している。各地域には多くの品種が存在しており、「昭和福ハゼ」「葡萄ハゼ」「伊吉ハゼ」「松山ハゼ」等知名度の高い品種のほか、マイナー的なものを含めると全国で100近い品種があるとされている⁴⁾。これらの品種は経験的に含蠟率、樹型、適地等の各特性が把握されており、更新の際には栽培者が経済性や環境条件に適した品種を選択している。



Photo. 3. 育成中のつぎ木苗 (3年生)
Grafting trees of 3 years old

九州育種場はこうした優良品種を素材にして下記の育種目標を掲げてハゼノキの育種研究を進めている。すなわち高含蠟性、安定高収量性、低樹高性、耐病虫害性、耐寒性等であり、更に優良苗木の大量育成法の研究である。前者については、関西以西で栽培されている有名15品種を保存しており、これらの品種間で人工交配を行い、優良品種創出の研究を進めている。また、1982～'84年にかけて約8万粒の種子と100本のつぎ木苗にガンマー線照射を行い、わい性を示す33個体を選抜し、保存して特性調査を進めている⁵⁾。後者については露地でのさし木はまったく発根しないことから、組織培養技術を用いた大量増殖の開発に大きな期待がよせられている。

これまでにつぎ木以外で成功した例は小川による埋幹のわずか1例にすぎない⁶⁾。このため苗木養成はつぎ木で行われるが、つぎ木技術者の不足や活着率が低いこともあって価格が高くなっている(Photo. 3.)。

九州育種場では1986年からハゼノキの組織培養技術を用いた大量増殖法開発の研究を実施している。これまで、種子からの無菌発芽苗を外植体に用いた増殖法に目途がついた段階であり、成木からのクローン増殖法の開発は継続実施中である。ここでは無菌発芽苗を用いた実験結果について取りまとめた。なお、本報は日本林学会論文集¹¹⁾、同九州支部研究論文集¹²⁾、九州育種場年報¹⁰⁾、木本植物の増殖と育種⁹⁾等で報告したものを取りまとめたものである。

2 材料と方法

ハゼノキの組織培養の手順をFig. 1. に示した。1986年10月19日福岡県八女町に栽培されているハゼノキ品種「昭和福ハゼ」の1個体(S-1)から成熟した果実を採取し、直ちに果皮を除去した後、充実した大粒の種子を選別した。種子には蠟分が付着しているため30～40%硫酸に60分間浸漬して取り除いた。種子の表面殺菌はクリーンベンチ内で70%エタノールで2分間、2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液(NaClO : アンチフォルミン)で10分間行い、さらに0.25%塩化第二水銀(HgCl_2)で10分間マグネチックスターラーで攪拌しながら滅菌した。殺菌剤を変える毎に、滅菌水で3～5回洗浄した。滅菌した種子は濾紙上で水分を取り除き発芽用培地へ置床した。発芽用培地は佐藤がスギの無菌発芽苗に用いたものと同様で⁸⁾、サッカロース 20mg/ℓ, ベンレート10ppmを加えた 0.7%寒天培地である。

2. 1 初代培養における寒天とサッカロース濃度の探索

寒天濃度は1ℓ当り 6, 7, 8, 9gの4水準とし、MS基本培地(MURASHIGE & SKOOG '62基本培地; 以下MS培地)³⁾にサッカロース30g/ℓを加え、6ベンジルアミノプリン(6-Benzyl aminopurine: BAP)とインドール酢酸(IAA)を各1mg/ℓ添加し、pHは5.4に調整した。外植体は無菌発芽苗の胚軸を用い、5mm程度に調整して培地に置床した。

サッカロース濃度は1ℓ当り, 0, 10, 30, 50gの4水準とし、MS培地に寒天8g/ℓを加えpHは5.8に調整した。添加ホルモンは寒天濃度の実験と同様である。両実験とも培養20日後にカルス形成率、生育状況について調査した。

2. 2 初代培養におけるシュート形成

培地はTable 1. に示したようにWPM基本培地(Woody Plant Medium '82基本培地; 以下WPM培地)¹⁾にサッカロース30g/ℓ, 寒天6gを加え、IAA0.5mg/ℓ及び1.0mg/ℓの単用区, それに IAA0.5mg/ℓと6-ハイドロメチルプテニルアミノプリン(Zeatin)を各々1.0mg/ℓを組合せた4種類の培地を用いた。

外植体は無菌発芽苗の幼根と幼芽部分を切除した胚軸及び子葉付き胚軸(Phot. 4.)の2種類を用いた。外植体の大きさは15～20mmに調整し、外植体の基部を培地にさしつけるように置床した。カルス形成個体数、シュート形成個体数等について培養45日目に調査した。

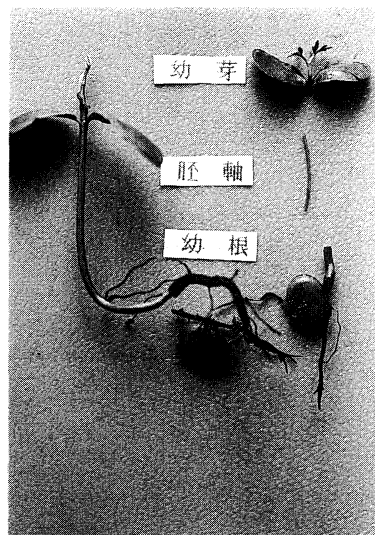


Photo. 4. ハゼノキの無菌発芽苗
(まきつけ25日間)
Germination (cultured 25 after days) of
Rhus saccadanea
Condition: Sucrose 20mg/ℓ, Agar: 7g/ℓ,
BENRATE: 10mg/ℓ, pH: 5.4

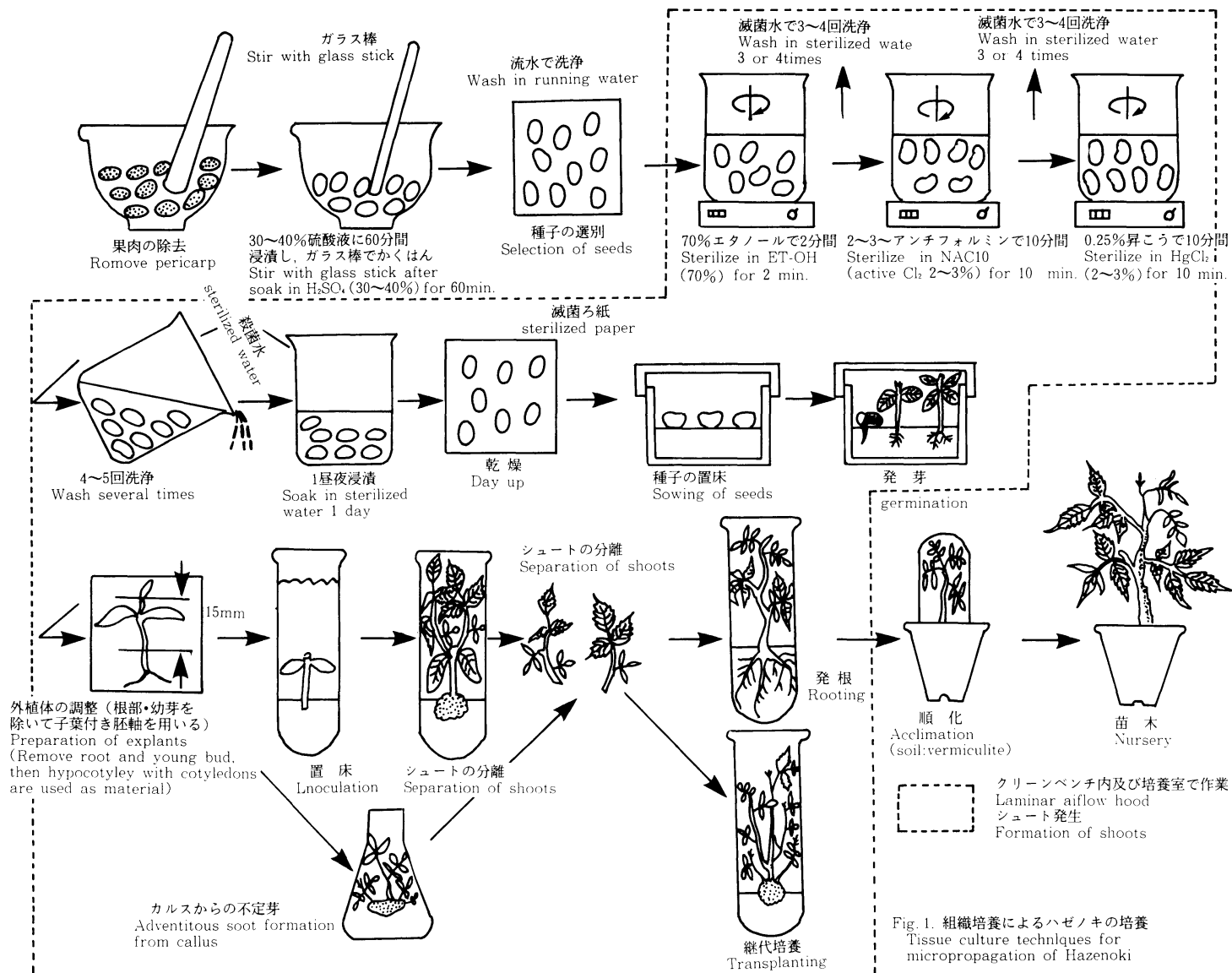


Fig. 1. 組織培養によるハゼノキの培養
Tissue culture techniques for micropropagation of Hazenoki

2. 3 発根培養

無菌発芽苗の幼根部分を切除して直接置床するものと、初代培養で形成したシュートを使用する 2通りの外植体を用いた。両者とも Table 2. に示したように IAA, NAA (ナフタレン酢酸), IBA (インドール酪酸) の 3 種類のホルモンを各々 $1\text{mg}/\ell$ 及び $2\text{mg}/\ell$ を添加した WPM 培地に サッカロース $20\text{g}/\ell$, 寒天 $6\text{g}/\ell$ を加え, pH5.4 に調整した発根培地で培養した。発根個体数, 平均根数について培養後 30 日目に調査した。

前記 2.1, 2.2, 2.3 の各実験とも, 調整した培地は培養ビンに分注し, オートクレーブで滅菌した。また, 外植体の調整はクリーンベンチ内で行なった。

いずれの培養も培養条件は温度 24°C , 照度 $3,000\text{Lux}$, 16 時間日長である。

2. 4 幼植体の順化

発根培養で発根した個体を用いて順化を行った。まず, 試験管から取り出した幼植体は根部に付着している寒天を滅菌水で洗い落とした。各個体とも試験管内で 50 日間以上育成したため, 根は試験管内にラセン状に伸長しており, 移植時に根長を 3 cm 程度に調整した。移植鉢は直径 10 cm の素焼鉢を用い, バームキュライトを 7 分目に詰め, オートクレーブで滅菌した後 1 本ずつ移植して順化を行った。順化は幼植体を移植した後, 十分灌水して直径 6 cm, 容量 100 cc のビーカーを幼植体にかぶせた A 区とかぶせない B 区の 2 通りで行った。

順化は室内の自然光下で行い, まず, 照度 100Lux で 10 日間, 次いで 500Lux で 10 日間行った後ビーカーを取り除き, さらに $2,500\text{Lux}$ で 10 日間順化した。その後, 1 日 2 時間程度直射日光の当たる場所に出して約 1 週間屋外で順化を行った。育苗に当たっては, 鉢の表面が少し乾いた頃に灌水を行った。これらの苗は順化を初めて約 1.5 カ月後には葉の緑色も増し若干曲がっていた主軸が直立したので, 一部を事業用苗畑に床替えした。すなわち, 順化で成功した 24 本の中, 健全な 16 本を $20 \times 20\text{cm}$ 間隔で床替を行い 7 日間は 70% 遮光の寒冷沙で日覆をした。

床替時と, 1 カ月毎に成長調査を行った。また, 床替 10 日後に 1 本当たり 2 g の複合肥料 (N:10 P:16 K:16) を施用した。

2. 5 組織培養の外植体を用いる萌芽枝の育成

供試材料は 人工交配によって得られた 13 年生の 1 個体から採取し, Table 4. に示す 4 処理の方法で各々枝を用いた。

採取した枝は長さ 30 cm に調整し, ガラス室の鹿沼土にさし木したもの (基部の 10 cm 埋め込み) と, 横に伏せて枝主軸の半周を露出させたもの (埋幹) の二つに分けて行った。処理 35 日目に萌芽枝の発生状況を調査し, 一部の萌芽枝は初代培養に用いた。また, 簡易な萌芽発生法として昭和福ハゼの幹を長さ 80 cm に調整して室内で水挿しを行った。

発生した萌芽枝を外植体を用いた培養は BAP を $0.5\text{mg}/\ell$ 添加した WPM 培地に サッカロース 30 g, 寒天 $8\text{g}/\ell$ を加え, pH 5.4 に調整した培地で行った。外植体は Table 4. に示した幹のさし木と埋幹から発生した萌芽枝 40 本と, 原木から採取した 50 本を用い, 腋芽をつけた部分を中心に 4 cm 程度に調整

した。滅菌は10%のハイアミンT液 (Benzethonium Chloride) をつけた毛筆で洗った後、ガーゼで蓋をしたビーカー内で、約1時間水道水を流して水洗いした。次にクリーンベンチ内で70%エタノールに20秒間浸漬、0.25%塩化第二水銀で2分間浸漬滅菌を行った。シュート形成等について培養30日後に調査した。

なお、培養は温度24℃、照度3,000Lux、16時間日長である。

3 結果と考察

種子の発芽は置床後16日目から始まり、25日目には30mm程度に伸長して幼芽も確認された。各試験に用いた外植体はこの時期のものであり、発芽過程において雑菌の発生もなく、ほぼ完全な無菌発芽苗を得ることが出来た。

3. 1 初代培養における寒天とサッカロース濃度の探索

カルス形成率は寒天濃度 6 g/ℓ, 7 g/ℓ 区において各々84.6, 91.7%と高い値であったのに対して、寒天濃度 8 g/ℓ, 9 g/ℓ 区では各々66.7, 69.2%と低い値であった。また、6 g/ℓ 区ではカルス形成後の分裂肥大が最も盛んであった。

サッカロースの濃度別カルス形成率は 0%区で認められなかった他は、10~50 g/ℓ 区で69~75%であった。両試験区とも個体によってカルス形成の遅速や、形成後の変色（黒褐色化）が認められた。これらの現象は外植体の大きさ、置床方法によって異なるが、二次代謝物質の影響かどうかは明らかにできなかった。別に行った試験では、培地に外植体を横に置床すると、基部をさしつけたものに較べてカルス形成は早い反面、変色や枯死する個体もあり、この現象は特に外植体の5 mm以下のもので顕著であった。一方、基部をさしつけたものはその部分のみが肥大しカルス形成後しだいに変色するが枯死には至らず変色した部分に新しいカルスの再生が見られた。このような変色やこれに伴う褐変枯死はヤマハゼ (*R. sylvestris* Sieb. et Zucc.) で少なく、昭和福ハゼで多く認められた。

3. 2 初代培養におけるシュート形成

置床45日目の試験管内におけるカルス及びシュート形成の結果をTable 1.に示した。

カルス形成率は66.7~100%であり、胚軸のみの外植体では若干低い値が認められたが子葉付き胚軸はすべての外植体からカルス形成が認められたが、植物ホルモンとカルス形成との関係は特に認められなかった。

一方、シュート形成は置床 7日目から観察され、20日目には10~20mmに成長した (Photo. 5.)。シュート形成はホルモンの種類や濃度に関係なく子葉付胚軸の外植体全てに認められたが、外植体当たりのシュート数は 3本以下と極めて少なかった。

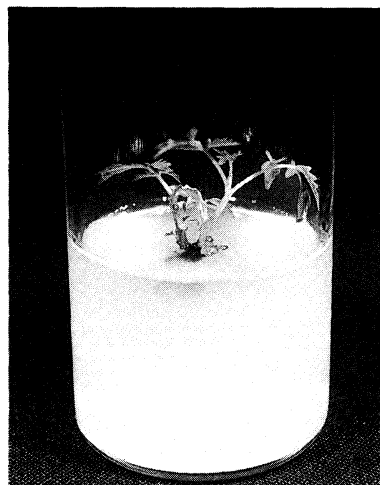


Photo. 5.
初代培養のシュート形成 (置床後45日目)
Results of shoot formation after 45
days of culture

Table 1. シュート形成の結果 (培養45日)
Results of shoot formation after 45 days of culture

植物ホルモン Growth Hormones (mg/ℓ)	培養数 No. of explants	外植体の部位 Type of explants	外植体の生育状況 (%) Growth of explant (%)		
			カルス形成 Callus formation (%)	シュート形成 Shoot formation (%)	雑菌 Contamination (%)
IAA (0.5)	13	胚 軸 Hypocotyl	13 (100)	0 (0)	0
	13	子葉付胚軸 Cotyledon with Hypocotyl	13 (100)	13 (100)	0
IAA (1.0)	12	胚 軸 Hypocotyl	8 (66.7)	0 (0)	0
	12	子葉付胚軸 Cotyledon with Hypocotyl	12 (100)	11 (100)	1 (9.1)
IAA (0.5) + ZEATIN (1.0)	13	胚 軸 Hypocotyl	13 (100)	0 (0)	0
	13	子葉付胚軸 Cotyledon with Hypocotyl	13 (100)	13 (100)	0
IAA (0.5) + ZEATIN (1.0)	12	胚 軸 Hypocotyl	11 (91.7)	0 (0)	0
	12	子葉付胚軸 Cotyledon with Hypocotyl	12 (100)	12 (100)	0

Conditions: WPM medium, Sucrose 30g/ℓ, Agar: 6g/ℓ, pH: 5.4

シュート形成については、2.2の実験においてカルスをWPM培地 (BAP 0.5mg/ℓ 添加) へ移植したものから不定芽の発生が確認されており、カルスからの不定芽誘導も今後検討しなければならない。また、培地組成や、植物ホルモンの種類や濃度などの組合せによって大量のシュート形成の可能性も考えられる。

初代培養では置床後数時間内で外植体から浸出するポリフェノール様物質で培地が黒くなる現象が起きる。これが、初代培養のシュート形成や次の発根培養の発根形成にどう影響するのか不明である。そこで筆者らは、寒天培地 (寒天 8g/ℓ) を用意しておき調整の終わった外植体の基部をさしつけてポリフェノール様物質を浸出させ、2～3時間後に所定の培地に置床する方法で行った。

3. 3 発根培養

発根培養の結果をTable 2.に示した。発根はホルモン及び外植体の種類によって異なり、無菌発芽苗を外植体に用いた培養では、IAA, NAA, IBAの各1mg/ℓ 添加区の発根率は各々69.2%, 53.8%, 58.3%であった。また、2 mg/ℓ 添加区では各々84.6%, 69.2%, 66.6%であり、濃度を上げると発

Table 2. ハゼノキの発根培養の結果 (培養30日)
Results of root formation after 30 days of culture

植物ホルモン Hormones (mg/ℓ)	外植体の種類 Type of Explant			
	芽生え (胚軸) Seedlings (Hypocotyl) *		培養シュート Cultured shoot **	
	培養数 No.of explants	発根個体 No.of root (%)	培養数 No.of explants	発根率 (%) No.of root (%)
IAA (1.0)	13	9 (69.2)	13	10 (76.9)
(2.0)	13	11 (84.6)	13	9 (69.2)
NAA (1.0)	13	7 (53.8)	13	7 (53.9)
(2.0)	13	9 (69.2)	13	8 (61.5)
IBA (1.0)	12	7 (58.3)	12	8 (66.7)
(2.0)	12	8 (66.6)	12	9 (75.0)

Remark: * Seedlings were cultivated under *ex-vitro* condition

** Shoots were cultivated under *in-vitro* condition

Conditions:WPM medium, Sucrose 20g/ℓ, Agar:6g/ℓ, pH:5.4

根率は高まる傾向が見られた。一方、初代培養由来のシュートを外植体とした培養では、IAA, NAA, IBAを各々1 mg/ℓ添加区で各々76.9%, 53.9%, 66.7%であり、2 mg ℓ添加区では各々69.2%, 61.5%, 75.0%の発根率となり、IAA添加区以外の試験区においては濃度増加による発根率の向上が認められた (Photo. 6.)。

3・4 幼植体の順化

順化の結果を Table 3.に示した。鉢にビーカーをかぶせたA区は順化中に6本 (20%) が雑菌に侵されたが枯死には至らなかった (Phot.7. 8.)。ビーカーをかぶせなかったB区では3～5日目にしおれ、14日目にはすべて枯損した。両区の枯損率の違いの原因は、A区では湿度が保たれ乾燥防止の効果があったこと等が考えられる。また、ビーカー除去後に枯損しなかったことについて、徐々に明るい場所へ移動させながら順化を続けたことによるものと考えられる。

Fig. 2.に順化苗の床替え後の成長を示した。床替え後1カ月以降の生育は順調で、9月24日の苗高は平均34cmで一般育苗を上回る成長を示し、10月には53cmとなった。(Phot. 9.)。

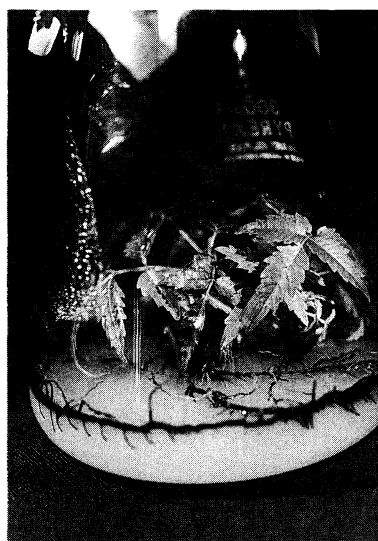


Photo. 6. 発根培養 (置床後30日間)
Root formation in 1st generation
(cultured 30 after days)

Table 3. ハゼノキの順化期間中の生存率
Survival rates during acclimation of *Rhus saccadanea* L.

	順化数 No. of individuals acclimated	20日後 20 days after	50日後 50 days after	苗畑定植 No. of individuals planted at nursery
A区	30	24	24 (80.0%)	16
B区	30	0	0 (0%)	0

A区はピーカをかぶせたもの

A in table means the rooting plants covered with beaker.

B区はそのまま

B in table means the rooting plants non covered

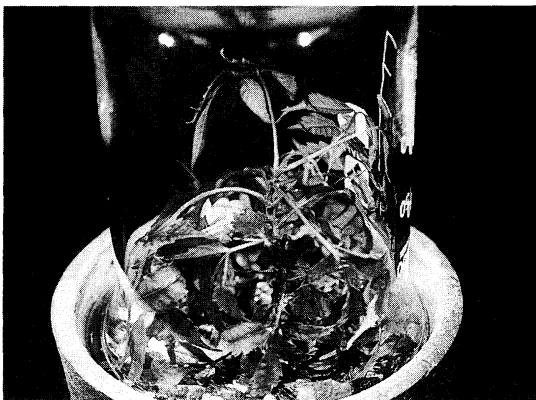


Photo. 7. ピーカ内での順化
Results of Acclimation of *Rhus saccadanea*

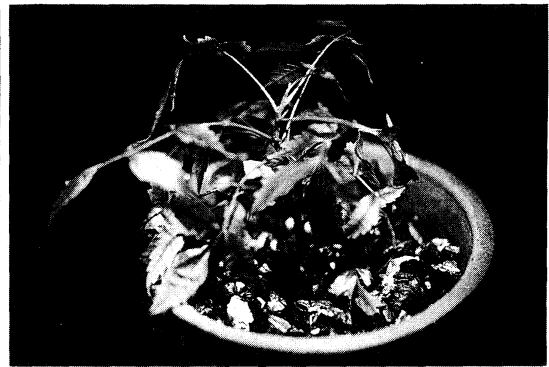


Photo. 8. 順化室での育成
Rearing trees in acclimation room



Photo. 9. 苗畑での育成 (移植後3.5月目)
Rearing trees at nursery

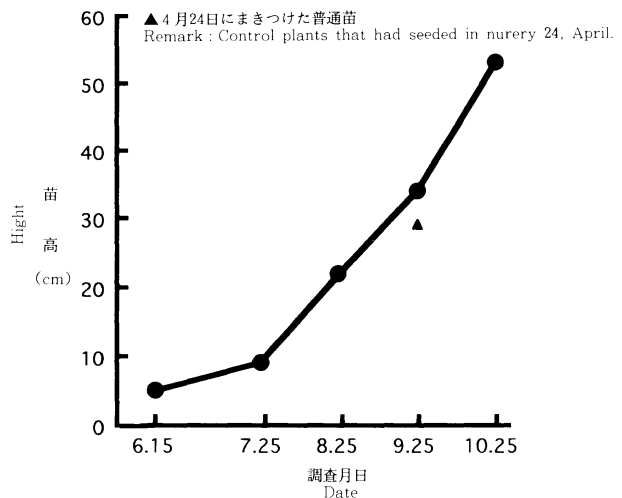


図-2 馴化床替苗の成長

Fig. 2. Hight of acclimated plants after replanting.

3. 5 組織培養の外植体に用いる萌芽枝の育成

育成35日目の萌芽枝発生状況及びそれらを外植体に用いて行った初代培養の結果をTable 4.に示した。

Table 4. ハゼノキの萌芽発生方法別のシュート形成と滅菌効果
Effect of sprout induction method on shooting and sterilization
in *Rhus saccidanea* L. (Hazenoki)

	ガラス温室 Greenhouse		野 外 Field	水さし (1990.4.16) Trunk-cutting in water
	幹のさし木 Trunk-cutting	幹の埋幹 Trunk- burying	原 木 Raw wood (Standing tree)	
処理数 (本) Number of trunks treated	14	16		12
シュート数 (本) Number of shoots	36	56		21
外植体数 Number of explants	40		50	
シュート形成 Number of explants elongating shoots	5 (12.5%)		19 (38.0%)	
雑菌汚染 Number of explants with contamination	37 (92.5%)		37 (74.0%)	
健全シュート Number of explants without contamination	3 (7.5%)		13 (26.0%)	

Conditions:WPM medium, Hormone:BAP0.5mg/ℓ, Sucrose 30g/ℓ, Agar:8g/ℓ, pH:5.4

培養30日目の調査 Asst.data 30 days

ガラス室内で行った幹のさし木法による萌芽枝発生は36本（個体平均2.6本）、埋幹法では56本（3.5本）であった。これらの萌芽枝は育成を始めて13カ月間も生存した。一方、室内における幹の水さしでは21本（個体平均 1.7本）と少なく生育も悪かった。また、40日後には萌芽枝の先端部に萎凋症状が現れ落葉し、その後枯損した。

初代培養の結果はTable 4. に示したようにシュート数、健全数とも原木由来のものが良い結果となった。また、雑菌汚染率はガラス室内由来の萌芽枝を外植体に用いた場合93%、室内由来のそれは74%であった。これはガラス室内では高温多湿であり、雑菌が繁殖しやすい条件下にあったものと考えられる。

以上ハゼノキの組織培養について記述したが本実験は、初代培養において発生するシュート本数が少なく、短期大量増殖法の確立までには至っていない現状である。しかし、前記のようにカルスからの不定芽の発生が確認されており、今後培地組成や植物ホルモンの種類や濃度の組合せによって多数の不定芽発生の可能性も期待できる。また、成木からの組織培養技術の開発についても継続して行う予定である。

引用文献

- 1) LLOYD, G. and Mc COWN: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture, Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc, 30, 421~427, 1981
- 2) 木蠟: 日本木蠟商工業共同組合
- 3) MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plantarum, 15, 473~496, 1962
- 4) 中島康博: 特用樹種の知識 ハゼノキ, 日本林業技術協会, 78~84, 1983
- 5) 西村慶二・前田武彦・戸田忠雄・日本林学会九州支部論文集36, 97~98, 1983
- 6) 小川保喜: 日本林学会九州支部論文集10, 147~148, 1954
- 7) 林業統計要覧(累年版), 林野共済会(林野庁監修), 1964
- 8) 佐藤 享: 日林誌68, 389~392, 1986
- 9) 戸田忠雄: 最新のバイオテクノロジー全書6, 農業図書 166~169, 1989
- 10) 戸田忠雄・西村慶二: 九育年報18, 84~88, 1990
- 11) 山手廣太・戸田忠雄: 98回日林論, 459~460, 1987
- 12) 山手廣太・戸田忠雄: 日林九支研論41, 67~68, 1988

**Clonal rearing of tree species which are
difficult to cultivate grow by cutting
or grafting propagation
— *Rhus saccidanea* (Hazenoki) —**

**Tadao TODA⁽¹⁾, Keiji NISHIMURA⁽²⁾
and Hirota YAMATE⁽³⁾**

Summary

Two kinds of aseptic explants, hypocotyl and hypocotyl with cotyledon, were used for this experiment. The aseptic hypocotyl which were fertilized for 60 seconds with 30-40 % of H_2SO_4 , 70% of Ethanol, 2% of NaClO and 0.25% of $HgCl_2$, were cultured on agar medium. However the average number of shoot formation per explant was fewer as 3 to 4 shoots in the first generation cultivate, the shoot formation rate used hypocotyle with cotyledon was 100% on both WPM media with 0.5mg/ℓ or 1.0mg/ℓ of IAA and with 1.0mg/ℓ with IAA + ZEATIN.

The rooting rate used the shoot of 1st generation cultures as explants was 76.9% on WPM medium with 1.0mg/ℓ of IAA and the rooting rate increased with the concentration of NAA or IBA.

The acclimation rate covered it with beaker after replanting was 80%. Growth of the acclimated individuals planted on the nursery was 34cm after 30days and 53cm after 60 days. In order to prepare the materials fortissue culture, methods for promoting the new shoots from adult trees were examined in the greenhouse. As a result, the average number of shoots was 2.6 by the stem cutting method and 3.5 by the buried stem method. The contamination rate in 1st generation cultures used as explants was as high as 93%.

(1) National Forest Tree Breeding Center, Kyushu Regional Breeding Office.

(2) National Forest Tree Breeding Center.

(3) Former researcher of the National Forest Tree Breeding Center, Kyushu Regional Breeding Office.