

組織培養法を用いた林木の不定的器官の 発生促進に関する研究

石 川 広 隆⁽¹⁾

Hiroataka ISIKAWA : Generation of Adventitious Plant Organs
by Tissue Culture Methods in Forest Trees

要 旨：針葉樹を主体に、林木のカルスと器官を培養し、不定芽不定根を発生させて幼植物体を得た。このことによりバイオテクノロジーを用いた林木の大量無性繁殖技術の基本的操作を開発することができた。

林木のカルス培養と不定根形成：カルスの人工培養法とカルスからの幼植物体の発生を調べた。この試験ではストロブマツ、スギ、キリ、の3種を材料としてカルスを形成させたが、不定芽の発生は見られなかった。不定根については、スギのカルスを α -ナフトレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)を培地に同時添加したときに発生することを観察した。またニセアカシアとアカマツの幼苗根端を培養したが、不定芽形成は困難であった。

林木茎頂培養の試み：スギ成木の茎頂や、スギとヤマモモの幼苗の茎頂を培養して幼植物体を得ることを試みた。幼苗の茎頂培養では簡単に幼植物体を得られたが、成木の場合には、いったん小枝を培養し、その葉腋から出現した潜伏芽を切りはなして移植する方法が効率が良かった。

針葉樹の胚軸等の培養における不定芽・不定根の人為的発生促進：スギ、ヒノキ等の子葉、胚軸、幼根を培養しながら新しい生長調節物質による不定芽・不定根の発生促進効果を試験した。胚軸培養による場合のみ不定芽・不定根の発生が見られたが、不定芽発生についてはBAPの効果が高かった。アブシジン酸(ABA)、モルファクチンの効果についても検討した。不定根の形成促進については、インドール-3-酪酸(IBA)、NAA、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)3種とも効果があり、IBAはスギ、ヒノキ両種に効果を示したが、2,4-Dはヒノキについてのみ高い効果を示した。クロマツとアカマツの胚軸培養ではBAPの効果は不明であったが、ABAを含む培地でクロマツ胚軸上に不定芽が発生した。

目 次

は じ め に.....	120
I 林木のカルス培養と不定根形成.....	120
I-1 ストロブマツとキリのカルス培養試験とその応用、ならびにニセアカシア・ アカマツ・クロマツの根端培養.....	120
I-2 スギのカルス培養と不定根の発生.....	123
II 林木茎頂培養の試み.....	129
II-1 スギ成木の茎頂および潜伏芽の培養と不定根形成.....	129
II-2 スギ・ヤマモモ幼苗茎頂の培養とオーキシン類による不定根形成促進作用.....	131
III 針葉樹の胚軸培養における不定芽・不定根の人為的発生促進.....	136
III-1 スギ胚軸からの不定芽形成に及ぼす6-ベンジルアデニンならびにアブシジン 酸(ABA)の作用.....	136

Ⅲ-2 スギとヒノキの胚軸からの不定根形成に及ぼすオーキシン類の作用……………	139
Ⅲ-3 スギ胚軸からの不定芽形成に及ぼすクロールフルレノール (CFI) の作用および ABAとCFIとの協調作用……………	141
Ⅲ-4 ヒノキ胚軸からの不定芽形成に及ぼすBAPとCFIとの協調作用……………	145
Ⅲ-5 マツ類胚軸の培養に及ぼすABAとBAPの作用……………	147
総 合 考 察……………	148
引 用 文 献……………	149
Summary ……………	152

は じ め に

無性繁殖法は林木のみならず樹木全般について育種の一手法として重用されているが、そのほかにもたんなる苗木増殖の手段に使用されることがある。たとえば凶作で種子の採取量が非常に少なかったときや、実生苗が病害を受けやすい地方で、さし木苗によってそれが回避できるような場合には良く利用されている。

また、じかざしといって山地にじかに枝をさし木して、苗畑作業の手間と面積を省く場合にも使用される。

無性繁殖法のなかでも接木は台木を準備しなくてはならず、また接木技術も必要とし、手間がかかるので、苗木とした場合に高価に売れるものか、貴重な研究材料だけに使用されることが多い。

ふつう林木は実生繁殖以外はこの無性繁殖法のさし木、とり木、根わけによって繁殖され、日本の主要林木のなかで針葉樹には根萌芽による繁殖が可能なものはないので、針葉樹の場合はもっぱらさし木、とり木で行われ、とりわけ多量生産を必要とする場合にはさし木が用いられる。

筆者は林木のさし木繁殖に関する基礎的研究を手がけ、とくにさし木困難な主要針葉樹¹⁻¹²⁾を中心に実行してきた。しかしさし木発根の研究だけでは林木の無性繁殖法の問題点を完全に解決することはできず組織培養の手法を取り入れる必要性に迫られた。

組織培養法により研究を進めるときには物理的・化学的条件を精密にして培養し、カルスや茎頂からの不定根形成条件をきわめることができるし、不定芽や不定胚形成¹³⁻⁴⁷⁾などさし木以外の無性繁殖の基礎的研究を推進することもできる。

組織培養法はこのほか林木の生理学的、病理学的研究や花成に関する試験、試験管内受精、細胞融合、胚培養、純系育成、放射線育種への応用など育種分野⁴⁸⁻⁶⁰⁾への貢献度も高い。

そこで、無性繁殖上の諸問題解決という目標をも含めて針葉樹の組織培養を計画した。

I 林木のカルス培養と不定根形成

I-1 ストローブマツとキリのカルス培養試験とその応用、ならびにニセアカシア・アカマツ・クロマツの根端培養。

(1) 研究目的

この試験は現在使用されているおもな培地の中から林木のカルス培養⁵¹⁻⁵⁴⁾に適する培地を選び、その培地によってたんに細胞が増殖するだけでなく不定根もしくは不定芽形成が可能かどうかを調査しようとしたものである。

つぎに分化した根原基が生長するにはどのような物質を必要とするかを調査するためにまず培養根端⁵⁵⁾⁵⁶⁾の生長に適した培地の探索をした。

この二つの実験を進めるときには、無菌の組織片と無菌苗とを必要とするので、この実験によって同時に林木の枝や種子内の胚から無菌材料を得るための殺菌技術を開発できると考えた。

(2) 材料と方法

カルス培養を目的とした場合……

ストロブマツ (*Pinus strobus* L.) の成木から組織を採取する場合は直径 5 cm 程度の枝を長さ 15 cm ほどに切りとって、無菌箱の中で 70% アルコールを十分ふりかけたのち、表皮を殺菌したピンセットで少しづつむしりとり、その下の節部組織にメスで 1 cm 間隔位の基盤目の切れ込みを入れ、各区切りの隅をピンセットでつまんでひきはがし、節部と形成層からなる組織片を培地上に植え込んだ。

キリ (*Paulownia tomentosa* STEUD.) の場合も同様にした。

胚軸からカルスを形成させる方法は、ストロブマツでは、種子を局方さらし粉の 5% 液中へ 30 分浸漬し、ときどきかきまわし、取り出してからペトリー皿上の無菌寒天上で発芽させ、胚軸が 2~3 cm 程度伸長したときに胚軸を 1 cm の長さに切断し培地上にのせた。胚軸切片が培地に接した部分からカルスが形成された。

ここでは REINERT & WHITE の培地⁵⁷⁾を使用した。

根端採取を目的とした場合……

アカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et Zucc.), クロマツ (*Pinus thunbergii* PARL.) については前述のストロブマツの場合と同様にして無菌幼苗を作り、幼根が 10~15 mm の長さまで伸長したとき先端から 10 mm を切りはなして SLANKIS の培地⁵⁸⁾で培養した。

ニセアカシア (*Robinia pseudacacia* L.) の種子は硬粒種子と呼ばれ普通的手段では発芽しにくいので、熱湯を金網かごの中に入れた種子の上から短時間 (2, 3 秒間) ふりかけ、ただちに冷水に移す方法で発芽促進処理を行い、その後直ちにウスプルン (メトキシエチレン塩化水銀 4.2%, 重炭酸ナトリウム 93.8%, その他を含む) の 500 倍液中で 20~60 分間殺菌処理をした⁵⁹⁾。

また、ウスプルンの代りにマツ類種子と同様にさらし粉を用いても効果があった。

ニセアカシアの根端培養には WHITE の培地⁶⁰⁾を使用した。

(3) 実験結果

ストロブマツの培養カルスは REINERT & WHITE の培地にインドール-3-酪酸 (Indole-3-butyric acid: IBA) を 10 mg/l の濃度で添加したとき良好な生長を示した (Photo. 1-1, 2 および Photo. 2-1)。

しかしカルスからは不定芽、不定胚、不定根などの器官分化が起らず、縦断切片や押しつぶし標本を作って観察しても、表面および内部に器官分化の形跡は見当たらなかった (Photo. 2-2)。押しつぶし標本からは巨大細胞や角状の形をした細胞の集団などが見られ、分裂中の細胞のなかには異常な核分裂が観察され、染色体橋の現象や 4 倍性細胞と思われるものも観察された (Photo. 3-1~4 および Photo. 4-1~4)。

アカマツの胚軸切片を培養したときに、IBA の 10 mg/l が培地中に添加されていると、ストロブマツカルス培養の際に見られなかった不定根の発生を観察することができた (Photo. 5)。

したがってマツ類に対する不定根形成促進能力は IBA においては 10 mg/l 前後にあると推察することができた。アカマツ胚軸からカルスを採取することはできなかった。

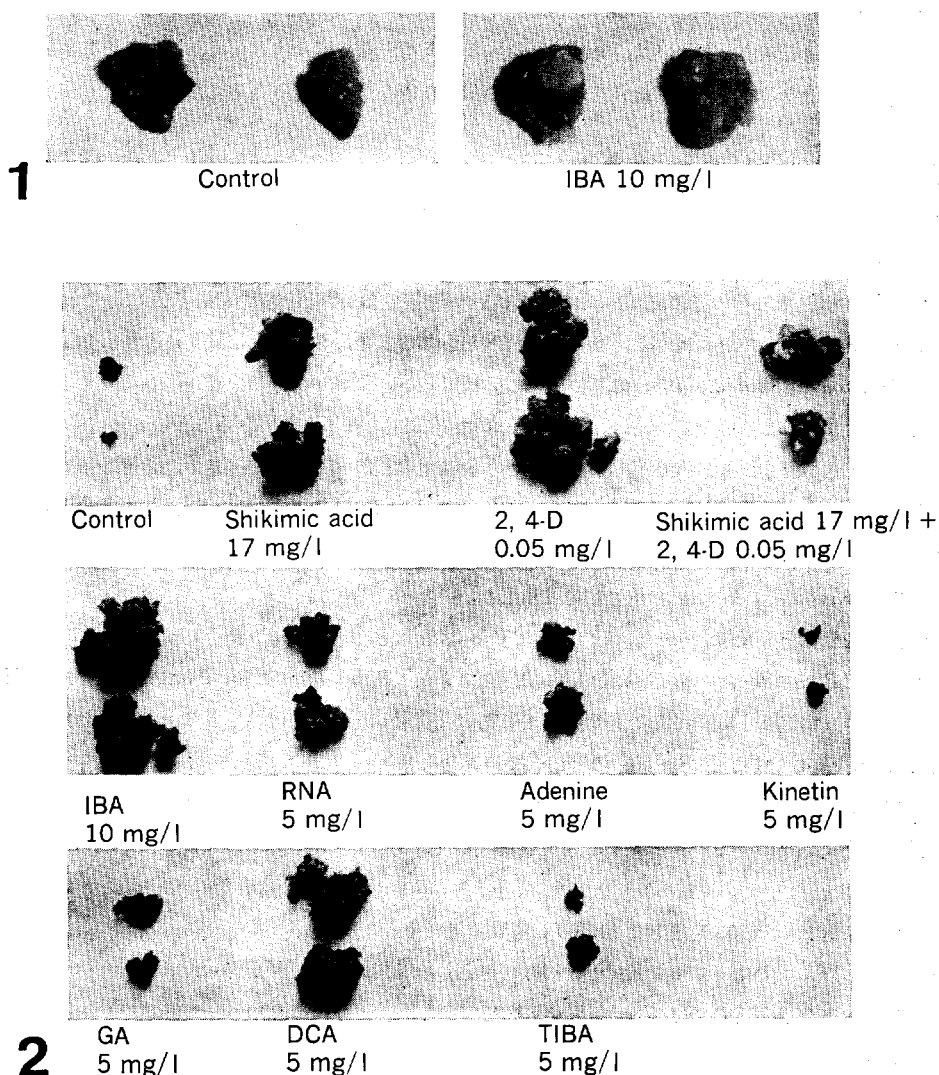


Photo. 1. RW培地におけるストローブマツカルスの生長

Growth of *P. strobus* callus in the REINERT & WHITE's medium

1. RW培地におけるストローブマツカルスの生長

上段はオーキシンなしの区

下段は IBA 10 mg/l の区 約×1

Growth of *P. strobus* callus on the simplified RW medium.

The upper row : without auxin.

The lower row : supplemented with 10 mg/l IBA.

2. ストローブマツカルスを種々の生長調整物質添加のもとに培養したときの生長

IBA 10mg/l 区と, 2,4-D 0.05 mg/l 区での良好な生長 約×1/2

Growth of *P. strobus* callus cultured on the same medium supplemented with plant growth substances.

RNA : Ribonucleic acid

DCA : Dichloranisole

GA : Gibberellin

TIBA : 2,3,5-Triiodobenzoic acid

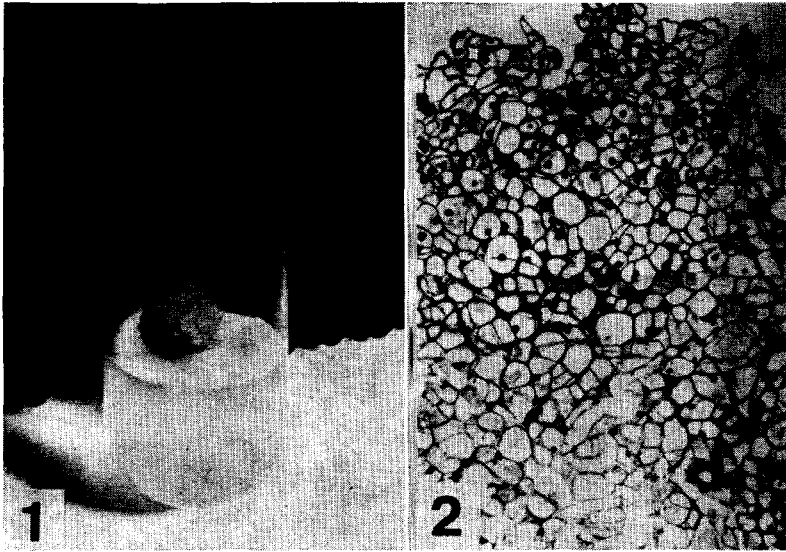


Photo. 2. 培養3か月のストロブマツカルスの生長とその縦断切片
カルス内部には器官分化は見られない

Callus growth of three month's duration of *P. strobus* and observation of its vertical section. Lack of organ formation in the inner part of the callus.

1. 小切片から移植して3か月後のストロブマツカルス 約×1/2
P. strobus callus in 3 months after transplantation of a small piece of callus.
2. 同上カルスの縦断切片。器官分化の形跡は見当らない 約×20
Longitudinal section of this callus which did not differentiate buds or roots.

またストロブマツとキリの成木組織から獲得した培養カルスはリグニンの生合成の研究にも利用された。培養したカルスからの不定根形成条件の探究は成功しなかったが、生化学的研究の面で一応の成果^{51) 52)}を得ることができた。

根端培養の実験ではニセアカシアの根端⁵⁵⁾の生長におよぼす糖類の効果を調べた。培地の糖濃度を2%に限定した場合には glucose と fructose が良好で、sucrose は前二者の約半分の生長量しか示さなかった。このことからモル濃度に統一した実験を行う必要が認められたがニセアカシアを材料に使用する実験はここで一応打ち切った。

アカマツとクロマツの根端培養⁵⁶⁾では培地に含ませる微量栄養素について調べ SLANKIS の培地⁵⁸⁾にピリドキシンとニコチン酸の両者を添加することによってアカマツの根端の生長が促進されることを観察した (Photo. 6-1, 2)。

この実験から根端培養においては微量栄養素はビタミンBグループを中心として考慮して行く必要があることが示唆された。

なおクロマツの根端はアカマツと異なりこの培地では全く生長しなかった。

I-2 スギのカルス培養と不定根の発生

(1) 研究目的

前節で述べたようにストロブマツとキリのカルス培養には成功したが、各種のオーキシンを使用してもカルスからの不定根形成には成功しなかった。培養カルスからの不定根形成を調査するためにはストロ

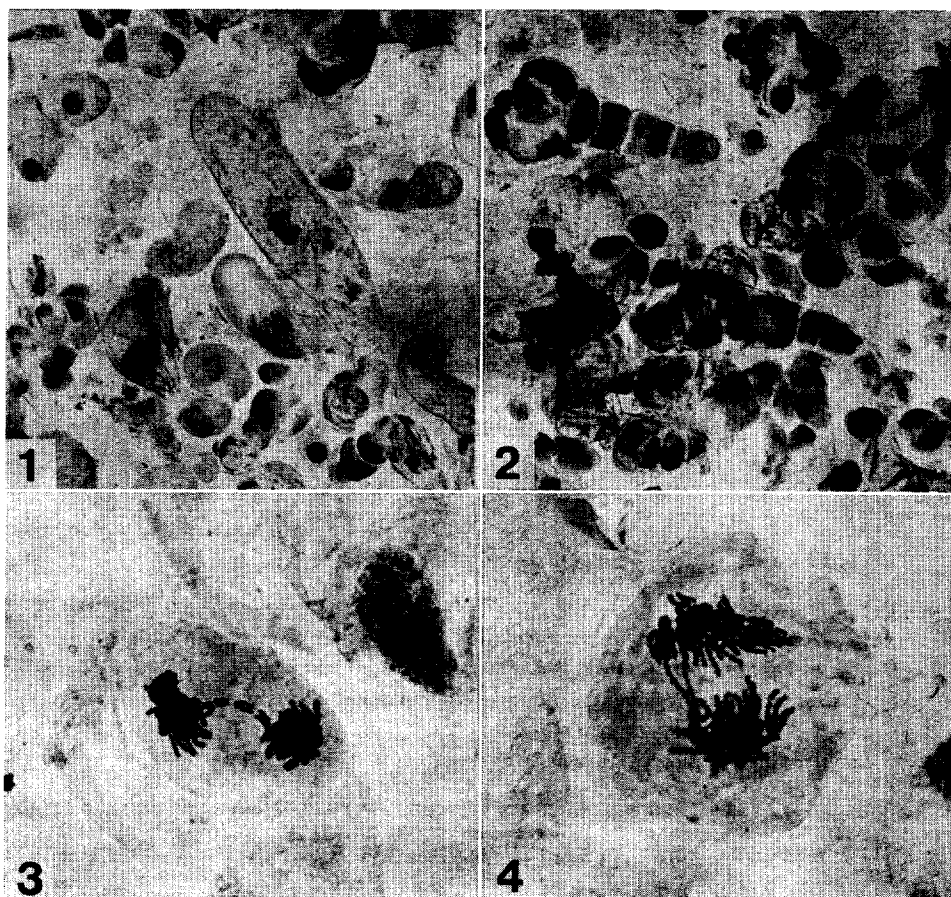


Photo. 3. ストローブマツ人工培養カルスの細胞学的観察。標本はおしつぶし法により作られた。カルス塊を細かく碎き 0.02 ノルマルのオキシキノリン液中に 20°C で約 2 時間浸漬し、その後 3 : 1 カルノアで固定し、酢酸オルセインと 1 ノルマル塩酸の液 9 : 1 に 60°C で 6 分間保ったのち、おしつぶした

Cytological observation of *P. strobus* callus cultured in test-tubes. Callus cells were treated by smear method. Photographs show giant cells or various types of cells and abnormal nuclear division.

1. ストローブマツ培養カルス内の巨大細胞。中央部やや右寄りの細胞 約×200
A gigantic cell in the callus.
2. カルス細胞の分裂増殖の一形態。左上と中央やや下寄りに見える角状のものをいう 約×200
Mass of cells that were formed after several cell divisions in the callus.
- 3, 4. カルス細胞の異常核分裂の後期。染色体のブリッジ現象などが見られる 約×600
Chromosomal delaying and bridges in anaphase of abnormal nuclear division in the callus.

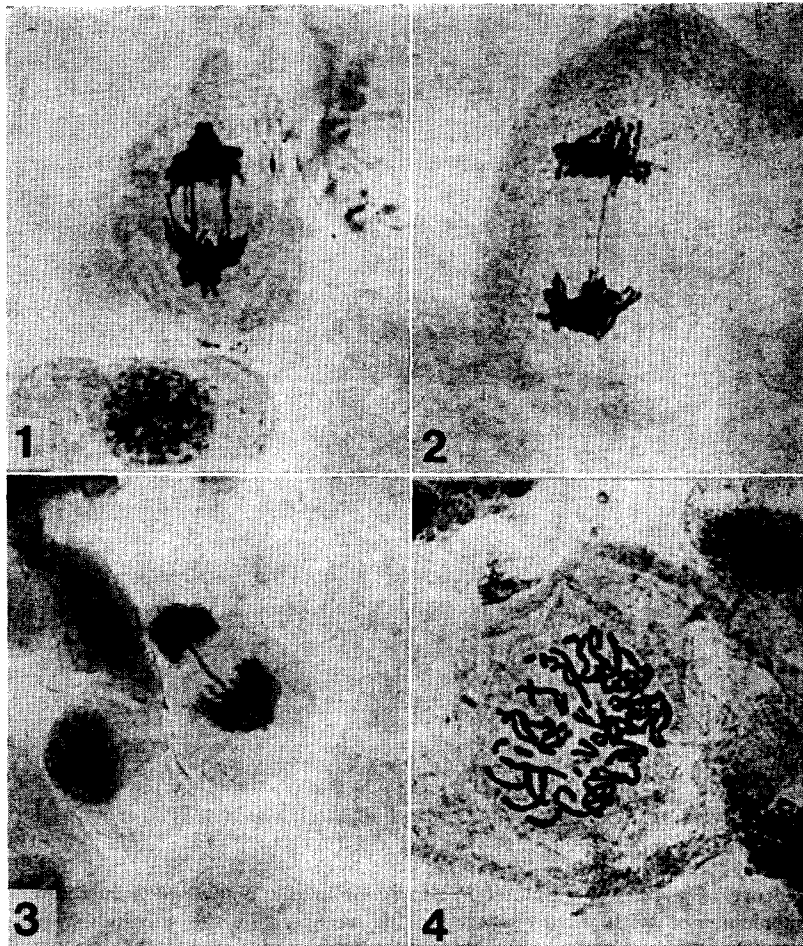


Photo. 4. ストローブマツ人工培養カルの細胞学的観察。異常核分裂形態のいろいろ
Cytological observation of *P. strobus* callus cultured in test-tubes.
Observation of abnormal nuclear division.

- 1, 2, 3. 染色体のブリッジ現象がみられる。写真2および3は紡錘体中央付近に細胞板が出現しはじめているので、核分裂終期と認められる 約×600
Various types of abnormal nuclear division. Chromosomal bridges of anaphase or telophase.
4. 核分裂中期の染色体。ストローブマツは $n=12$ であるので、ここに見られる染色体数から $4n$ 細胞のように考えられる 約×800
A polyploidy cell.

ーブマツやキリは不適当な材料であると考えられた。

アカマツ胚軸からIBA処理によって不定根が発生したことはすでに述べたが、胚軸という器官が起源となって不定根が発生してくるのであろうと考えられ、培養カルスからの不定根発生の場合とは区別して考えなければならないと思われた。

林木のなかでスギは林業上最も重要な樹種であり、古くからの経験でさし木発根のしやすい個体もあることが知られており、さし木造林さえ行われているほどであるから、不定根形成条件を研究するためには最適の材料であり、まずスギの人工培養カルスからの不定根形成について調べることにした。

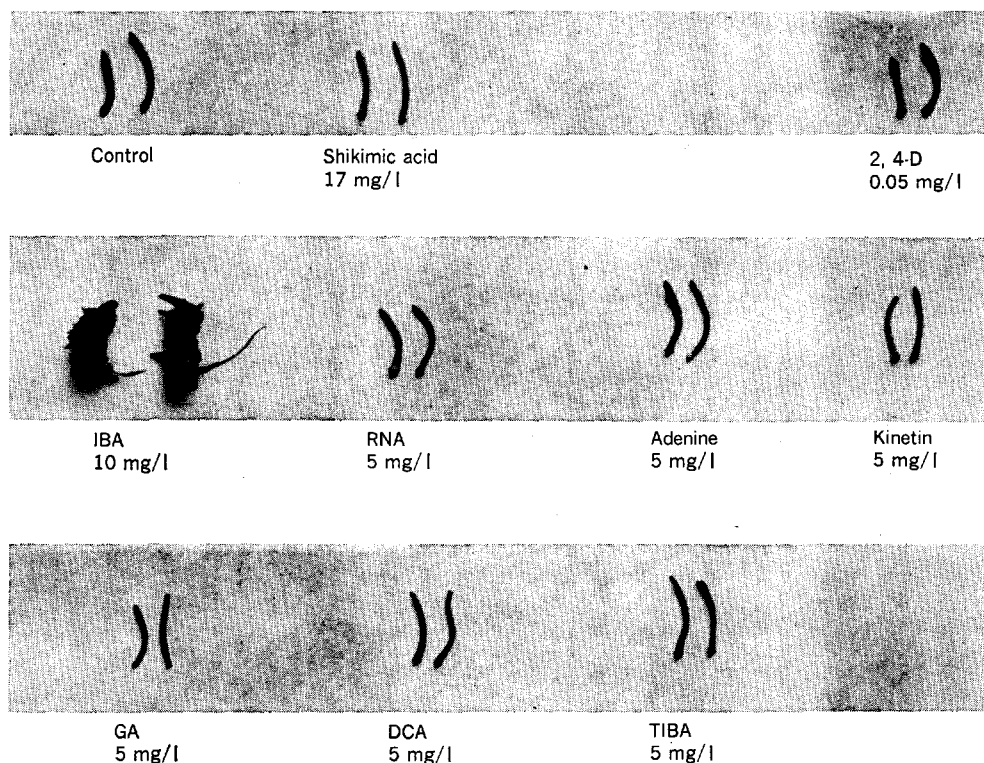


Photo. 5. WHITE の寒天培地によるアカマツ胚軸切片の培養。培地は WHITE の無機塩組成にイーストエキス 0.1% と寒天 2% を加えたもの。9 種の添加物質のうち IBA 処理区のみ発根がみられた

Culture of hypocotyl pieces of *P. densiflora* in the WHITE's agar medium supplemented with yeast extract lacking sugars, and the medium was supplemented with nine substances for testing materials. Plate shows root formation of hypocotyls as a result of IBA supplement to the medium.

(2) 材料と方法

マイズルキコンスギと呼ばれる俗称をもつ発根しやすいスギの、さし木後数年たった幼齢木の芽を用いた。

殺菌法について述べると、親木より小枝の状態で切除した材料を短時間外気中で運び、殺菌直前に先端 3 cm の部分を切り取って、アンチホルミン（次亜塩素酸ナトリウム溶液）の 1% 水溶液に 20 分間浸漬した。この間に殺菌試験片の表面に気ほうが残らないよう筆の穂先でよく洗い、そのあと無菌水で洗い流した。

この殺菌片の先端にある冬芽の葉原基を外側からめくるようにしてピンセットで取り除き、約 1 mm ほどの大きさになった茎頂を、生長点よりわずかに下のところで切りはなした。

この茎頂を WOLTER & SKOOG の培地（以後 WS 培地と呼ぶ）でナフタレン-1-酢酸カリ（naphthalene-1-acetic acid のカリウム塩、以後 NAA と略す）0.25 mg/l と 6-ベンジルアデニン（6-benzyl-adenine または 6-benzylaminopurine ともいう。以後 BAP と略す）0.15 mg/l を添加した培地⁶¹⁾上に置床した。

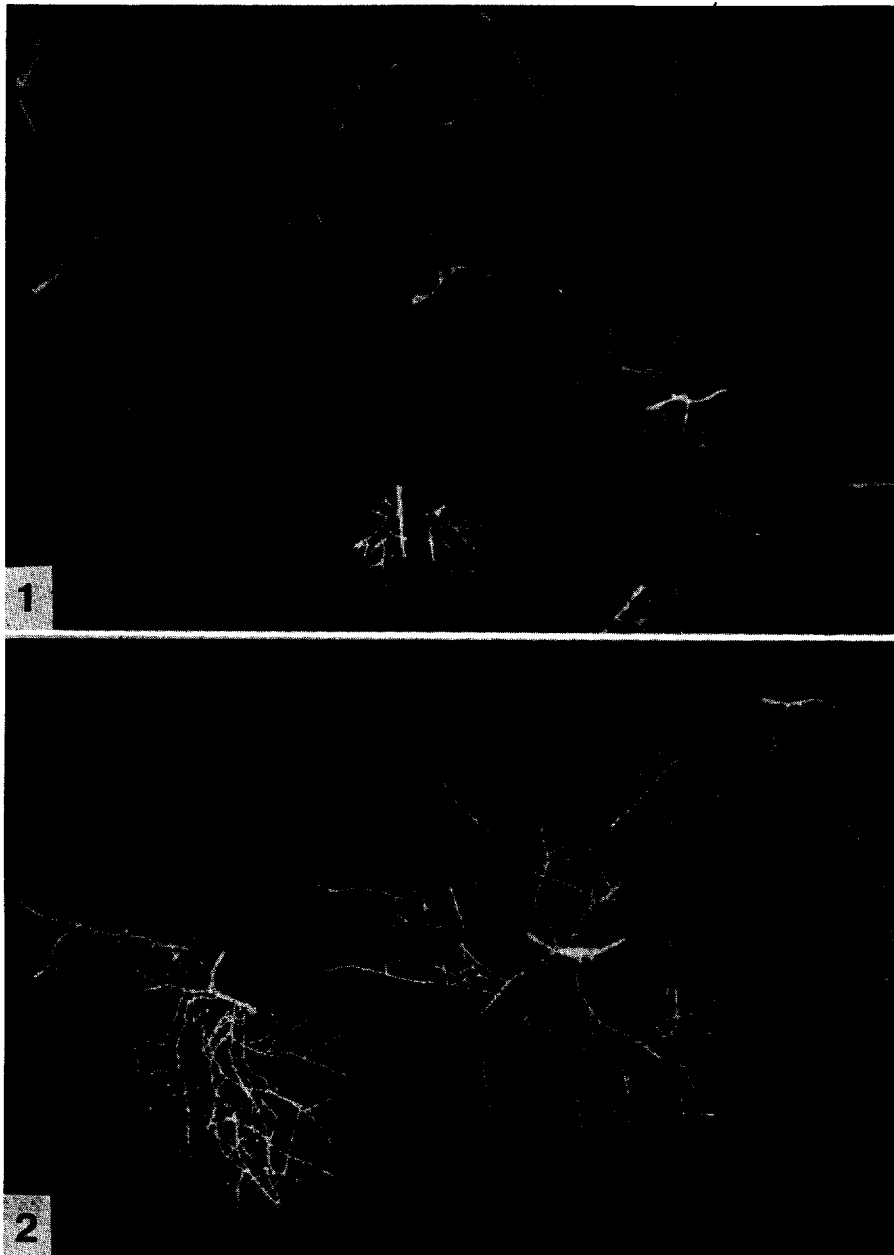


Photo. 6. アカマツの根端培養におけるビタミンB群の生長促進作用
Growth promotion by vitamin B complex in root tip culture
of *P. densiflora* using SLANKIS' medium.

1. スランキスの欧州アカマツ根端培養用培地でのアカマツ根端の生長 (対照区) はほぼ等倍
Growth of root tips of *P. densiflora* in the S medium.
2. スランキスの培地へピリドキシン 0.05 mg/l とニコチン酸 0.05 mg/l を添加した培地におけるアカマツ根端の生長。対照区と比べて生長の良いことがわかる。ほぼ等倍
Fine growth in the S medium supplemented with 0.05 mg/l pyridoxine and 0.05 mg/l nicotinic acid.

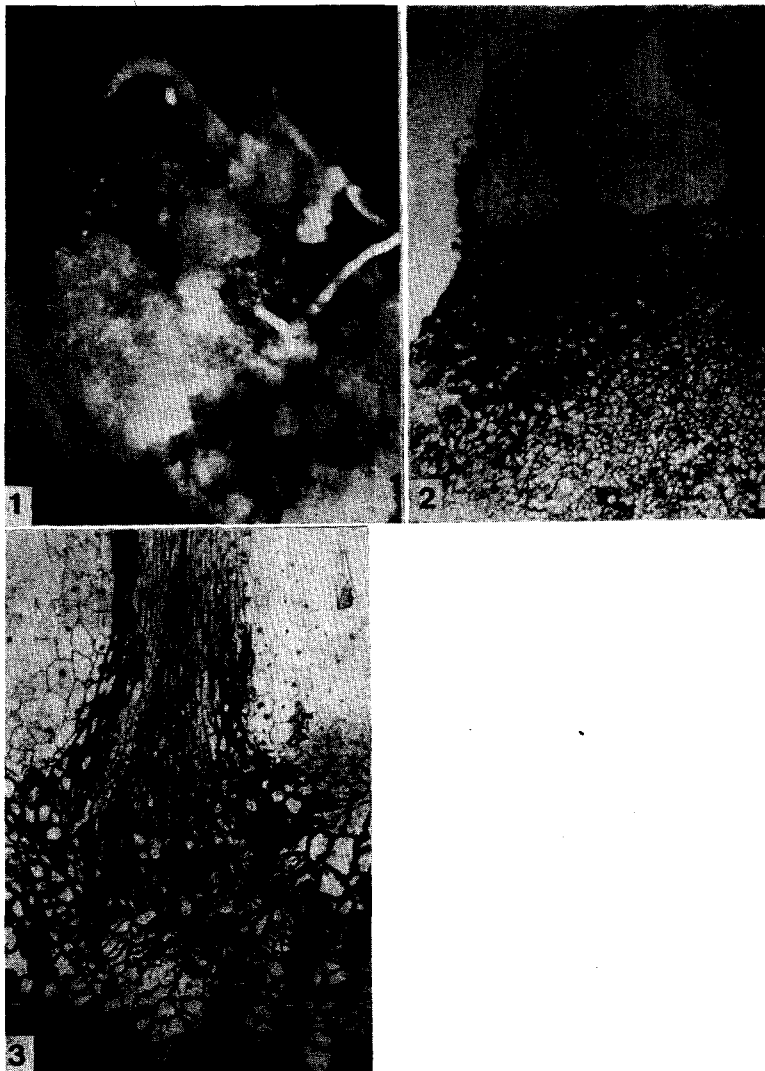


Photo. 7. スギのカルスを subculture し NAA 1×10^{-5} M と BAP 1×10^{-6} M を含む WS 培地へ移植したとき発生した不定根

Adventitious root formation originated in subcultured callus of *Cryptomeria japonica* in the WOLTER and Skoog's medium supplemented with 1×10^{-5} M NAA and 1×10^{-6} M BAP.

1. 斜め上方へ向って発生し伸長している不定根が見られる 約 $\times 10$
Adventitious roots generated on the upper part of the callus.
2. 同不定根および発生部位近傍の縦断切片。固定には FAA 90 : 5 : 5 を用い, safranin と fast green の二重染色を行った。パラフィン切片の厚さは 10~20 ミクロン。不定根は比較的やわらかいカルス細胞集団の表面付近から突然に発生しているように見える。カルス内部での器官分化は認められなかった 約 $\times 40$

Longitudinal section of the adventitious root and callus. The material was fixed by FAA 90 : 5 : 5 and stained with safranin and fast green. Paraffin section was 10—12 μ thick. The root generated from surface of the callus without organ differentiation in the deep part of the callus.

3. 同不定根の中心柱付近の縦断切片 約 $\times 200$
A longitudinal section of a stele and adjacent tissue of an adventitious root.

(3) 実験結果

移植茎頂の下部切口からカルスが増殖した。このカルスを1辺5 mmの大きさの立方体に切り取り、移植用のカルスとした。

NAAの 1×10^{-6} MとBAPの1, 2, 4, 6, 8×10^{-6} Mおよび 1×10^{-6} Mを含む培地に移植し5か月後にはBAP 1×10^{-6} M区と 8×10^{-6} M区とに不定根の形成がみられた (Photo. 7-1)。

その中間の濃度であるBAPの2, 4, 6×10^{-6} M各区には全く発根がみられず、スギ培養カルスからの発根は、この実験では、かなり偶発的であった。しかしスギ培養カルスからの不定根形成を始めて確認し、発生箇所のマイクローム切片による組織学的観察を行った。

縦断面のみで横断面については実行していないが Photo. 7-2, 3 で示したようにかなりゆるく重なった円形の細胞のかたまりの表面からにわかに不定根の組織が出現しているように観察された。なお、この実験で発生した不定根の屈地性の有無についてははっきりせず、上方に向かって発生するものが多かったが、横方向、下方向に生長するものもあり、一般に無方向性であった。

発根に関する解剖学的観察調査の必要がある。

ま と め

林木のカルス培養を試みたがストロブマツとキリの培養カルスからはオーキシンの作用によっても不定根形成がみられなかった。

しかしスギの培養カルスからはNAAとBAPの組み合わせによって、わずかではあるが不定根形成をひき起こすことがわかった。

林木の根端は、培地が適合した場合には培養が可能でビタミンBグループのチアミン、ビオチン、コリン、ピリドキシンやニコチン酸などが根の生長に対して促進的効果を示すことがわかった。

II 林木茎頂培養の試み

II-1 スギ成木の茎頂および潜伏芽の培養と不定根形成

(1) 研究目的

スギ成木の茎頂を培養して不定根を発生させると同時に芽を伸長させ、1個の幼植物体を獲得し、それによって成木からの無性繁殖を完成しようとするものである。

また潜伏芽を培養し、それを幼植物に仕立てることができるようになれば、小枝の先から一挙に多数の苗が獲得できるので、無性繁殖の目的からいって非常に望ましい。

カルスから発生した幼植物には倍数性、異数性の細胞から成るものが多数存在することが、多数の研究者⁽²⁾⁶⁹⁻⁷²⁾によって証明されており、親と全く同じ遺伝的性質をもつ子供を増殖するという無性繁殖の目的に合わない。しかし、成木の芽を培養する茎頂培養や潜伏芽の培養では、このようなことはきわめてまれであるため、さし木などと同様な目的をもって使用することができる。これが茎頂培養の長所でもある。

(2) 材料および方法

スギ小枝および芽の殺菌法はI-2の方法と同じで、3 cmの長さの小枝全体を同方法で殺菌したとき、普通20~30%、順調に行けば50%程度の無菌小枝を獲得することができる。茎頂だけ採取する場合はさらに無菌率が高くなり普通90%以上の無菌茎頂を得ることができる。

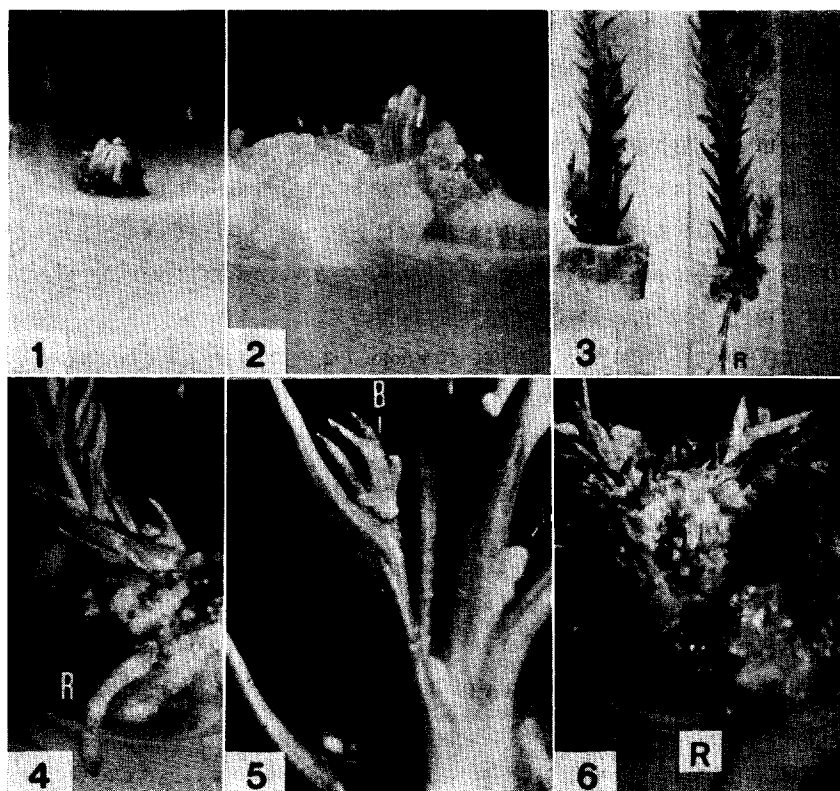


Photo. 8. スギ成木小枝の頂芽と腋芽の培養

Culture of terminal buds and axillary buds of *Cryptomeria japonica*.

1. オーキシンを含まない WS 培地上でのスギ頂芽。カルス形成が悪い 約×3
A terminal bud showing poor callus differentiation on the WS medium without supplementation of auxin.
2. オーキシシン IBA 1~10 mg/l, または NAA 1~5 mg/l, または 2, 4-D 0.1~1.0 mg/l 含有の培地で培養した頂芽の下部切口近傍で見られる盛んなカルス形成。不定根形成は全く見られなかった 約×4
One of terminal buds showing vigorous callus differentiation on the WS medium supplemented with IBA, NAA or 2, 4-D.
3. スギ成木の小枝(長さ3 cm)の無菌培養。培地へのオーキシシン添加により不定根を形成することはあるが、発根率はきわめて低かった。発根の有無にかかわらず腋芽の伸長は盛んである。ほぼ実物大。Rは発生した不定根を示す
A branchlet culture showing poor differentiation of adventitious roots and vigorous elongation of axillary buds.
4. 腋芽を切除して IBA 3 mg/l 含有の培地へ移植すると発根して幼植物体が得られる 約×8
Root formation of a transplanted axillary bud on the WS medium supplemented with 3 mg/l IBA.
5. 培養中の小枝の腋芽形成部分の拡大写真。bは動き始めたばかりの腋芽。Bは伸長開始後1週間以上たった腋芽 約×8
The beginning of elongation of axillary buds from a cultured branchlet of *Cryptomeria* on the WS medium.
6. 腋芽bの移植により発生した群立苗条(多生苗条)。この幼植物の針葉は juvenile form(幼形)を示した。使用された培地は WS 培地に NAA 1×10^{-5} M と BAP 2×10^{-6} M の両方を含有していた。Rは不定根を示す 約×3
Multiple shoots generated from a transplanted young axillary bud on the WS medium supplemented with 1×10^{-5} M NAA and 2×10^{-6} M BAP.

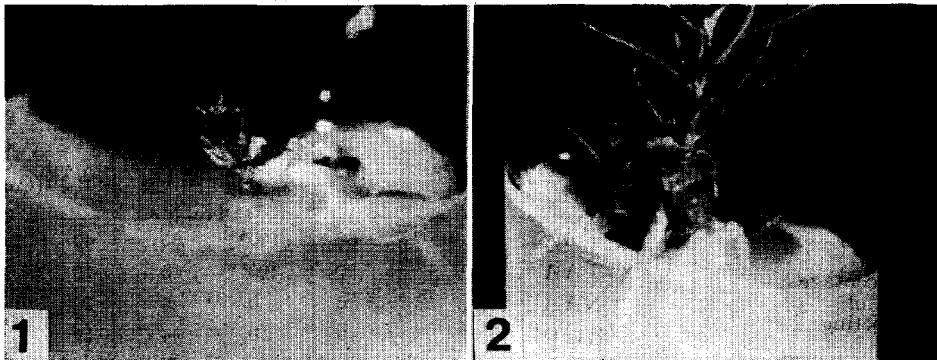


Photo. 9. Photo 8-6 に示した群立苗条の切断移植により得られた幼植物体
Plantlets from the multiple shoots originated in the axillary bud of
Cryptomeria japonica in the Photo 8-6.

1. 9本発生した苗条のうち最小のものをオーキシン入りの培地へ移植し発根させたもの
約×6
Root formation of the smallest shoot isolated from the multiple shoot on the
WS medium supplemented with auxin.
2. Photo 8-6 で示した苗条のうち大型のものを選んで切りはなし、オーキシン入りの培地
へ移植し発根させたもの 約×4
Root formation of the biggest shoot isolated from the multiple shoot on the
same medium supplemented with auxin.

これらをWS培地上におき、オーキシン類による不定根形成促進効果を調べた。培養条件は25°C、蛍光灯1900ルクス、14時間照明であった。

(3) 実験結果

スギ成木から採取した茎頂はオーキシン類を含まない培地ではカルス形成をほとんど起さず不定根の形成も見られなかった。NAA, 2,4-D, IBAを含む培地ではこの3者のいずれにも下部切口に盛んなカルス形成がみられた。しかし発根は見られなかった (Photo. 8-1,2)。

3 cmの小枝ではわずかに下部切口付近より発根するものがあった (Photo. 8-3)。しかし発根本数は非常に少なかったので、この方法を実用的な無性繁殖法に結びつけることはできなかった。

つぎに培養小枝の腋芽が潜伏芽の状態を脱して生長してきたもの (Photo. 8-3,5 B) を移植する方法を用いて比較的良好な成績を収めた (Photo. 8-4)。この際潜伏芽の動き始めたばかりのもの (Photo. 8-5 b) を移植するとNAAとBAPを含む培地において生長点近傍から群立した苗条 (multiple shoots)⁷⁸⁾を発生することがあり (Photo. 8-6)、この場合はこの苗条を切除してオーキシンを含む培地に移植したところ容易に不定根を形成して幼植物体となった (Photo. 9-1,2)。この手法が確立できれば1個の潜伏芽から獲得できる幼苗の数は飛躍的に高くなるはずであるが、multiple shoots 発生の確率がまだ低いので、当分の間は潜伏芽が20 mm以上伸長したものを切りはなして移植することによって1個の腋芽から1個の幼植物を得る方法を用いた方が確実である。

II-2 スギ・ヤマモモの幼苗茎頂の培養とオーキシン類による不定根形成促進作用

(1) 研究目的

成木の培養茎頂からはオーキシンによりカルス形成が引き起されたが、不定根形成は起り難かった。不定根形成の条件についてさらに調査を進めるために成木より発根しやすいと思われる幼苗を材料とし、そ

Table 1. スギ幼苗から採取した 10 mm 茎頂の培養におけるオーキシン類の
効果 (1 か月培養の結果, 1 区あたりの試験個体数 10 本)

Effect of auxins in culture of 10 mm-long stem tips
of young *Cryptomeria* seedlings.

	オーキシンの濃度 (mg/l)	10	1	0.1	0.01	0 (Cont.)
	オーキシンの種類					
発根率 (%) Percentage of rooting	I B A	83	100**	83	40	40
	I A A	80	100**	38	10	40
	N A A	0	0	20	20	40
	2, 4-D	0	0	44	29	40
カルス径の平均値 (mm) Average diameter of generated callus	I B A	6.7**	5.8**	4.3**	0.8	2.4
	I A A	6.6**	4.0*	3.1	2.7	2.4
	N A A	1.7	2.6	1.9	1.5	2.4
	2, 4-D	5.0**	5.5**	4.6**	3.0	2.4
不定根の平均数 (本) Average number of adventitious roots	I B A	2.2	8.4**	2.7	0.4	0.5
	I A A	2.6**	2.3**	0.8	0.1	0.5
	N A A	0	0	0.2	0.4	0.5
	2, 4-D	0	0	0.4	0.3	0.5
不定根長の平均値 (mm) Average length of adventitious roots	I B A	4.2**	5.0*	8.6*	30.0	23.0
	I A A	5.8**	15.1	36.7	33.0	23.0
	N A A	0**	0**	2.5**	24.5	23.0
	2, 4-D	0**	0**	16.5	13.5	23.0

**発根率については χ^2 検定, その他は LSD の検定により危険率 1% 水準で有意 (対照区と比較)

Significant at 1% level by χ^2 test for percentage of rooting and by LSD test for other items.

* LSD の検定により危険率 5% 水準で有意 (対照区と比較)

Significant at 5% level by LSD test.

Table 2. ヤマモモ幼茎から採取した 15 mm 茎頂の培養に及ぼす

I B A 高濃度浸漬処理の発根促進効果 (培養期間 2 週間)

Effect of strong IBA treatment in culture of 15 mm-long stem tips
of young *Myrica* seedlings. The tip was dipped into strong IBA
solution in a moment before culture.

IBA 処理濃度 (mg/l) IBA concentration	0 (Cont.)	100	1000	10000
発根率 (%) Percentages of rooting	0	100*	75	25
枯死率 (%) Percentages of withering	0	0	0	75*
平均不定根数 (本) Average number of adventitious roots	0	2.30	2.75	0.75

* χ^2 検定により危険率 5% 水準で有意

Significant at 5% level by χ^2 test.

の茎頂より起る不定根形成についての基礎的研究を進めた。また特用樹として有用であるがし木発根の困難な広葉樹のひとつであるヤマモモ (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) を材料として、その幼苗の茎頂培養により発根困難性の原因を探ることを試みた。

(2) 材料の方法

スギ種子をウスブルンの 0.2% 水溶液に 16 時間浸漬し、取り出して無菌水で洗い 1% 寒天上で発芽させた。約 2.5 か月後にエピコチルが 10 mm 程度に伸長して幼茎と呼ぶことのできるまでに達したとき、茎頂より 10 mm の長さに幼茎を切りはなし WS 培地に移植した。

ヤマモモは堅い内果皮を有するので金づちを使ってこれを割り、内部の種子を取り出した。殺菌はウスブルンの 0.2% 水溶液の中へ 10 分間種子を浸漬し、そのあとの水洗はしないで 1% の無菌寒天上に移して発芽させた。25°C の培養温度で約 1 か月後に発芽を開始したが発芽率は良くなかった。1 か月半後に幼茎を茎頂より 15 mm の長さのところで切りはなし、これを WS 培地で培養した。培養温度 25°C、照明は蛍光灯で 1900 ルクス、日長は 14 時間とした。

(3) 実験結果

スギ幼苗 スギ幼苗の 10 mm 茎頂の培養においては Photo. 10-1 で示したようにオーキシン (IBA) 濃度が高い場合、幼茎の下部切口より盛んなカルス形成が行われる。オーキシン濃度が適度であるとカルス形成だけでなく不定根形成も盛んである (Photo. 10-2)。低濃度の場合カルス形成も貧弱となり、不定根形成率も悪くなる。その結果を Table 1 で示した。IBA (インドール-3-酢酸のソーダ塩、商品名 IBAS) も IAA (インドール-3-酢酸のカリ塩) も 1 か月の培養では発根率において 1 mg/l 区がもっとも良く、NAA と 2,4-D では 1 か月では発根促進効果が認められなかった。発根率と不定根数からいって IBA 1 mg/l 区がもっとも成績が良かった。カルス形成作用は IBA、IAA、2,4-D が良く、濃度については IBA と IAA の 10 mg/l と、2,4-D の 1 mg/l が最もよかった。根の伸長が抑制される濃度は IBA、NAA においては 0.1 mg/l より高い濃度で、IAA では 10 mg/l から、2,4-D では 1 mg/l 以上からであった。IBA、IAA の濃度が高くなるにしたがって不定根発生数は多くなるが、根の伸長は抑制され、その形態は太く短くなることがこの表および Photo. 10-2 で示されている。

また根長ばかりでなく茎頂の方も 2,4-D 処理では生長の抑制をうけることがはっきりした。2,4-D 10 mg/l を含む培地上では茎頂の伸長生長は著しく阻害された。Photo. 10-1 でみられる例のように茎頂は移植時点の長さ 10 mm のままで伸長しなかった。

ヤマモモ幼苗 20~30 mm の長さにまで伸長したヤマモモの幼茎を切りはなし、IBA のソーダ塩の 100, 1000, 10000 mg/l 各液へ瞬間 (1~2 秒間) 浸漬し、水洗しないで WS 培地のオーキシンを含まないものに挿つけた。対照区は幼茎下部を水に瞬間浸漬してから同一培地に挿しつけた。培養 2 週間後の調査結果を Table 2 で示した。

対照区では発根が見られなかった (Photo. 10-4)。発根率は 100 mg/l に浸漬したもの (Photo. 10-5) がもっとも良好であったが、不定根数では 1000 mg/l 区も良好な成績を示した。しかし 1000 mg/l 区には多少の葉害らしきものが見られた。10000 mg/l は高濃度すぎるようで多くの茎頂は黒褐色を呈して枯死した。これらの結果を総合してみると瞬間浸漬法では 100~1000 mg/l 液への浸漬を目安とすれば良いものと考えられる。

瞬間浸漬法は無菌操作上で多少の困難性を伴うので、これよりも容易な方法として、オーキシンを含有

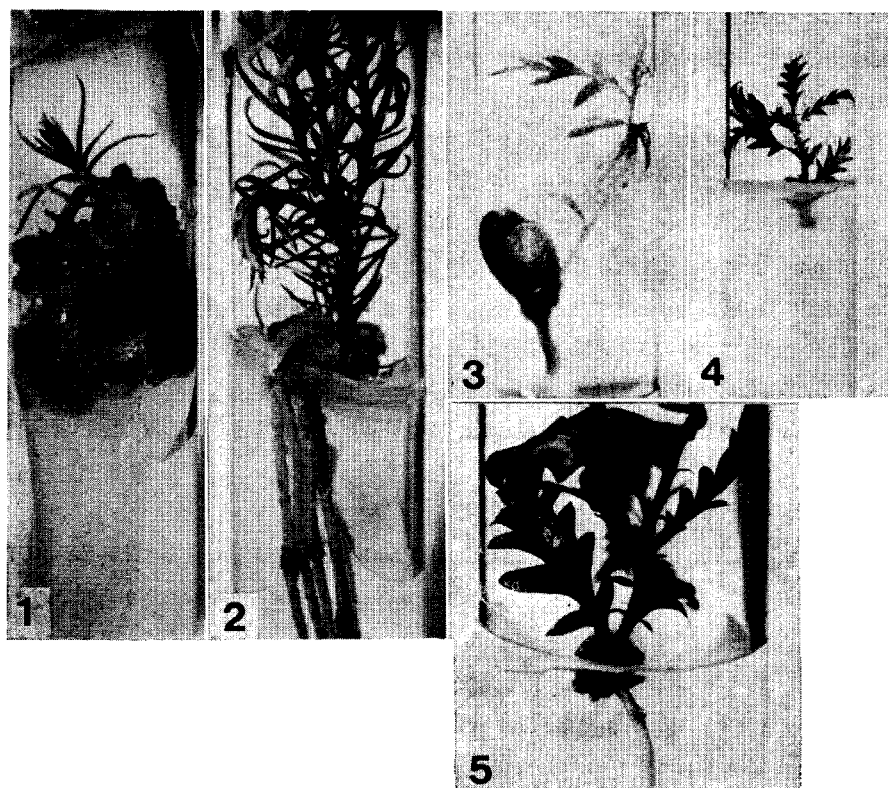


Photo. 10. スギおよびヤマモモ無菌幼苗の茎頂 10 mm の培養と IBA の効果
(スギは 1 か月培養, ヤマモモは 5 週間培養のもの)

Culture of 10 mm-long stem tips of *Cryptomeria japonica* and *Myrica rubra*, and effect of IBA.

1. IBA を 10 mg/l 含有する WS 培地に移植したスギ茎頂。切口近傍から盛んなカルス増殖が見られる。このような高いオーキシン濃度の培地では不定根形成は悪く, カルス増殖が盛んで, 茎頂の伸長生長が停止する 約×2
A shoot tip of *C. japonica* on the WS medium supplemented with 10 mg/l IBA. The tip stops its elongation and shows vigorous callus formation but no root formation.
2. IBA 1 mg/l を含む培地ではカルス形成と不定根形成がともに盛んである。不定根の形態は太く短かい 約×2
The shoot tip shows callus and root formation on the same medium supplemented with 1 mg/l IBA.
3. 発芽後 2～3 週目のヤマモモ無菌苗 約×2
Sterile culture of a *M. rubra* seedling.
4. Photo 10-3 にみられるヤマモモ幼苗の茎頂 15 mm を切除し移植したもの。オーキシンを全く含まない WS 培地を使用。芽はわずかに生長するが発根はみられず, わずかにカルス形成が起る 約×1
Myrica shoot tip (ca. 15 mm long) from the seedling on the WS medium without auxin (left). The stem tip on the same medium without auxins shows poor bud elongation and callus formation, but no root formation.
5. 同様に 15 mm 長のヤマモモ茎頂を切除し IBA 100 mg/l の液に瞬間浸漬したのち WS 培地へ移植したもの。発根が良い。根は太く短くなる 約×3
Vigorous root formation from a 15 mm-long shoot tip cutting of *M. rubra* cultured on the same medium without auxin, but the shoot tip was dipped in a moment into the 100 mg/l IBA solution prior to planting to the agar medium.

Photo. 11.

ヤマモモ茎頂 (15 mm 長) の培養と、IBA の発根促進作用。ほぼ実物大
Culture of 15 mm-long shoot tip of *M. rubra* and effect of IBA.

1. オーキシンを含有しないWS培地に植えつけた茎頂。不定根形成はみられなかった
A shoot tip transplanted on the WS medium without auxin. The tip shows no root formation.
2. IBA 1 mg/l 含有の同培地における盛んな不定根形成
Vigorous root formation of the transplant to the same medium supplemented with 1 mg/l IBA.



する培地で材料を培養する方法、つまり低濃度オーキシソ液へ長期間浸漬したときの効果について調査した。オーキシソ濃度はスギ茎頂の発根に好結果をもたらしたIBAソーダ塩の1 mg/l を用いた。対照区はオーキシソを含まないWS培地とした。約1か月後の発根調査をTable 3に示した。IBA処理区 (Photo. 11-2) は発根率が非常に高く、無処理区 (Photo. 11-1) に比べて不定根の形成数も多かった。

ま と め

スギ成木の小枝の先および頂芽を培養した。この方法では不定根形成は良くなかったが、小枝を利用した他の方法で将来性のある手段を発見した。小枝の先端部3cmを培養していると形態学的には腋芽であるところの潜伏芽が数本伸長してくるので、それを切りはなして培養する方法である。

成木の茎頂培養における不定根形成条件については不明の点が多かったので、材料を発根しやすいと思われる幼苗の茎頂に変え、オーキシソを使用して発根促進効果をみた。

Table 3. ヤマモモ幼茎から採取した15 mm茎頂の培養に及ぼすIBAの発根促進効果 (培養期間約1か月)

Root formation from the 15 mm-long stem tips isolated from young *Myrica* seedlings in the WS medium supplemented with 1 mg/l IBA.

IBA 濃度 (mg/l) IBA concentration	0 (Cont.)	1
発根率 (%) Percentage of rooting	0	100**
平均不定根数 (本) Average number of adventitious roots	0	9.43**

**発根率については χ^2 検定により危険率1%水準で有意。
平均不定根数については発根数の分散分析により危険率1%水準で有意
Significant at 1% level by χ^2 test for percentage of rooting and by variance analysis for root number.

さらに、さし木困難樹種であるヤマモモの幼苗茎頂についても同時に調査した。ヤマモモについても幼苗ではオーキシンによる不定根形成作用が盛んであった。そこでヤマモモも本来はオーキシン処理が有効のはずであると考えられ、さし木発根困難な原因は他の理由によるものであらうと考えられた。

Ⅲ 針葉樹の胚軸培養における不定芽・不定根の人為的発生促進

Ⅲ-1 スギ胚軸からの不定芽形成に及ぼす 6-ベンジルアデニンならびにアブシジン酸 (Abscisic acid 以後 ABA と略す) の作用

(1) 研究目的

第 1 章において述べたようにストローマツの培養カルスからは不定芽も不定根も発生しなかったが、アカマツの胚軸からは不定根の発生が観察できた。そのとき針葉樹においてはカルスからよりは器官からの方が分化が容易であらうと考えた。

またスギについてはすでに述べたように培養カルスでも容易に不定根が発生することが観察されたので、スギを材料として使用することが最適であらうと考えられた。

(2) 材料と方法

スギ胚軸を使用した。無菌胚軸の作り方はⅡ-2において述べた方法を用いた。得られた無菌幼苗の胚軸の部分と幼根だけを使用し、その他の部分は切り捨てた。発芽してから切りはなすまでの期間は 2 週間であった。

実験 A では幼根つきの胚軸 (10 mm) を培養し、実験 B では幼根も切り取った胚軸のみ約 20 mm をさらに 2 等分して 10 mm の円柱を 2 本作り、これを上部胚軸 (胚軸の中央より上の部分を指す。エピコチルのことではない)、下部胚軸 (胚軸の中央より下の部分。幼根に近い方を言う) と名付け使用した。

培養には実験 A, B, C とも WS 培地を使用し、実験 A では NAA だけを添加した場合と、NAA と

Table 4. 明暗 2 区におけるスギ胚軸の培養と ABA, BAP が不定芽形成に及ぼす影響 (培養期間 3 か月)

Adventitious bud formation from the *Cryptomeria* hypocotyl under illuminated condition in the GLINBLAT's medium supplemented with ABA or BAP.

添加物質の種類 Growth substances added to basal medium (mg/l)	各処理区あたりの 不定芽形成率(%) Percent of bud formation per treatment	
	照明区 Illuminated	暗黒区 Dark
ABA 1.0	33	0
ABA 0.1	11	0
BAP 10.0	22	0
BAP 10.0+NAA 0.1	20	13
Cont.	6	0

註: GLINBLAT 培地はマルツエキス (ME) を含有している
GLINBLAT's medium contains malt extract.
実験個体数は 1 区あたり 9~17 本
Hypocotyls used for one plot are 9 to 17.

BAP の両者を添加⁽¹⁶⁾⁽⁸¹⁾⁽⁸⁸⁾した場合とについて調べた。25°C, 1900 ルクス, 14 時間照明の条件下 (明区と名付けた) で実行した。

実験 B では WS 培地の無機塩組成に加えて GRINBLAT 培地⁽⁸⁹⁾の有機微量物質組成 (myo-inositol 100 mg/l, niacinamide 0.5 mg/l, pyridoxine HCl 0.5 mg/l, thiamine HCl 0.1 mg/l, glycine 2.0 mg/l, malt extract 500 mg/l) を使用, sucrose 2%, 寒天 1% を加え, それに ABA⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾あるいは BAP を加えるか, BAP と NAA の両者を同時に加えた場合について調査した。

実験 B だけマルツエキス⁽⁸⁹⁾を使用した。実験 C では修正 WS 培地 (実験 B で使用した培地からマルツエキスだけを除いた) に上部胚軸だけを培養し ABA または BAP の最適作用濃度を

決定するための試験を行った。

(3) 実験結果

培養開始後2か月で実験Aにおける NAA 0.02 mg/l 添加区および対照区において、胚軸から不定芽が発生し始めるのを観察した。

オーキシン類などの生長調整物質類を含まない培地でも、わずかではあるがスギの培養胚軸からは不定芽が発生することを観察した。

培養開始後6か月の不定芽発生率調査では対照区で12%、NAA 0.02 mg/l 含有区で17%であった (Photo. 12-1)。NAA 1.0 mg/l と BAP 0.1 mg/l の含有区では不定芽は形成されず不定根が形成された (Photo. 12-2)。不定芽は胚軸上部の切口付近からも発生したが、とくに決まった部分からというわけではなく、Photo. 12-1 のように胚軸から幼根に移行する部分や、胚軸の下部付近からも発生した。しかし全体としては胚軸上部から発生する場合の方が多かった。

実験Bについては結果を Table 4 および Photo. 12-3, 4, 5 で示した。表からも明らかなように暗黒区ではほとんど不定芽形成は起らなかった。明区で培養の上部胚軸からはかなりの不定芽形成が認められたが、下部胚軸からは不定芽形成が見られなかった。明区の ABA 1 mg/l 区では胚軸の数か所に隆起部が認められ、そこから不定芽が発生してくることがわかった (Photo. 12-3)。また同一濃度区の中でも胚軸に個体差があって、カルス化が非常に進行し、胚軸全体が黄褐色のカルスとなっていくものと、カルス化の少ないものがあった。全体が黄褐色にカルス化する場合でも発生した不定芽だけはしばらく緑色を保っていた (Photo. 12-4)。BAP 10 mg/l 区においては隆起部が乳頭状の突起となり (Photo. 12-5)、その中心部に緑色が周囲よりやや濃い点が出現し、そこから不定芽が伸長して来た。これらの不定芽を切りはなして 0.1~1.0 mg/l 程度の IBA などのオーキシン類を含む培地へ移植すると不定根を形成してやがて幼植物体に生長した。

ABA区とBAP区とにおいては胚軸の下部の培地と接した部分は黒色に見え、この部分は薬害によるためか壊死しているように見えた。

実験Cで行った1.5か月間および3か月間培養の結果を Table 5 および Fig. 1 で示した。

この実験では不定芽形成はABA, BAPともに 1 mg/l の区から始まり、3か月後においてもこの濃度区が最良の成績を保持した。

BAPの 1~10 mg/l 区では3か月間培養で不定芽数において ABA 1 mg/l 区をしのぐようになったが、BAP 10 mg/l 区の不定芽は発生後の伸長生長が非常におそいうえに、6か月間培養では胚軸の約半数が枯死するという結果があらわれたので、処理濃度としては高すぎると判定した。以上のことから最適濃度の範囲は1~5 mg/l が安全であると考えられた。ABAは1 mg/l 区の濃度においてはもっとも高い不定芽形成率を示したが、推計学的検定の結果では危険率5%以内での有意差は認められなかった。

不定根について見るとABAの全処理区について不定根の発生を見ることはできたが、生長が非常にわるく、伸長生長が抑制されているようであった。またBAPでは0.01 mg/l 区において不定根伸長の促進的効果をあらわしたが0.1 mg/l 以上は不定根に対し伸長抑制作用を持ち、さらに0.5 mg/l 以上では発根は全く見られなかった。

結論としては0.1 mg/l 以上のBAPは不定根形成および根の生長に対し、強い阻害作用を示したといえることができる。

Table 5. スギ培養胚軸からの不定芽形成促進と不定根形成抑制に及ぼす

ABAとBAPの濃度別効果

Bud formation and suppression of root formation from *Cryptomeria* hypocotyls by supplement with ABA or BAP in the WS medium.1.5 か月間培養
1.5 month culture

	Cont.	ABA (mg/l)				BAP (mg/l)					
	0	0.5	1	2	4	0.01	0.1	0.5	1	5	10
平均不定芽数 (個) Average number of adventitious buds	0	0.17	0.33	0.22	0	0.08	0	0.08	0.33	0.11	0.17
発芽率 (%) Percent of bud formation	0	17	33	22	0	8	0	8	33	11	17
平均根数 (本) Average number of adventitious buds	0.67	0.33	0.33	0.33	0.42	0.75	0.25	0	0	0	0
発根率 (%) Percent of rooting	67	33	33	33	42	75	17	0	0	0	0
平均根長 (mm) Average root length	11.1	5.7	2.0	2.4	1.8	29.8	0.5	0	0	0	0

3 か月間培養
3 month culture

	Cont.	ABA (mg/l)				BAP (mg/l)					
	0	0.5	1	2	4	0.01	0.1	0.5	1	5	10
平均不定芽数 (個) Average number of adventitious buds	0.08	0.33	0.42	0.22	0	0.1	0	0.33	** 0.78	0.56	** 0.83
発芽率 (%) Percent of bud formation	8	25	42	22	0	8	0	22	** 67	44	* 58
平均根数 (本) Average number of adventitious buds	0.67	0.33	0.42	0.33	0.42	0.75	0.25	0	0	0	0
発根率 (%) Percent of rooting	67	33	42	33	42	75	17	0	0	0	0
平均根長 (mm) Average root length	14.5	6.9	*- 3.0	2.4	*- 1.8	** 48.1	*- 0.5	0	0	0	0

**LSDの検定により危険率1%水準で対照区と比べて有意

Significant at 1% level by LSD test.

* 同上危険率5%水準で有意

Significant at 5% level by LSD test.

註: 平均根長の**印は促進的に, *-印は抑制的に働いたことを示す

The symbols (**) and (*)- indicate "promotive" and "inhibitive", respectively.

実験個体数は1区あたり12本

Hypocotyls used for one plot are 12.

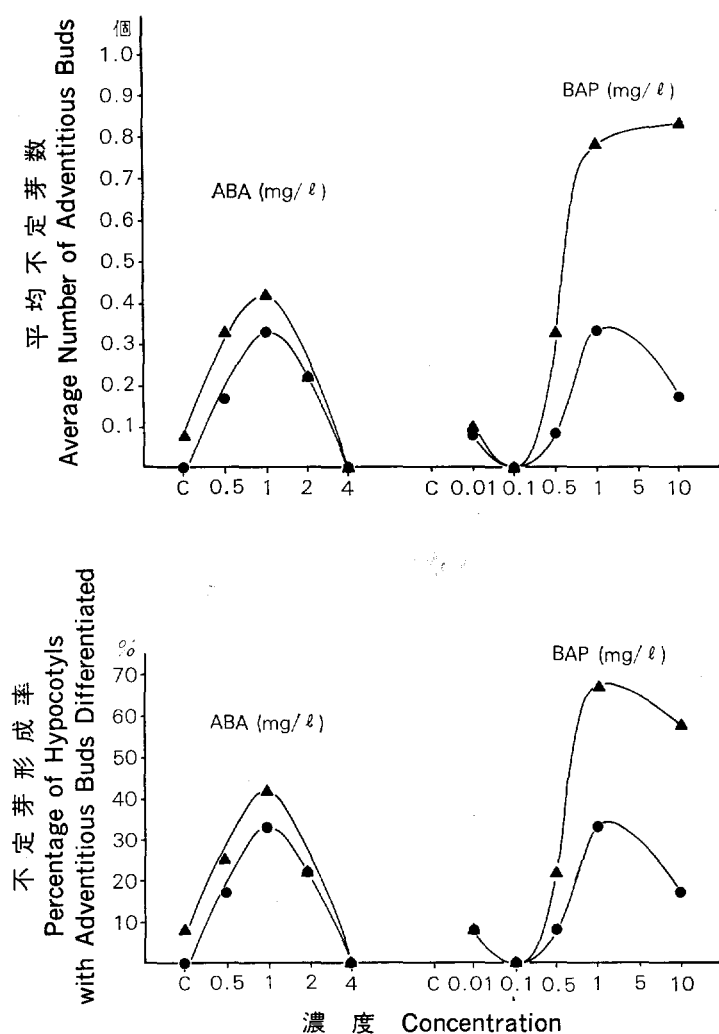


Fig. 1. スギ培養胚軸のアブシジン酸および 6-ベンジルアデニンによる不定芽形成促進

Adventitious bud formation in *Cryptomeria* hypocotyl by abscisic acid or 6-benzylaminopurine.

Circles : after 1.5 months, Triangles : after 3 months.

C in abscissae : control.

Ⅲ-2 スギとヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* SIEB et ZUCC.) の胚軸からの不定根形成に及ぼすオーキシン類の作用

(1) 研究目的

Ⅲ-1 の実験においてスギ胚軸から不定根が形成されることをみた。また I-1 でも示したようにアカマツの胚軸培養で IBA 10 mg/l の濃度が不定根の促進形成に効果的であった。ここではヒノキの胚軸について、オーキシン類で不定根形成促進が可能であるかどうかをスギ胚軸と比較しながら実験し検討することとした。

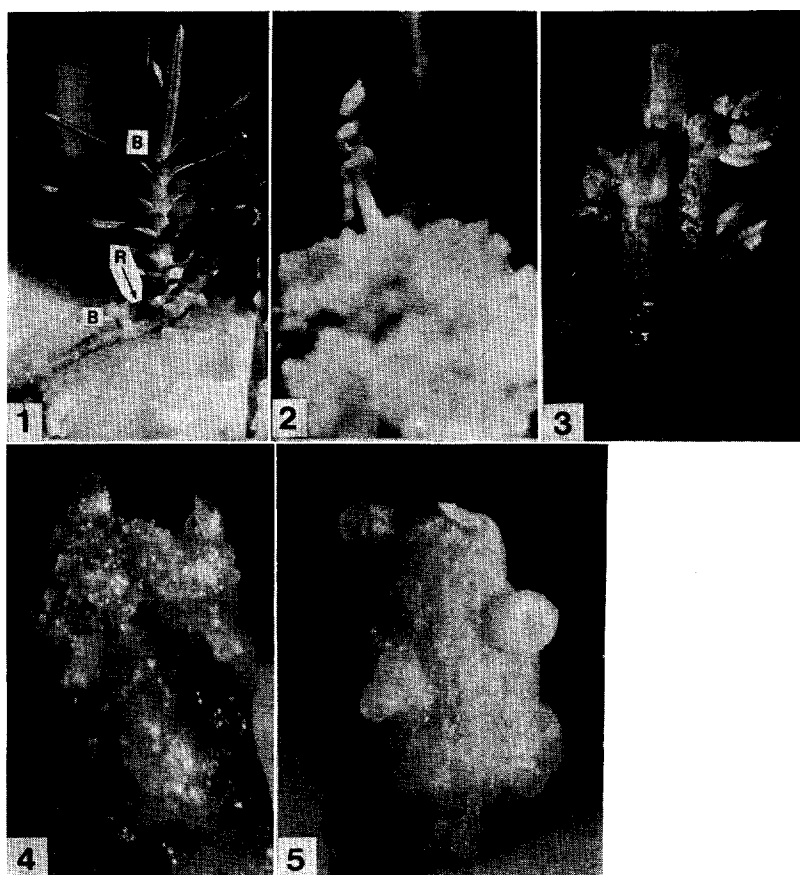


Photo. 12. WS 培地で培養中のスギ胚軸切片からの不定芽と不定根の形成

Adventitious bud and root formation on *Cryptomeria* hypocotyls cultured on the WS medium, and effect of ABA and BAP.

1. NAA 0.02 mg/l を含む培地に幼根が付着したままの胚軸を培養したときに発生した不定芽 (B) と不定芽の基部から発生した不定根 (R) 約×4
Adventitious buds (B) generated from a hypocotyl with radicle. An adventitious bud shows adventitious root formation at its lower part. The hypocotyl and radicle were cultured on the WS medium supplemented with 0.02 mg/l NAA.
2. NAA 1.0 mg/l と BAP 0.1 mg/l の混合区で発生した根状体。胚軸下部はカルス化している 約×3
Root-like structure generated from a hypocotyl which was cultured on the WS medium supplemented with 1.0 mg/l NAA and 0.1 mg/l BAP.
3. ABA 1 mg/l を含む WS 培地で発生した胚軸の膨張と不定芽形成。約 3 か月間培養 約×6
Swelling of hypocotyl and bud formation from a hypocotyl which was cultured on the same medium supplemented with 1 mg/l ABA.
4. ABA 1 mg/l 区で起った胚軸のカルス化と不定芽形成。この胚軸は壊死した 約×6
Callus and bud formation from a hypocotyl which was cultured on the same medium supplemented with 1 mg/l ABA.
5. BAP 10 mg/l 区で発生してイボ状または乳頭状の突起物。その中心にみられるさらに小さな突起物が不定芽の原基。ここから不定芽が伸長する。3.5 か月間培養 約×6
Papilla-like structure generated from a hypocotyl cultured on the same medium supplemented with 10 mg/l BAP. An adventitious bud elongates from the center of the structure.

(2) 材料と方法

この試験も III-1 と同じ方法で作製したスギとヒノキの無菌胚軸の上部 10 mm を試験管内で培養して比較した。修正 WS 培地に NAA 5 mg/l, 2,4-D 1 mg/l, IBA 1 mg/l をそれぞれ添加した 3 種の培地を使用した。培養条件も III-1 と同じである。

(3) 結 果

培養 3 か月後の発根率を Table 6 で示した。1 処理区当たりの試験個体数は 8～20 本であった。Photo. 13 で示すようにすべての区において、胚軸が培地に接した部分からカルス形成が見られ、カルス形成についてだけ見るとスギの方が盛んであった (Photo. 13-1, 3, 5)。ヒノキはカルス形成については劣るが不定根形成はスギよりも多かった (Photo. 13-2, 4, 6)。この培養条件の下ではスギもヒノキもオーキシンの作用により胚軸から不定根形成が見られ、ヒノキの方が刺激を受けやすいことを観察することができた。IBA 1 mg/l ヒノキ胚軸の中には数十本という多数の不定根を形成するものもあった (Photo. 13-6)。

IBA 1 mg/l 区においてのみスギ胚軸の上部切口付近から不定芽が発生した (Photo. 13-5)。この区ではスギ胚軸の上部から不定芽が、培地に接している切口付近からはカルスと不定根が形成された。20 個体中 5 個体にこの現象が見られた。スギの胚軸を IBA の 1 mg/l を含む培地で培養したときは、不定根形成も行われるし、不定芽形成も著しくは阻害されないようであった。いっぽうヒノキ胚軸については同一条件で不定芽形成が全く見られなかった。

III-3 スギ胚軸からの不定芽形成に及ぼすクロールフルレノール (sodium methyl 1-2-chloro-9-hydroxyfluorene-(9)-carboxylate, 以後 CF1 と略す) の作用および, ABA と CF1 との協調作用

(1) 研究目的

BAP がスギ胚軸からの不定芽形成を促進することは III-1 で述べた。スギ培養カルスからの不定根形成の際、NAA と協調作用を示すこともすでに述べた。しかしスギ培養カルスから不定芽を形成するまでには至っていない。したがってカルスからの不定芽形成を促進する物質について調査を進めて行く必要があった。

いっぽうタバコの培養カルスではカイネチン 2 mg/l と CF1 0.1～1.0 mg/l の濃度で協調作用⁷⁷⁷⁷⁸⁾が見られカルスからの苗条発生率が高いことが発見された。そこで不定芽形成の比較的容易なスギ胚軸を用いて、CF1 の不定芽形成促進効果を調べた。

Table 6. スギとヒノキの胚軸培養におけるオーキシン類の不定根形成促進作用 (培養期間 3 か月)

Root formation from *Cryptomeria* and *Chamaecyparis* hypocotyl cultured in the WS medium supplemented with auxins.

オーキシン濃度 (mg/l) Auxin conc.	0 (Cont.)	NAA 5	2,4-D 1	IBA 1
スギ発根率 (%) Rooting percentage of <i>Cryptomeria</i> hypocotyls	0.1	12.5	29.4	65.0
ヒノキ発根率 (%) Rooting percentage of <i>Chamaecyparis</i> hypocotyls	0.3	46.7	100	100

a) スギ胚軸を IBA 1 mg/l で培養した区のみ、不定芽と不定根が同時に発生した。不定芽形成率は 25%

Both adventitious buds and roots were differentiated only in the lot of *Cryptomeria* hypocotyls cultured with the medium containing 1 mg/l of IBA. Percentage of bud formation was 25%.

b) χ^2 検定により、5% の危険率で、ヒノキの発根率がスギの発根率よりも高いといえる

Rooting percentage is higher in *Chamaecyparis* than in *Cryptomeria*, at 5% level by χ^2 test.

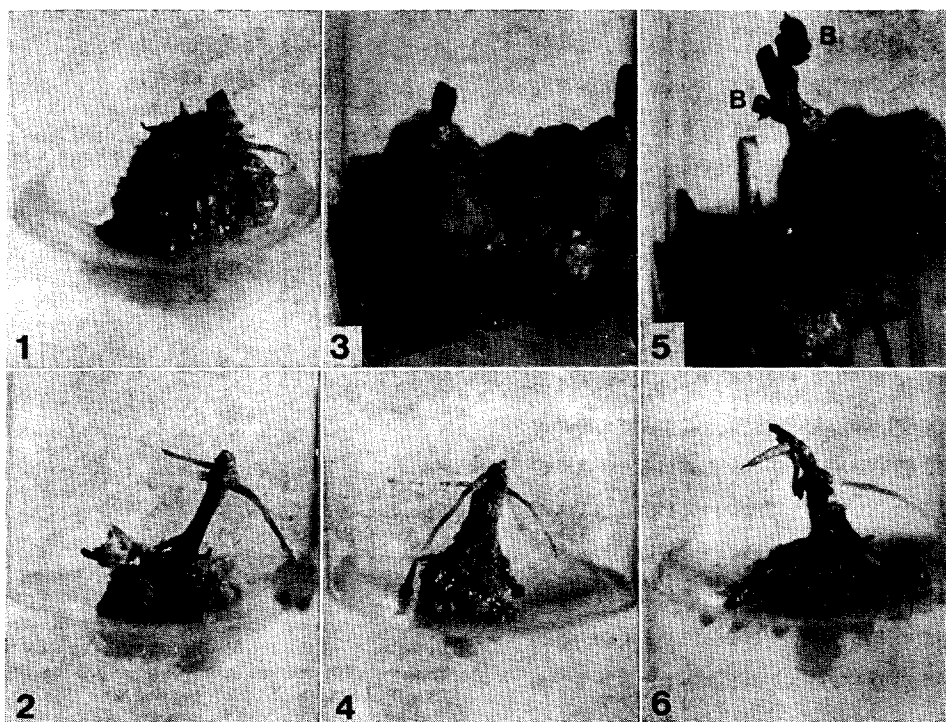


Photo. 13. スギとヒノキの培養胚軸に対するオーキシンの不定根形成とカルス形成促進作用。3 か月間培養。1, 3, 5 はスギ胚軸。2, 4, 6 はヒノキ胚軸。1, 2 は NAA 処理, 3, 4 は 2,4-D 処理, 5, 6 は IBA 処理 約×3.5

Adventitious root and callus formation on a hypocotyl of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* in the WS medium containing auxin.

- スギ胚軸 NAA 5 mg/l 入り WS 培地における盛んなカルス形成。不定根数は小
Vigorous callus formation and poor root formation of a *Cryptomeria* hypocotyl which was cultured on the WS medium supplemented with 5 mg/l NAA.
- ヒノキ胚軸 NAA 5 mg/l 入り WS 培地。スギと比べてカルス形成は小。発根数は大
Poor callus formation and vigorous root formation of a *Chamaecyparis* hypocotyl which was cultured on the same medium supplemented with 5 mg/l NAA.
- スギ胚軸 2,4-D 1 mg/l 入り培地。カルス形成は大。不定根数は小
Vigorous callus formation and poor root formation of a *Cryptomeria* hypocotyl on the same medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D.
- ヒノキ胚軸 2,4-D 1 mg/l 入り培地。カルス形成は小, 不定根多数
Poor callus formation and vigorous root formation of a *Chamaecyparis* hypocotyl on the same medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D.
- スギ胚軸 IBA 1 mg/l 入り培地。カルス形成, 不定根形成ともに大。上方切口付近より不定芽 (B) も発生
Vigorous callus and root formation of a *Cryptomeria* hypocotyl on the same medium supplemented with 1 mg/l IBA. A few adventitious buds were generated from the hypocotyl.
- ヒノキ胚軸 IBA 1 mg/l 入り培地。カルス形成は小。発根数最大
Poor callus formation and more vigorous root formation of a *Chamaecyparis* hypocotyl on the same medium supplemented with 1 mg/l IBA. The hypocotyl shows the greatest number of roots.

(2) 材料と方法

スギ胚軸を材料とし、III-1 で述べた方法を用いスギ胚軸上部 10 mm を切りはなして WS 培地で CF1 の 0.25~2.0 mg/l を含むものに移植した。培養条件は III-2 と同様にした。さらに 0.5~2.5 mg/l の濃度範囲で CF1 を含む培地のそれぞれに BAP の 2 mg/l を同時に添加し、協調作用を調べた。

(3) 実験結果

培養 4 か月後の結果を Table 7 で示した。LSD 検定によって見たところ、不定芽の平均数の比較では有意差が認められなかった。

また、無処理区の不定芽の形態が正常であったのに、CF1 処理区の不定芽はすべて奇形を示した。

Table 7 はスギの培養胚軸に対する BAP と CF1 の協調作用を調査するために 4 か月間培養した結果を示したものである。この試験の結果についても不定芽形成率の面から見ただけでは BAP の効果のみならず、BAP と CF1 の協調作用も全く見られなかった。

しかし不定芽の形成の平均数について見ると BAP 2 mg/l 区と、BAP 2 mg/l+CF1 0.5 mg/l 区において対照区に比べて有意な増加が認められた。この際 CF1 を含有している各区において、奇形的不定芽の発生が見られた (Photo. 14-2, 3, 4)。Photo. 14-2 で見られる不定芽の形態は複雑で説明し難く、同

Table 7. スギ培養胚軸に及ぼす CF1 と BAP の影響

Formation of abnormal shape of bud and suppression of bud generation in *Cryptomeria* hypocotyls by culture medium added with CF1 and BAP.

A. CF1 単独処理 Treatment by CF1 alone

CF1 濃度 (mg/l) CF1 conc.	0 (Cont.)	0.25	0.5	1.0	2.0
不定芽発生率 (%) Percent of bud formation	37.5	55.6	44.4	27.3	10.0
不定芽平均数 (個) Average number of buds	0.50	1.56	0.67	1.00	0.10
不定芽の形態 Shape of buds	正 常 Normal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal

実験個体数 1 区あたり 8~11 本, 培養期間: 4 か月

Hypocotyls used for one plot are 8 to 11. Period for culture: 4 months.

B. CF1, BAP 併用処理 Treatment by CF1 and BAP

BAP と CF1 の濃度 (mg/l) Conc. (BAP+CF1)	0+0 (Cont. 1)	2+0 (Cont. 2)	2+0.5	2+1.0	2+2.5
不定芽発生率 (%) Percent of bud formation	71	60	57	63	18
不定芽平均数 (個) Average number of buds	0.7	1.4	1.4	0.8	0.2
不定芽の形態 Shape of buds	正 常 Normal (伸長はやい Speedy elongation)	正 常 Normal (伸長おそい Slow elongation)	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal

実験個体数 1 区あたり 7~11 本, 培養期間: 4 か月

Hypocotyls used for one plot are 7 to 11. Period for culture: 4 months.

Cont. 1. 完全な無処理区と BAP 2 mg/l だけを加えた区との比較における対照区

Control to the medium only with BAP.

Cont. 2. BAP 2 mg/l だけを添加した培地と、BAP 2 mg/l のほかに CF1 を添加した各培地との比較における対照区

Control to the media with different concentrations of CF1.

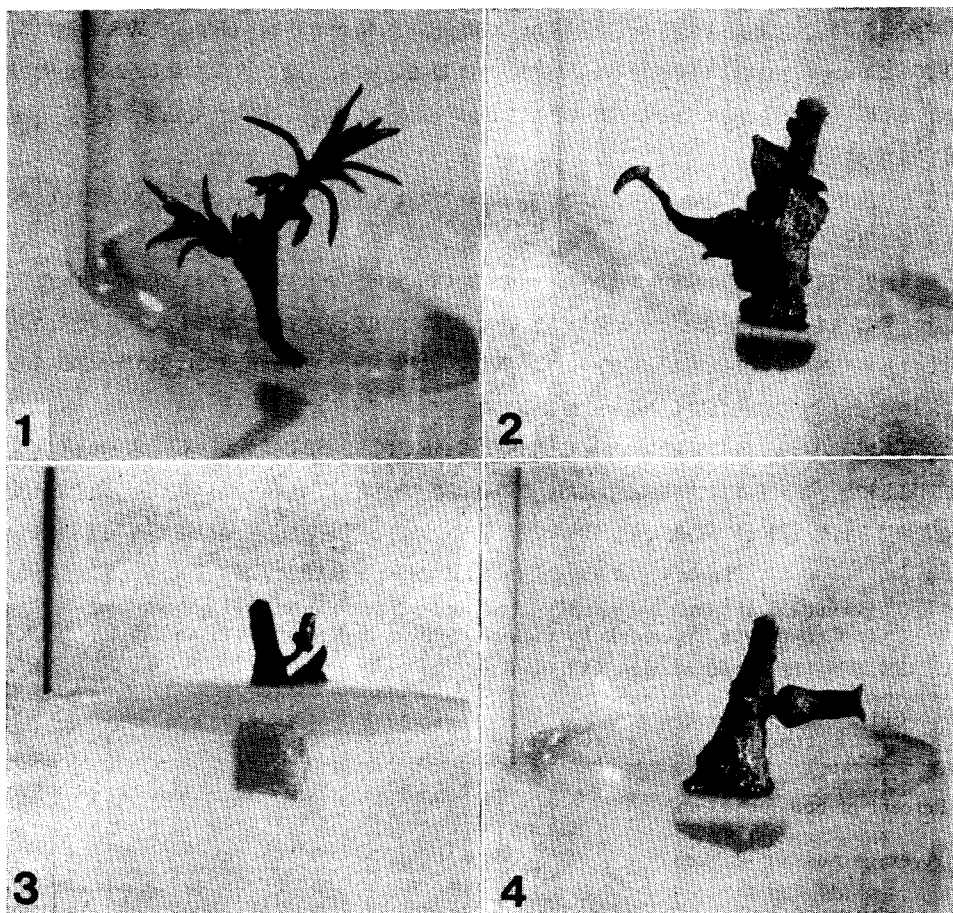


Photo. 14. スギ胚軸からの不定芽形成に及ぼすモルファクチンの作用
4 か月間培養の結果 約×4

Abnormal bud formation on a *Cryptomeria* hypocotyl in the WS medium containing morphactin (CFI).

1. 生長調整物質を含まないWS培地におけるスギ不定芽の形態 (対照区)
Shape of adventitious buds of a hypocotyl cultured on the WS medium without plant growth substances.
2. BAP 2 mg/l+CFI 0.5 mg/l を含む培地における草刈り鎌またはツルの首状をした奇形的不定芽 3. 同じ培地で発生した長い柄をもつ不定芽
2 and 3. Abnormal buds of a hypocotyl on the same medium supplemented with 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l CFI.
4. BAP 2 mg/l+CFI 1.0 mg/l を含む培地で発生した異常形態の不定芽
Abnormal shape of a bud generated from a hypocotyl on the same medium supplemented with 2 mg/l BAP and 1.0 mg/l CFI.

Photo. の 3 と 4 はコップ状を示し、長いものと短かいものがあるがいずれも有柄であった。同時期に無処理区で発生した不定芽 (Photo. 14-1) では生長点の伸長が始まり、幼茎さえかなりでき上っていたが、CFI 含有区の胚軸上不定芽の葉原基などはコップ状の形態の植物器官の内部に納まったままで、外見上の動きは認められなかった。不定根形成は無処理区でのみ見られた。なお幼根からの不定芽の発生を調査するために無菌幼苗の主根の先端 10 mm を BAP 2.0 および 5.0 mg/l 入りの WS 培地で 4 か月間培

Table 8. ヒノキ培養胚軸に及ぼす CF1 と BAP の影響

Formation of abnormal shape of bud and suppression of bud generation in *Chamaecyparis hypocytis* by culture medium added with CF1 and BAP.

A. CF1 単独処理 Treatment by CF1 alone

CF1 濃度 (mg/l) CF1 conc.	0 (Cont.)	0.25	0.5	1.0	2.0
不定芽発生率 (%) Percent of bud formation	25	10	27	0	0
不定芽平均数 (個) Average number of buds	0.25	0.10	0.45	0	0
不定芽の形態 Shape of buds	正 常 Normal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal

実験個体数 1 区あたり 8~13 本, 培養期間: 4 か月

Hypocotyls used for one plot are 8 to 13. Period for culture: 4 months.

B. CF1, BAP 併用処理 Treatment by CF1 and BAP

BAP と CF1 の濃度 (mg/l) Conc. (BAP+CF1)	0+0 (Cont. 1)	2+0 (Cont. 2)	2+0.5	2+1.0	2+2.5
不定芽発生率 (%) Percent of bud formation	25	88*	86*	88*	57
不定芽平均数 (個) Average number of buds	0.50	4.50**	3.71**	2.50**	0.86
不定芽の形態 Shape of buds	正 常 Normal (伸長はやい Speedy elongation)	正 常 Normal (伸長おそい Slow elongation)	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal	異 常 Abnormal

実験個体数 1 区あたり 7~8 本, 培養期間: 4 か月

Hypocotyls used for one plot are 7 to 8. Period for culture: 4 months.

* χ^2 検定により Cont. 1 と比べて危険率 5% 水準で有意

Significant at 5% level by χ^2 test, compared with Cont. 1.

**LSD の検定により Cont. 1 と比べて危険率 1% 水準で有意

Significant at 1% level by LSD test, compared with Cont. 1.

養したが、無処理区を含め変化は現われなかった。

III-4 ヒノキ胚軸からの不定芽形成に及ぼす BAP と CF1 との協調作用

(1) 研究目的

スギの場合と同様な意味において新しい不定芽形成促進物質としての CF1 のヒノキに対する効力の有無と、BAP と CF1 の協調作用について調べた。

(2) 材料と方法

スギの場合と全く同様に種子を殺菌し、25°C で培養した。11 日後に発芽を開始したが胚軸を採取したのは発芽後 18 日たってからであった。胚軸の採取法、培地、培養条件ともスギと同じである。

(3) 実験結果

4 か月間培養の結果を Table 8 で示した。ヒノキは CF1 単独処理では不定芽の発生率が少なかったが BAP の添加により非常に高い発生率を示した。胚軸 1 個あたりの不定芽発生数も増加する傾向を示した。不定芽の形態はスギと同様にコップ状のほかウィングラス状を呈するもの、さらにラッパ状 (Photo. 15-5, 6) のものまであり、筒状の形態の中途からさらにもう 1 個の筒状体が分枝したものもあった (Photo. 15-4)。

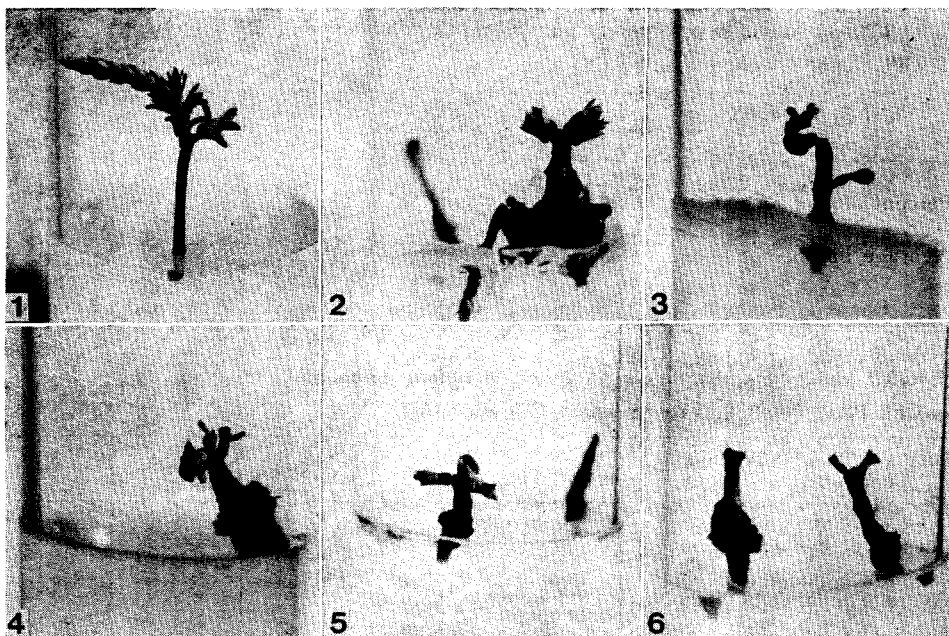


Photo. 15. ヒノキ胚軸からの不定芽形成に及ぼすモルフェクチンの作用
4 か月間培養の結果 約×4

Abnormal bud formation on a *Chamaecyparis* hypocotyl in the WS medium containing morphaction (CF1).

1. 生長調整物質の入らないWS培地でのヒノキ不定芽の形態（対照区）
Shape of adventitious buds generated from a *Chamaecyparis* hypocotyl on the WS medium without plant growth substances.
2. BAP 2 mg/l 区で発生した不定芽（上部切口付近のもの、特に異常は認められない）下部に形成されているのはカルス
Normal shape of adventitious buds generated from a hypocotyl on the same medium supplemented with 2 mg/l BAP.
3. BAP 2 mg/l+CF1 1.0 mg/l で発生した複雑な形態をした奇形的不定芽。
4. 同じ処理区で発生した奇形的不定芽で右側のものは筒状またはコップ状の形態の途中から枝分れして同じ形態のものが発生している
3 and 4. Abnormal shape of adventitious buds of a hypocotyl which was cultured on the same medium supplemented with 2 mg/l BAP and 1.0 mg/l CF1.
5. BAP 2 mg/l+CF1 2.5 mg/l で発生したコップ状の不定芽2個と、コップ形が縦裂して開いたものとなり、内部の不定芽が良く観察できるもの。左向きと右向きのものは芽が伸長生長を開始して、もともとコップ状またはコップ状であったものから芽の先が出現してきた。中央のものは葉原基のほかに幼根らしいものも着いている
6. 同一の培地において発生したラッパ状の形態をした奇形的不定芽
5 and 6. Abnormal buds of a hypocotyl on the same medium supplemented with 2 mg/l BAP and 2.5 mg/l CF1. A bud elongated from inside of the abnormal shape.



Photo. 16. クロマツ胚軸から発生した不定芽
ABA 1 mg/l を含む
WS 培地で 2 か月間
培養の後発生した
約×4

Adventitious bud formation on a *Pinus thunbergii* hypocotyl in the WS medium supplemented with 1 mg/l ABA.

スギの場合もヒノキの場合も、BAP の 2.0 mg/l 単独処理の場合は正常の形態の不定芽発生が見られるが、伸長生長については無処理区と比べ抑制されているようであった。

Photo. 15-5 は BAP 2.0 mg/l + CF1 2.5 mg/l の培地から発生した不定芽で左端のものはコップ状の形態の内部から葉原基が伸長をはじめたところである。中央に見られる不定芽はコップ状の形態のものが裂けて内部構造が偶然にも出現したもので、そこに幼胚状の形態をみることができる。これを *embryo-like structure* もしくは *embryoid* (胚様体) と呼んでも差しつかえないと思われる。この構造は幼根らしきものを有している。

このようなさまざまな形態をしたグラス状のものは形態学的にいったどのような器官の変形したものであるか、はっきりしたことはわからなかった。すでに III-1 で述べたような BAP により発生促進させられたスギ胚軸の *papilla-like shape*⁴⁸⁾ と同じもので、この形態の伸長したものであるとも考えられる。いずれにせよ CF1 と BAP の協調作用によって出現したものらしく現在の段階では奇形的不定芽と呼んでいる。また処理区の芽の伸長生長は無処理区の不定芽と比べてきわめて遅かった。

ヒノキの無菌幼苗の主根を先端から測って 10 mm の長さで切りはなして BAP 2.0 mg/l および BAP 2.0 mg/l + CF1 0.5 mg/l の培地で 4 か月間培養したが、この幼根培養では無処理区を含めすべてに変化はみられなかった。

III-5 マツ類胚軸の培養に及ぼす ABA と BAP の作用

(1) 材料と方法および結果

クロマツとアカマツの胚軸上部 10 mm を WS 培地で培養した。培地には ABA 0.5~4.0 mg/l, BAP 0.01~10 mg/l, NAA 0.01~0.5 mg/l, NAA 1.0 mg/l + BAP 0.1 mg/l の各濃度を添加して試験した。

(2) 実験結果

アカマツについては全く変化なく、クロマツについてののみ ABA 1 mg/l 区においてわずか 12 本中 2 本 (17%) の不定芽形成をみることができた。この不定芽を Photo. 16 で示した。マツ類では 1976 年までの時点では子葉の培養⁴⁶⁾により不定芽の形成を見た例があるだけで、胚軸から発生した不定芽の観察例は始めてのことであるので、写真を付してその形態を示すこととした。現在までのところ、クロマツとアカマツはヒノキやスギと比べ胚軸⁴⁶⁾からの不定芽形成がきわめて困難である。

ま と め

針葉樹類は一般に培養カルスや培養器官から不定芽や不定根の発生が困難であったが、胚軸を利用して不定芽、不定根の発生促進に関する知見を得た。

使用した生長調整物質では ABA が 1 mg/l の濃度でスギにおいてわずかに不定芽形成を促進するように見受けられたが、それよりも BAP 1.0~5.0 mg/l の方が効力が強かった。

ヒノキ胚軸も BAP によって不定芽の形成が促進された。CFI を単独か BAP と共同で作用させるとスギもヒノキも奇形的不定芽を形成した。したがって CFI すなわちモルファクチンと呼ばれる生長調整物質の使用にあたっては十分な注意が必要であろう。

スギとヒノキの胚軸に対して NAA, 2,4-D, IBA で処理すると不定根の形成が見られたが、なかでも IBA によって多量の不定根を形成することがわかった。

以上の実験から林木の胚軸について、不定芽の形成促進を生長調整物質の選び方いかんによってあるていどまで制御できることがわかった。こんごはもっと広範囲に生長調整物質と呼ばれるものについて調査を進め、さらに老木の組織・器官からも不定器官を発生促進させることと、幼植物体を獲得できるように研究する必要がある。

総 合 考 察

林木のカルス培養は 1930 年代からなされてきたが、すくなくとも subculturing に成功したのは広葉樹で 1937 年 (GAUTHERET)⁷⁹⁾、針葉樹で 1950 年 (BALL)⁸⁰⁾であって針葉樹の方がたちおけている。培養カルスからの器官分化成功例のなかでとくに不定芽形成の面から見ると、広葉樹で 1949 年 (JACQUIOT)⁸⁰⁾、針葉樹で 1950 年 (BALL)⁸⁰⁾に始めて行われているが、それからの研究においても針葉樹の成功例は非常に少ない。

とくに老齡樹から採取した組織片を培養し、不定芽を形成させた例は 1976 年まではほとんどない。筆者は最初成木の組織を材料としたが器官再発生において困難性が高かったので juvenile stage のもの、例えばエピコチル (epicotyl)、子葉、胚軸、幼根などを材料とした。この分野の研究では KONAR ら⁸²⁾によりコノテガシワの (*Thuja orientalis* L.) 子葉から胚葉体の発生 (1965 年) が見られたのを最初として、石川⁴⁸⁾は 1974 年にスギの胚軸から不定芽を発生させ、ダイオウショウ (*Pinus palustris* MILL) の子葉からの不定芽発生例 (SOMMER ら, 1975)⁴⁶⁾も報告された。これらの実験では発生した胚葉体や不定芽を母体から切りはなして移植すると幼植物体となった。続いてダグラスモミ (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO.) の胚の切片をカルス化させたものから⁴⁷⁾とアメリカツガ (*Tsuga heterophylla* SARGENT) の子葉 (CHENG, 1976)⁸¹⁾およびダグラスモミの子葉⁸²⁾からも不定芽を誘発させることに成功するようになった。このように近年になってから幼齡の材料を用いての器官分化の成功例が続々と報告されている。また幼苗の茎頂や胚軸からの不定根形成についてもオーキシン類を使用すると促進効果の高いことが判明した。したがって現在ではスギとヒノキの胚軸から、生長調整物質の選び方いかんによって不定芽と不定根を人為的に発生させることができる。スギ胚軸からの不定芽発生には ABA と BAP とを用いたが、ABA は BAP にくらべて効果がうすいようであった。モルファクチン (CFI) はタバコを材料とした場合にくらべて不定芽発生の促進効果はうすく、針葉樹胚軸に対しては奇形的不定芽を発生させた。奇形的不定芽発生の作用は CFI と BAP と同時使用のとき協調作用を起し増大するようであった。小倉⁷⁷⁾の実験によると CFI によりタバコカルスから発生した幼植物体の中のいくつかは dwarfism を起した。これらの事

例から CF1 は植物に対して異常現象を起させるのではなからうかと考えられる。成木の培養カルスからの不定芽形成条件の探索はこんども続けられなければならないが、成功の可能性をもつ生長調整物質として BAP の類縁化合物である 6-3-メチル-2-ブテニルアミノプリン (2iP)⁴⁷⁾ やベンツアントラセン⁸⁸⁾ など、いままでに各種の植物に用いて不定芽発生に成功したことのある薬品に注意を向けて調査する必要がある。

引用文献

- 1) 石川広隆・草下正夫：林試研報，116，59～64，(1959)
- 2) ————：林木の育種，10，2～3，(1959)
- 3) ————・大橋弘毅：林試研報，119，59～65，(1960)
- 4) ————：林試研報，135，49～52，(1962)
- 5) ————：日林講，72，223～226，(1962)
- 6) ————：日林講，74，215～217，(1963)
- 7) ————：日林講，75，232～234，(1964)
- 8) ————：日林講，76，193～196，(1965)
- 9) ————：日林講，77，177～179，(1966)
- 10) ————：新花卉，59，10～13，(1968)
- 11) ————：林試研報，214，77～109，(1968)
- 12) TODA, R. and H. ISIKAWA : *Agronomia Lusitana*, 32, 319～336, (1971)
- 13) JAQUIOT, C. : *C. R. Acad. Sci.*, 247, 1489～1492, (1958)
- 14) NEKRASOVA, T. V. : *Soviet Plant Physiol.*, 11, 107～113, (1964)
- 15) WINTON, L. L. : *Amer. J. Bot.*, 55, 159～167, (1968)
- 16) WOLTER, K. E. : *Nature*, 219, 509～510, (1968)
- 17) 森 寛一・下村 徹・浜上悦次・池上雍春：農事試研報，13，1～92，(1969)
- 18) ELLIOTT, R. F. : *Planta*, 95, 183～186, (1970)
- 19) OHYAMA, K. : *JARQ*, 5, 30～34, (1970)
- 20) ROMBERGER, J. A. and C. A. TABOR : *Amet. J. Bot.*, 58, 131～140, (1971)
- 21) ELLIOTT, R. F. : *N. Z. J. Bot.*, 10, 254～258, (1972)
- 22) 岡 成美・大山勝夫：日蚕雑，42，317～324，(1973)
- 23) ————・———：日蚕雑，43，230～235，(1974)
- 24) ALTMAN, A. and R. GREN : *Physiol. Plant.*, 30, 240～245, (1974)
- 25) 町田英夫・大石 惇・細井寅三・河合博史：静大農研報，24，15～21，(1974)
- 26) ROMBERGER, J. A. and C. A. TABOR : *Ames. J. Bot.*, 62, 610～617, (1975)
- 27) KITAHARA, E. H. and L. S. CALDAS : *For. Sci.*, 21, 242～243, (1975)
- 28) GAUTHERET, R. J. : *C. R. Acad. Sci.*, 210, 632～634, (1940)
- 29) JACQUIOT, C. : *C. R. Acad. Sci.*, 229, 529～530, (1949)
- 30) SEELIGER, I. : *Flora*, 148, 218～254, (1959)
- 31) MATHES, M. : *Phyton*, 21, 137～141, (1964)
- 32) KONAR, R. N. and Y. P. OBEROI : *Phytomorph.*, 15, 137～140, (1965)
- 33) WINTON, L. L. : *Science*, 160, 1234～1235, (1968)
- 34) ANEJA, S. and C. K. ATAL : *Curr. Sci.*, 38, 69, (1969)

- 35) WINTON, L. L. : Amer. J. Bot., 57, 904~909, (1970)
- 36) ——— : For. Sci., 17, 348~350, (1971)
- 37) HU, C. Y. and I. M. SUSSEX : Phytomorph., 21, 103~107, (1971)
- 38) WINTON, L. L. : For. Sci., 18, 151~154, (1972)
- 39) GRINBLAT, U. : J. Amer. Soc. Hort. Sci., 97, 599~603, (1972)
- 40) 横山奉三郎 : 植物の化学調節, 8, 97~100, (1973)
- 41) 岡 成美・大山勝夫 : 日作紀, 43, 289~290, (1974)
- 42) MEHRA, A. and P. N. MEHRA : Bot. Gaz., 135, 61~73, (1974)
- 43) ISIKAWA, H. : Bot. Mag. Tokyo, 87, 73~77, (1974)
- 44) 佐藤 亨 : 日林誌, 56, 55~62, (1974)
- 45) VARDI, A., P. SPIEGEL-ROY and E. GALUN : Plant Sci. Lett., 4, 231~236, (1975)
- 46) SOMMER, H. E., C. L. BROWN and P. P. KORMANIK : Bot. Gaz., 136, 196~200, (1975)
- 47) CHENG, T. Y. : Plant Sci. Lett., 5, 97~102, (1975)
- 48) ISIKAWA, H. : IUFRO Genetics-SABRAO Joint Symposia, Tokyo, D-2, 1-13, (1972)
- 49) 石川広隆 : 材料, 24, 806~815, (1975)
- 50) ——— : 遺伝, 29, 41~49, (1975)
- 51) HASEGAWA, M., T. HIGUCHI and H. ISIKAWA : Plant and Cell Physiol., 1, 173~182, (1960)
- 52) HIGUCHI, T., H. ISIKAWA and M. HASEGAWA : 木材誌, 6, 229~232, (1960)
- 53) 石川広隆・矢沢静江・塙 順 : 日林講, 74, 227~229, (1963)
- 54) ———・———・宿谷文平 : 日林講, 74, 230~231, (1963)
- 55) 戸田良吉・石川広隆 : 科学, 21, 598, (1951)
- 56) ISIKAWA, H. : 日林誌, 38, 5~7, (1956)
- 57) REINERT, J. and P. R. WHITE : Physiol. Plant., 9, 177~189, (1956)
- 58) SLANKIS, V. : Physiol. Plant., 1, 278~289, (1948)
- 59) 戸田良吉・石川広隆 : 日林誌, 33, 312, (1951)
- 60) WHITE, P. R. : Plant Physiol., 9, 585~600, (1934)
- 61) WOLTER, K. E. and F. SKOOG : Amer. J. Bot., 53, 263~269, (1966)
- 62) BONNER, J. : Bull. Torrey Bot. Club, 69, 130~133, (1942)
- 63) SLANKIS, V. : Physiol. Plant., 2, 131~137, (1949)
- 64) SEELIGER, I. : Flora, Jena, 144, 47~83, (1956)
- 65) BARNES, R. L. and A. W. NAYLOR : For. Sci., 5, 158~168, (1959)
- 66) ———・——— : Physiol. Plant., 12, 82~89, (1959)
- 67) ULRICH, J. M. : Physiol. Plant., 15, 59~71, (1962)
- 68) BACHELARD, E. P. : and B. B. STOWE : Physiol. Plant., 16, 20~30, (1963)
- 69) 山田卓三・篠遠喜人 : 染色体, 67, 2215~2280, (1967)
- 70) ———・——— : 染色体, 69~70, 2271~2280, (1967)
- 71) NIIZEKI, M. and W. F. GRANT : Canad. J. Bot., 49, 2041~2051, (1971)
- 72) 矢沢静江 : 東女大論集, 22, 281~291, (1972)
- 73) EARLE, E. D. and R. W. LANGHANS : J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99, 352~358, (1974)
- 74) HEIDE, O. M. : Nature, 219, 960~961, (1968)
- 75) CHIN, T. Y., M. M. MEYER and L. BEEVERS : Planta, 88, 192~196, (1969)
- 76) 山口俊彦・中島哲夫 : 日作紀, 41, 531~532, (1972)
- 77) OGURA, H. : Bot. Mag. Tokyo, 88, 1~8, (1975)
- 78) ——— : Plant. and Cell Physiol., 16, 563~569, (1975)

- 79) GAUTHERET, R. J. : C. R. Acad. Sci., **205**, 572~574, (1937)
- 80) BALL, E. : Growth, **14**, 295~325, (1950)
- 81) CHENG, T. Y. : Plant and Cell Physiol., **17**, 1347~1350, (1976)
- 82) ——— : Science, **198**, 306~307, (1977)
- 83) KOCHHAR, T. S., P. R. BHALLA and P. S. SABHARWAL : Planta, **94**, 246~249, (1970)

Generation of Adventitious Plant Organs by Tissue Culture Methods in Forest Trees

Hiroataka ISIKAWA⁽¹⁾

Summary

The tissue and organ culture has rapidly been improved as a new method for the vegetative propagation of woody species. The present study was carried out to obtain the plantlets from cultured callus and organ.

Cambial explants from branchlets of *Pinus strobus* and *Paulownia tomentosa* produced callus in the REINERT and WHITE'S medium, but did not develop the organ. In *Cryptomeria japonica* the callus formation followed by root formation was observed after approximately 5 months of culture in the modified WOLTER and SKOOG'S medium supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) 1×10^{-6} M or 8×10^{-6} M in addition to potassium naphthalene-1-acetate (NAA) 1×10^{-6} M.

The root culture was made with *Robinia pseudacacia* and *Pinus densiflora*. For the *Robinia* root tip culture, the seven different media added with each of the following sugars in 2% concentration : glucose, mannose, galactose, fructose, lactose, maltose, and sucrose to the WHITE'S medium were applied. The material root tips were incubated at 25°C during the experiment period. The results showed that glucose and fructose were more suitable than the other sugars as a C-source for the *Robinia* root tip culture. In the sucrose, maltose, and mannose media, roots grew to some extent, but in both the galactose and lactose media the root elongation was almost completely inhibited.

The roots in the galactose and lactose media turned brown in color and died in a few days, while the roots in the control solution without a C-source remained white. For the *Pinus densiflora* root tip culture, the modified SLANKIS' media supplemented with adenosine triphosphate, nicotinic acid, or pyridoxine in addition to nicotinic acid were used. The material roots were cultured at 25–30°C. The result showed that pyridoxine and nicotinic acid were effective as growth promoting substances for culturing root tips of Japanese red pine.

Winter buds isolated from *Cryptomeria* trees did not develop any new shoots and roots. On the other hand, in the sterile culture of 3 cm branchlet cuttings, root formation was occasionally observed, and many axillary buds developed from the axil of leaves in both rooted and non-rooted branchlets in the test tube. The developed axillary buds were isolated and transplanted on the new medium, and then some of them developed adventitious roots. In the explanting of the primordium of the axillary bud, a vigorous callus formation was observed and the multiple shoots were formed in some of the calli on rare occasions. These shoots were individually cultured and all of them developed into plantlets. Modified WOLTER and SKOOG'S medium was mainly used in both the above and as well as the following

Received March, 29, 1986

(1) Silviculture Division

experiments.

The experiment was carried out to induce adventitious bud and root from the isolated organs of young seedlings by the use of plant growth regulators. Stem tips of young *Cryptomeria* seedlings differentiated vigorous roots by IBA and IAA among four auxins tested. Optimum concentration of IBA and IAA was 1 mg/l in rooting percentage, and 1 mg/l of IBA and 10 mg/l of IAA in the generated number of roots.

Myrica rubra is one of the broadleaf trees which have difficulty in the adventitious root formation of cuttings. In the micropropagation by stem tip cutting of *Myrica* seedling, the cuttings produced numerous roots successfully in the culture medium containing 1 mg/l of IBA. Through short time dipping treatment for the cut surface of stem tip cuttings excised from young *Myrica* seedlings, they showed maximum rooting percentage in the IBA-rich solution on the concentration of 100–1000 mg/l among 0–10000 mg/l.

The development of adventitious buds and roots on the hypocotyl section of *Cryptomeria japonica* was also observed *in vitro*. The addition of ABA (1 mg/l) or BAP (1–10 mg/l) to the culture medium promoted bud formation (Fig. 1), but inhibited rooting.

Morphactin treatment at the concentration of 0.25–2.0 mg/l of CF1 caused the formation of monstrous adventitious buds on the hypocotyl sections which were excised from the young *Cryptomeria* seedlings.

In the culture of *Chamaecyparis obtusa* hypocotyl, BAP at the concentration of 2 mg/l was quite effective to bud formation. Monstrous adventitious buds were generated on the *Chamaecyparis* hypocotyls as well as on the *Cryptomeria* hypocotyls by the action of morphactin. The number of abnormal buds increased by the addition of BAP to the medium containing morphactin. Influence of morphactin on the formation of monstrous buds on the hypocotyl was stronger with *Chamaecyparis* than with *Cryptomeria*.

Adventitious root formation in *Cryptomeria* and *Chamaecyparis* hypocotyl was promoted best by 1 mg/l of IBA among three kinds of auxins used at a concentration of 5 mg/l of NAA, 1 mg/l of 2,4-D, and 1 mg/l of IBA. In the present experiment, the adventitious root formation in any auxin was superior on the *Chamaecyparis* hypocotyl than on the *Cryptomeria* hypocotyl.

Bud formation on the hypocotyls of *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* was not successful, but a few buds were formed on *Pinus thunbergii* hypocotyl cultured on the medium supplemented with 1 mg/l ABA.