

クロマツの組織培養

近藤禎二・岡村政則

Teiji KONDO and Masanori OKAMURA

Tissue Culture of Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii*)

Summary

In a mature embryo culture of *Pinus thunbergii*, 5 μ M BAP was added to the primary culture medium. ARNOLD and ERIKSSON (AE) medium and GRESSHOFF and DOY medium were suitable for culture. Active charcoal was effective for the elongation of the shoot at 0.5% (W/V).

There was a difference among 20 open-pollinated families in the number of adventitious buds and the weight of the cultures. The culture conditions for the germinated seedlings were different from that for the embryo culture. In the primary culture medium, 10 μ M BAP and 1 μ M NAA were added to the AE medium. The concentration of the medium was adequate at half or one-fourth of the original concentration of the AE Medium.

要旨：クロマツの胚培養及び芽生えの培養における培養条件を検討した。胚培養における、不定芽の分化については、6-ベンジルアミノプリン（BAP）を5 μ M程度の濃度で培地に添加するのが適当であった。培地の種類については、用いた5種類の培地のうちAE培地及びGD培地が適当であった。分化した不定芽からのシュートの伸長及び芽の数の増加には、0.5%（W/V）の活性炭の添加が有効であった。不定芽分化における家系間差異について、関東育種基本区のクロマツ精英樹の自然受粉種子20家系を用いて調べたところ、分化した芽の数及び培養物の生重に家系間差異が見られた。芽生えを用いた培養における、不定芽の分化については、BAPを10 μ M、 α -ナフタレン酢酸を1 μ M培地に添加するのが適当であった。培地の濃度については、AE基本培地の1/2倍または1/4倍が適当であった。

1 はじめに

クロマツとタイワンアカマツとの種間雑種であるワカマツの種子は、花粉の入手、交配作業、種子の生産性上の問題から、貴重なものになっている。ワカマツの種子を用いた培養法について検討しているが^{10, 15)}、試験用に多量に用いることが難しい。クロマツは、ワカマツの雌親であることから、培養条件においても、ワカマツと共通点があると考えられ、クロマツの種子は、多量に入手できる。また、クロマツにおいてもマツノザイセンチュウ抵抗性個体が選抜されており、抵抗性個体からの種子生産も近々可

能になると予想され、少量の種子からの苗木生産に組織培養の利用が期待される。クロマツの培養については、これまでに胚培養を行った例はあるが、報告数は多くない^{5,7,19)}。そこで、クロマツを用いて、培養系の確立のための試験を行った。培養は、成熟胚を用いた胚培養と、芽生えの一部を用いた培養について検討した。

2 胚 培 養

2. 1 不定芽の分化¹⁴⁾

2. 1. 1 材料と方法

クロマツ精英樹鹿島1号の自然受粉種子を用いた。種子の滅菌は、7%過酸化水素水中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら15分間滅菌し、その後1晩滅菌水に浸漬した後、再度7%過酸化水素水で15分間滅菌し、クリーンベンチの中に持ち込み、滅菌水で2~3回すすいだ。胚の摘出には、実体顕微鏡を用いた。培養室の条件は、25℃、3,000lux、16時間日長であった。培地には、GD改変培地（GD培地）²⁰⁾及びLP培地¹⁾を用いた。初代培養では、これら両培地に、BAPを、0、1、5、25 μ M添加し、約1カ月培養した。培養には9cmシャーレを用い、1シャーレ当たり5胚植え込み、1処理区5シャーレ、25胚を植え込んだ。初代培養後、約1カ月おきに、BAPを添加しない初代培養と同じ培地に2回植え替えたあと、胚の生存率及び長さが2mm以上の芽の数を調査した。

2. 1. 2 結果と考察

初代培養では、両培地とも枯死する胚がほとんど見られなかったが、継代培養を2回繰り返すうちに枯死する胚や雑菌に汚染された胚が生じたので、雑菌に汚染された胚を除いた生存率を表1に示した。

表1 継代培養後の胚の生存率

培 地	BAP濃度 (μ M)	供試胚数	初代, 継代培養後の生存胚数		生存率 (%)	
			初 代	継代1回目 継代2回目		
GD	0	19	19	19	19	100
	1	20	20	19	18	90
	5	25	25	25	25	100
	25	25	25	24	22	88
LP	0	21	21	20	19	90
	1	22	21	20	18	82
	5	18	18	16	13	72
	25	19	19	15	6	32

いずれのBAP濃度においても、GD培地の方が、LP培地より生存率が高かった。BAPの濃度が高くなるに従って生存率が低くなる傾向が見られたが、BAP25 μ Mで、LP培地の生存率が32%だったのに対し、GD培地では88%だった。また、発芽した芽の色も、GD培地では深緑色だったのに対し、LP培地ではやや淡緑色であり、GD培地の方がクロマツの培養に適していると考えられた。なお、

L P 培地を用いたワカマツの胚の初代培養では¹⁵⁾、供試胚数が少なかったものの、50 μ M まで生存率が低下せず、今回のクロマツの結果と似た傾向を示した。

継代培養後の芽の分化数は、初代培養の B A P 濃度、培地の種類によって大きく異なった（表 2）。初代培養において B A P 無添加区では、両培地とも 1 つの胚から 1 つの芽しか生ぜず、1 μ M でも、ほとんどの胚から 5 個以下の芽しか生じなかった。5 μ M においては、G D 培地では、平均 14.0 個、最高 45 個、L P 培地では、平均 7.5 個、最高 18 個の芽を分化し、両培地ともこの濃度で最もよく芽を分化し

表 2. 継代培養後の芽の分化数

培 地	BAP濃度 (μ M)	供試胚数	胚 当 た り の 芽 の 数					胚当たり 平均芽数
			1 - 5	5 - 10	11 - 15	16 - 20	21 -	
G D	0	19	19	0	0	0	0	1.0
	1	18	14	2	2	0	0	3.8
	5	25	1	10	6	4	4	14.0
	25	22	1	12	7	1	1	10.3
L P	0	19	19	0	0	0	0	1.0
	1	18	16	2	0	0	0	2.5
	5	13	3	6	3	1	0	7.5
	25	6	4	1	1	0	0	6.0

た。25 μ M においては、G D 培地で平均 10.3 個、L P 培地で平均 6.0 個と、5 μ M に比べて減少した。以上のことから、クロマツの胚は、G D 培地に、B A P を 5 μ M 添加して培養するのが適当であると考えられた。

2. 2 培地の種類¹¹⁾

2. 2. 1 材料と方法

不定芽の分化の条件を検討する際に用いた G D 培地及び L P 培地に加え、A E 培地²⁾、D C R 培地⁶⁾、S H 改変培地¹⁸⁾を用いて、不定芽の分化における培地間の比較を行った。材料には、クロマツ精英樹鹿島 1 号の自然受粉種子を用い、各培地 30 胚ずつ用いた。種子の滅菌法、胚の摘出法、培養室の条件は、上記と同様である。初代培養では、培地に B A P を 5 μ M の濃度で添加し、約 1 カ月間培養し、継代培養では、B A P を抜いた初代培養と同じ培地に、約 1 カ月おきに 2 回植え替え、芽の数、培養物の生重を調査した。培地に添加したショ糖及び寒天の濃度は、それぞれ 30 g / ℓ 、8 g / ℓ に統一した。

2. 2. 2 結果と考察

継代培養後、A E、D C R、L P 培地で枯死した胚が見られた（表 3.）。A E 培地では、芽の数が 3 ~ 38 個、平均 17.7 個と、用いた培地の中で最も多かった。この培地では、培養物の成長が早く、特に 3 胚については、大きくなったので 2 回目の継代培養の際に切り分けた。G D 培地では、芽の数が 1 ~ 19 個、平均 8.4 個で、この培地でも成長の良いものがあつた。D C R 培地では、4 ~ 12 個、平均 6.6 個、L P 培地では、1 ~ 16 個、平均 7.0 個、S H 培地では、2 ~ 13 個、平均 6.5 個であつた。各培地での芽の数の平均値

表3. 継代培養後における各培地での芽の数と培養物の生重

培 地	供 試 胚 数	生存胚数	芽 の 数 (個)		生 重 (mg)	
			平 均 値	標準偏差	平 均 値	標準偏差
AE	28	24	17.7	9.6	266.8	203.5
DCR	15	14	6.6	2.3	72.6	17.9
GD	25	25	8.4	4.1	89.3	49.3
LP	27	25	7.0	3.8	88.1	23.5
SH	29	29	6.5	3.4	69.8	20.1

を t 検定法で検定すると、A E 培地では、1 % 水準で芽の数が有意に多く、G D 培地でも残る 3 培地に比べて多い傾向にあった (表 4.)。

表4. 芽の数における培地の影響 (t検定法による)

培 地	AE	DCR	GD	LP	SH
AE	—	4.24**	4.46**	5.17**	5.87**
DCR		—	1.50	0.39	0.09
GD			—	1.21	1.83
LP				—	0.53
SH					—

表中の数値はt値

** : 有意水準 1 %

継代培養後の培養物の生重においては (表 3), A E 培地で94~978mg, 平均266.8mgと、用いた培地の中で最も重く、切り分けた培養物の成長が特に良かった。G D 培地では、41~281mg, 平均89.3mg, L P 培地では、54~141mg, 平均88.1mgと、同程度の値を示した。D C R 培地では、42~108mg, 平均72.6mg, S H 培地では、36~110mg, 平均69.8mgと、ともに低い値を示した。各培地での生重の平均値

表5. 生重における培地の影響 (t検定法による)

培 地	AE	DCR	GD	LP	SH
AE	—	3.54**	4.24**	4.36**	5.20**
DCR			1.23	2.13*	0.45
GD			—	0.39	1.95
LP				—	3.09**
SH					—

表中の数値はt値

** : 有意水準 1 %

* : 有意水準5%

を t 検定法で検定すると (表 5), A E 培地は、他の 4 培地に比べて 1 % 水準で生重が大きく、L P 培地及び G D 培地もやや大きい傾向があった。

芽の色は、A E 培地では正常な緑色あるいは淡緑色であった。G D 培地ではやや深緑色をしており、これら両培地の成分はほぼ適当であると考えられた。L P 培地では、生重は中程度だったものの、緑色が薄く、何らかの成分が適量でないと考えられた。なお、G D および L P 培地での結果は、不定芽の分化の条件の検討の際の結果と同じ傾向を示した。

以上のことから、継代培養後の芽の数、生重、芽の色を総合的に考慮すると、今回試験した中では A E 培地がクロマツの胚培養に適当であると考えられたが、芽の色、生存率に若干の難点があることから、改良の余地もある。クロマツの胚培養において、A E 培地と G D 培地を用いて、アミノ酸類の効果を調べた報告では²¹⁾、G D 培地の無機多量要素に、MS 培地の無機微量元素、グリシンを除いた有機物及び A E 培地のアミノ酸類を原報告の 1～3 倍の濃度で用いるのが適当としている。最適な培地についても今後検討する必要がある。

2. 3 活性炭の添加によるシュートの伸長¹²⁾

2. 3. 1 材料と方法

G D 培地に B A P を $5 \mu\text{M}$ 添加した培地で胚を約 1 カ月間初代培養した。その後、B A P を添加しない初代培養の培地およびその培地に活性炭を 0.5% の濃度で添加した培地で、約 1 カ月間隔で 2 回継代培養した。なお、ショ糖は、両培地とも $30\text{g}/\ell$ 、寒天は、初代培養及び活性炭を添加しない培地では $7\text{g}/\ell$ 、活性炭を添加した培地では $9\text{g}/\ell$ とした。材料には、クロマツ精英樹鹿島 1 号の自然受粉種子を用い、初代培養を 1 カ月行なった後、2 種類の継代培養の培地に 20 胚ずつ用いた。継代培養後、切り分けたシュート塊の数、シュートの最大長（最大シュート長）、芽の数、生重を測定した。

2. 3. 2 結果と考察

初代培養では、2. 1 不定芽の分化と同じような反応を示した。活性炭添加培地及び無添加培地に、それぞれ 20 胚ずつ植え込んだが、前者で 3 胚、後方で 2 胚が枯死した。継代培養後の培養物を写真 1 に示し、シュート及び芽の調査結果を表 6 に示した。切り分けたシュート塊の数では、両培地間に差がな

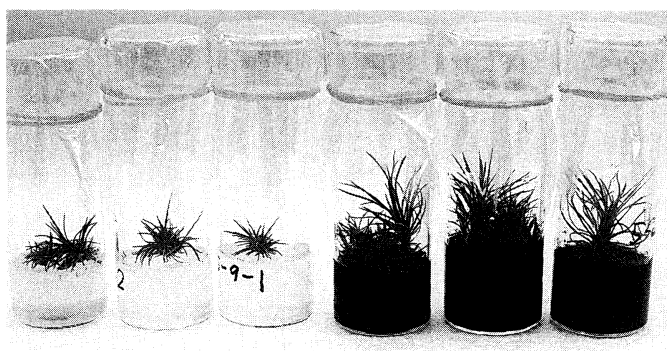


写真1. シュートの伸長における活性炭の効果

表 6. 継代培養の培地への活性炭添加の効果

種子 No.	活性炭, 添加培養				活性炭, 無添加培地			
	シュート 塊数	最大 シュート長	芽 数	生 重	シュート 塊数	最大 シュート長	芽 数	生 重
	(個)	(mm)	(個)	(mg)	(個)	(mm)	(個)	(mg)
1	2	8	10	261	2	3	7	103
2	2	8	17	582	1	3	5	44
3	2	11	15	824	2	4	16	231
4	3	11	32	740	2	3	8	98
5	3	8	53	1,636	2	3	11	157
6	2	20	18	990	3	4	43	671
7	1	9	25	1,083	1	3	12	116
8	1	12	26	581	1	2	15	154
9	1	3	21	330	1	2	16	210
10	1	7	27	622	2	3	10	182
11	1	8	27	481	1	3	14	127
12	2	14	22	1,119	2	3	16	132
13	1	10	24	687	2	3	25	228
14	2	6	21	399	2	3	27	278
15	3	5	28	728	2	4	20	233
16	2	8	23	932	2	3	9	186
17	2	8	39	1,649	2	4	23	300
18	—	—	—	—	2	3	24	306
平均値	1.8	9.1	25.2	802.6	1.8	3.1	16.7	208.7
t 検定	—	**	*	**	—	**	*	**

** : 有意水準 1 %

* : 有意水準 5 %

かった。最大シュート長では、活性炭添加培地で3～20mm、平均9.1mm、無添加培地で2～4mm、平均3.1mmで、両培地間に1%水準で有意な差があった。芽の数では、活性炭添加培地で10～53個、平均25.2個、無添加培地で5～43個、平均16.7個で、両培地間に5%水準で有意な差があった。芽の数においては、活性炭添加培地の方が多い結果になったが、活性炭添加培地では、芽の原基から肉眼で確認できる大きさになるまでの期間が短いために、継代培養後の芽の数が多くなった可能性もあると考えられた。生重では、活性炭添加培地で261～1,649mg、平均802.6mg、無添加培地で44～671mg、平均208.7mgで、1%水準で有意な差があった。

以上のことから、継代培養後の培地への活性炭の添加が、シュートの伸長、芽の数の増加、生重の増加に効果があり、活性炭を添加することで発根までの継代培養の期間の短縮が可能であると考えられた。継代培養の培地に活性炭を添加がシュートの伸長に効果があることは、多くの植物で報告されており、その原因として、植物ホルモン、フェノール系物質やオートクレーブ後に生成される毒性のある物質などの、シュートの伸長を阻害する物質を活性炭が吸着することが考えられている⁴⁾。テーダマツの胚培養において、継代培養の培地への活性炭の添加が、不定芽の伸長に効果があることが報告されている¹⁷⁾。また、活性炭を添加した培地では、寒天濃度を上げたにもかかわらず、オートクレーブ後の培地の固まり方が弱かった。ドイツトウヒで、寒天濃度が低いほどシュートの伸長が良かったという報告があり³⁾、培地の固さも影響している可能性がある。

2. 4 不定芽分化における家系間差異¹⁶⁾

2. 4. 1 材料と方法

関東育種基本区のクロマツ20精英樹の自然受粉種子を用い、各処理20胚ずつ用いて初代培養を行った。初代培養には、半分の濃度にしたA E培地にBAPを $5\mu\text{M}$ または $25\mu\text{M}$ 添加した培地を用いた。継代培養には、BAPを添加しない初代培養と同じ培地を用い、約1カ月間隔で2回継代培養した。培地のショ糖濃度は、 $30\text{g}/\ell$ 、寒天濃度は、 $8\text{g}/\ell$ とした。

2. 4. 2 結果と考察

初代培養後の培養物は、BAP $25\mu\text{M}$ の方が芽の分化数が多かったが、芽の数が小さく計数するまでには至らなかった。継代培養第2代後の生存率は、初代培養のBAP $5\mu\text{M}$ では供試した全家系平均で36%まで低下し、 $25\mu\text{M}$ では22%まで低下した(図1.)。BAPの濃度別では、 $25\mu\text{M}$ の方が生存率が低く、両濃度間の相関係数は0.46で、5%水準で有意だった。家系別に見ると(図2.)、片浦1号のように両濃度とも生存率が高いものもあれば、可児5号のように両濃度とも低いものもあった。また、 $25\mu\text{M}$ では、4家系の生存率が0だった。

芽の数においては、初代培養BAP $5\mu\text{M}$ では供試した全家系平均で5.2個、 $25\mu\text{M}$ では平均6.3個であった。家系別に見ると(図3.)、南設楽1号が $5\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ とも最も良かった。図からも読みとれるように、 $5\mu\text{M}$ で芽の数が多かった家系は、 $25\mu\text{M}$ でも多い傾向にあり、 $25\mu\text{M}$ において供試した胚がすべて枯死した4家系を除いた16家系における、 $5\mu\text{M}$ と $25\mu\text{M}$ の芽の数の相関係数は0.56で、5%水準で有意だった。分散分析の結果、 $5\mu\text{M}$ では家系間に5%水準で有意な差があり、 $25\mu\text{M}$ では有意な差が見られなかった。

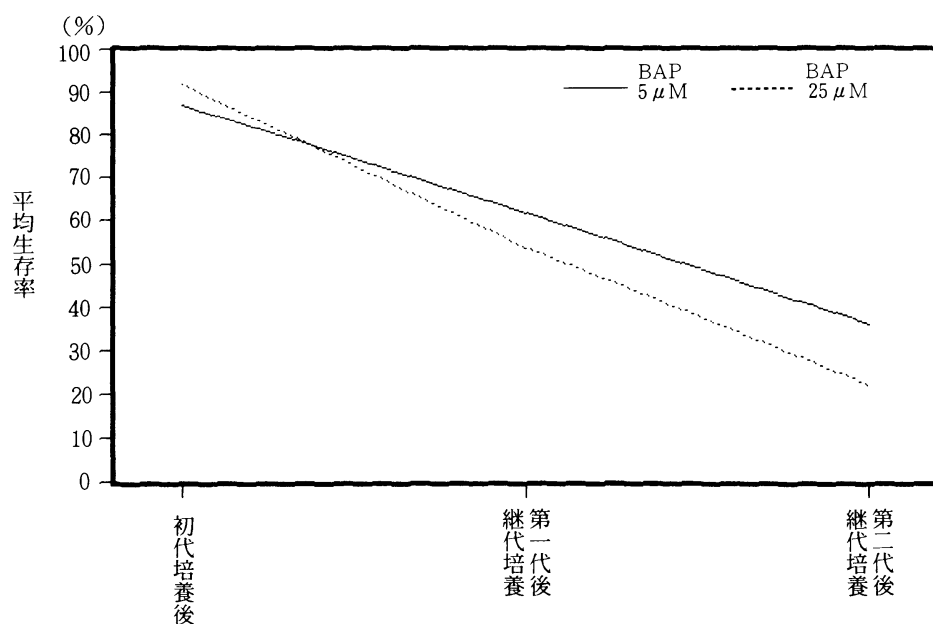


図1. 培養過程における生存率の推移

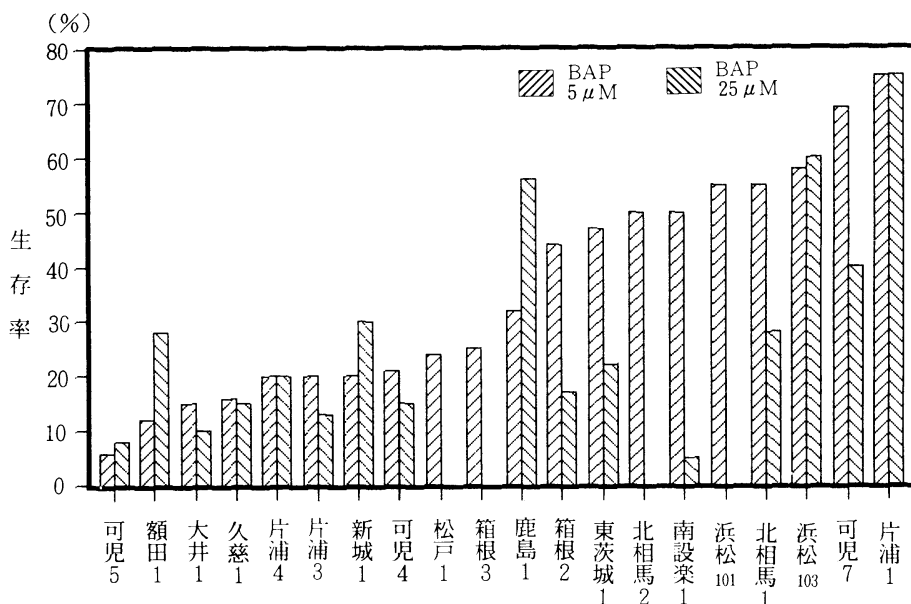


図2. 繼代培養後の家系別の生存率

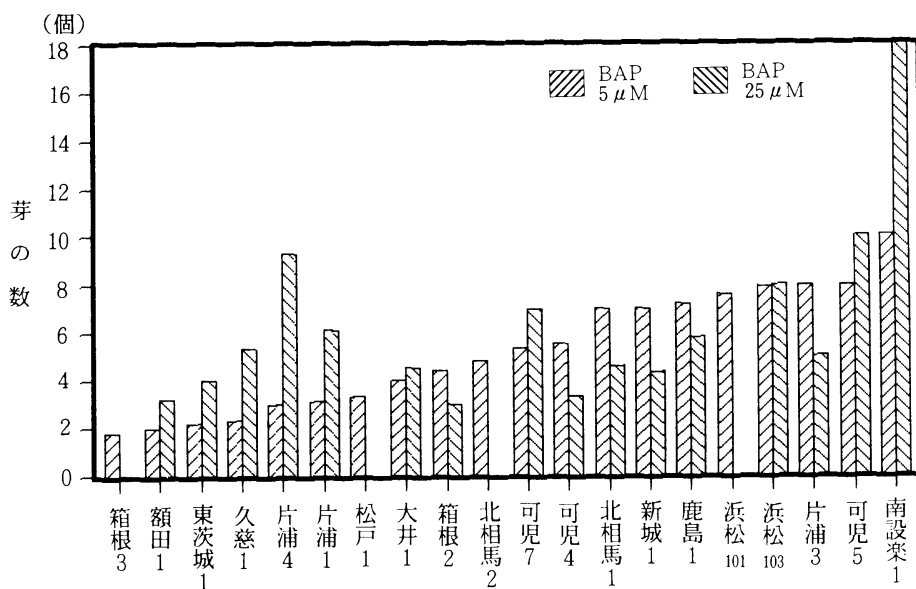


図3. 繼代培養後の家系別の芽の数

培養物の生重においては、初代培養BAP $5\mu\text{M}$ では供試した全家系平均で190.2mg, $25\mu\text{M}$ で平均294.9mgであった。家系別に見ると(図4), 浜松103号は、両濃度とも生重が大きかったが、片浦4号、片浦1号、可児5号のように、 $5\mu\text{M}$ での生重は大きくないものの $25\mu\text{M}$ では大きい値を示すものがあった。

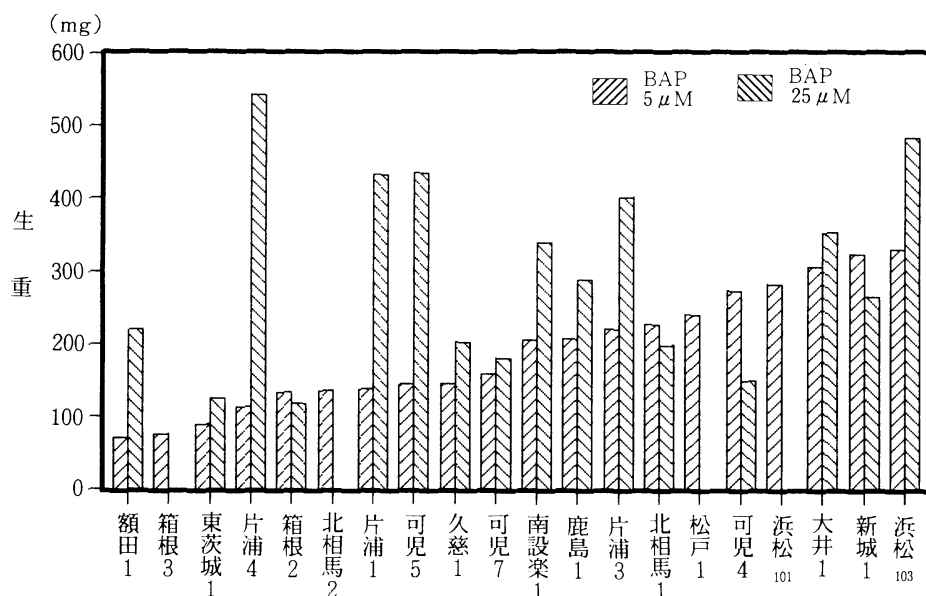


図4. 継代培養後の家系別の培養物生重

た。枯死したものを除く16家系における、両濃度間の相関係数は0.17で有意ではなかった。分散分析の結果、 $5\mu\text{M}$ では家系間に5%水準で有意な差があり、 $25\mu\text{M}$ では1%水準で有意な差があった。

以上のように、今回用いたクロマツ精英樹家系では、胚培養において芽の数及び培養物の生重に家系間差が見られた。また、生存率においても家系間で大きな違いがあった。これらのことは、クロマツの胚培養を実用化する際に、培養に適した家系を選ぶことが必要なことを示唆する。クロマツの胚培養には、今回の供試家系の中にも入っている鹿島1号の自然受粉種子を用いてきたが、継代培養後に枯死する胚が多かった。用いた種子の活力の問題もあるが、AE培地の何らかの成分が適当でないために起こる可能性が高い。今後培地の成分について検討する必要がある。分化した芽の数についても、これまでの結果に比べて少なかった。このことは、種子の保存状態が悪くなかったために種子の活力が落ちたか、あるいはAE培地を半分の濃度で用いたことが良くなかったかのどちらかの可能性がある。ただ、AE培地を半分の濃度で用いることについては、予備実験において基本培地と半分の濃度の培地とが差がなかったことから今回用いている。

今回調査した形質のうち、生存率、芽の数は増殖効率に大きく影響し、生重は培養物の成長に関係している。そこで、今回供試した家系について、これら形質ごと、BAP濃度ごとに偏差値をとり、5段階の指数で評価した(表7.)。この指数を基に、生存率が低くなく、芽の数及び生重がよいものを選び、表中に○印を付け、逆に成績の良くなかったものに×印を付けた。同じ条件で培養するのには、この結果を参

考にすればよい。また、培養がうまくいかなかった家系については、培地の改良が必要なものもあると考えられる。

3 芽生えを用いた培養

胚培養では、胚を摘出するのに手間がかかることから、より簡易に培養する方法についても検討する必要がある。そこで、ストローブマツで成功している、芽生えを用いた培養法⁸⁾をクロマツに適用した。

3. 1 芽生えからの不定芽の分化¹³⁾

3. 1. 1 材料と方法

クロマツ精英樹鹿島1号の自然受粉種子を、パーミキュライトを入れたプラントベッドに播種し、発芽後、子葉が展開した直後の芽生えを材料に用いた。子葉を付けた約1cmの胚軸を芽生えから切り

取り、7%過酸化水素水中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら10分間滅菌した後、滅菌水で3回すすいで培地に植え込んだ。培地は、A E培地にショ糖を30g/ℓ、寒天を8g/ℓ加え、BAPと α -ナフタレン酢酸(NAA)を、表8に示す6つの組み合わせの濃度で添加し、オートクレーブ前にpH5.7に調整した。容器は、直径2cm、高さ10cmの棒びんを用い、各処理20個の外植体を植え込んだ。初代培養を表8に示す6つの条件で約1カ月間行い、継代培養は、ホルモンフリーの同じ培地で行い、約1.5カ月培養した後、芽の数を調査した。

3. 1. 2 結果と考察

表8に培養過程での培養物の個数を示した。初代培養では、外植体の7.5%に雑菌が発生し、初代培養後に、各処理あたり3~4個が枯死し、継代培養後にさらに2~9個が枯死した。BAP 2 μ M、NAA 1 μ Mの区で生存数が12個と最も多かったが、その他の区では6~8個と大きな差がなかった。各処理区における、生存した培養物当たりの芽の数の平均値を図5に示した。不定芽は、幼芽の部分から

分化しており、子葉からは分化しなかった(写真2)。NAAの添加、無添加に拘わらず、BAPの濃度が高くなるに従って芽の数が多くなったが、BAP 25 μ Mでの芽の大きさは、10 μ Mでのものに比べてや

表7. 生存率、芽の数、生重における家系別偏差値

家 系	BAP 5 μ M					BAP 25 μ M				
	生存率	芽の数	生 重	判定*		生存率	芽の数	生重	判定*	
久 慈 1	2	2	2	×		2	3	2		
東茨城 1	4	2	2	×		3	2	2	×	
鹿 島 1	3	4	3			5	3	3		
北相馬 1	4	4	3			3	3	2		
北相馬 2	4	3	2			2				
松 戸 1	2	2	4			2				
箱 根 2	3	3	2			3	2	2	×	
箱 根 3	2	2	2	×		2				
片 浦 1	5	2	2	×		5	3	4		
片 浦 3	2	4	3			3	3	4		
片 浦 4	2	2	2	×		3	4	5	○	
大 井 1	2	3	4			2	3	3		
浜 松 101	4	4	4	○		2				
浜 松 103	4	4	5	○		5	3	4		
可 児 4	2	3	4			3	2	2	×	
可 児 5	2	4	2			2	4	4	○	
可 児 7	5	3	3			4	3	2		
額 田 1	2	2	2	×		3	2	2	×	
南設楽 1	4	5	3	○		2	5	3		
新 城 1	2	4	5	○		3	2	3		

* ○印：成績が良かった家系

×印：成績が悪かった家系

表8. 初代培養でのBAPとNAAの濃度及び継代培養での培養物の継代個数

処理区	BAP (μ M)	NAA (μ M)	供試数 (個)	汚染数 (個)	第1回 継代個数	第2回 継代個数
1	2	0	20	3	13	6
2	10	0	20	1	15	7
3	25	0	20	0	14	6
4	2	1	20	2	14	12
5	10	1	20	1	14	8
6	25	1	20	2	15	6

や小さかった。NAAについては、NAA添加区の方が無添加区に比べて約2倍の数の芽が分化し、芽の大きさも、NAA添加区の方が大きかった。

以上のことから、クロマツの芽生えを用いた培養では、BAPに加えてNAAを用いることが必要なことが明らかになった。クロマツの胚培養では、BAPのみで不定芽を誘導でき¹⁴⁾、NAAを加える場合も薄い濃度で添加されているが⁷⁾、芽生えではNAAが必要であることは、胚と芽生えの成育ステージの違いによるものと考えられた。KAULは⁸⁾、ストロブマツの芽生えを用いて、BAP 2 mg/ℓ (約10 μM)、NAA 0.2 mg/ℓ (約1 μM) を添加した培地で初代培養を行い、次にホルモンフリーの培地に移植して植物体を育成した。その際、初代培養の期間を5～6週間にするとカルス形成が盛んになり、不定芽の数が減少するとしているが、今回の試験ではカルス化は見られなかった。

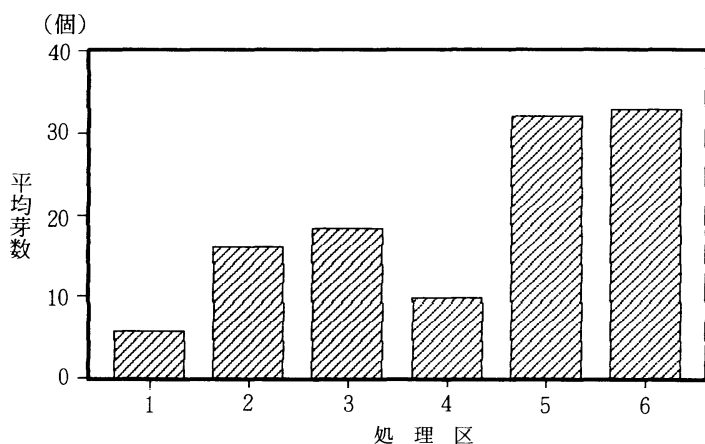


図5. BAPとNAAの芽の分化への効果
(処理区の番号は表8と対応している)

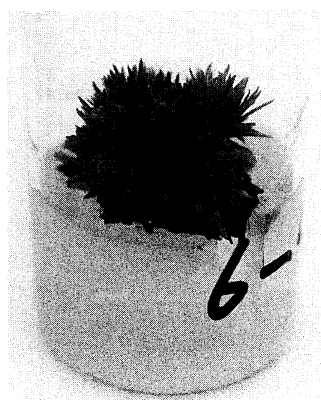


写真2. 芽生えを用いた培養における不定芽の分化 BAP25 μM, NAA1 μM で初代培養した

3. 2 不定芽の分化における培地成分の濃度の影響⁹⁾

3. 2. 1 材料と方法

材料及び外植体の調整法は、3. 1 の項と同じである。培地には、AE培地の1倍区、1/2倍区、1/4倍区、1/8倍区の4段階の濃度とし、ショ糖30g/ℓ、寒天8g/ℓを加えた。初代培養では、BAP10 μM、NAA1 μMを添加した培地で約1カ月間培養した。継代培養では、培地ごとに、ホルモンフリーにした初代培養の培地に植え継ぎ、約1.5カ月後に、次の継代培養を行った直後に芽の数を調査した。

表9. 培地の濃度別の芽ばえの培養経過

培地の濃度	初代培養 個数	第1回 継代培養 個数	第2回 継代培養 個数	雑菌汚染数	枯死数	枯死率* (%)
1倍区	20	15	9	6	5	33
1/2倍区	20	18	16	1	3	16
1/4倍区	20	18	17	1	2	11
1/8倍区	20	18	18	1	1	5

* : 枯死率 = 枯死数 / (初代培養個数 - 雑菌汚染個数) × 100

3. 2. 2 結果と考察

表9に、継代培養後の培養物の個数を示した。初代培養で雑菌に汚染されたものがいくらかあったが、枯死したものは、1倍区で最も多く枯死率は33%だった。枯死率は、培地の濃度が低くなるに従って減少し、1/8区では5%だった。図6に、生存した培養物当たりの芽の数を示した。平均芽数は、1倍

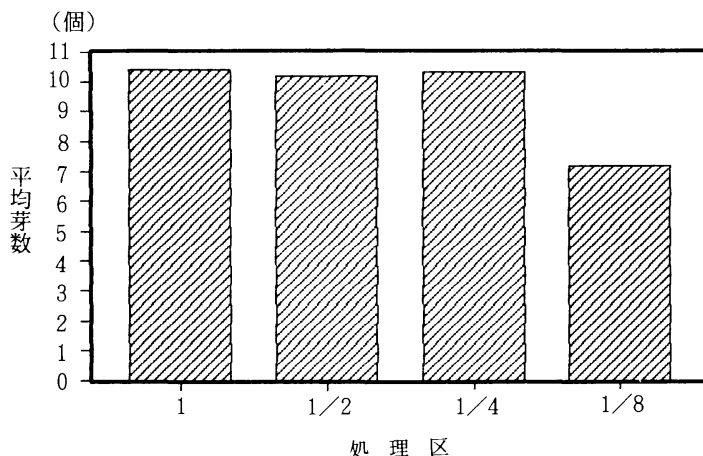


図6. 培地の濃度の芽の分化への効果

区10.4個、1/2倍区10.2個、1/4倍区10.3個と、これらの区ではほとんど同じで、1/8区のみが7.2個と少なかったが、統計的に有意な差はなかった。培養物の大きさにおいては、1倍区、1/2倍区で大きく、1/8倍区で小さかった。

以上のことから、クロマツの芽生えを用いた培養では、培養物の枯死率や芽の分化数を考慮すると、AE基本培地の1/2倍区または1/4倍区が適当であると考えられた。ARNOLD and ERIKSSON²⁾は、*Pinus contorta*の胚培養において、AE培地の濃度を検討し、不定芽の分化、発達、伸長には基本培地の1/4倍区が適当であると報告している²⁾。AE培地は、エンドウの葉肉からのプロトプラストの培養のために用いられたもので、MS培地を改変したものであり、塩類の濃度が高い。一方、林木用の培地は、一般に塩類の濃度が低いものが多いが、今回の結果も、これまでの傾向と一致した。

引 用 文 献

- 1) AITKEN -CHRISTIE, J. and THORPE, T. A. : Clonal propagation Gymnosperms, In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants I", 82-95, Academic Press, NewYork (1984)
- 2) ARNOLD, S. von and ERIKSSON, T. : In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*, Can. J. Bot., 59, 870-874 (1981)
- 3) ARNOLD, S. von and ERIKSSON, T. : Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) KARST, Plant Cell Tissue Organ Culture, 3, 257-264 (1984)

- 4) DAVID, A.: *In vitro* propagation of gymnosperms, In "Tissue culture in forestry", 72-104, Martinus Nijhoff, Dordrecht (1982)
- 5) FUKUDA, T., FUJII, Y. and KANAMITSU, K.: Production of resistant pine plantlets against the nematode disease through tissue culture techniques I, Mokuzaï Gakkaishi, 35, 1139-1143 (1989)
- 6) GUPTA, P. K. and DURZAN, D. J.: Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*), Plant Cell Reports, 4, 177-179 (1985)
- 7) ISHII, K.: In vitro plantlet formation from mature embryo of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*), J. Jpn. For. Soc. 70, 278-282 (1988)
- 8) KAUL, K.: Plant regeneration from cotyledon-hypocotyl explants of *Pinus strobus* L., Plant Cell Reports, 6, 5-7 (1987)
- 9) 近藤 禎二: クロマツ芽生えからの不定芽の誘導(Ⅱ) —培地の濃度の効果—, 関東林育年報, 22, 73-76 (1990)
- 10) 近藤 禎二・九島宏道: ワカマツ(クロマツ×タイワンアカマツ)の胚培養(Ⅱ) —植物体の再生—, 99回日林論, 451-452 (1988)
- 11) 近藤 禎二・九島宏道: クロマツの胚培養(Ⅱ) —培地の検討—, 99回日林論, 453-454 (1988)
- 12) 近藤 禎二・九島宏道: クロマツの胚培養(Ⅲ) —活性炭の培地への添加による芽の伸長効果—, 99回 日林論, 455-456 (1988)
- 13) 近藤 禎二・九島宏道: クロマツ芽生えからの不定芽の誘導, 林木の育種, 特別号, 9-10 (1989)
- 14) 近藤 禎二・九島宏道・黄 鈞: クロマツの胚培養(Ⅰ) —不定芽の分化—, 39回日林関東支論, 103-104 (1987)
- 15) 近藤 禎二・九島宏道・古越隆信: ワカマツ(クロマツ×タイワンアカマツ)の胚培養(Ⅰ) —不定芽の分化—, 98回日林論, 457-458 (1987)
- 16) 近藤 禎二・富田正徳・清水 一: 胚培養におけるクロマツ精英樹の家系間差異, 102回日本林学会大会, 口頭発表 (1991)
- 17) MEHRA- PALTA, A., SWEITZER, R. H. and MOTT, R. L.: Hormonal control of induced organogenesis. -Experiments with excised plant parts of loblolly pine-, Tappi, 61, 37-40 (1987)
- 18) RILEY, K. and WASHER, J.: Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture, plantlet formation from embryonic tissue, N. Z. J. For. Sci., 7, 199-206 (1977)
- 19) 佐藤 亨: 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) SOMMER, H. E., BROWN, C. L. and KORMANIK, P. P.: Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* MILL.) tissue culture in vitro, Bot. Gaz., 136, 196-200 (1975)
- 21) 富田正徳: クロマツ胚培養におけるアミノ酸類の効果, 植物組織培養, 9, 231-232 (1992)