

樹木の器官・カルス培養の基礎的研究

佐藤 亨⁽¹⁾

SATO, Toru : Basic Studies of Organ and Callus Culture
in Woody Plants

要 旨 : 組織培養によるクローン増殖法を数種の樹木に適用し、器官培養とカルス培養によって幼植物体を得る方法を確立した。

器官培養においては、まず芽生えの組織器官からの植物体再生を試みた。スギの芽生えの子葉・胚軸と幼芽部分を外植体として植物体を再生できたが、幼芽部分から得られた植物体数が最高であった。クヌギ堅果芽生えから伸長した上胚軸を外植体として、初代培養の結果、上胚軸の鱗片葉着生部位からのみ、芽やシュートの発生を認め、継代培養によって堅果当たり平均 400 本の植物体を得られた。シラカンバの試験管で育成した幼植物体の葉柄から苗条原基を得るための鉄分は、成木の葉柄からの苗条原基を作成するよりも低濃度でよかった。成木シナミザクラの新梢の培養では、試験管よりも三角フラスコでシュートを多く発生した。成木クヌギの節つき茎軸の初代培養では、培地の種類による開芽伸長の差がみられ、また継代培養では培地への硫黄の増量によって、シュートのネクロシスを押さえることができた。

カルス培養では、スギの未熟種子から、クロマツの胚軸及び、ポプラ類の新梢形成層からよくカルスを誘導できた。スギカルスから根の発生をみたが、クロマツでは器官再生はみられなかった。ポプラ類のカルスからはよく植物体の再生ができ、継代培養カルスの植物体再生能力は 2.7~4.9 年持続した。そして、カルスの状態で 3.5~8 年間保存できた。

目 次

1 はじめに	36
1.1 組織培養の研究史	36
1.2 研究目的と背景	38
2 供試材料と方法	39
2.1 供試材料	39
2.1.1 本研究でとりあげた樹種	39
2.1.2 器官培養に用いた外植体	40
2.1.3 カルス誘導に用いた外植体	40
2.2 培地の組成と調製	40
2.2.1 基本培地の組成と適用樹種	40
2.2.2 培地の調製	41
3 器官培養	44
3.1 スギ及びクヌギの芽生えからの器官分化	44

3.1.1	ス	ギ	44	
3.1.2	ク	ヌ	ギ	49
3.2	試験管内養成シラカンバ幼植物体の葉柄からの器官分化		57	
3.3	シナミザクラ及びクヌギ成木組織からの器官分化		65	
3.3.1	シナミザクラ		65	
3.3.2	ク	ヌ	ギ	68
4	カルス培養		78	
4.1	スギ、クロマツ及びポプラ類のカルス誘導		78	
4.1.1	ス	ギ	78	
4.1.2	クロマツ		79	
4.1.3	雑種ヤマナラシ		80	
4.1.4	その他のポプラ類		80	
4.2	スギ及びポプラ類のカルスからの器官再生		81	
4.2.1	ス	ギ	81	
4.2.2	雑種ヤマナラシ		84	
4.2.3	その他のポプラ類		89	
4.3	カルスの継代培養に適した培地組成及びカルスの培養保存可能日数と 器官再分化能持続期間		94	
4.3.1	ス	ギ	95	
4.3.2	クロマツ		98	
4.3.3	ポプラ類		101	
5	ま と め		109	
	謝 辞		111	
	引用文献		112	
	Summary		117	

1 は じ め に

1.1 組織培養の研究史

樹木を対象にした組織培養の研究は、1924年に SCHMIDT によってマツ属、トウヒ属、及びコノテガシワ属植物の胚培養が行われたのがその始まりである (BROWN and SOMMER, 1975)。広葉樹でも、TUKEY (1933) によるサクラ類の胚培養が行われた。そして樹木を材料としたカルス形成では、GAUTHERET が 1934 年に、ヤマネコヤナギとアメリカヤマナラシの形成層組織の切片の培養によって成功した。しかし、残念ながら植物ホルモンがまだ発見されていなかったため、継代培養は永続しなかった (鎌田・原田, 1985)。

1937年に植物ホルモンの一つ、インドール酢酸 (IAA) が使用されるようになって以来、カルス培

養を主体にした組織培養が進められた。しかし、材料は農作物を中心にした草本植物が主流を占め、樹木では BROWN and SOMMER (1975) や WINTON (1972 a; 1972 b) のレビューによっても分かるように、針葉樹や広葉樹の胚培養やカルス培養が細々と行われていたにすぎず、そのため、樹木の場合は草本植物のような発展がみられなかった。その理由を BONGA and DURZAN (1985) は、1) 樹木の生活環は長期にわたり、2) 外植体として胚や幼植物体を使うよりも、野外の成木から外植体が採られることが多いために生理的変動が大きく、3) 遺伝的変動が大きいため、実験結果の予想をたてにくく、4) 周期的に成木の組織をガラス器内に収容できない。そして、5) 野外に育った材料から採った外植体の組織内には細菌やバクテリアなどの汚染物が多く含まれ、それらの除去は困難か、しばしば不可能に近いことなどを挙げている。

このほかに、樹木にはポリフェノール性物質や有機酸が含まれている樹種が多いため、外植体として採取・切断した場合、細胞の破壊によってこれらの物質が細胞外に流出・酸化し、組織の活性を低下させてしまう (斉藤, 1986; 1987)。このことは、胚や芽生えなどはそれらの含量が少ないが、成木になるにつれて含量が多くなることを示している。そして、これは上述の2)の生理的変動によって、外植体として胚や芽生えの培養は容易であっても、成木を用いた場合には培養が難しいことを意味する。

もう一つの問題は、草本植物の組織培養の先駆的な研究が盛んになった時期の培地は、すべて一年生植物の組織培養のために処方されていたが、多年生の本木植物である樹木の組織培養においても、同じ培地が使われてきたことである。すなわち、培地問題に加えて、さきに述べた外植体の生理的違いや遺伝的違いが、培養結果を大きく左右したことが考えられる。

その後、樹木の組織培養の研究は多数行われるようになったが、はかばかしい進歩はなかった。この間、STONE and DUFFIELD (1950) によって、五葉松類の交配種子の胚を無菌培養して耐病性の交雑苗を得たことが報告された。1968年には、WOLTER と WINTON によりそれぞれ別個に、発根の難しいヤマナラシ (aspen) 系ポプラのカルス培養によるシュートと根の分化が報告され、これを機に、樹木の組織培養に関する研究が急速に発展した。そして1970年代に入って、研究者の増加もあって、樹木の組織培養の試験研究は進展し、組織・器官からの植物体再生が1978年までに、被子植物37種、裸子植物18種で成功するに至った (WINTON, 1978)。その後、植物体再生に成功した種数は急増し、約10年後の1987年に至って、被子植物で25科以上の185種、裸子植物で9科、48種の多数になった (斉藤, 1987)。

本木植物における組織培養の利用分野としては、育種の分野と生理の分野が考えられる。

育種の利用分野については、組織培養手段を用いた大量増殖の実地利用が、aspen系ポプラとその雑種 (AHUJA, 1983; BAROCKA et al. 1985)、ユーカリ (高山, 1989)、ラジアータマツ (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984; 石井, 1986)、ダグラスモミ (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984; 農林水産技術会議, 1982)、センペルセコイア (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984; 農林水産技術会議, 1982) 及びテーダマツとフランス海岸松 (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984) において、実用的な段階に達した。最近では、ブナ (AHUJA, 1984)、コウゾ (OKA and OHYAMA, 1985)、カンバ (SMITH and McCOWN, 1983)、ニレ類 (REDENBAUGH et al. 1981; STICKLEN et al. 1986) 及び

ポプラ類 (RUSSEL and McCOWN, 1986; SAITO et al, 1987, 1988) のプロトプラストの培養による植物再生あるいはサスペンション培養による体細胞胚様体の分化方法が確立され、細胞融合による雑種樹木の作出も間近いものと思われる。また、薬培養による半数体植物の育成も、ポプラ属を主体としながら徐々に進行している。

一方、生理の分野では、細胞レベルでの各種耐性に対する選抜や、養分要求性などの研究が開始されている。特に器官培養は、対象とする器官の成長、発育に及ぼす栄養、並びに環境要因を研究するための有効な手段となっている。それぞれの樹種に適した培地の探索や、添加する植物成長調節物質の種類と濃度などの研究が急速に進んでいる。そして、樹木の各種器官、頂芽や腋芽、あるいはカサの培養が行われ、シュートの発生・展開とそれらからの発根等に及ぼす好適条件が明らかにされつつある。

1.2 研究目的と背景

昭和32年度から発足した精英樹選抜育種事業は、我が国の森林の量的、質的な向上を目指したもので、最初、有用人工造林樹種である法定7樹種、すなわちスギ、ヒノキ、アカマツ、クロマツ、カラマツ、エゾマツ、トドマツを主体にした集団選抜であった。精英樹選抜育種事業のなかで選ばれた優良個体群をつぎ木やさし木で増殖し、採種園・採穂園を造成し、事業用の種苗を生産した。また、天然林を収穫した高標高地への拡大造林に伴って顕著になった造林木の気象災害への対応策の一つとして、昭和45年からスギ、ヒノキ等の気象害抵抗性育種事業（雪害、凍害、寒風害）が始まった。つぎに、昭和53年から、西日本のマツ枯れ対策の一つとしてマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業が、さらにシイタケ原木生産のため、シイタケ原木育種事業（クヌギ、コナラ）が発足した。続いて、カラマツの材質育種（繊維傾斜角度が小さく、材がねじれないものの選抜）が行われた。また、スギ、ヒノキの穿孔性害虫（スギカミカリ、スギザイノタマバエ）、ヒノキの漏脂病、カラマツ根株心腐病、トドマツ枝枯れ病などに関する育種的調査が行われ、穿孔性害虫については抵抗性育種がすでに開始されている。

これらの各種育種事業においてはそれぞれ成長、材質、抵抗性等について優れた個体が多数選抜されたが、精英樹による採種園・採穂園産の種苗が事業用種苗の約4割をまかなっている以外は造林普及が極めて低率の状態にある。特に、シイタケ原木用のクヌギの選抜個体、カラマツの優良材質個体による採種園が造成されたにもかかわらず、結実が悪く、また、つぎ木不和合性等のため普及増殖が困難である。このため、昭和60年度から林木の組織培養技術事業化プロジェクト（対象樹種はクヌギ、コナラ、ウダイカンバ、ミズナラ、ハゼほか）が、次いで61年度から地域バイテク研究開発プロジェクトとして、組織培養による優良個体の増殖技術の開発が、主としてシイタケ原木のクヌギ、コナラ、ミズナラなどを対象として発足し、林業試験場（現森林総合研究所）の技術指導のもとに、国立林木育種場、都道府県林業試験場が協力して研究に着手した。

ひるがえって、樹木には他の農作物と違って、長い生育期間、大きな樹体、大きい遺伝的変異、成熟・結実年齢に達するまでに長い年月を要すること、林地での被害防除が困難なことなど、育種事業及び研究の実施上多くのリスクがある。従って、林木育種には長期的な展望と多額の投資を必要とするのが常である。このため、次代検定の労力・経費を極力節減できるように、それぞれの地域適応性を重視した地域区分を行い、優良成熟木の集団選抜を育種の基本方式としてきた。しかし、現実の育種事業では

増殖に難点があることが明らかになってきた。大庭(1984)は、これらの不利をカバーするには、検定済みの育成品種を普及に移す農作物の育種とは大きく異なり、成長、材質、各種抵抗性等の複合した形質をもつ優良木を経常的に選抜し、あるいは交配し、増殖普及し、その事業造林を行うなかで事後検証的に次代検定を行うべきであり、そのためには材料の急速・大量増殖技術が重要ポイントであると述べた。さらに、BURDON(1982)、LIBBY(1983)らはクローン利用林業の長所と短所をまとめ、育種目標の多様化、複合化に対して、クローン化技術を利用した林木育種の新展開を説き、クローンの急速・大量増殖のための組織培養法の利用を期待している。

同様に、BONGA(1985)は、林木育種における組織培養による無性繁殖の重要性について述べたうえで、有性生殖による数世代にわたる育種で得られる遺伝獲得量よりも、選抜個体を無性繁殖して用いた場合の獲得量が大いこと、クローンの大量増殖によって育種結果が生産性向上に直結することを説明している。さらに、斉藤(1985c)は、林木の育種年限を短縮するために組織培養を利用するうえで当面推進すべき課題として、優良個体の大量増殖、林木の環境適応性の増大、変異の拡大、さし木・つぎ木の困難な個体のクローン増殖の4点を挙げている。

樹木の育種においては、次代検定を極力避けるか、軽い検定で済ますことが極めて重要である。その意味で集団選抜があり、選抜個体のクローン増殖が大きくクローズアップされてくる。樹木における長期的対応としては、新しい遺伝変異の創出の研究がなされなければならないが、短期的対応として、優良個体の大量増殖の研究が挙げられる。前述のBONGA(1985)や斉藤(1985c)の考え方は組織培養によるクローン大量増殖法を用いることにより、LIBBY(1983)、大庭(1985)らが示すクローン林業の実現に大きな可能性を付与するものといえよう。このような考え方から、樹木における組織培養技術の開発が望まれる。

本研究は、昭和40年代後半から着手した樹木の組織培養の結果を総合的にとりまとめたものである。すなわち、まず1)各樹種の優良個体のクローンの大量増殖に資するために、スギ、クヌギ、シラカンバ、シナミザクラ等の樹種・系統におけるクローン増殖に適した外植体の選択、培地及び培養条件の探索をした。次いで、2)新しい遺伝変異を創出するための支持研究として、スギ、クロマツ、ヤマナラシ、ポプラ等の素材をカルス経由でクローン増殖をするため、各樹種・系統におけるカルスの誘導と継代培養、並びに培養カルスからの植物体の再生に適した培養条件の探索を行った。

2 供試材料と方法

2.1 供試材料

2.1.1 本研究でとりあげた樹種

本研究では、培養手法ごとに、次の樹種をとりあげた。

(1) 器官培養

- i 芽生えの器官培養……スギ、クヌギ
- ii 葉柄、節間茎軸培養……シラカンバ
- iii 節付茎軸培養……クヌギ、シナミザクラ

(2) カルス培養

- i カルス誘導……スギ, クロマツ, ポプラ類
- ii カルスからの器官分化……スギ, ポプラ類
- iii カルスの保存と器官再生能力……ポプラ類

2.1.2 器官培養に用いた外植体

本研究では, 次の3種類の外植体を用いた。

(1) 芽生えの組織

スギでは無菌発芽させた芽生えの子葉, 幼芽部分及び胚軸を外植体として使用した。クヌギでは堅果を無菌発芽させて伸長させた上胚軸を外植体とした。

(2) 葉柄と茎軸

試験管内育成のシラカンバ幼植物体の葉柄と節間茎軸を苗条原基誘導用の外植体とした。

(3) 腋芽

シナミザクラ及びクヌギの当年生枝の葉腋にある腋芽(潜芽)を, 茎軸と葉柄を含めて外植体とした。この場合, 野外の成木から材料を採ったため, 採取前の天候と表面殺菌には十分な配慮をした。

2.1.3 カルス誘導に用いた外植体

(1) 形成層

本研究では次の四通りの切り出し法で外植体を調製した。①樹木の当年生枝の表皮を剥ぎ, 内皮と形成層と一部木部を含む部分を削り, 5 mm×5 mm 程度の大きさのカマボコ状の外植体を調製した。②表面殺菌した当年生枝を3 mm 程度の厚さをもつ円板状に切って外植体とした。③5 mm 程度の長さの円柱状に切り, それを縦割りにして, やはりカマボコ状の外植体とした。④樹種によっては, 剥皮した当年生枝を5 mm の長さに切った円柱状の木部をそのまま外植体とした。

(2) 未熟種子

スギ及びクロマツの生育途中の緑色球果から摘出した外種皮が乳白色の未熟種子をそのままカルス誘導のための外植体とした。

(3) 雄花鱗片

スギ及びマツの花粉飛散前の雄花の鱗片を, カルス誘導の外植体として用いた。

2.2 培地の組成と調製

本研究では, いくつかの基本培地をそのまま用いたり, また無機・有機成分の一部の組成を改変して用いた。すなわち, MURASHIGE and SKOOG (1962, MS), WOLTER and SKOOG (1966, WS), STEINHALT, STANDIFER and SKOOG (1961, SSS), Woody Plant medium (LLOYD and McCOWN, 1981, WPM), Broad-leaved tree medium (CHALUPA, 1981, BTM), ECONOMOU and READ (1984, ER), IDE and SAITO (IS, 1985b) 及び BW 等の培地である。

Table 1 に本研究で用いた主要な基本培地の成分組成を掲げた。これらの基本培地の一部の組成を改変した場合は, おおのこの実験の材料と方法の項で述べる。

2.2.1 基本培地の組成と適用樹種

本研究で用いた基本培地ごとに、器官培養及びカルス培養を行った樹種を Table 1 に示した。

これらの培地には、外植体からのカルス誘導と増殖、カルスからの不定芽の形成、外植体から直接的な腋芽の発生と伸長、シュートの増殖及びシュートからの発根などの「ひきがね」として、植物成長調節物質 (植物ホルモン) が必要である。本研究では、サイトカイニンとしてはベンジルアミノプリン (BAP)、カイネチン (KIN) 及びゼアチン (Zeatin) を、またオーキシニンとしてはナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酪酸 (IBA)、インドール酢酸 (IAA) 及び 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) を用いた。そして、樹種及び培養目的に応じて濃度を変え、単独または組み合わせで加えた。さらにサイトカイニン様物質として、Adenosine-3', 5'-cyclicmonophosphate, Na salt (c-AMP) と Dibutyladenosine-3', 5'-cyclicmonophosphate, Na salt (dib. c-AMP) を用いた。

2.2.2 培地の調製

本研究では培地の調製に際し、次の手順で作成したストック液を、4℃で貯蔵しておいて随時蒸留水で希釈する方法をとった。

- ① ストック A 液……Ca 塩を除き、微量元素を含む無機塩類の 20 倍液。
- ② ストック B 液……Ca を含む塩類の 200 倍液。
- ③ ストック C 液……K₂SO₄ を用いる場合に、その 100 倍液を作る。この液は溶かすときに温度を必要とし、冷蔵すると再結晶するので常温 (室温) におく。
- ④ Fe ストック液……Fe-EDTA (Na 塩) は蒸留水で溶かし、また、Fe₂SO₄·7H₂O と Na₂·EDTA とを用いて調製するときには、それぞれの液を温めながら攪拌溶解したのち、徐々に混ぜあわせて冷却し、200 倍液を作る。
- ⑤ ビタミン、アミノ酸類のストック液……おのおのの 100 倍液を作っておく。
- ⑥ 植物成長調節物質ストック液……サイトカイニン類は、1 規定の水酸化ナトリウム (NaOH) 液で溶かして 10 mM のストック液を、また、オーキシニン類は 99.5% エタノールで溶かして 10 mM のストック液を調製しておく。

培地調製にあたっては、脱イオン蒸留水を所要の培地総量より少なめにとり、スターラーで攪拌しながら、上記のストック液の必要添加量をメスシリンダーまたはメスピペットを用いて秤量して加えた。すなわち、培地 1 リットル調製するときには、ストック A 液 50 ml、ストック B 液 5 ml、ストック C 液 10 ml、Fe ストック液 5 ml をそれぞれ加えた。また、アミノ酸、ビタミン類は培地組成に応じて、メスピペットで秤量して加えた。ただし、ミオーイノシトールは必要量をその都度直示天秤で直接秤量して加えた。

必要なストック液と植物成長調節物質の所定量を加えたのち、脱イオン蒸留水を加えて総量を調整した。その後、pH メーターを用い、0.2 規定の水酸化カリウム (0.2 N-KOH) または水酸化ナトリウム (0.2 N-NaOH) 液と、0.2 規定の塩酸 (0.2 N-HCl) 液で所定の pH 値に調整した。培地の pH 値は Table 1 に示した。pH 調整後、1% の寒天粉末を加え、オートクレーブ内で 100℃ 近くの温度で 20~30 分間温めて寒天を溶かし、よく攪拌してから、試験管、三角フラスコ、バイオフラスコに一定量を分注した。分注した容器の口は、家庭用アルミホイルを二重にしてキャップした。培地を分注、

Table 1. 基本培地の成分組成 (mg/l)
Composition of basic media (mg/l)

塩類 Salts	培地 Medium	WS培地 (WOLTER and SKOOG)	改変WS培地 (Modified WOLTER and SKOOG)	MS培地 (MURASHIGE and SKOOG)	SSS培地 (STEINHART, STANDIFER and SKOOG)
NH ₄ NO ₃		50	50	1 650	
(NH ₄) ₂ SO ₄					
KNO ₃		170	170	1 900	125
KCl		140	140		
K ₂ SO ₄					
KH ₂ PO ₄				170	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O		45	35		
MgSO ₄ · 7H ₂ O		1 564	764	370	125
CaCl ₂ · 2H ₂ O				440	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		611	425		500
NaNO ₃					
Na ₂ SO ₄		425	425		
FeSO ₄ · 7H ₂ O				27.9	
Na ₂ -EDTA				37.3	
Fe-EDTA-(Na)		5.5	5.5		
Fe ₂ (SO ₄) ₃					25
MnSO ₄ · 4H ₂ O		14	9	22.3	2.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		5.7	3.2	8.6 (4H ₂ O)	0.1 (no H ₂ O)
H ₃ BO ₃		3.2	3.2	6.2	0.05
KI		1.6	1.6	0.83	0.25
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O				0.25	
CuSO ₄ · 5H ₂ O				0.025	
CoCl ₂ · 6H ₂ O				0.025	0.025
NiCl ₂ · 6H ₂ O					0.025
TiO ₂					0.2
AlCl ₃					
Myo-inositol		10	10	100	100
Pyridoxine-HCl		0.1	0.1	0.5	
Thiamine-HCl				0.1	0.2
Coline-HCl					0.5
Nicotinic acid				0.5	
L-arginine					400
L-glycine				2.0	
L-glutamine					
L-tyrosine					
L-cysteine					10
L-lysine					
L-ascorbic acid					
Sym-diphenylurea					

WPM 培地 (Woody plant medium)	BTM 培地 (Broad- leaved tree medium)	改変 HELLER (Modified HELLER medium)	ER 培地 (Modified MS)	IS 培地 (IDE and SAITO)	BW 培地 [1/2(BTM+ WPM)]
400	65		400	680	283
	240	132	132		120
	190		202	170	95
		750		140	
990	860				925
170	170		408	80	170
		125 (H ₂ O)			
370	370	250	370	370	370
96	44	75	440		70
556	640			710	598
		600			
27.8	27.8				27.8
37.3	37.3				37.3
		5.5	42.1	5.6	
22.3 (H ₂ O)	22.3 (H ₂ O)	0.1	16.9 (H ₂ O)	8	22.3 (H ₂ O)
8.6	8.6	1.0	8.6	9	8.6
6.2	6.2	1.0	6.2	3.2	6.2
	0.15	0.01		0.8	0.08
0.25	0.25		0.25	0.25	0.25
0.25	0.25	0.03 (no H ₂ O)	0.25	0.25	0.25
	0.02		0.025		0.01
		0.03			
		0.03			
100	100		100	100	100
0.5	0.5			0.1	0.5
1.0	1.0		0.4	0.1	1.0
0.5	0.5			0.8	0.5
2.0	2.0				2.0
	2.0				1.0
				10	
				100	
				1	
				3	

Table 1. (つづき) (Continued)

塩類 Salts	培地 Medium	WS 培地 (WOLTER and SKOOG)	改変 WS 培地 (Modified WOLTER and SKOOG)	MS 培地 (MURASHIGE and SKOOG)	SSS 培地 (STEINHART, STANDIFER and SKOOG)
Fumaric acid					
Urea					[200]
Sucrose		20 000	20 000	30 000	20 000
pH		5.8	5.8	5.8	5.8
適用樹種 Applied species		● <i>Prunus</i> ○ <i>Cryptomeria</i> ○ <i>Populus</i>	○ <i>Cryptomeria</i> ○ <i>Pinus</i>	○ <i>Populus</i>	○ <i>Pinus</i>

● 器官培養 Organ culture ○ カルス培養 Callus culture

キャップしたガラス容器は、2 気圧、121°C のオートクレーブ内で 18~20 分間加圧滅菌した。以下、本文中にこの加圧滅菌の方法を「常法により加圧滅菌した」として記載した。

滅菌したガラス容器は室温で冷やし、寒天を固めて培養に用いた。

3 器 官 培 養

3.1 スギ及びクヌギの芽生えからの器官分化

針葉樹ではスギ、広葉樹ではクヌギの芽生えの器官を外植体としたマイクロプロパゲーションの方法を検討した。

3.1.1 スギ

(1) 材料と方法

この実験に用いたスギの種子は、青森・名古屋両営林局で事業的に採集し、その一部を森林総合研究所が分譲を受け、同所の種子貯蔵庫に貯蔵中のものであった。産地及び実験開始時の発芽率は次のとおりである。

- a. 宮城産スギ：宮城県牡鹿郡産，49%
- b. 富山産スギ：富山県中新川郡産，44%

ソフテックス（軟 X 線）によって、内容の充実した種子だけを集めて供試した。種子を水につけ、マグネチックスターラーで攪拌しながら 24 時間経過後、第二塩化水銀（昇汞、 $HgCl_2$ ）の 0.2% 液で 15 分間、攪拌しながら種子の表面殺菌をした。殺菌後、滅菌蒸留水で 5 回水洗し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。

発芽床には、ショ糖 2%，ベンレート 10 ppm を加えた 0.75% 寒天培地を、18 mm×180 mm 試験管（なお、用いた試験管はすべて同じ大きさであるため、以下単に試験管と略す）に 10 ml あて分注したものを用いた。種子は置床後 15 日目頃から発芽し始め、発芽床に根を伸ばし、胚軸は直立して伸長した。伸長して種皮が子葉先端から脱落する前後の芽生えの根部を切り捨て、Photo. 1 に示したよ

WPM 培地 (Woody plant medium)	BTM 培地 (Broad- leaved tree medium)	改変 HELLER (Modified HELLER medium)	ER 培地 (Modified MS)	IS 培地 (IDE and SAITO)	BW 培地 (1/2(BTM + WPM))
20 000 5.4	20 000 5.8	20 000 5.8	20 000 5.0	1 10 20 000 5.8	20 000 5.6
● <i>Quercus</i>	● <i>Quercus</i>	● <i>Quercus</i>	● <i>Quercus</i>	● <i>Betula</i>	● <i>Quercus</i>

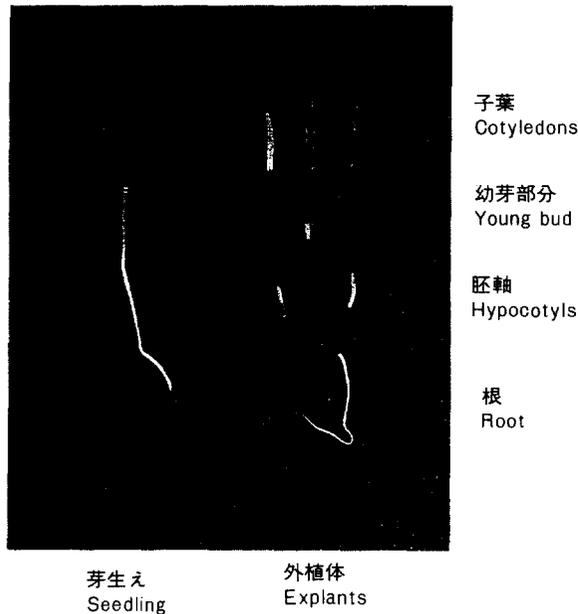


Photo. 1. スギ芽生えと外植体
A young sugi (*Cryptomeria japonica*) seedling and segmented explants.

うに、子葉・胚軸及び幼芽部分(将来、上胚軸に伸長する芽を含み、0.5~1.0 mm の胚軸をつけた部分)に分割し、それぞれを外植体とした。芽生え1本から子葉3個、胚軸は2分割、幼芽部分は1個ずつとし、計6個の外植体を得た。

各培地ごとにそれぞれの産地の芽生えを17本ずつ用い、子葉・胚軸・幼芽部分別に下記の培地を入れた試験管に置床した。外植体は2か月おきに植物ホルモンの組成が同一の培地に移植し、培養開始6か月後の不定芽とシュートの分化状況を調べた。

不定芽を分化させる培養に用いた培地(分化培地)は、予備実験の結果から、スギの培養に適することになった WOLTER and SKOOG (WS) 培地である。培地は、ベンジルアミノプリン (BAP) を 1, 3.16, 及び 10 μM の各濃度を加えた 3 種に対し、それぞれにナフタリン酢酸 (NAA) を 0 及び 0.316 μM の濃度で加えたので、合計 6 種類の培地となった。調製した培地は試験管に 10 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。

次に、外植体から分化したシュート及び不定芽を切りとり、植物ホルモンを欠いた WS 寒天培地(発根培地)に移植して、成長と発根を促した。植えつけ 1 か月を経過しても発根が認められなかった場合には、0.316 μM の NAA を加えた WS 寒天培地に再度移植して発根をはかった。移植 3 か月後に、試験管内で発根成長した苗条の数を調べた。

不定芽やシュートの分化及び発根のための培養条件は、照度 3 000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

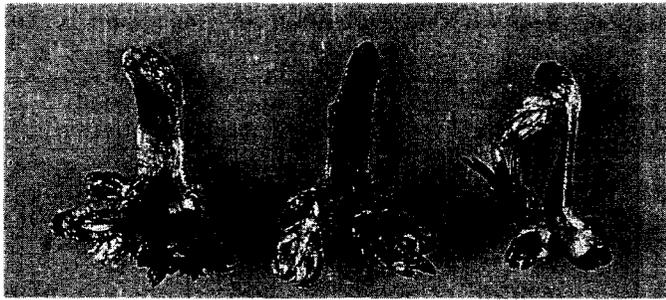
i 不定芽の分化とシュートの形成

3 種類の外植体からの不定芽の分化の程度は、培地の植物ホルモンの組成によって多少異なったが、培養開始後約 2 か月ごろから芽の形成が肉眼で認められ始め、植物ホルモンが同一組成の培地への移植によって芽が伸長し、シュートを形成した。子葉の多くは基部切断面から、胚軸は両端の切断面あるいは一方の切断面から不定芽を分化した。幼芽部分は初め全体が肥大し、そのあとで不定芽を分化した。それぞれの外植体からの不定芽・シュートの分化状況を Photo. 2 に示した。

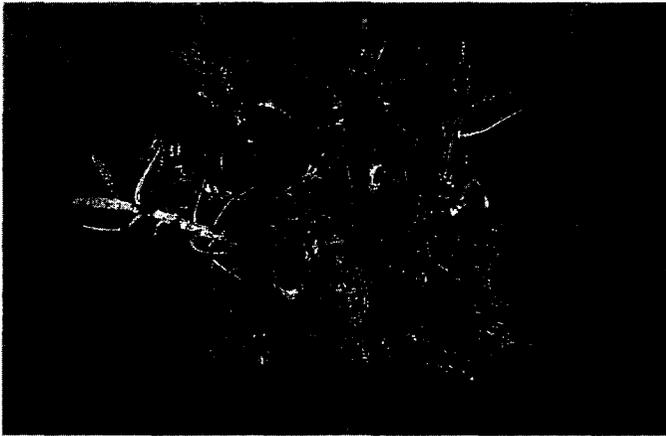
分化培地における培養 6 か月目の外植体の種類別の芽・シュートの分化率(芽・シュートを分化した外植体数/供試外植体数)を Table 2 に掲げた。宮城産スギでは、外植体の違いによる分化率の違いが非常に大きく、BAP の濃度の効果は小さかった。すなわち、幼芽部分からの分化率が 53~94% と最も高く、次いで胚軸において 38~77% と高く、子葉からの分化率は極めて低く 17% 以下であった。統計的にも BAP 濃度による差は認められず、外植体の種類間には 0.1% 水準で有意差が認められた。また、富山産スギでも、宮城産スギの場合と同様な外植体の種類による違いが認められた。一方、富山産スギでは BAP 濃度による芽・シュートの分化率の違いが認められ、BAP の 1 μM で最も高い分化率を示し、次いで 3.16 μM で高かったが、10 μM では急に低くなった。統計的には、外植体の種類間では 0.1% 水準で、また BAP 濃度間では 5% 水準で有意差が認められた。

ISIKAWA (1974) によれば、スギ胚軸は BAP 10 mg/l (44.4 μM) を加えた培地上で 22% の分化率を示し、また、BAP 2.0 mg/l (8.88 μM) を加えた修正 WS 培地上では 60% の分化率を示した (ISIKAWA, 1978)。本実験における胚軸の場合 (佐藤, 1986)、ISIKAWA が用いた BAP の濃度よりも低い 1 μM (0.225 mg/l) または 3.16 μM (0.711 mg/l) で高い分化率を示し、高濃度の 10 μM (2.25 mg/l) では分化率が低くなった。

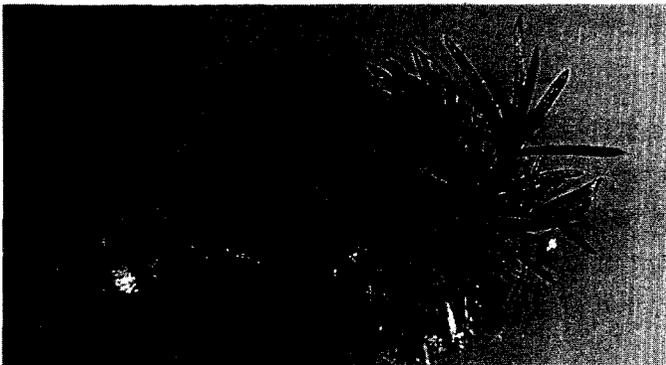
次に、NAA のシュートの分化率への効果は、明らかでなかった。しかし、NAA を含む培地での外植体はカルスを形成することが多く、かつ、一度誘導された不定芽もカルスに包まれたり、あるいは不定芽がカルス化する現象もみられた。マツ属のいろいろな種の子葉から不定芽を分化させる実験



子葉から
From cotyledons



幼芽部分から
From young bud



胚軸から
From hypocotyls

Photo. 2. 3種類の外植体からの芽・シュートの分化状況
Induction of buds and shoots from 3 kind-explants in young
sugi (*Cryptomeria japonica*) seedling.

(ABDULLAH et al., 1985; AITKEN, et al., 1981; DAVID, et al., 1982; KOLEVSKA-PLETIKAPEC et al., 1983; SOMMER et al., 1975 など)が行われ、多くは芽やシュートの誘導・形成に成功している。しかし、マツ属に比べ、本実験のスギ子葉のシュート分化率は極めて低いが、これは樹種の違いによるものと考えられる。一方、マツ属で行われている cotyledon-hypocotyl の培養 (KAUL, 1987) にほぼ等しい幼芽部分の培養は、スギにおいては本研究が初めての例であったが、それからの分化率は

Table 2. スギ芽生えの外植体別の芽・シュート分化率
Bud and shoot differentiation rates of 3-kind explants from young sugi (*Cryptomeria japonica*) seedlings

タネの産地 Seed source	植物成長調節物質 Plant growth regulators		芽・シュートの分化率 Bud and shoot differentiation rate (%)		
	BAP (μ M)	NAA (μ M)	子葉 Cotyledon	胚軸 Hypocotyl	幼芽部分 Bud primordium with hypocotyl and cotyledons
宮 城 Miyagi	1	0	9.8	68.8	82.3
	3.16	0	6.0	76.5	94.1
	10	0	16.7	38.2	58.8
	1	0.316	6.0	46.9	76.5
	3.16	0.316	10.4	71.9	82.4
	10	0.316	14.6	75.0	52.9
富 山 Toyama	1	0	6.4	66.7	87.5
	3.16	0	2.0	42.9	64.7
	10	0	8.0	21.9	11.8
	1	0.316	10.0	60.0	76.5
	3.16	0.316	2.0	42.9	70.6
	10	0.316	4.0	14.7	47.1

外植体数は、各処理当たり子葉は 46~51 個、胚軸は 28~34 個及び幼芽部分は 16~17 個であった。

Numbers of explants were 46~51 cotyledons, 28~34 hypocotyls and 16~17 bud primordia with hypocotyl and cotyledons for each treatment, respectively.

極めて高率であった。

分化した外植体当たりの芽・シュートの分化数を Table 3 に掲げた。分化した芽・シュートの数は最低 1 本から最高 19 本まで数えられ、バラツキが非常に大きかった。ここでも外植体の種類の違いによる分化数の差が明らかで、両産地とも幼芽部分で最も多く、次いで胚軸、子葉の順に少なくなった。分化した芽・シュートの数には、BAP の濃度による違いは明らかでなかったが、強いていえば中濃度の 3.16 μ M の BAP を添加した培地上で多い傾向を示した。また、ここでも NAA の効果は不明確であった。

ii 育成した発根苗木数

分化培地で 6 か月間培養して分化した長さ 3 mm 以上の芽、シュートを切り取り、発根培地に移植し、発根を促進した。発根しないものは 1 か月後に、NAA 添加培地に再移植した。発根培地に移植した小さな芽のなかには、褐変枯死するものやカルス化するものがみられた。一般的に大きいシュートを移植した場合、発根と成長が旺盛であった。移植の 3 か月後において、発根して地上部の成長も良好な苗条の例を Photo. 3 に示した。

供試した芽生え 17 本の各外植体から獲得した総苗木数を 17 で割り、1 本当たりの平均苗条数を求め、外植体の種類ごと、分化培地別ごとにまとめ、Fig. 1 に示した。最高 11 本から最低 1 本まで分布した。この Fig. 1 から、宮城産スギが富山産スギよりも獲得苗条数がやや多いように思われる。また、全体的

Table 3. スギ芽生えの外植体別の芽・シュートの分化本数

Mean numbers and ranges of buds and shoots developed from 3-kind explants of young sugi (*Cryptomeria japonica*) seedlings

タネの産地 Seed source	植物成長調節物質 Plant growth regulators		芽・シュートの分化本数 Mean numbers and ranges of buds and shoots		
	BAP (μM)	NAA (μM)	子葉 Cotyledon	胚軸 Hypocotyl	幼芽部分 Primordium with hypocotyl and cotyledons
宮 城 Miyagi	1	0	1.6 \pm 0.9 (1~2)	3.4 \pm 2.2 (1~8)	4.6 \pm 4.5 (1~14)
	3.16	0	4.3 \pm 1.5 (3~6)	3.4 \pm 2.5 (1~10)	6.9 \pm 4.7 (1~10)
	10	0	2.6 \pm 2.3 (1~8)	2.9 \pm 1.9 (1~8)	4.7 \pm 3.7 (1~13)
	1	0.316	1.0 \pm 0.0 (1)	1.9 \pm 1.4 (1~5)	8.5 \pm 4.9 (1~19)
	3.16	0.316	1.0 \pm 0.0 (1)	2.6 \pm 2.2 (1~10)	5.1 \pm 5.7 (1~19)
	10	0.316	2.0 \pm 1.4 (1~5)	3.4 \pm 2.7 (1~11)	4.9 \pm 4.3 (1~10)
富 山 Toyama	1	0	1.7 \pm 0.6 (1~2)	2.5 \pm 1.9 (1~8)	4.6 \pm 4.1 (1~16)
	3.16	0	12.0 \pm 0.0 (12)	1.8 \pm 1.2 (1~4)	5.5 \pm 4.4 (1~15)
	10	0	1.5 \pm 0.3 (1~3)	4.3 \pm 2.7 (1~8)	4.5 \pm 2.1 (3~6)
	1	0.316	1.2 \pm 0.5 (1~2)	1.5 \pm 0.5 (1~2)	7.2 \pm 4.5 (1~16)
	3.16	0.316	1.0 \pm 0.0 (1)	2.5 \pm 1.1 (1~2)	6.7 \pm 4.5 (1~11)
	10	0.316	1.0 \pm 0.0 (1)	1.2 \pm 1.1 (1~2)	3.3 \pm 2.3 (1~6)

数字は平均 \pm 標準偏差, ()内数字は範囲を示す。

Figures indicate average number \pm standard deviation, and figures in parentheses are range of numbers of shoots

にみた場合, BAP の低濃度添加の分化培地での苗木数が多く, BAP の濃度が高くなるにつれて苗木数が少なくなっている。外植体別にみれば, 幼芽部分からの苗木数が断然多く, 次いで胚軸の順で, 子葉からは非常に少なかった。統計的には, 分化培地に与えた BAP 濃度間, 種子の産地間ともに1%水準で有意差が認められた。

発根したスギ苗木は, 畑土をつめた育苗箱に移植し, 噴霧灌水下に置いて馴化した結果, 90%以上の活着を示し, Photo. 4 に示したような成長を示した。

3.1.2 クヌギ

(1) 材料と方法

10月中旬, 森林総合研究所構内のクヌギ林(約10年生, 樹高約8m)から収集した堅果(ドングリ)を, 使用時までビニール袋に入れて4°Cで貯蔵した。

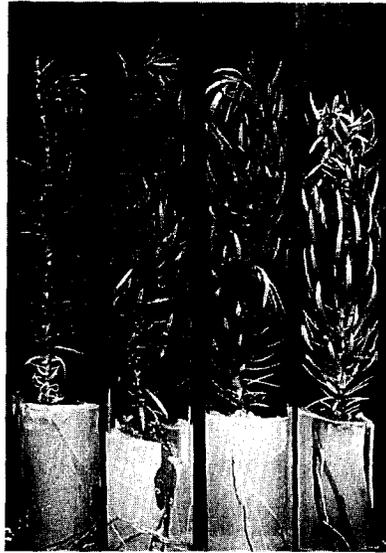


Photo. 3. 発根して伸長したスギ苗木
Rooted and elongated shoots in sugi (*Cryptomeria japonica*).

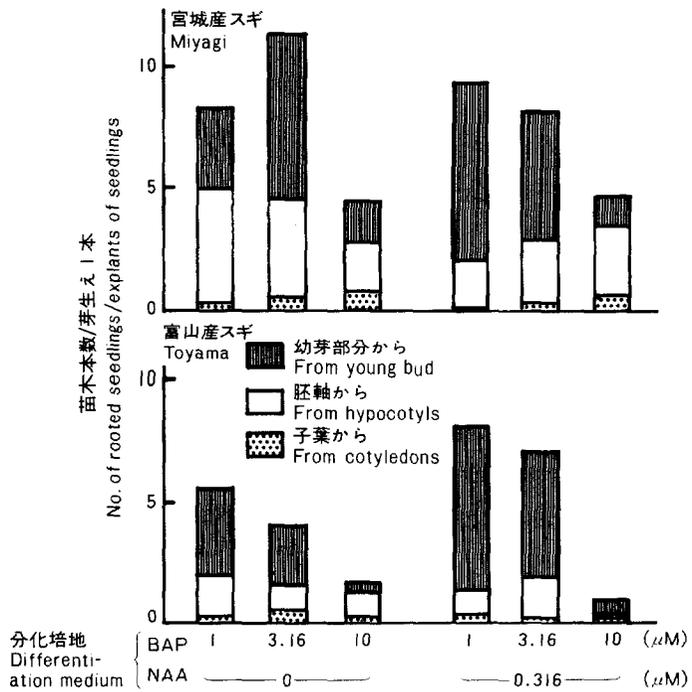


Fig. 1. 外植体として用いた芽生え1本から得られた平均苗木数
Average numbers of rooted shoots derived from explants for a young sugi (*Cryptomeria japonica*) seedling.

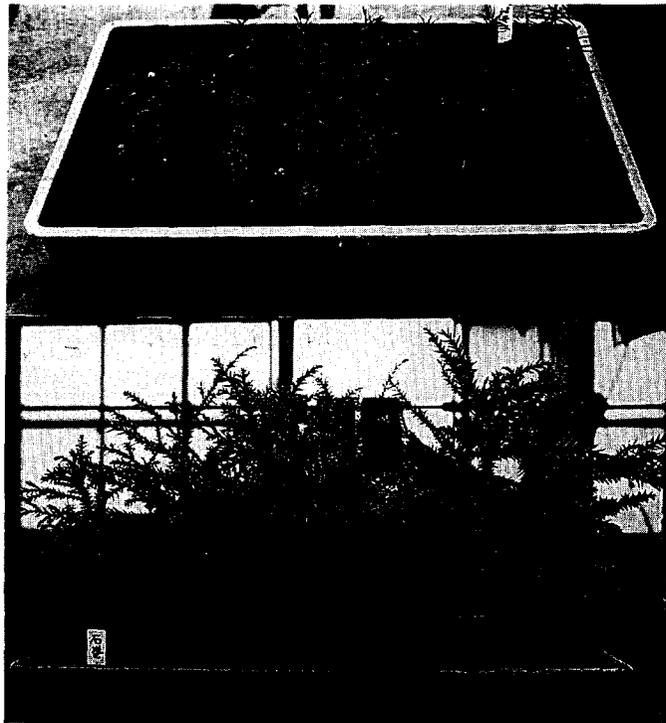


Photo. 4. 噴霧灌水下で畑土に馴化したスギ苗木
Sugi (*Cryptomeria japonica*) seedlings habituated on nursery soil
under mist spray.

上: 移植 15 日後。Upper: 15 days after transplanting.

下: 移植 7 か月後。Lower: 7 months after transplanting.

無菌苗の育成は次のように行った。約 50 日貯蔵した堅果をよく水洗し、次いで 70% エタノール液に 5 分間浸漬して表面殺菌し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。堅果はまず果皮を無菌的に取り除いたのち、横半分を切断し、上胚軸、胚軸、幼根及び子葉の一部を含む上半分を、おのおの切断面を下にして試験管内の培地 (培地量 15 ml) に置床した。外植体が大き過ぎて試験管に入らない場合には、さらに子葉部分を切り落とした。

無菌苗育成用の培地には、CHALUPA (1984) によって処方された BTM (Broad-leaved tree medium) 培地に下記の植物ホルモンを加えて、常法によって加圧滅菌したものを用いた。植物ホルモンの添加は BAP を 1, 10 μM の 2 水準と、NAA を 0.1, 1 μM の 2 水準とを組み合わせた。

培養約 2 か月後、上胚軸が 6~8 cm に伸長し、対生の本葉が 2 枚または 4 枚開き始めたとき、初代培養の外植体として用いた。上胚軸は鱗片葉をつけて約 2 cm の長さで切断して外植体とし (Photo. 5), 100 ml フラスコ内培地 (培地量 40 ml) にほぼ 3 mm 深さにさしつけた。外植体の初代培養にも、BTM 培地を用い、BAP を 10 μM , NAA を 0.316 μM 添加した。

初代培養開始から約 50 日後、鱗片葉の着生部位から 1~数個の芽を発生した外植体を、発生した芽



芽, 堅果と根
Bud, acorn and root

外植体 (上胚軸)
Explants (epicotyl
with scaly leaf)

Photo. 5. クヌギ無菌苗からの外植体の調製
Explants derived from aseptically grown
young seedling in kunugi (*Quercus*
acutissima).

矢印: 鱗片葉. Arrow: Scaly leaf.

の直下で下部の上胚軸を切り捨て、芽とその上部の上胚軸を 200ml フラスコ内培地 (培地量 70 ml) に継代培養した。継代培養の培地にも BTM 培地を用い、BAP を $1\mu\text{M}$ 、または $3.16\mu\text{M}$ と、NAA を $0.316\mu\text{M}$ とを組み合わせ添加した。その後約 50 日間の培養によって、培養物の基部及びシュートの下部から多数の芽の発生がみられ、シュートも伸長した。

そこで、25 mm 以上に伸長したシュートを収穫して発根試験に供し、残りの芽と短いシュートの塊は基部のカルスを切り除き、300 ml フラスコ内培地 (培地量 100 ml) に 2 代目の継代培養を行った。3 代目以降の継代培養は、30~40 日ごとに 25 mm 以上のシュートを収穫し、残りの芽と短いシュートの塊は分割し、カルスを切り除いて 300 ml フラスコを用いて継代培養を繰り返した。収穫したシュートの発根のための培地は、継代培養の初期で得られたシュートにはそれぞれ 2 水準の濃度で、IBA と NAA とを組み合わせた BTM 培地を用いた。その後、収穫される堅果ごとのシュート数が多くなってからは、1/2 濃度に薄めた BTM 及び WPM (Woody plant medium) の各培地 (無機養分とショ糖を 1/2 に薄め、塩酸ピリドキシン、グリシン

及びグルタミンを除去) を発根用の培地とし、IBA と NAA を組み合わせ加えたものを用いた。

継代培養初期に得られたシュートの発根試験には、試験管 (培地量 15 ml を用い、のち、6, 7 代目の継代培養で得られたシュートの発根試験には、50 ml (培地量 25 ml) または 100 ml (培地量 40 ml) のフラスコを用いた。試験管にはシュートを 1 本あて、フラスコにはシュートを 2~3 本あてさしつけた。

すべての培養条件は、照度 5000 ルックスの蛍光灯下、日長 16 時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

地面に落下した堅果 (ドングリ) を収集供試したため、雑菌による汚染率が極めて高く (87.5%)、10 本の無菌苗しか得られなかった (あとの実験において、堅果を剥皮したのち表面殺菌したところ、90% 以上の堅果が無菌化できた)。このため、培地の植物ホルモンの組成による無菌苗の生育状態の違いを吟味することができなかった。以下、堅果 (ドングリ) 個体からの増殖苗をクローンと呼ぶことにする。

i シュートの増殖

無菌苗の上胚軸を、約 20 mm の長さに切って外植体とした初代培養では、培養 20~30 日目頃から、鱗片葉着生部位から芽の分化発生がみられ、鱗片葉の着生していない外植体からは全く芽が分化しなかった。多くの芽を分化したクローンは、Photo. 6 に示したように、培養 52 日目までに上胚軸の鱗片葉着生部位から数本の芽やシュートを発生し、なかには 10 mm 以上伸びたシュートもみられた。しかし、10 クローン中 2 クローンは 1 か所から 1 本の芽しか分化せず、伸長も不良であった。

Photo. 6 でも分かるように、すべての外植体は植えつけた切り口部位に黄褐色のカルスを形成し、そのすぐ上部の上胚軸から白色のカルス状突起物の形成がみられた。材料と方法の項で述べたように、最下部の芽あるいはシュートの直下で上胚軸を切りわけ、上部のみを継代培養に移した。2 代目の継代培養のシュートは、Photo. 7 に示したように多数増殖をした。

継代培養の 2 代目以後の培養物は、短いシュートの基部の腋芽が伸びて芽、シュート数が増加するとともに、25 mm 以上の長いシュートの数も増加した。多くのクローンでは、伸長したシュートの葉はほとんど開かないが、芽数の増殖不良のクローンでは、葉を展開するシュートが多かった。

10 クローンのうち、シュート増殖数が多かったクローンは、継代培養の都度、芽、シュートの塊（ここでは芽株と呼ぶ）を分割して移植したので、5 代目で最高 21 株に達したクローンもあった。ただ、



Photo. 6. 初代培養におけるクヌギ上胚軸からの芽・シュートの発生状況 (培養 52 日目)

Bud and shoot formation from epicotyls of kunugi (*Quercus acutissima*) in initial culture (52 days after beginning of initial culture).

BTM, BAP 10 μ M, NAA 3.16 μ M.

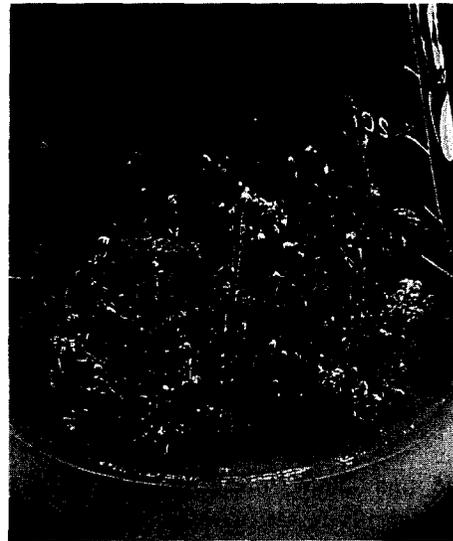


Photo. 7. 継代培養 2 代目におけるクヌギの芽・シュートの発生、伸長状況 (培養 43 日目)

Bud and shoot formation obtained by 2nd subculture of juvenile explants of kunugi (*Quercus acutissima*) (43 days after beginning of 2nd subculture).

BTM, BAP 1 μ M, NAA 0.316 μ M.

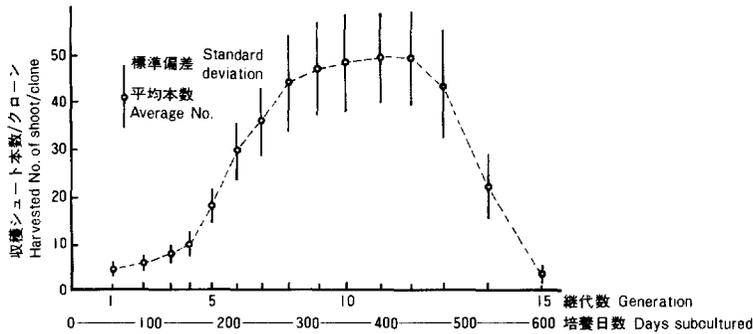


Fig. 2. クヌギ上胚軸の継代培養によって得られたシュート本数
Numbers of shoots obtained by successive subculture of epicotyls in kunugi (*Quercus acutissima*).

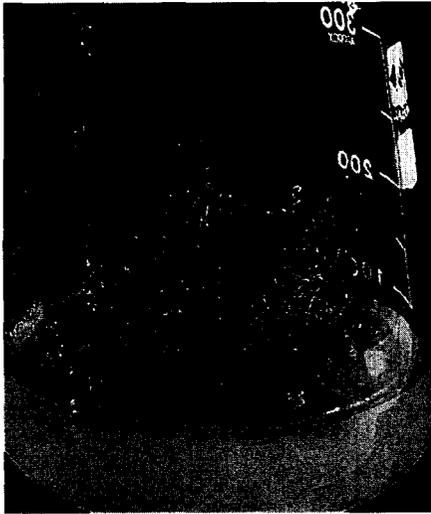


Photo. 8. 継代培養9代目におけるクヌギの芽・シュートの発生, 伸長状況 (培養25日目)

Bud and shoot formation obtained by 9th subculture of divided explants in kunugi (*Quercus acutissima*) (25 days after beginning of 9th subculture).

増殖不良のクローンは初代培養でさしつけた3株(上胚軸3本)のままのものもあった。

このようにして、継代培養したクヌギ上胚軸由来の培養物から収穫できたシュートの数の推移について、10クローンの平均値±標準偏差を Fig. 2 に示した。1代目の継代培養の終わりに収穫できたシュート数は、10クローン平均で4.0本、2代目では4.8本、3代目では7.3本と徐々に増加し、5代目では17.9本に急増した。そして、8~12代目の培養によって得られるシュート数は安定し、平均45本以上であった。あるクローンの一部の増殖状況は(20芽株中の4株)、Photo. 8 のとおり旺盛であった。

しかし、13代目の継代培養のころから褐変枯死する芽株が現われはじめ、15代目ではほとんどの芽株が枯死してしまった。生き残った芽株は増殖率の極めて悪いクローンであった。この芽株枯死の原因は、現在までのところ明らかでないが、シュートの盛んな増殖によってエチレンが発生し、ガラス器内に

に充満して、芽株の枯死を招いたのではないかと考えられる。

継代培養15代の約600日の間に、堅果(クローン)当たりの合計収穫シュート数は平均407本であった。しかし、Fig. 2 の標準偏差の大きさが示すようにクローンによるバラツキが極めて大きく、クローンによっては15代の継代培養中に、28本のシュートしか収穫できなかったものから、最高では1048本のシュートを収穫できたものまで本数に大きな違いがあった。

Quercus 属樹種の若い材料を使った組織培養によるマイクロプロパゲーションの報告 (BENNETT and DAVIES, 1986; CHALUPA, 1984; CHEVRE et al, 1983; 井出・山本, 1987; SAN-JOHE et al., 1988; VIEITEZ and VIEITEZ, 1980; VIEITEZ et al., 1985) では, 2~4 か月生幼苗, または1年生苗の茎頂や節 (腋芽) つき茎片を出発材料としている。鱗片葉つきの上胚軸を初代培養の出発材料としたのは, 本報告が初めてである。

CHALUPA (1984) は, *Quercus robur* の腋芽培養において, 4種類の基本培地を比較し, BTM 及び WPM 両培地がよい結果を示したことを報告した。また, VIEITEZ et al. (1985) は同じ樹種で8種類培地を検討した結果, GRESSHOFF and DOY (1972) 培地がやや優れていることを示した。本実験においては, 若いクヌギの組織を外植体として用いて, BTM 培地と WPM 培地を比較した予備実験から, BTM 培地が適していることが分かったので, 一貫して BTM 培地を用いた。

シュート増殖のために添加した BAP の量について, CHALUPA (1984) は, 0.2 mg/l (0.89 μ M) ~ 0.8 mg/l (3.5 μ M) を適当とし, VIEITEZ et al. (1985) はこれより低い濃度の 0.1 mg/l (0.44 μ M) を用いている。本実験で, 初代培養において BAP を 10 μ M (2.25 mg/l) 添加したほかは, シュート増殖のための継代培養には 1 μ M (0.225 mg/l) または 3.16 μ M (0.711 mg/l) を添加した。この BAP の濃度は, CHALUPA (1984) が適当とした濃度とはほぼ同じである。

継代培養日数が 30~50 日の間における, 1 μ M または 3.16 μ M 濃度の BAP を加えた BTM 培地では, シュート頂端にネクロシスを起こすことも少なく, かつ, 25 mm 以上伸長したシュート数も継代数を増すにつれて次第に増加した。

ii 収穫したシュートからの発根と馴化

1~5 代の継代培養で収穫したシュートは, その数が少なく, かつ, クローン当たりのバラツキがあって, 十分な発根試験を組めなかった。そこで, IBA と NAA をそれぞれ 0, 1 μ M の 2 水準の濃度で組み合わせたり, あるいは両者を 0.316, 1 μ M の 2 水準の濃度で組み合わせた BTM 培地を用い, クローン当たり 1~2 本のシュートをさしつけた。この結果から 0~70% の発根率が得られたが, シュート当たりの発根数は, 1~3 本にとどまった (佐藤ら, 1987) (Photo. 9)。

6 代目の継代培養において, クローン当たり 12 本以上のシュートが得られた 5 クローンについて, NAA (0.1 μ M) を加えたうえで, IBA を 4 水準



IBA 0.316 1 0.316 1 (μ M)
NAA 0.316 0.316 1 1 (μ M)

Photo. 9. 継代培養 2 代目で得られたクヌギシュートからの発根 (培養 60 日目)

Rooting from shoots derived from 2nd subcultures of kunugi (*Quercus acutissima*) (60 days after beginning of culture).
培地 Medium: BTM.

の濃度 (0.316, 1, 3.16 及び 10 μ M) で添加した BTM 培地にさしつけた。さしつけ 60 日後の発根率を Table 4 に示した。このデータを MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換したのち、分散分析した結果、IBA の濃度の間には有意性が認められなかったが、クローン間には 1.0% 水準で有意性が認められた。Table 4 から分かるように BTM 培地に加えた IBA の濃度効果は、低濃度から高濃度になるにつれてやや発根率が高まる傾向を示したが、統計的には有意でなかった。しかし、さらに大きな違いはクローン間差であった。使用した 5 クローンのうち、2 クローンはやや高い発根率を示し、2 クローンはほとんど発根しなかった。

次いで、7 代目の継代培養によって収穫されたシュートを用いて、発根試験を行った。ここで用いた培地は、BTM, WPM の両培地の無機養分とショ糖の濃度を 1/2 に薄め、有機成分としてミオーイノシトール、塩酸チアミンとニコチン酸のみ加えた培地である。オーキシンは NAA (0.316 μ M) と IBA の 2 段階の濃度 (1, 3.16 μ M) とを組み合わせた。さしつけ 45 日後の発根率を Table 5 に掲げた。全体に高い発根率が得られたが、1/2 WPM 培地に IBA を 1 μ M, または 3.16 μ M の濃度で加えた場合の発根率は高かった。しかし、1/2 BTM 培地に IBA を 1 μ M, または 3.16 μ M 添加した培地では、どのクローンもやや低い発根率を示した。シュート当たりの発根数は 1~5 本であった (Photo. 10)。7 代目の培養で収穫した 6 クローンのシュートの発根率を、MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換したデータを分散分析した結果を Table 6 に示した。培地の種類と IBA の濃度間には有意性が認められたが、クローン間には有意性がみられなかった。すなわち、1/2 BTM 培地よりも 1/2 WPM 培地が発根に有利であり、また、IBA の効果は 1 μ M よりも 3.16 μ M の濃度で発根率が高いことが、統計的にも認められた。

発根したシュートの馴化のため、パーライトとバーミキュライトを 1:1 で混ぜた用土をつめたポットに、発根試験に用いたシュートを移植して噴霧灌水下に置いた。発根したシュートは 90% 以上の高

Table 4. 継代培養 6 代目で得られたクヌギシュートの発根率に及ぼす IBA の効果 (BTM 培地)
Influence of IBA on rooting of shoots derived from 6th subculture in kunugi (*Quercus acutissima*) (BTM medium)

IBA (μ M)	発根率 Rooting rates (%)				
	クローン番号 Clone No.				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 8
0.316	12.5	50.0	0.0	0.0	0.0
1	25.0	60.0	0.0	0.0	0.0
3.16	25.0	80.0	33.3	0.0	0.0
10	25.0	80.0	100.0	0.0	20.0
供試シュート数/処理 No. of shoots used /treatment	8	10	3	4	5

すべての培地に 0.1 μ M の NAA を含む。

All media were supplemented with 0.1 μ M of NAA.

Table 5. クヌギ上胚軸の継代培養7代目で得られたシュートの発根に及ぼす培地の種類とオーキシン濃度の効果

Effects of kind of medium and auxin concentration on rooting rates of shoots derived from 7th subcultures in kunugi (*Quercus acutissima*)

培地 Medium	植物成長調節物質 Plant growth regulators		発根率 Rooting rates (%)					
	NAA (μM)	IBA (μM)	クローン番号 Clone No.					
			No. 1	No. 2	No. 4	No. 6	No. 7	No. 8
1/2 BTM	0.316	1	50.0	76.0	12.5	75.0	50.0	0.0
		3.16	100.0	100.0	67.5	75.0	50.0	100.0
1/2 WPM	0.316	1	100.0	100.0	67.5	100.0	100.0	100.0
		3.16	100.0	100.0	100.0	75.0	100.0	100.0
供試シュート数/処理 No. of shoots used/treatment			8	14	8	4	2	4



Photo. 10. 継代培養7代目で得られたクヌギシュートからの発根 (培養45日目)
Rooting from shoots derived from 7th subcultures of kunugi (*Quercus acutissima*)
(45 days after beginning of culture).

培地 Medium: 1/2 WPM.

オーキシン Auxins: IBA $1\mu\text{M}$, NAA $0.316\mu\text{M}$.

率で活着した。これに対して、根の出ているシュートは移植後も発根することなく枯死した (Photo. 11)。

3.2 試験管内養成シラカンバ幼植物体の葉柄からの器官分化

ここでは、シラカンバのガラス器内養成幼植物体を用いて、その大量増殖の可能性を検討した。

(1) 材料と方法

森林総合研究所第二樹木園に植栽されているシラカンバ成木の当年生枝を採り、SAITO and IDE (1985 a) によって開発された、改変 MS 培地を用いた剥皮枝条の培養を行い、無菌の不定芽苗条を得

Table 6. 継代7代目に得られたクヌギシュートの発根率の分散分析
Analysis of variances of rooting rates of shoots derived from 7th subcultures in kunugi
(*Quercus acutissima*)

Factor	df	SS	MS	F	P
A : Medium	1	2 542.05	2 542.05	15.965	**
B : IBA	1	975.36	975.38	6.126	*
C : Clone	5	1 261.05	252.21	1.584	ns
A × B	1	1 120.66	1 120.66	7.038	*
Error	15	2 388.45	159.23		
Total	23	8 287.59			

データは MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式 $\theta = 1/2 \{ \arcsin \sqrt{x/n+1} + \arcsin \sqrt{x+1/n+1} \}$
(ここで, x=成功数, n=供試数) によって変換。

Data were transformed by MOSTELLER and YOUTZ (1961)'s formula, $\theta = 1/2 \{ \arcsin \sqrt{x/n+1} + \arcsin \sqrt{x+1/n+1} \}$ (where x=number of successes observed, n=sample size).

ns : 有意性なし * : 5%水準で有意 ** : 1.0%水準で有意
No significant Significant at 5% level Significant at 1.0% level

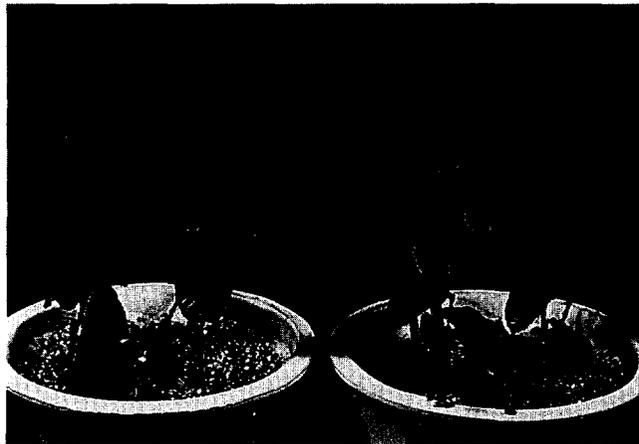


Photo. 11. 馴化中のクヌギ苗木

Kunugi (*Quercus acutissima*) seedlings under habituation.

使用培土 : パーライト1+バーミキュライト1。

Soil used : Perlite 1 + Vermiculite 1.

た。これらをさらにガラス器内で培養し、発根成長させ、約3か月後に葉が4~5枚に生育した幼植物体を外植体採取用の材料とした。幼植物体の茎頂から数えて、1~4番目の節から出ている葉の葉柄(長さ1.0~2.0 cm)及び節間茎軸(長さ0.8~1.0 cm)を無菌的に切り取って外植体とした。

ここで、二つの試験を行うための培地を用意した。まず、葉柄培養による苗条原基誘導に及ぼす Fe-EDTA (Ferric monosodium ethylenediaminetetraacetate) の濃度の効果を検討するため、

SAITO and IDE (1985b) によって処方された IS 培地の Fe-EDTA の濃度を, 5.6, 32.1, 58.6, 及び 85.0 mg/l に変更した培地を準備した。そしてそれぞれの培地に, 5.5 μ M の BAP と 0.316 μ M の NAA を添加した。培地は試験管に 15 ml あて分注し, 常法により加圧滅菌した。

次に, ガラス器内で培養育成したシラカンバ幼植物体の葉柄, 及び節間茎軸からの苗条原基誘導に及ぼす BAP と IAA のホルモン組成の効果を検討した。前述の実験から, 葉柄の苗条原基誘導に好適と考えられた 42.1 mg/l の Fe-EDTA を加えた改変 IS 培地に, BAP を 1 μ M または 3.16 μ M, NAA を無添加または 0.1 μ M 添加の組み合わせで 4 種の培地を準備した。培地は試験管に 15 ml あて分注し, 常法により加圧滅菌した。次いで, 誘導した苗条原基を分割移植して苗条の成長を促進するために, 3.16 μ M の BAP と 0.1 μ M の IAA を加えた IS 基本培地を, 100 ml フラスコに 50 ml あて分注して常法で加圧滅菌した。

以上の二つの実験では, 各幼植物体の茎頂から数えて 1~4 番目の葉柄及びその節の下の節間茎軸の 2 種類の外植体を, ラテン方格配置に従って各実験のそれぞれ 4 種類の培地に割りつけた。葉柄は下部切り口を 2~3 mm の深さに培地にさし付け, 茎軸は培地上に水平に置床した。

これらの培養条件は, 照度 5000 ルックスの蛍光灯下, 日長 16 時間, 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

i 苗条原基誘導に及ぼす Fe-EDTA 濃度と葉柄採取位置の影響

改変 IS 培地の Fe-EDTA の濃度を変え, BAP を 5.5 μ M, NAA を 0.316 μ M 加えた培地上での葉柄は, 培養開始後 20~25 日の間に培地に植えつけた切り口が膨大し, 徐々に苗条原基を形成した。培養開始後 45 日目の苗条原基形成率は, Table 7 のとおりであった。

Table 7 の数値を MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換して分散分析した結果を, Table 8 に掲げた。Fe-EDTA の濃度間には, 5% 水準で有意性が認められた。しかし, 葉柄の着生位置によ

Table 7. シラカンバの苗条原基誘導に及ぼす Fe-EDTA の濃度と葉柄着生位置の効果
Effects of concentrations of Fe-EDTA in medium and petiole position on the initiation of shoot primordia on cultured petioles in shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*)

Fe-EDTA の濃度 Concentration of Fe-EDTA (mg/l)	苗条原基形成率 Induction rates of shoot primordia (%)				平均 Mean
	茎頂からの葉柄の着生位置 Position of petiole from stem apex				
	1st	2nd	3rd	4th	
5.6	20.0	50.0	0.0	20.0	22.5
32.1	50.0	40.0	50.0	80.0	55.0
58.6	50.0	75.0	40.0	50.0	53.8
85.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
平均 Mean	30.0	41.2	22.5	37.5	

4 種の培地に葉柄着生位置当たり 20 個ずつ置床した。すべての培地に 5.5 μ M の BAP と 0.316 μ M の NAA を加えた。For each of the four different media, 80 sections were positioned (20 sections per position of petiole). Each concentration of Fe-EDTA was combined with 5.5 μ M of BAP and 0.316 μ M of NAA.

Table 8. シラカンバの葉柄培養における苗条原基形成率に及ぼす Fe-EDTA の濃度効果の分散分析
Analysis of variances of petiole explant position and concentration of Fe-EDTA on shoot primordia formation rates on cultured petiole in shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*)

Factor	df	SS	MS	F	P
葉柄の着生位置 Position of petioles	3	447.80	149.27	1.25	ns
Fe-EDTA の濃度 Conc. of Fe-EDTA	3	3704.41	1234.80	10.36	*
誤差 Error	9	1072.92	119.21		
全体 Total	15	5225.14			

データは MOSTELLER and Youtz (1961) の式 $\theta = 1/2 \{ \arcsin \sqrt{x/n+1} + \arcsin \sqrt{x+1/n+1} \}$ によって変数変換した。

Data were transformed by MOSTELLER and Youtz (1961)'s formula, $\theta = 1/2 \{ \arcsin \sqrt{x/n+1} + \arcsin \sqrt{x+1/n+1} \}$.

ns : 有意性なし No significant * : 5%水準で有意 Significant at 5% level

る苗条原基形成率には有意性は認められなかった。

Fe-EDTA を 85.0 mg/l 加えた改変 IS 培地では、葉柄の切り口の膨大は全くみられず、苗条原基の誘導は認められなかった。これに対して、5.6, 32.1 及び 58.6 mg/l の 3段階の Fe-EDTA を含む改変 IS 培地の葉柄の切り口は膨大し、帯褐緑色または緑色の苗条原基を形成した。外植体の苗条原基の形成率は、Fe-EDTA を 32.1 mg/l 含む培地が 55.0% で最高を示し、次いで、58.6 mg/l を含む培地では 53.8% と高く、5.6 mg/l を含む培地では 22.5% と低くなった。葉柄の着生位置による苗条原基の形成率は、22.5~41.2% の範囲を示し、それほど大きい違いはなかった。

シラカンバのガラス器内養成幼植物体の葉柄を外植体としたとき、苗条原基の形成に及ぼす改変 IS 培地の Fe-EDTA の適量は、32.1~58.6 mg/l の間にあった。SAITO and IDE (1985b) は、Fe-EDTA を 85.0 mg/l 含む培地で成木から採った葉柄培養による苗条原基の誘導及び植物体再生に成功した。しかし本実験では、同じ濃度の Fe-EDTA を加えた培地で苗条原基の誘導ができなかった。このことは、成木の葉柄の培養によって、苗条原基を誘導できる Fe-EDTA の濃度と、ガラス器内で育成した、幼植物体の葉柄の培養による苗条原基誘導に適した Fe-EDTA の濃度とは、異なることを示したものである。幼植物体から採った葉柄を、培養して苗条原基を誘導する場合に、改変 IS 培地に加える Fe-EDTA の量は、32.1~58.6 mg/l の中間に近い 42.1 mg/l (0.1 mM) が適量と考えられた。

ii シラカンバの葉柄と茎軸外植体の苗条原基形成及び苗条形成数に及ぼす BAP と IAA の効果

前項の実験において、幼植物体の葉柄外植体から苗条原基を誘導する際には、改変 IS 培地に加える Fe-EDTA の適量は 42.1 mg/l と推定された。本実験では、この Fe-EDTA の量を加えた改変 IS 培地に、BAP (1 μM 及び 3.16 μM) と IAA (1 及び 0.1 μM) を組み合わせ、ガラス器内養成シラカンバ幼植物体の葉柄と茎軸の外植体を置床した。培養 57 日目における苗条原基の形成率を Table 9

Table 9. シラカンバの葉柄及び茎軸の苗条原基誘導に及ぼす BAP と IAA 濃度の効果
Effects of concentration of BAP and IAA on the initiation of shoot primordium formation on petiole and stem internode explants in shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*)

外植体 Explant		葉柄 Petioles		茎軸 Stem internode segments		
BAP (μM)	IAA (μM)	苗条原基 Shoot primordium	形成率	大きさ	形成率	大きさ
			% of initiation (%)	Size	% of initiation (%)	Size
1	0		0.0	—	25.0	Small
1	1		25.0	Larger	25.0	Larger
3.16	0		75.0	Largest	50.0	Larger
3.16	1		100.0	Small	100.0	Small

葉柄、胚軸の外植体をそれぞれ12個ずつ4種類の培地に置床した。すべての培地には 42.1 mg/l の Fe-EDTA を加えた。

Twelve sections each of petiole and stem internode segment were inoculated on each of the four different media which also contained 42.1 mg/l of Fe-EDTA.

に示した。この表の苗条原基形成率を変数変換したのちに統計処理したところ、外植体に用いた葉柄と茎軸の両方とも、BAP 及び IAA の効果に 1.0% 水準で有意性を認めることができた。

苗条原基の形成率は、植物ホルモンの濃度と組み合わせによって異なった。すなわち、3.16 μM の BAP と 1 μM の IAA とを添加した培地では、葉柄、茎軸ともに苗条原基の形成率は 100% であったが、その大きさは小さく褐色を呈した。BAP を 3.16 μM 加え、IAA を欠いた培地では、両外植体ともに次に高い形成率を示し、暗緑色の大きい苗条原基が形成された (Photo. 12)。BAP を 1 μM 加えた培地では苗条原基の形成率がやや低くなり、IAA を欠いた培地でこの傾向が強かった。

苗条原基から苗条を伸長させるため、BAP を 3.16 μM と IAA を 0.1 μM 加えた IS 基本培地に、苗条原基をそれぞれ数個に分割して移植培養した。その結果を Table 10 に示した。葉柄を外植体として BAP を 3.16 μM 加え、IAA を除いた改変 IS 培地で誘導した苗条原基を、BAP を 3.16 μM と IAA を 0.1 μM 添加した IS 基本培地に移植して



Photo. 12. 改変 IS 培地上でシラカンバ葉柄基部から形成された苗条原基塊 (培養 57 日目)

Differentiation of initial shoot primordium clumps on the base of a shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*) petiole explant (57 days after inoculation in modified IS medium).

BAP 3.16 μM , NAA 0 μM .

Table 10. シラカンバ外植体上に誘導した苗条原基から伸長したシュート数
Numbers of elongated shoots from shoot primordium developed on explants in shirakanba
(*Betula platyphylla* var. *japonica*)

苗条原基誘導に用いた培地の BAP と IAA の濃度* Concentration of BAP and IAA in medium used for shoot primordium formation*		苗条原基培養培地** Medium for shoot primordia culture**		シュート本数/苗条原基 No. of shoots/shoot primordium	
BAP(μM)	IAA(μM)	BAP(μM)	IAA(μM)	葉柄 Petiole	節間茎軸 Stem internode segment
1	0			—	すべて褐変または枯死 All turned brown or died
1	0.1	3.16	0.1	すべて褐変または枯死 All turned brown or died	42.0***
3.16	0			28.3	37.2
3.16	0.1			7.7	14.0

* : 42.1 mg/l の Fe-EDTA を含む培地で 57 日間培養。

Cultured for 57 days on the medium obtaining 42.1 mg/l of Fe-EDTA.

** : 5.6 mg/l の Fe-EDTA を含む培地で 35 日間培養。

Cultured for 35 days on the medium containing 5.6 mg/l of Fe-EDTA.

*** : シュート伸長のための培地で培養中に褐変または枯死したものが多く含まれた。

Shoots turned brown and died while being cultured on the medium for shoot elongation.

35 日間培養した時の平均シュート本数は 28.3 本であった。全く同様に、茎軸を外植体とした場合の平均シュート形成数は、37.2 本であった (Photo. 13)。これに対して、IAA を加えた改変 IS 培地で苗条原基誘導を行った場合は、シュート本数がやや少なくなり、葉柄を外植体としたときには 7.7 本、茎軸では 14.0 本であった。

iii シラカンバ葉柄、茎軸の外植体培養における急速なクローン増殖の潜在力

上述のようにして得られたシュートは、改変 MS (SAITO and IDE, 1985 b) 培地を用いて容易に発根するが、幼苗の径が細い傾向がある。このため、培養 2 か月後に根を切り捨て、茎頂と 2~3 葉をつけた上部シュートを再度植えつけて培養する必要がある (Photo. 14)。このようにして、茎軸の直径の太い頑丈なシラカンバ幼苗を得るためには、苗条原基誘導に約 1.5 か月、シュートの成長に約 1 か月、発根と成長に約 2 か月、再度移植して発根と成長に約 1.5 か月かかるとして、計 6 か月が必要である。Table 10 の結果によって、1 本のガラス器内幼植物体から 4 個の葉柄を得て培養するとすれば、

$$4 (\text{葉柄数}) \times 0.75 (\text{苗条原基形成率}) \times 28 (\text{シュート数/葉柄}) = 84 \text{ 本 (シュート数)}$$

となり、84 本のシュートが得られる。発根率を 80% とすれば、発根幼苗は 67 本となる。67 本の幼植物体を生育させて再び 4 個あての葉柄を得て培養するとすれば、2 代の培養によって、4500 本の苗が得られる。

$$67 (\text{初代の幼苗数}) \times 4 (\text{葉柄数}) \times 0.75 (\text{苗条原基形成率}) \times 28 (\text{シュート/葉柄}) \\ \times 0.80 (\text{発根率}) = 4502 (\text{苗数})$$



Photo. 13. 分割した苗条原基塊から発生伸長したシラカンバのシュート (IS 培地で 35 日目)
Shoot elongation following culture of divided clumps of shoot primordium in shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*) (35 days after inoculation in IS medium).

BAP 3.16 μ M, IAA 0.1 μ M.



Photo. 14. 発根伸長したシラカンバ幼苗

Rooted and elongated shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*) plantlets.

すなわち、1本のガラス器内養成シラカンバ幼植物体の葉柄外植体から約1年間の培養によって、発根幼苗の数は4500本となる。

同じ方法によって、1本の幼植物体の茎軸から約1年間で3500本の発根幼苗が得られる計算になる。従って、ガラス器内の幼苗1本から6か月ごとの2代の培養によって、合計約8000本の幼苗が得られる計算になる (SATO et al., 1986)。

発根した苗条は、パーライトとバーミキュライトを1:1に混ぜてポットにつめたものに移植し、フアイロンハウス内の噴霧灌水下に置いて馴化した。馴化中の苗条を Photo. 15 に示し、これらを野外に植栽した結果を Photo. 16 に示した。



Photo. 15. 馴化しつつあるシラカンバ幼植物
Shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*) plantlets which are being habituated in soil.

使用培土：パーライト1+バーミキュライト1。Soil used : Perlite 1 + Vermiculite 1.

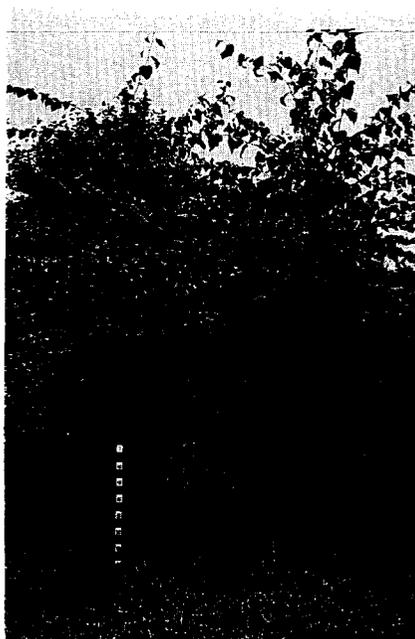


Photo. 16. 組織培養で育成されたシラカンバの植栽林
Field planted shirakanba (*Betula platyphylla* var. *japonica*) trees which were obtained through tissue culture.

3.3 シナミザクラ及びクヌギ成木組織からの器官分化

本研究では、次亜塩素酸殺菌法を用いて、シナミザクラとクヌギの成木から採取した腋芽の培養によるシュートの大量増殖を試みた。

3.3.1 シナミザクラ

(1) 材料と方法

森林総合研究所多摩森林科学園のサクラ展示林に植栽育成されているシナミザクラ (*Prunus pseudocerasus*) の枝を、開花前で新梢が開芽伸長する以前に採取し、実験室に持ち帰って水ざしした。水ざし開始約 50 日後に、室温で枝から伸長した新梢を外植体として採取した。伸長した新梢を、次亜塩素酸ソーダ (NaClO, 有効塩素 4%) 液に 5 分間浸漬処理したのち、滅菌水で 3 回洗い流して表面殺菌し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。風乾した新梢 (茎軸) を、葉をつけた節を中心にして長さ 2.0 cm 内外の長さに切断して外植体とした。

初代培養には、BAP の 0, 1, 3.16 及び $10 \mu\text{M}$ の 4 濃度水準と、IBA の 0 及び $0.316 \mu\text{M}$ の 2 濃度水準とを組み合わせた 8 種の WS 培地を用意した。8 種類の培地をそれぞれ 10 本の試験管に 15 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。80 個の外植体を各試験管に 1 本ずつ、下部切り口を約 5 mm 深さに培地にさしつけた。

初代培養約 30 日後、同じ組成の培地に、腋芽から伸長した芽またはシュートを移植して、1 代目の継代培養を行った。このときの培養器具は、試験管及び 50 ml フラスコを用いた。1 代目の継代培養はほぼ 50 日とし、培養した芽またはシュートから分化したシュート数を調査した。続いて、1 代目の継代培養で得られたシュートのうち、長さ 15 mm 以上のものだけを 2 代目の継代培養に用いた。ここでは、BAP 濃度は 0.316, 1, 3.16 及び $10 \mu\text{M}$ の 4 水準とし、IBA は 1 代目培養と同じく 2 水準で、両者を組み合わせた 8 種類のホルモン組成の WS 培地に植えつけた。培地は 100 ml フラスコに 40 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。そして培養 50 日後のシュート増殖数を調べた。

2 代目の継代培養で得られたシュートのうち、長さ 15 mm 上のものを、IBA を 0.316 または $1 \mu\text{M}$ の濃度で加えた WS, MS 及び WPM の 3 培地にさしつけた。50 ml の三角フラスコに培地を 30 ml あて分注し、常法により加圧滅菌して用いた。

以上の培養条件は、照度 5 000 ルックスの蛍光灯下、日長 16 時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

BAP と IBA 濃度を異にした 8 種類の WS 培地にさしつけた初代培養 30 日後の時点で、茎軸外植体の 80% 以上から芽が伸長した。しかし、そのほとんどは 1 本の茎軸から 1 個の芽だけの開芽・伸長にとどまり、BAP を欠いた培地では、BAP を加えた培地に比べてその伸長は小さかった。

30 日目に茎軸から伸びた芽だけを切り取って、初代培養の培地と同じホルモン組成の WS 培地に移植し、50 日間継代培養した。培養を始めて 20~30 日の間に移植体の基部の葉腋から新しい芽・シュートが発生しはじめた。培養 50 日目の芽・シュートの発生状況を、Table 11 及び Photo. 17 に示した。BAP を加えない培地ではシュートの増殖は全くなく、BAP を $1 \mu\text{M}$ 、もしくは $3.16 \mu\text{M}$ の濃度で加えた培地での発生シュート数が多くなり、それより濃度の高い $10 \mu\text{M}$ では発生シュート数はやや少な

Table 11. シナミザクラのシュート発生数に及ぼす培養ガラス器具と BAP 濃度の影響 (1代目の継代培養)

Influences of culture vessels and concentration of BAP on shoot formation in shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*)(1st subculture)

培養ガラス器 Culture vessel	IBA (μM)	シュート発生数 Numbers of shoots			
		BAP (μM)			
		0	1	3.16	10
18 mm×180 mm 試験管 18 mm×180 mm test tube	0	1.0±0.0	5.8±1.5	6.3±1.3	3.3±2.6
	3.16	1.0±0.0	7.5±1.9	5.0±2.5	3.3±1.5
50 ml 三角フラスコ 50 ml flask	0	1.0±0.0	8.9±4.1	8.7±2.4	6.0±2.3
	3.16	1.0±0.0	6.8±2.0	7.5±3.2	6.2±1.5

数字は平均シュート本数±標準偏差。

Figures : average number of shoots±standard deviation

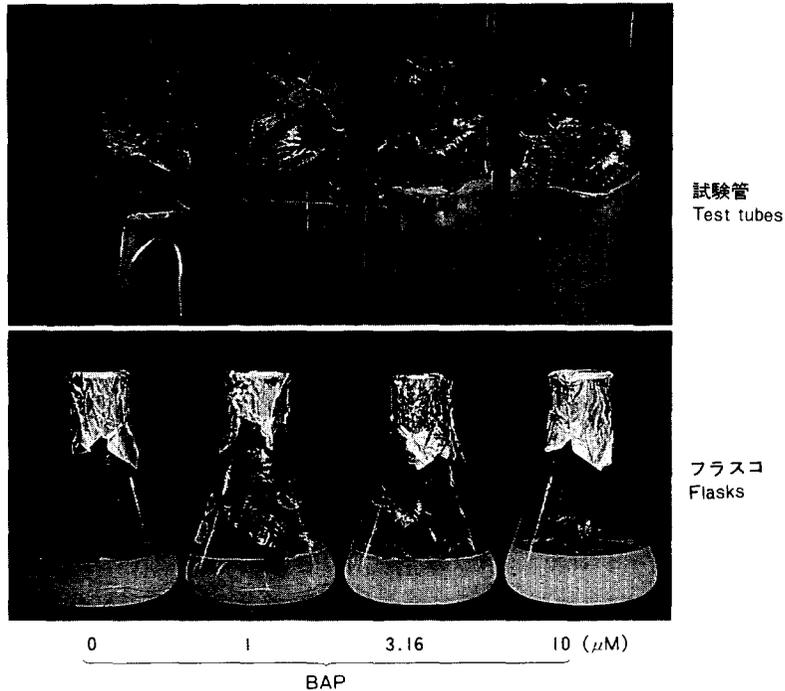


Photo. 17. シナミザクラの培養に使用したガラス器具の違いによるシュート発生状況の差
Difference of shoot formation between test tube and flask cultures in shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*).

くなった。

このシュート発生数の分散分析の結果を Table 12 に示した。継代培養1代目のシュート発生本数は、培養に使用したガラス器具の間に1.0%水準で、また BAP 濃度間に0.1%水準で有意差が認められ

た。

培養ガラス器具の違いによるシュートの発生数の差は明らかで、BAP を加えた培地では、試験管で培養したときよりも、フラスコで培養したときに多数のシュートが発生した。BAP を $10\mu\text{M}$ 加えたときにシュート数が減少する傾向は、試験管で培養した場合に顕著にみられ、フラスコで培養したときには顕著でなかった。IBA の効果は明らかでなかった。

2代目の50日間の継代培養で、Fig. 3の結果を得た。BAP 低濃度の $0.316\mu\text{M}$ と、高濃度の $10\mu\text{M}$ 培地では、移植体1本当たりのシュート発生数は平均6本程度であったが (Photo. 18), BAP が中濃度の $1\mu\text{M}$ 及び $3.16\mu\text{M}$ の培地では平均 $10\sim 12$ 本と多く発生した。IBA の効果は明らかでない。ここで発生したシュートの長さを、長 (茎長 15mm 以上), 中 (茎長 $15\sim 8\text{mm}$), 及び短 (茎長 8mm 以下) に分けて調べた場合、BAP を低い濃度で加えた培地では、長いシュートが数多く、短いシュー

Table 12. シナミザクラのシュート発生数に及ぼす培養器具と植物成長調節物質濃度の効果の分散分析
Analysis of variances of influences in numbers of shoot formation on two kind culture vessels and plant growth regulators in shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*)

Factor	df	SS	MS	F	P
培養容器 Culture vessel	1	10,401	10,401	10.767	**
BAP	3	98,643	32,881	34.038	***
IBA	1	0.456	0.456	0.472	ns
Error	10	9,660	0.966		
Total	15	119,160			

ns: 有意性なし
No significant

** : 1.0%水準で有意
Significant at 1.0% level

*** : 0.1%水準で有意
Significant at 0.1% level

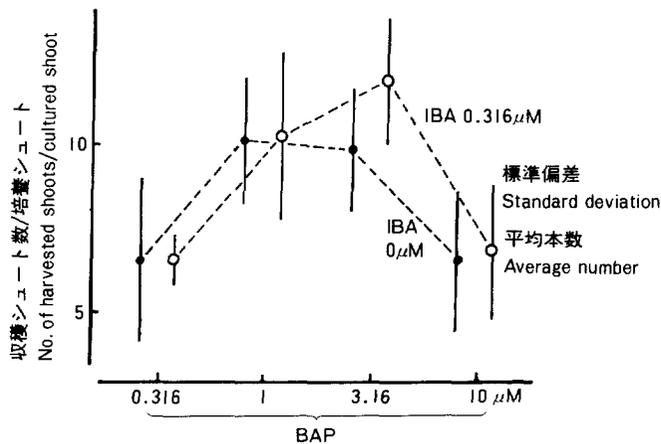


Fig. 3. シナミザクラのシュート分化に及ぼす BAP と IBA の効果
Effects of BAP and IBA on the shoot formation in shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*).

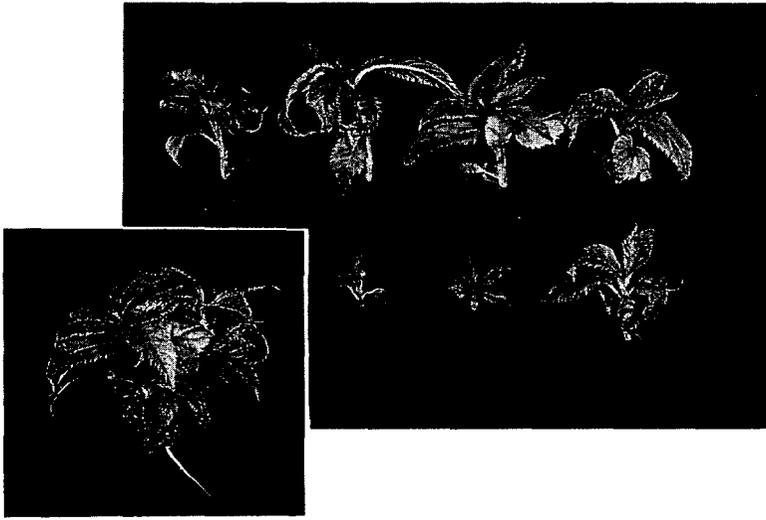


Photo. 18. シナミザクラのシュート増殖状況 (1個の培養シュートから収穫された7本のシュート)

Proliferating state of shooting in shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*) (harvested 7 shoots from a cultured shoot).

トが数少なく発生したのに対して、やや高濃度で BAP を加えた培地では、長いシュートは少なく、短いシュートが多く発生した。この傾向は IBA を加えた場合に強く現れた。継代2代目のシュートの発生本数を統計処理した結果は、BAP の効果は5% 水準で認められたが、IBA の効果は認められなかった。

収穫したシュートを発根させるため、 $0.316 \mu\text{M}$ または $1 \mu\text{M}$ の IBA を加えた WS, MS 及び WPM 培地にさしつけた。発根率はいずれの培地でも90%以上を示した。伸長成長は WS 培地でやや不良であり、MS, WPM 両培地ではよく成長した (Photo. 19)。

3.3.2 クヌギ

(1) 材料と方法

i 初代培養

森林総合研究所の樹木園に植栽されている11年生クヌギ (*Quercus acutissima*) 林分の2~3個体から、5月中旬と8月上旬に当年生枝を採取し、材料とした。これらから外植体を調製し、腋芽の開芽伸長に及ぼす培地の違いを調査した。外植体は、節(葉の着生部)を中心にしてその上下それぞれ1cm内外の長さに枝を切り、葉身を切り捨てて葉柄だけを着けて Y 字型になるように調製した (Photo. 20)。

次に、同所の実験畑に植栽されている11年生のクヌギのつぎ木5個体を選び、地上約1mの高さで台切りして萌芽させた。萌芽した枝を2年間伸長させ、その枝から伸長した当年生側枝を採取した。この材料は、個体別の腋芽の開芽伸長の違いと培養の良否の調査に用いた。外植体の調製法は前述の場合



Photo. 19. シナミザクラのシュートの成長と発根
Shoot elongation and rooting in culture of shinamizakura (*Prunus pseudo-cerasus*).

左から WS, MS 及び WPM 培地。 From left to right : WS, MS and WPM medium.

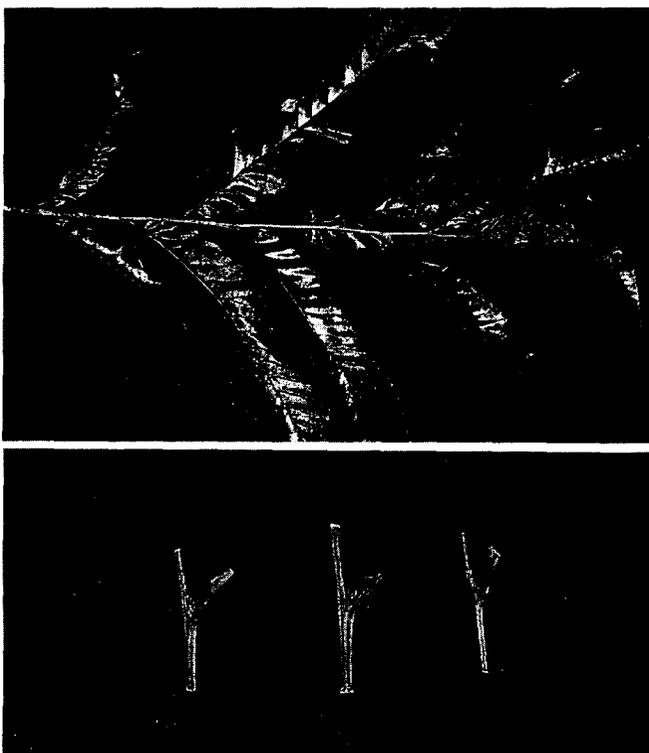


Photo. 20. クヌギ成木の当年生枝と調製した外植体
Current year twig and explants prepared from the twig in kunugi (*Quercus acutissima*).

上 : 当年生枝。 Upper : Current year twig. 下 : 外植体。 Lower : Explant prepared.

と同じである。

調製した外植体は、70% エタノールに1分間浸漬したのち、有効塩素量0.5%または1.0%の次亜塩素酸ソーダ液に15分間、攪拌しながら浸漬して表面殺菌を行った。滅菌蒸留水で3~5回洗ったのち、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。切り口3か所は、殺菌剤で傷んだ部位を切り戻した。

初代培養にはBTM, WPM, ER (改変 MS), または m.H (改変 HELLER) 培地を用い、BAP を $1\mu\text{M}$ または $3.16\mu\text{M}$ の濃度、NAA を $0.316\mu\text{M}$ の濃度で組み合わせ加えた。培地は試験管に15 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。外植体は準備した寒天培地に、外植体の下部切り口を約5 mm の深さにさしつけた。

初代培養の培養条件は、照度3000ルクスの蛍光灯下、日長16時間、 25°C の恒温とした。

ii 継代培養

初代培養において、茎軸外植体の腋芽が開芽し、それからシュートが15 mm 以上に伸長したとき、茎軸外植体からシュートのみを切り取って継代培養を開始した。しかし、開始1~2週間後に頂端から褐変枯死するシュートが多かった。そこで、第1代継代培養に限り、腋芽シュートが着生している外植体の茎軸を、シュートを中心にして上下1 mm 程ずつ切り残し、その茎軸が寒天培地中に埋まる程度に植えつけるよう、方法を変更することにした。2代目からは、1代目継代培養の外植体の茎軸と、茎軸下部のカルスを除去した芽株を移植した。

継代培養はそれぞれの培養期間を35~55日とし、シュートの伸長状態をみながら繰り返し移植した。その都度1.5 cm 以上のシュートを収穫して発根培養に割り当てた。シュート基部の芽を持った株を、カルスを切り除いて移植した。継代培養の培地として、BTM, WPM の両培地ともよい結果が得られなかったため、この二つの培地組成をそれぞれ半減して、加え合わせた成分の培地をBW 培地と名付け、 $3.16\mu\text{M}$ のBAP と $1\mu\text{M}$ のNAA とを組み合わせ用いた。また、収穫したシュートの発根用培地は、クヌギ芽生えの上胚軸由来のシュートの発根により結果が得られた、1/2濃度のWPM (1/2濃度の無機成分+10 g/l のショ糖+100 mg/l ミオイノシトール+1 mg/l 塩酸チアミン+0.5 mg/l ニコチン酸) 培地に、IBA を $3.16\mu\text{M}$ と、NAA を $0.316\mu\text{M}$ とを組み合わせ添加したものを用いた。

次に、継代培養1~数代の間は、移植したシュートが茎頂からネクロシスを起こして枯死するものが多いので、まず、継代1代目における枯死を起こさないような培地の探索、特にBW 培地の無機成分の増減による効果について検討した。すなわち、

- ① ネクロシス抑制効果があると考えられるCaの増加
- ② 同じくSの量の増加
- ③ カロースの形成の促進あるいは抑制に効果があると考えられるMgとFeの量の関係

の3点について、BW 培地の無機成分の組成を変えた培地を用意し、初代培養で得られたシュートを移植培養した。

継代培養用培地は200 ml のバイオフィラスコに60 ml あて、発根用培地は100 ml 三角フラスコに45 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。これらの培養条件は照度5000ルクスの蛍光灯下、日長

16時間, 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

i 初代培養

クヌギ成木の当年生枝を外植体として, $1\mu\text{M}$ または $3.16\mu\text{M}$ の BAP と, $0.316\mu\text{M}$ の NAA とを組み合わせて加えた BTM, WPM, ER (改変 MS), または m.H 上での腋芽シュートの開芽伸長率を, Table 13 に示した。寒天培地に植えつけた外植体は, 置床 10~20 日後に葉柄の付け根に離層を生じ, 葉痕の上部の茎軸腋芽が伸び始め (Photo. 21), 30~45 日の間に腋芽シュートの長さは 15~25 mm に達した (Photo. 22)。

Table 13 に示したように, 雑菌による外植体の汚染率は, 5月採取の材料では 40% 以下でやや低かったが, 8月採取の材料は最高 68% に達した。これは5月採取の場合, 一斉に伸長した当年生枝は, 伸長し始めてから約1か月の間外気と風雨にさらされたのに対して, 8月採取の枝は梅雨期に伸長し始めたため, 採取されるまでの暴露期間が1か月以上と長くなること, また, 外気温が高く, 雑菌の増殖が盛んなことに起因するものと考えられる。また, 梅雨期の6~7月の雨天続きの時に採取した材料の滅菌はほとんど成功せず, 無菌の外植体が全く得られなかった。

生存した外植体数に対して, 腋芽シュートが開芽・伸長 (15 mm 以上) した外植体数の百分率 (開

Table 13. クヌギ成木の腋芽培養における腋芽シュートの開芽伸長率に及ぼす培地組成の効果
Effects of medium compositions on rates of elongated axillary buds in explants derived from mature trees in kunugi (*Quercus acutissima*)

採取月日 Collection date	培地 Medium	BAP (μM)	外植体数 No. of explants	コンタミ率 Percent of contamination (%)	生存外植体数 No. of explants survived	開芽・伸長 外植体数 No. of elongated buds	開芽伸長率 Rate of elongated buds (%)
May 12	BTM	1	40	30.0	28	12	42.9
		3.16	40	17.5	33	16	48.5
	WPM	1	40	32.5	27	15	55.5
		3.16	40	27.5	29	14	48.3
	ER	1	40	40.0	24	8	33.3
		3.16	40	20.0	32	8	25.0
Aug. 10	BTM	1	50	58.0	21	13	61.9
		3.16	50	42.0	29	20	69.0
	WPM	1	50	58.0	21	11	52.4
		3.16	50	42.0	29	16	55.2
	m. H	1	50	48.0	26	12	24.0
		3.16	50	68.0	16	5	31.3

BTM: Broad-leaved tree medium, WPM: Woody plant medium, ER: 改変 (modified) MURASHIGE and SKOOG's medium, and m. H: 改変 (modified) HELLER medium.

すべての培地に $0.316\mu\text{M}$ の NAA を含む。All media were supplemented with $0.316\mu\text{M}$ of NAA.



Photo. 21. クヌギ成木の外植体から伸長した腋芽 (培養15日目)
Elongation of an axillary bud excised from explant in mature trees in kunugi (*Quercus acutissima*) (15 days after beginning of initial culture).



Photo. 22. クヌギ成木の外植体の初代培養における腋芽シュートの成長 (培養45日目)
Axillary shoot formation from explants of mature trees in initial culture in kunugi (*Quercus acutissima*) (45 days after beginning of initial culture).

芽伸長率)は、培地の種類により幾分違いが見られた。5月と8月の両採取時期ともに、m.H及びER培地よりも、BTMまたはWPM培地においてよい結果を示した。また、BAPの濃度間の開芽伸長率は、5月採取の材料では $1\mu\text{M}$ 添加培地よりも $3.16\mu\text{M}$ 添加培地において高率であるが、8月採取の材料では効果は逆転している。これは、材料の内生ホルモンの組成が材料採取の時期によって異なるためと考えられる。

次に、外植体を採取した個体間の開芽伸長率の違いをTable 14に掲げた。表に示した5個体間につ

Table 14. クヌギ成木の腋芽培養における開芽伸長率の個体間差
Individual difference of elongation rates of axillary bud culture from mature trees in
kunugi (*Quercus acutissima*)

培地 Medium	BAP (μM)	開芽伸長率 Elongation rates of axillary bud (%)				
		1号木 No. 1	2号木 No. 2	3号木 No. 3	4号木 No. 4	6号木 No. 6
BTM	1	66.7	28.6	83.3	50.0	85.7
	3.16	66.7	16.7	50.0	40.0	75.0
WPM	1	33.3	37.5	66.7	40.0	85.7
	3.16	57.1	66.7	50.0	60.0	83.3
m. H	1	28.6	37.5	40.0	16.7	25.0
	3.16	50.0	0.0	50.0	33.3	40.0

5月17日置床, 6月22日調査。すべての培地に0.316 μM のNAAを含む。

May 17 inoculated. June 22 observed. All media were supplemented with 0.316 μM of NAA.

いては、開芽伸長率の高い6号、3号及び1号木がみられ、2号と4号木はやや低い率を示した。また、ここでも培地の種類による効果がみられ、全体としてBTM、WPM両培地がm.H培地よりも適していた。BAPの濃度間には一定の傾向は認められなかった。

ii 継代培養

A クヌギ成木の腋芽シュートの継代培養による増殖

8月に採取したクヌギの成木の秋伸び枝から、調製した外植体を培養して得た腋芽シュートを、BW培地(BAP 3.16 μM , NAA 0.1 μM)を用いて、1代の期間が35~55日の日数で継代培養した。その植え継ぎごとに枯れた芽株数、収穫シュート数(及びレンチ)と、それらからの発根率を調べ、その概略をTable 15に示した(Photo. 23及びPhoto. 24)。継代培養1年目で生存芽株数は半減し、2年目でもとの30%、3年目で20%まで減少した。

各継代の芽株当たりの長さ15 mm以上の収穫シュート数のレンチは0~12本で、継代培養中に枯れる芽株には、培養当初からシュートが全く発生しないものが多かった。生存芽株数に対する平均収穫シュート数は、最高4.9本であり、シュートを生産しなかった芽株を除けば、芽株当たり10本近い数になった。

収穫したシュートの発根は、終始1/2 WPM培地を用いて行った。その発根率は40%以下が3回だけで、それ以外は76%以上、多くは80%以上の高い値を示した(Photo. 25)。

クヌギの継代培養によるシュートの増殖方法には、本研究で行ったような継代移植の都度、シュートを収穫して発根させるやり方と、収穫したシュートをまた増殖培地に移植してシュートを増やしていく方法とがある。短期で多量のシュートを増すには後者の方法が効率的と考えられる。

B BW培地の無機成分の多少が継代培養1代目の生存に与える効果

① BW培地のCaの増量がクヌギ腋芽シュートの生存に及ぼす効果

吉田(1972)は、カルス及び生体の生育に対して必要とするCaの量を、 $\text{Ca}^{++}/(\Sigma \text{M}^{++} - \text{Ca}^{++})$ で

Table 15. クヌギ成木の腋芽シュートの継代培養における生存率, 収穫シュート数及び発根率
Survival rates, harvested numbers of shoot from axillary bud culture and rooting rates of shoots in kunugi (*Quercus acutissima*)

継代数 Generation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
培養日数 Days of subcultureing	64	35	35	35	37	42	45	40	37	41	37	43	50	51	55	41	51	48	47	47
移植芽株数 No. of bud cluster inoculated	64	53	44	44	37	31	30	29	24	23	20	19	19	17	16	16	16	14	13	13
枯損芽株数 No. of bud cluster died	11	9	0	7	6	1	1	5	1	3	1	0	2	1	0	0	2	1	0	0
生存芽株数 No. of bud cluster survival	53	44	44	37	31	30	29	24	23	20	19	19	17	16	16	16	14	13	13	13
収穫シュート数 No. of shoot harvested	0	13	26	25	54	53	52	39	48	69	94	58	51	36	31	34	49	50	42	58
同上レンジ Range of shoot	(0)	(0-5)	(0-3)	(0-6)	(0-4)	(0-9)	(0-8)	(0-8)	(0-9)	(0-10)	(0-12)	(0-7)	(0-8)	(0-7)	(0-6)	(0-6)	(0-7)	(0-7)	(0-8)	(0-10)
平均シュート数 Average No. of shoot	0.0	0.3	0.5	0.7	1.7	1.8	1.8	1.6	2.1	3.5	4.9	3.0	3.0	2.3	1.9	2.1	3.5	3.8	3.2	4.5
発根率 (%) Rooting rate	—	100.0	46.1	84.0	75.9	66.0	70.0	82.0	77.1	89.8	92.5	96.6	84.3	86.1	93.5	79.4	89.8	88.0	83.3	86.7

培地は BAP を $3.16 \mu\text{M}$ と NAA を $0.1 \mu\text{M}$ を加えた BW (BTM 培地と WPM 培地の各成分の半量を加えた) 培地。

Medium was BW medium supplemented with $3.16 \mu\text{M}$ of BAP and $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

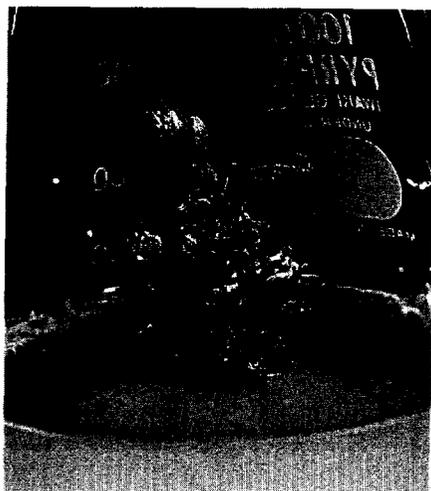


Photo. 23. クヌギ腋芽の1代目継代培養におけるシュートの発生と伸長
Multiple shoot formation and shoot elongation in 1st subculture of axillary bud
in kunugi (*Quercus acutissima*).

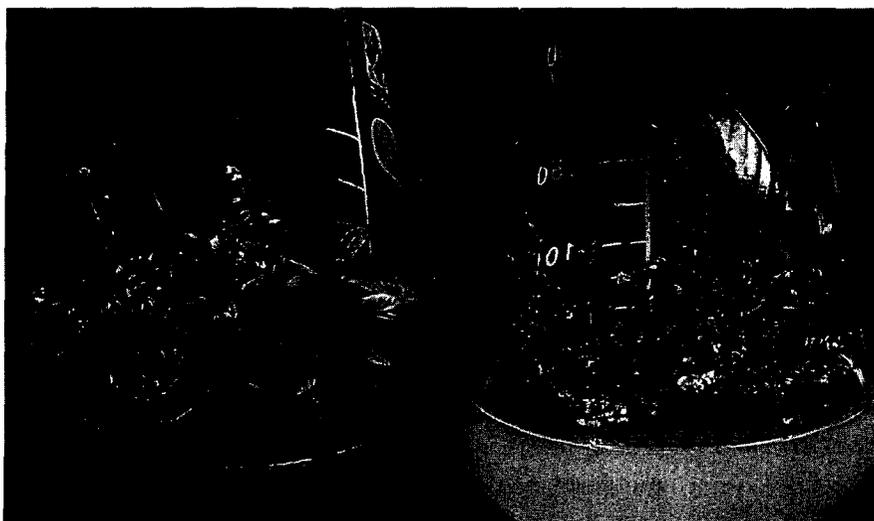


Photo. 24. クヌギ腋芽の8代目継代培養におけるシュートの増殖状況
Aspects of shooting in 8th subculture started from axillary shoot in kunugi
(*Quercus acutissima*).

左: シュート数が少なく、葉は開いている。

右: シュート数が多く、葉は開かない。

Left : Number of shoots was less, and leaves were open.

Right : Number of shoots was numerous, and leaves were closed.

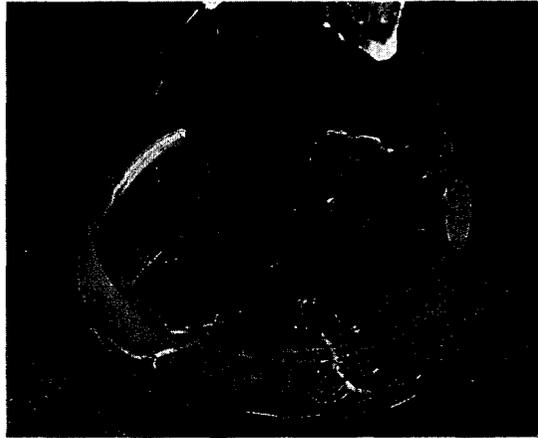


Photo. 25. クヌギシュートの発根 (培養50日目)
Rooted shoot in kunugi (*Quercus acutissima*) (50 days after beginning of culture).

示し、カルスはこの比が0.1以下でよく生育するが、植物体は0.5あるいは1.0以上を必要とするとしている。ここで ΣM^{++} は培地中の無機成分の全 mM 量を、 Ca^{++} は Ca の mM 量を表す。本来、BW 培地のこの比は0.29であるが、この比が0.57及び1.0になるように、 $CaCl_2$ と $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ の量を増やした。それに BAP を2水準 (1, 3.16 μM)、NAA を0.1 μM で組み合わせた培地に腋芽シュートを移植した。

移植2か月後の培養体の生育状態を Table 16 に示した。上述の比が0.57では、BW 標準培地とほとんど変わらない生存率を示したが、1.0では生存率がやや低下した。SHA and PETERSON (1985) による MS 培地の Ca の量を増した培地を用いたジャガイモのシュートの培養では、ネクロシスの発生がなかったが、本試験ではネクロシスを発生した。

② BW 培地に加えた S の量が腋芽シュートの生存に及ぼす効果

一般に、土壌や培地の S の量が不足した場合には、植物体上にネクロシスを起こしやすいといわれている (BHOJWANI and RAZDFAN, 1983)。BW 培地の S 成分は、 $MgSO_4$ 、 $7H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ と K_2SO_4 で組成されている。しかし、前二者の量は非常に少なく、 K_2SO_4 で5.3 mM ほど含まれている。この K_2SO_4 の量について、BW 培地に0, 5.3 mM 加えた区と、10.6, 15.9 mM に増量して加えた処理区とを設けた。これら4種類の培地に BAP の2水準 (1 μM と 3.16 μM) を組み合わせた8種類の培地 (すべての培地に0.1 μM の NAA を添加) に腋芽シュートを移植培養した。その培養2か月後の生存率を Table 17 に示した。

K_2SO_4 を5.3 mM 加えた標準培地に比べて、0mM の培地では生存率が少し低下し、10.6 mM の培地ではほぼ同じであった。これに対して、3倍増の15.9 mM を加えた培地では生存率が高くなり、特に BAP の1 μM 区では83%、3.16 μM 区では100%の生存率を示し、Table 17 において半枯れとして示したシュート上部に、ネクロシスを起こしたシュートの発生率も少なかった。

Table 16. クヌギ腋芽シュートの生存率に及ぼす BW 培地の Ca 量の効果

Effect of amount of Ca in BW medium on the survival rates of axillary bud culture from mature trees in kunugi (*Quercus acutissima*)

CaCl ₂ · 2H ₂ O + Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O		BAP (μM)	生存率 Survival rates (%)		
Ca/ΣM-ΣCa	mM		生存 (S)	半枯れ (N)	枯死 (D)
0.29	6.1	1	42.8	6.3	50.0
		3.16	50.0	8.3	41.7
0.57	10.9	1	35.7	21.4	42.9
		3.16	50.0	25.0	25.0
1.00	21.5	1	25.0	12.5	62.5
		3.16	30.0	0.0	70.0

各培地には 0.1 μM の NAA を添加。半枯れは腋芽シュートの上部にネクロシスを起こしたものの。

Each medium was supplemented with 0.1 μM of NAA. (S) are survival, (N) are necrosis on the top of axillary shoot bud, and (D) are dead of the bud.

Table 17. BW 培地に与えた K₂SO₄ の量がクヌギ腋芽シュートの生存に及ぼす効果

Effect of amounts of K₂SO₄ in BW medium on the survival rates of the axillary shoot in kunugi (*Quercus acutissima*)

K ₂ SO ₄ (mM)	0			5.0			10.5			15.8		
	生存 (S)	半枯れ (N)	枯死 (D)									
BAP(μM)												
1	37.5	12.5	50.0	42.9	42.9	14.2	25.0	25.0	50.0	83.3	16.7	0.0
3.16	37.5	25.0	37.5	75.0	12.5	12.5	71.4	0.0	26.6	100.0	0.0	0.0

各培地には 0.1 μM の NAA を添加。半枯れは腋芽シュートの上部にネクロシスを起こしたものの。

Each medium was supplemented with 0.1 μM of NAA. (S) are survival, (N) are necrosis on the top of axillary shoot bud, and (D) are dead of the bud.

③ BW 培地の Mg と Fe の量が腋芽シュートの生存に及ぼす効果

植物体を傷つけた場合に、細胞内に生成されるカロースの量は、体内の Mg と Fe の量に影響されることがあるといわれている。BW 培地の Mg の量を標準及び 1/10 とし、また、Fe を標準と、全く欠く 4 種類の培地 (Table 18) を調製して、クヌギの腋芽シュートを継代培養した。約 2 か月培養した結果、BW 基本培地で最高の生存率を示した。Mg を減量した場合と Fe を欠いた場合では生存率が非常に低下し、枯死したものが非常に多かった。

ここで特に目立ったのは、Fe を欠いた場合はカルスが形成されないか、または形成されても極めて小さい。これに対して、Mg を 1/10 の量にし、Fe を標準で加えた培地では、非常に大きなカルスを形成したことであった。このことは、クヌギのカルス培養に示唆を与えるものと思われる。

Table 18. BW 培地の Mg と Fe の量がクヌギ腋芽シュートの生存率に及ぼす効果
Effect of amounts of Mg and Fe in BW medium on the survival rates of the axillary shoot in kunugi (*Quercus acutissima*)

MgSO ₄ ·7H ₂ O (mM)	Fe-EDTA (mM)	生 存 率 Survival rates (%)			シュートの根元のカルスの大きさ Callus on the base of shoot
		生存 Survival	半枯れ Necrosis on the top of shoot	枯死 Dead	
3.0	0.1	93.6	0.0	6.2	中 Middle
3.0	0.0	25.0	25.0	50.0	極小またはなし Small or no
0.3	0.1	38.9	33.3	27.8	極めて大 Largest
0.3	0.0	14.3	0.0	85.7	なし No

各培地には 3.16 μM の BAP と 0.1 μM の NAA を加え、Fe-EDTA 0.0 mM の培地には Na₂-EDTA を 0.1 mM 加えた。Each medium was supplemented with 3.16 μM of BAP and 0.1 μM of NAA, and medium with 0.0 mM of Fe-EDTA contained 0.1 mM of Na₂-EDTA

4 カルス培養

4.1 スギ、クロマツ及びポプラ類のカルス誘導

本研究では、針葉樹として代表的な造林樹種のスギ、クロマツについて、また、広葉樹は雑種ヤマナランを含む 9 種のポプラについて、カルス誘導における外植体及び培地の種類、並びにそれに対するオーキシンとサイトカイニンの種類と濃度の最適条件を検討した。

4.1.1 スギ

(1) 材料と方法

カルス誘導の外植体には、雄花鱗片と未熟種子を用いた。雄花鱗片を用いる場合、雄花を 70% エタノールで 5 分間表面殺菌した後、滅菌濾紙上で風乾した。その後、滅菌ずみの 3% 寒天上で、滅菌ピンセットを用いて鱗片をはがして、これをそのまま外植体とした。

未熟種子を用いる場合には、緑色の生育途上の球果を 70% エタノールで 5 分間表面殺菌したのち、滅菌濾紙上で風乾した。この球果を滅菌濾紙上で、滅菌ピンセットを用いて鱗片をはがし、そのなかから乳白色の未熟種子を摘出し、外植体とした。

いずれの場合も改変 WS 培地を基本培地とし、オーキシンとして NAA, IBA, 及び 2,4-ジクロロフェノオキシ酢酸 (2,4-D) を、サイトカイニンとしてカイネチン (KIN) 及び BAP とを数水準の濃度で組み合わせ、約 10 ml ずつ各処理単位ごとに 20 本あての試験管に分注し、常法により加圧滅菌した。培養条件は、照度 500 ルックスの蛍光灯照明下、日長 14 時間、25°C の恒温下で 45 日間培養した。

(2) 結果と考察

雄花からはがした鱗片の基部からカルスが形成されたが、鱗片の基部に着いている花粉囊からはカルスが形成されなかった。置床時期別に見ると、最もカルスの形成率が高かったのは、10月18日に置床した場合、KINが低濃度では、①2,4-Dの効果が大きく、次いで②NAAの効果はやや低く、③IBAの効果はほとんど認められなかった。KINが高濃度になるとNAAが低濃度でも効果を示し、IBAでもやや効果を示した。11月22日に置床した場合、KINが低濃度が、NAA, 2,4-Dともによくカルスを形成した。12月22日に置床した場合には、KINとBAPによる違いもNAA, 2,4-D及びIBAの効果の差もほとんど見られなかった。次いで1月21日に置床した場合には、やや低いカルス形成率を示した。

スギの球果から未熟種子を摘出して、改変WS培地で培養したところ、より未熟な種子を置床した6月4日及び6月12日の場合のカルス形成は、NAA, 2,4-Dともに高い形成率を示した。これらに、0または $1\mu\text{M}$ の濃度でBAPを組み合わせ添加した場合には特に高い形成率を示したが、BAPが $10\mu\text{M}$ では、NAAと2,4-Dがいずれの濃度でもカルス形成率は極めて低かった。7月2日に採取した球果から摘出した未熟種子を外植体とした場合には、全くカルス化しないか、あるいは極めて低い形成率であった。未熟種子の場合は、未熟種皮が分裂能力をもっている時期に、その表皮未分化組織からカルス形成が起こることを確かめた。

4.1.2 クロマツ

(1) 材料と方法

雄花鱗片及び芽生えの胚軸を外植体としてカルスの誘導を行った。まず、雄花は70%エタノールで表面殺菌したのち風乾、その雄花から無菌ピンセットを用いて、花粉囊をつけた鱗片をはぎ取り外植体とした。この場合、NAAとBAPまたはKINとを組み合わせ加えた改変WS培地を用いた。培養条件は、照度500ルクスの蛍光灯照明下、日長14時間、 25°C の恒温とした。

胚軸外植体の調製は、クロマツ貯蔵種子を7.5%過酸化水素水で15分間表面殺菌して、風乾した種子を無菌寒天上で発芽させた。種皮が落ちる前の芽生えの胚軸を2~3mmの長さに切断した切片を外植体とした。カルス誘導の培地はSTAINHALT, STANDIFER and SKOOG (SSS) 培地とし、NAA, 2,4-D, BAP及びKINを単独で、それぞれ $0.01\mu\text{M}$ から10倍ずつ増して $100\mu\text{M}$ に至る5水準で加えた。培養条件は照明1000ルクスの蛍光灯照明下、日長16時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

花粉が、四分子期〜一核期に当たる時期においてのみ、鱗片基部からのカルス形成がみられた。カルスの形成率は極めて低く、NAAの $0.316\mu\text{M}$ 、または $1\mu\text{M}$ 添加培地でも20%以下であった。

クロマツ芽生えの胚軸から、NAAを $0.1\sim 100\mu\text{M}$ 、または2,4-Dを $1\sim 100\mu\text{M}$ の範囲で添加したSSS培地上でカルス誘導ができた。そして、NAAまたは2,4-Dを $1\sim 100\mu\text{M}$ の範囲で加えたSSS培地上では、継代培養または器官形成試験に移せるほどのカルスを高率に誘導できた。しかし、2,4-Dを含む培地上で誘導したカルスは、形成後急速に褐変しやすい傾向を示した。BAPまたはKIN単独加用のSSS培地上では、対照区と同様全くカルスを誘導できなかった。

DURZAN et al. (1976) は、*Pinus banksiana* の発芽 5 日目の幼苗を用いて、MS 培地に L-アルギニン を 400 mg/l 加えたときに、優れたカルス形成をみた。この場合は、 $\text{NH}_4\text{-N}$ が多量に加えられたう えに、有機の窒素成分が SSS 培地と同量加えられたことになる。HARVEY and GRASHAM (1969) の実験では、Soft pine のカルス誘導とその成長には 2,4-D が有効であり、Hard pine には NAA が有効であるとしている。本実験でも、Hard pine に属するクロマツの胚軸からのカルス誘導には、NAA より効果を示した。

4.1.3 雑種ヤマナラシ

(1) 材料と方法

カルス誘導に用いた外植体は、森林総合研究所実験畑に植栽されている雑種ヤマナラシ（十条製紙 KK. 北上樹木センターで、*Populus sieboldii* × *P. grandidentata* の交配によって得られた雑種群）のうち、Y-102 と命名されたクローンから採取した。4~5 cm 長に切断した当年生枝を中性洗剤でよく洗い、70% エタノールに 2 分間浸漬して表面殺菌した。これを風乾した後、その両端を約 1cm ずつ切り捨て、枝を厚さ 3mm 内外の円盤状に輪切りにした組織片を外植体とした。

カルス誘導用には、WS 及び MS 培地を用い、両培地に BAP を $1\ \mu\text{M}$ の濃度で加えたうえで、NAA または 2,4-D を 0.1, 1, 及び $10\ \mu\text{M}$ の 3 水準でそれぞれ加えた。培地は試験管に 10 ml ずつ分注し、加圧滅菌した後、外植体を置床した。これらの培養条件は、照度 1000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

置床後 25 日目のカルス形成状況を見ると、WS 培地の形成率は MS 培地よりも優れており、WS 培地に NAA を $10\ \mu\text{M}$ 加えた培地で最高の 90% の形成率を示した。また、2,4-D を加えた MS 培地でのカルス形成とその成長は、NAA を加えた培地より早かったが、カルスの表面が褐変することも急速であった。結果的には MS 培地よりも WS 培地が、雑種ヤマナラシのカルス誘導には適していた。

4.1.4 その他のポプラ類

(1) 材料と方法

森林総合研究所樹木園に植栽されているポプラ類 8 種から、前年生枝を採取して供試した。採取した枝は、70% エタノールで 5 分間表面殺菌、風乾したのち、木部と形成層を含む皮層を $5\ \text{mm} \times 5\ \text{mm}$ 位に切り取って外植体とした。WS 培地を用い、BAP の 0 または $1\ \mu\text{M}$ に、NAA または 2,4-D の 0.1, 1, $10\ \mu\text{M}$ の 3 水準をそれぞれ組み合わせた。培地は試験管に 15 ml あて分注し、常法によって加圧滅菌した。培養条件は、照度 1000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

培養 45 日目のカルス形成の状況を調べた結果、全体として継代培養に適しカルスを高率に形成したホルモン濃度は、NAA, 2,4-D とともに $1\ \mu\text{M}$ であった。また、 $10\ \mu\text{M}$ では濃度が高すぎる傾向を示した樹種が多かった。

Leuce に属する *Populus sieboldii* と *P. alba* とを比較すると、前者がよくカルスを形成し、また、両者とも NAA よりも 2,4-D の効果が高いことが認められた。*P. alba* では、NAA, 2,4-D と

もに高濃度の $10\ \mu\text{M}$ で加えた場合にカルス形成率が高かった。

Tachmahaca 節に属する *P. simoni* と *P. maximowiczii* では、前者がどの培地上でもよくカルスを形成し、後者は前述の *P. alba* とよく似たカルス形成を示した。

Aegeiros 節に属する *P. canadensis*, *P. deltoides* 及び *P. × euroamericana* の2系統 (I-45/51, I-214) のうち、*P. canadensis* では $1\ \mu\text{M}$ の BAP に、 $1\ \mu\text{M}$ の NAA を添加した培地で100%のカルス形成率を示し、NAA の効果が 2,4-D の効果を上回った。このことは前述した *Leuce* 節、*Tachmahaca* 節に属する樹種と傾向を異にした。*P. canadensis* 以外の3種のカルス形成はやや不良であった。

4.2 スギ及びポプラ類カルスからの器官再生

この研究では、スギカルスからの根の発生及び aspen 系ポプラを含むポプラ類カルスからのシュートの発生について検討した。

4.2.1 スギ

(1) 材料と方法

スギのカルスから植物器官の形成を目的として、幼雄花の鱗片を NAA と KIN とを組み合わせた改変 WS 培地で誘導したカルスを用い、継代培養を行わず、BAP と NAA を組み合わせ加えた分化用改変 WS 培地に直接移植して、カルスからの器官の再生を調べた。カルス誘導には Table 19 下段の培地を用いた。

また、未熟種子起源のカルスを、c-AMP 及び dib. c-AMP に NAA と組み合わせた WS 培地で継代培養して、カルスの増殖状況をみながら、その後の器官の形成について調べた。

各培地は試験管に 10 ml あて分注し、常法によって加圧滅菌した。培養条件は、照度 1000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 14 時間、 25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

スギ雄花鱗片から誘導したカルスを、分化用培地に移植した結果を Table 19 に示した。NAA を $3\ \mu\text{M}$ 加えた培地では多くのカルスから発根したが、 $10\ \mu\text{M}$ ではわずかのカルスから発根し、 $1\ \mu\text{M}$ では全く発根しなかった。しかも、発根したカルスの由来は、Table 19 の下段に示したように、NAA を $0.2\ \mu\text{M}$ か $1\ \mu\text{M}$ というような低濃度で、しかも、KIN も低濃度で加えた培地で誘導したカルスが多い。そして、分化培地に NAA を $3\ \mu\text{M}$ 、または $10\ \mu\text{M}$ 加えたものに、BAP を $3\ \mu\text{M}$ を組み合わせ加えた培地で発根が多かった。このように、カルス誘導と発根した培地との関連がみられたが、いずれの培地からも不定芽や不定胚の形成は全くみられなかった。

カルスからの発根の経時的状況は、まず、斜面培地上のカルスの上表面のおおむね中央付近から根が出現し、空中へ伸長したのち下方へ曲がり、その先端が、寒天培地内に伸長していく例が多くみられた (Photo. 26)。

針葉樹のカルスからシュートを形成した報告例は、KAUL and KOCHHER (1985) の *Pinus strobus*, BOURGKARD and FAVRE (1988) の *Sequoia sempervirens* がある。また、WASHER et al. (1977) は *Pinus radiata* のカルスから、木部、形成層及び皮層組織を分化させた。しかし、これらのカルス

Table 19. スギカルの誘導培地と器官形成培地との関係 (改変 WS 培地)
Relation of callus induction medium and organ formation medium in sugi (*Cryptomeria japonica*)(modified WS medium)

植物成長調節物質 Growth regulators		置床カルス数 No. of callus inoculated	器官形成したカルス数 No. of callus which formed organ			発根したカルスの誘導培地番号 Callus induction medium number of rooted callus
NAA (μM)	BAP (μM)		不定芽 Adventitious bud	不定根 Adventitious root	発根カルス率 Percentage of rooted callus (%)	
1	1	8	0	0	0.0	
	3	8	0	0	0.0	
	10	8	0	0	0.0	
	30	8	0	0	0.0	
3	1	8	0	1	12.5	②
	3	8	0	4	50.0	①, ②, ⑤, ⑥
	10	8	0	1	12.5	②
	30	8	0	1	12.5	⑦
10	1	8	0	0	0.0	①, ③
	3	8	0	2	25.0	
	10	8	0	1	12.5	
	30	8	0	1	12.5	

カルス誘導培地番号 Callus induction medium number

NAA(μM) \backslash KIN(μM)	0.3	1	3
	0.2	①	②
1	④	⑤	⑥
5	⑦	⑧	—

は胚組織から由来しており、成木の器官・組織由来のカルスからシュートを分化させたものはない。

次に、未熟種子から誘導したカルスを、c-AMP 及び dib. c-AMP を 0.01 μM から 10 μM までに至る 5 水準の濃度 (Table 20) で加えた WS 培地を用いて培養した。もともと c-AMP 及び dib. c-AMP はサイトカニン様物質として、不定芽、不定胚の分化形成のひきがねとなるといわれている (MANGAT and JANJUA, 1987; 水越ら, 1973)。しかし、本実験では根の発生のみがみられ、植物地上部の分化はみられなかった。1~3 代目まではカルスの成長増殖のみ認められた。そして 4 代目から 6 代目までの間に、Table 20 に示したように、培養カルスから根の分化形成をみた。なお、継代培養期間は約 6 か月であった。

培養カルス単位の根の分化率をみると、継代培養 4 代目では発根したカルスの率は低かったが、5 代目ではすべての c-AMP 培地と、多くの dib. c-AMP 培地で高い発根率を示した。しかし、6 代目になるとほとんどの培地で発根しなくなった。5 代目の発根率は c-AMP では濃度が高まるにつれて高くなり、最高 44.4% を示した。これに対して dib. c-AMP では、低濃度の 0.01 μM と高濃度の 10



Photo. 26. スギカルスからの発根
Root formation from callus in sugi (*Cryptomeria japonica*).

Table 20. c-AMP 及び dib. c-AMP がスギカルスの発根率に及ぼす効果 (WS 培地)
Effects of c-AMP and dib. c-AMP on rooting rates of sugi (*Cryptomeria japonica*) callus (WS medium)

植物成長調節物質 Growth regulators		発根率 Rooting rates (%)		
		継代数 Generations		
		4th	5th	6th
	(μM)			
Control	0	0.0	7.1	0.0
c-AMP	0.01	6.3	7.1	0.0
	0.1	0.0	18.8	0.0
	0.316	6.7	37.5	0.0
	1	6.3	31.3	6.7
	10	0.0	44.4	0.0
dib. c-AMP	0.01	18.2	0.0	0.0
	0.1	0.0	7.1	0.0
	0.316	0.0	6.3	0.0
	1	0.0	30.8	14.2
	10	0.0	0.0	0.0

すべての培地に $0.1 \mu\text{M}$ の NAA を含む。

All media were supplemented with $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

μM 培地での発根はみられず、中間の濃度で発根した。

以上述べたように、BAP, c-AMP 及び dib. c-AMP を含む改変 WS, または WS 培地上で培養したスギカルスから地下部, すなわち, 根の分化発生のみみられた。ここでは, NAA が効果を表したことも考えられる。一般には BAP などのサイトカイニン類, あるいは c-AMP のようなサイトカイニン様物質が, シュートのような地上部器官の分化のひきがねとして働くことが明らかにされているが, スギのカルスからの不定芽, それに続くシュートなど, 植物地上部の発生は認められなかった。

最近, HAKMAN and FOWKE (1987) は *Picea glauca*, *P. maritima* の未熟胚を用い, また, HAKMAN and ARNOLD (1988) は *Picea glauca* の未熟胚を用いた実験で, embryogenic callus を誘導し, それから胚様体発生を起こしている。さらに, ARNOLD and HAKMAN (1988) は, *Picea abies* の未熟または成熟胚から得られた embryogenic callus から体細胞胚を得た。スギの培養カルスからの不定胚, またはシュートの分化形成の方法を確立することは今後の課題である。

4.2.2 雑種ヤマナラシ

(1) 3, 4代継代培養したカルスからのシュート分化

i 材料と方法

雑種ヤマナラシ Y-102 クローンの新梢の形成層から, BAP と NAA とを加えた WS 培地で誘導したカルスを, 中濃度の 2, 4-D, と低濃度の BAP を組み合わせた MS 培地で継代培養した。シュート分化の実験に用いたカルスは, ほぼ2か月ごとに3回植え継ぎ培養したものを3代目カルス, 初めの2回は2か月ごと, 次の2回は1か月ごとに植え継ぎ培養したものを4代目カルスとした。両者の継代培養期間は, 継代培養開始後ほぼ6か月であった。

シュート分化に用いた培地は, ① WS 基本培地 (NH_4NO_3 の量が 50 mg/l , 以下 WS-標準), ② WS-中 N (NH_4NO_3 の量を 676 mg/l に増したもの) 及び ③ WS-多 N (NH_4NO_3 の量を 1637 mg/l に増したもの) の3種類である。

また, シュート分化のひきがねとして加えるサイトカイニンには, BAP の代わりにゼアチンを用い, その濃度を 1, 3.16, 10 及び $31.6 \mu\text{M}$ の4水準とした。従って,

3種類の培地×4ゼアチン濃度=12種類の培地

を調製した。なお, すべての培地には $0.1 \mu\text{M}$ の NAA を加えた。

培地は試験管に 10 ml あて分注し, 常法により加圧滅菌した。3代目及び4代目カルスはそれぞれ8個を用い, 各カルスは無菌3%寒天上ではほぼ同大(約 100 mg)に12等分し, 12種類の培地に移植した。培養条件は, 照度 1200 ルックス の蛍光灯照明下, 日長14時間, 24°C の恒温とした。

ii 結果と考察

培養開始後, 早いものでは約1か月でグリーンスポットが実体顕微鏡下で観察され, 徐々に1~数枚の葉がカルス表面に出現し, 次いで葉のつけ根から茎が出はじめた。なお, カルス表面に葉のみ出現し, シュートの出現がないものもあった。また, シュートを分化したカルスにおいては, 置床したあと, 成長と緑化が認められたが, 培地の NH_4NO_3 の量の多少にはほとんど関係がなく, ゼアチンを $3.16 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ の濃度で与えた培地でみられた。これに対して, $1 \mu\text{M}$ または $31.6 \mu\text{M}$ のゼアチンを

添加した培地上のカルスの多くは、増殖・成長をせず、移植時の帯緑黄色から次第に褐変した例が多かった。

培養3か月目におけるシュート分化の結果を Table 21 に示し、カルスからのシュート発生状況を Photo. 27 に示した。

供試カルス数に対して、シュート分化を認めたカルス数の割合(%)を、シュート形成率として示した。最も高いシュート形成率は WS-中 N, 3.16 μM ゼアチン培地で、特に4代目カルスにおいては、87.25%の高率を示した。次いで、同 10 μM のゼアチン培地上の4代目が62.5%, WS-標準, 3.16 μM ゼアチン培地で30%以上のカルスからシュート分化をみた。しかし、ほかの9種の培地上では極めてシュート形成率が低いか、または全く分化しなかった。

培地の NH_4NO_3 の添加量とシュート形成率の関係をみると、WS-標準に比べて、WS-中 N でのシュート形成率が高かった。さらに、窒素成分を増量した WS-多 N では形成率が低くなった。また、ゼアチン濃度からみれば、3.16 μM が最も大きな効果を示し、次いで 10, 31.6 μM と続くが、低濃度の 1 μM では全く効果がなかった。

このシュート形成率を MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換したのち、分散分析した。その結果、培地の種類、すなわち、 NH_4NO_3 の量の間には5%水準で、ゼアチンの濃度間に1%水準で有意性が認められた。しかし、3代目と4代目のカルスの間には有意性がなかった。また、培地の種類の寄与率は15%、ゼアチン濃度のそれは37%を示した。

カルスからの器官分化の重要な条件として、培地に加えられる N 源の化学的形態があげられ、ニンジンの不定胚形成には、 NO_3 より NH_4 の効果が大きいとされている (HALPERIN and WETHERRELL, 1965)。SAITO (1980 b) は、イタリー改良ポプラのカルス培養物からの茎葉分化に、培地中の NH_4NO_3 の量が効果的に働くことを明らかにした。すなわち、 NH_4NO_3 が少量 (88 mg/l) では全く分化せず、中量 (568 mg/l) 及び多量 (2370 mg/l) では分化し、特に多量培地でよく分化することを認めている。これに対して本試験では中量 (676 mg/l) 培地でよく分化したが、これは樹種、カルスの培養前歴のほか、培地を構成するほかの無機成分の違いによるものと考えられる。いずれにしても、雑種ヤマナラシカルスからのシュート分化のためには、WS 基本培地の NH_4NO_3 の量では不足で、本試験で分化が多かった 676 mg/l 近傍が適量と思われる (佐藤, 1981)。

多くの場合、高濃度のオーキシシンと、低濃度のサイトカイニンを加えた培地でカルスを誘導し、中濃度のオーキシシンと、低濃度のサイトカイニンを加えた培地で継代培養し、サイトカイニンをやや多く含む培地に移すことによって、シュートまたは不定胚が分化する。WINTON (1968) 及び WOLTER (1968) は、*Populus deltoides* のカルスを BAP 単独で加えた WS 培地上で、SAITO (1980 b) は、イタリー改良ポプラ I-214 のカルスを用いて BAP と 2,4-D を加えた培地でシュートを分化させた。

本実験においては、雑種ヤマナラシカルスを、BAP の代わりにゼアチンを用いて NAA と組み合わせ、かつ、 NH_4NO_3 を増量した WS 培地で培養してシュートを分化させた。多くの場合、サイトカイニンとして BAP が使われているが、ここでは天然サイトカイニンであるゼアチンを用い、その効果的濃度は 3.16~10 μM であることが分かった。

Table 21. 雑種ヤマナラシカルのシュート形成率と発生数に及ぼす培地組成とゼアチン濃度の効果

Effects of medium composition and concentration of zeatin on shoot formation rates and numbers of shoot per callus in aspen hybrid, *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*

分化培地 Medium	WS-標準 WS-standard				WS-中N WS-median N				WS-多N WS-abundant N			
	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6
ゼアチン濃度 Concentration of Zeatin (μM)	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6
シュート形成率(%) Shoot formation												
3代目の8個のカルスから From 8 calli after 3 passages	0	25.0	25.0	0	0	50.0	50.0	0	0	25.0	0	0
4代目の8個のカルスから From 8 calli after 4 passages	0	37.5	0	2.5	0	87.25	62.5	12.5	0	0	2.5	12.5
シュート発生数/カルス No. of shoots/callus	—	1.5	2.5	—	—	4.0	3.3	1.0	—	2.5	1.0	—
範囲 Range	—	1~3	1~	—	—	1~7	2~5	1	—	2~3	1	—
葉のみの発生数/カルス No. of leaves/callus	—	2.6	1.0	1.0	—	4.5	4.8	2.0	—	3.0	1.0	2.0
範囲 Range	—	1~5	1	1	—	2~9	2~9	2	—	3	1	2

WS-標準培地は NH_4NO_3 を 50 mg/l, WS-中N培地は 676 mg/l, WS-多N培地は 1 637 mg/l を含む。すべての培地に $0.1 \mu\text{M}$ のNAA を添加。WS-standard medium contained 50 mg/l. WS-median N medium contained 676 mg/l and WS-abundant N medium contained 1 637 mg/l of NH_4NO_3 , respectively.All media were supplemented with $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

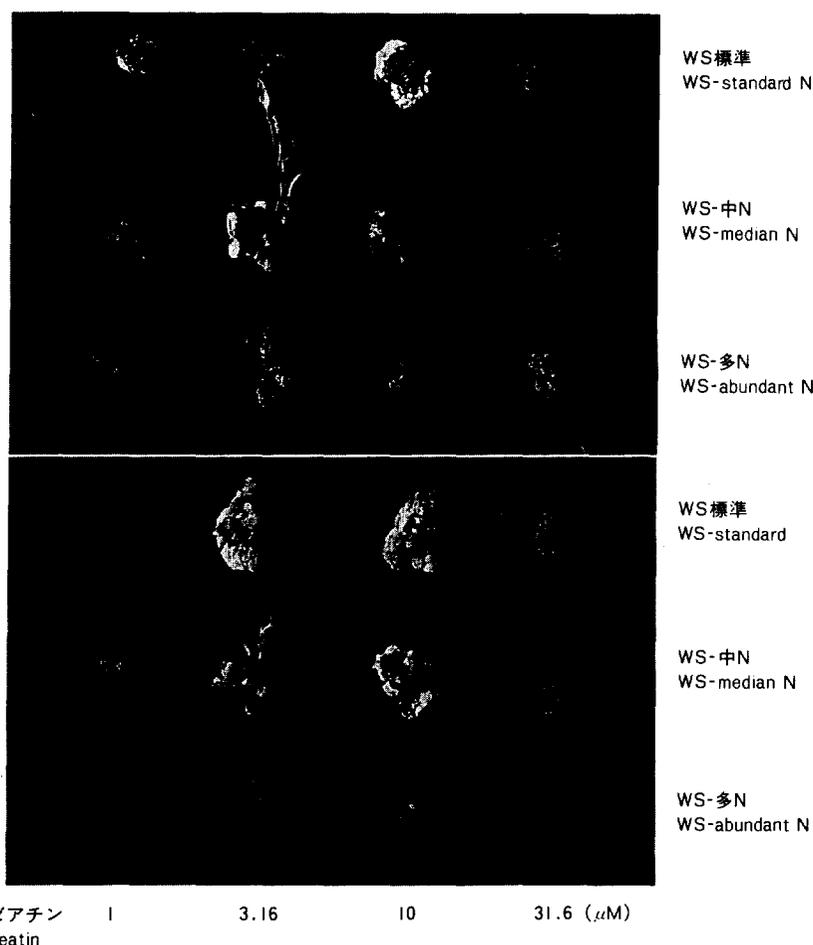


Photo. 27. 雑種ヤマナラシカルスのシュート形成に及ぼす培地組成とゼアチン濃度の効果
Effects of medium composition and concentration of zeatin on shoot formation
from callus in hybrid aspen (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*).

(2) 8代継代培養したカルスからのシュート分化

i 材料と方法

本項では、前項で用いた雑種ヤマナラシカルスの一部を 2,4-D, NAA, BAP とを組み合わせ加えた MS 培地で、8代継代培養したカルスからのシュート分化を調べた。

分化培地は、前項と同じく、WS-標準, WS-中N, 及び WS-多N の3種類とした。また、シュート分化のひきがねとしてのサイトカイニンには、BAP とゼアチンを、それぞれ 1, 3.16, 10, 及び 31.6 μM の4水準で添加した。各培地には 0.1 μM の NAA を合わせて加えた。

培地は試験管に 10 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。培養条件は、照度 3000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

ii 結果と考察

培養3か月後のカルスからのシュート分化は、ゼアチン添加培地で低頻度で認められたにすぎず、BAP 添加培地では全く分化しなかった。

そこで、これらのカルスを同じ組成で、同じサイトカイニン（BAP もしくはゼアチン）添加の培地に移植した。その培養により、ゼアチン添加の各培地では、徐々にシュートの分化が認められた。再移植後、3か月のシュート分化の結果を Table 22 に示した。しかし、BAP を添加した培地では、再移植後3か月経過してもシュート形成は全くみられなかった。

ゼアチン添加の WS 培地の、 NH_4NO_3 の量を変えた3種類の培地のなかで、シュート形成率が最も高かったのは WS-中N で、次に WS-多N、WS-標準培地の順であった。また、最もシュート形成率が高かったゼアチン濁度は $10 \mu\text{M}$ であり、次に、 3.16 及び $31.6 \mu\text{M}$ であった。処理組み合わせでは、WS-中N の $10 \mu\text{M}$ ゼアチン培地で75%、同じく $31.6 \mu\text{M}$ ゼアチン培地で62.5%と高く、次いで WS-標準及び WS-多N の、ともに $10 \mu\text{M}$ ゼアチン培地の37.5%であった。Table 22 のシュート形成率を前述の MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式によって変数変換し、分散分析を行った。その結果、培地の NH_4NO_3 の量間には有意性は認められず、ゼアチン濃度間では5%水準で有意性が認められた。雑種ヤマナラシの継代培養を行った3、4代目カルスでは、ゼアチン濃度が $3.16 \mu\text{M}$ で最高68.8%の分化率が得られたのに対して、8代目のカルスでは、それより濃度の高い $10 \mu\text{M}$ について最高75.0%の分化率を示し、次いで、 $31.6 \mu\text{M}$ の高濃度でシュート分化率が高かった。しかも、再移植して6か月目においてこの結果が得られた。以上により、カルスの継代培養代数の増加につれて、シュート分化にかかる日数を多く必要とし、高いサイトカイニン濃度を要するようになるものと考えられる。また、BAP を加えた培地では、再移植した6か月後でも全くシュート分化は見られなかった。

さし木が難しく根伏せなどによる伝統的な増殖方法がとられている aspen 系ポプラには、培養カ

Table 22. 雑種ヤマナラシカルスのシュート形成率とカルス当たりのシュートの発生数に及ぼす培地組成とゼアチン濃度の効果（8世代継代培養カルス）

Effects of medium composition and concentration of zeatin on shoot formation rates and numbers of shoots per callus in aspen hybrid (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) (from 8 generation's callus)

培地 Medium	WS-標準 WS-standard				WS-中 WS-median N				WS-多N WS-abundant N			
	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	31.6	10	31.6
ゼアチン濃度 Concentration of Zeatin (μM)	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	31.6	10	31.6
シュート形成率(%) Shoot formation	0.0	12.5	7.5	0.0	12.5	12.5	75.0	62.5	0.0	12.5	37.5	25.0
発生シュート数/カルス No. of shoots/callus	0	1.0	2.0	0	1.0	2.0	3.7	4.4	0	5.0	5.0	3.5
範囲 Range	—	1	1~5	—	1	2	1~8	1~8	—	5	1~8	3~4

分化培地の成分は Table 21 と同じ。すべての培地に $0.1 \mu\text{M}$ の NAA を添加。

Compositions of differentiation media were same as Table 21. All media were supplemented with $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

ルスから植物再生をはかるために組織培養手法を用いることの意義がある。aspen 系ポプラからの植物再生は、*Populus tremuloides* について MATHES (1964) により報告された。その後、1968年に WOLTER と WINTON によって培養カルスから植物体が再生されたのも aspen 系ポプラであり、続いて WINTON から同様の報告 (1970; 1971) がなされた。

4.2.3 その他のポプラ類

(1) ヤマナラシ

i 材料と方法

誘導したヤマナラシ (*Populus sieboldii*) のカルスを、NAA, 2,4-D, BAP を加えた MS 培地で、ほぼ 60 日ごとに 3 代継代培養したカルスを外植体として、カルスからの器官分化を調べた。

分化培地には、前記雑種ヤマナラシの継代培養 8 代目カルスからの分化試験に用いたものと同じ組成の培地を用い、培養方法及び培養条件も同じであった。

ii 結果と考察

培養 3 か月後のシュート分化率は極めて低かったが、同じ培地成分に同じ濃度のゼアチン、または BAP を加えた培地上にカルスを移植して再培養した。BAP を加えた培地では全くシュート分化がなかった。ゼアチンを加えた培地での再培養 3 か月後のシュート分化の状態を、Table 23 に示した。シュート形成率は、培地の NH_4NO_3 の量を増した WS-中N で高く、次いで WS-標準, WS-多N の順であったが、その差は小さい。ゼアチンの効果は、本試験で最も高濃度で加えた $31.6 \mu\text{M}$ で最高のシュート分化率を示し、次いで、 $10 \mu\text{M}$ のゼアチン濃度で高かった。しかし、 $1 \mu\text{M}$ と $3.16 \mu\text{M}$ のゼアチンでは低い分化率か、あるいは全く分化しなかった。シュート形成率について、MOSTELLER and Yourtz (1961) の式で変数変換して分散分析した。その結果、添加した NH_4NO_3 の量による培地間には有意差はなく、ゼアチン濃度間には 5% 水準で有意差が認められた。

Table 23. ヤマナラシカルスのシュート形成率とシュート発生数に及ぼす培地組成とゼアチン濃度の効果

Effects of medium composition and concentration of zeatin on shoot formation rates and numbers of shoots per callus in yamanarashi (*Populus sieboldii*)

培地 Medium	WS-標準 WS-standard				WS-中 N WS-median N				WS-多 N WS-abundant N			
	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6
ゼアチン濃度 Concentration of Zeatin (μM)	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6	1	3.16	10	31.6
シュート形成率 (%) Shoot formation	0.0	16.7	41.7	75.0	8.3	16.7	50.0	66.7	0.0	0.0	41.7	50.0
発生シュート数/カルス No. of shoots/callus	0	2.0	1.2	4.8	1.0	1.0	2.7	7.0	0	0	3.6	6.2
範囲 Range	—	1~3	1~2	1~9	1	1	1~5	1~13	—	—	1~8	1~12

分化培地の成分は Table 21 と同じ。すべての培地に $0.1 \mu\text{M}$ の NAA を添加。

Compositions of differentiation media were same as Table 21. All media were supplemented with $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

分化したカルス当たりのシュート本数は、WS-中Nのゼアチン 31.6 μM 培地で1カルス当たり1~13本(平均7.0本)、次いで、WS-多Nのゼアチンの31.6 μM 培地では1~12本(平均6.2本)、WS-標準のゼアチンの31.6 μM 培地でも1~9本(平均4.8本)であった。結果的には、WS培地に加えたNH₄NO₃の量には関係なく、ゼアチンを31.6 μM 加えた培地上で多くのシュート本数を分化させることができた。

(2) ギンドロ

i 材料と方法

誘導したギンドロ (*Populus alba*) カルスを、低濃度のBAPと中濃度のNAA, 2,4-Dを加えたMS培地で継代培養したところ、カルスの成長増殖が極めて旺盛であった。そこで、MS培地のNH₄NO₃の量を減らしたMS-中N(NH₄NO₃を620 mg/l)、MS-少N(NH₄NO₃を165 mg/l)とMS-標準(NH₄NO₃を1650 mg/l)の3種類にBAP, NAA, 2,4-Dを加えた培地に500日間継代培養したギンドロのカルスを用いた。

分化培地は、雑種ヤマナラシの分化試験のところで用いた、WS-標準、WS-中N及びWS-多Nの3種類の培地とし、シュート分化のひきがねとして、ゼアチンを3.16 μM及び10 μMの2水準で加えた。培地は試験管に15 ml あて分注し、常法によって加圧滅菌し、カルスはほぼ150 mg あて移植した。培養条件は、照度2000ルクスの蛍光灯照明下、日長16時間、25°Cの恒温とした。

ii 結果と考察

分化培地に移植して2か月経過後のシュート形成率(シュート形成カルス数/供試カルス数×100%)をTable 24に示した。カルスの継代培養に用いた培地の側からみると、MS-標準で培養したカルスからのシュート形成率が低いように思われるが、MS-中N及びMS-少Nのそれと比べてさほどの違い

Table 24. 500日間培養したギンドロカルスのシュート形成率(シュート形成カルス数/供試カルス数%)
Shoot formation rates from calli which were subcultured for 500 days in *Populus alba*

分化培地 Differentiation medium	シュート形成率 Shoot formation rates(%)					
	WS-標準 WS-Standard		WS-中N WS-median N		WS-多N WS-abundant N	
ゼアチン濃度 Concentration of Zeatin (μM)	3.16	10	3.16	10	3.16	10
継代培養培地 Subculture medium						
MS-標準 MS-standard(NH ₄ NO ₃ 1650 mg/l)	16.7	50.0	50.0	33.3	16.7	33.3
MS-中N MS-median N(NH ₄ NO ₃ 620 mg/l)	50.0	62.5	62.5	62.5	50.0	25.0
MS-少N MS-less N(NH ₄ NO ₃ 165 mg/l)	66.7	66.7	50.0	66.7	66.7	50.0

分化培地の成分は Table 21 に同じ。分化培地には 0.1 μM の NAA を添加。

Compositions of differentiation media were same as Table 21, and were supplemented with 0.1 μM of NAA.

はなかった。また、分化培地の側からみた場合には、WS-中Nにおいて幾分高い形成率を示しているようにみられるが、WS-標準及びWS-多Nにおいても $3.16\ \mu\text{M}$ のゼアチンを加えた培地で高い分化率を示した。

この形成率を、MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換して分散分析した結果は、継代培養に用いた培地の種類間、分化用培地の種類間、及びそれに加えたゼアチン濃度間のいずれにも、有意性が認められなかった。ただ、継代培養用培地の違いによらず、分化培地としてのWS-中Nでやや高い分化率を示したことから、500日間の継代培養で保存したギンドロカルのシュート分化には、WS-中Nに $3.16\ \mu\text{M}$ または $10\ \mu\text{M}$ のゼアチンを加えた培地が適していると考えられた。

(3) カナデンススポブラ

i カルスの増殖のための継代培養中にみられたシュート分化

A 材料と方法

カナデンススポブラ (*Populus canadensis*) のカルスを、BAP を $0.316\ \mu\text{M}$ 加えた上で、2,4-D と NAA をそれぞれ 0, 0.01, 0.1, $1\ \mu\text{M}$ の4水準で加えたMS培地で2代目の継代培養を行った。そのときに、グリーンスポットやシュートの分化をみたので、そのカルス数を調べた。

次に、3代目継代培養において、2,4-D と NAA をそれぞれ 0.1 及び $1\ \mu\text{M}$ の2水準を組み合わせた4種類のMS培地で培養したカルスを、4代目には、 $0.316\ \mu\text{M}$ のBAPを加えた上で、2,4-D を 0.01, 0.1 及び $1\ \mu\text{M}$ の3水準、NAA を 0.1 及び $1\ \mu\text{M}$ の2水準で組み合わせた6種類のMS培地で培養した。この場合も、2,4-D の低濃度培地上で、自然にシュートを分化したのでそのカルス数を調べた。

カルスの継代培養培地は、いずれも試験管に10ml あて分注して、常法によって加圧滅菌した。培養条件は、照度1000ルクスの蛍光照明下、日長16時間、 25°C の恒温とした。

B 結果と考察

2代目の継代培養を60日間行ったカルス各10個から、シュートを分化したカルスの数を、Table 25 に示した。Table 25 の数値を MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換したのち、分散分析した結果、2,4-D の濃度間にもみ 0.1% 水準で有意性が認められ、その寄与率は79.7%と大きかったが、NAA の濃度間には有意性が認められなかった。2,4-D の0及び低濃度 ($0.01\ \mu\text{M}$) の培地上で多くのカルスからシュートを分化したが、濃度が高くなるにつれて、シュートを分化するカルスの数は減り、 $1\ \mu\text{M}$ では全くシュートを分化しなかった。また、NAA の効果は全く見られなかった。

次に、2,4-D と NAA をそれぞれ 0.1, $1\ \mu\text{M}$ の濃度で組み合わせた4種類のMS培地上で行った3代目の継代培養をしたカルスを用い、2,4-D と NAA を組み合わせ加えた6種類のMS培地で4代目の培養をした。その結果、シュート形成をみたカルス数を Table 26 に示した。3代目培養培地からみると、2,4-D の濃度が $0.1\ \mu\text{M}$ では、 $1\ \mu\text{M}$ よりもシュートを形成したカルスの数が多い。また、4代目培養培地からみると、NAA の効果は大きくなかったのに対して、2,4-D の効果が大きく、 $0.01\ \mu\text{M}$ では培養したカルスの30~100%がシュートを分化したが、0.1, $1\ \mu\text{M}$ ではシュートをほとんど分化しなかった (Photo. 28)。

Table 25. カナデンススポプラカルの2代目継代培養においてシュートを分化したカルス数 (カルス10個当たり)
Numbers of shoot formed calli on 2nd subculture in *P. canadensis* (per 10 calli)

2, 4-D (μM)	シュートを分化したカルス数 No. of shoot forming calli				計 Total
	NAA (μM)				
	0	0.01	0.1	1.0	
0	9	10	9	7	35
0.01	8	9	10	4	31
0.1	3	1	4	1	9
1	0	0	0	0	0
計 Total	20	20	23	12	75

すべての培地に $0.316 \mu\text{M}$ の BAP を添加。
All media were supplemented with $0.316 \mu\text{M}$ of BAP.

Table 26. カナデンススポプラカルの4代目継代培養中にシュート分化したカルス数 (カルス10個当たり)
Numbers of calli which formed shoots in 4th subculture in *P. canadensis* (per 10 calli)

前代の継代培養培地 (3代目) (3rd generation)		4代目継代培養中に分化したカルス数 No. of shoot forming calli in 4th subculture					
		0.1*			1*		
2, 4-D (μM)	NAA (μM)	0.01**	0.1**	1**	0.01**	0.1**	1**
0.1	0.1	10	1	0	10	0	0
1	0.1	8	0	0	3	0	0
0.1	1	10	0	0	10	0	0
1	1	7	0	0	4	0	0

前代培養, 継代培養培地ともに $0.316 \mu\text{M}$ の BAP を添加。
Both preculture and subculture media were supplemented with $0.316 \mu\text{M}$ of BAP.
*: NAA 濃度 Concentration of NAA (μM) **: 2, 4-D 濃度 Concentration of 2, 4-D (μM)

これらの分化実数を MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換し, 分散分析した。その結果, 3代目のオーキシン (2, 4-D と NAA) の組み合わせと濃度には, 1.0% 水準で有意性が認められたが, その寄与率は 4.64% と低かったのに対し, 4代目培地の 2, 4-D 濃度では 0.1% 水準で有意性が認められ, その寄与率は 82.61% と非常に高かった。

ii 500日間継代培養したカルスからのシュート分化

A 材料と方法

カナデンススポプラのカルスは, MS 基本培地で継代培養した場合には極めて早い成長を示した。そこで, ギンドロと同様に MS 基本培地のほかに, NH_4NO_3 の量を変えた MS-中N と MS-少N 培地

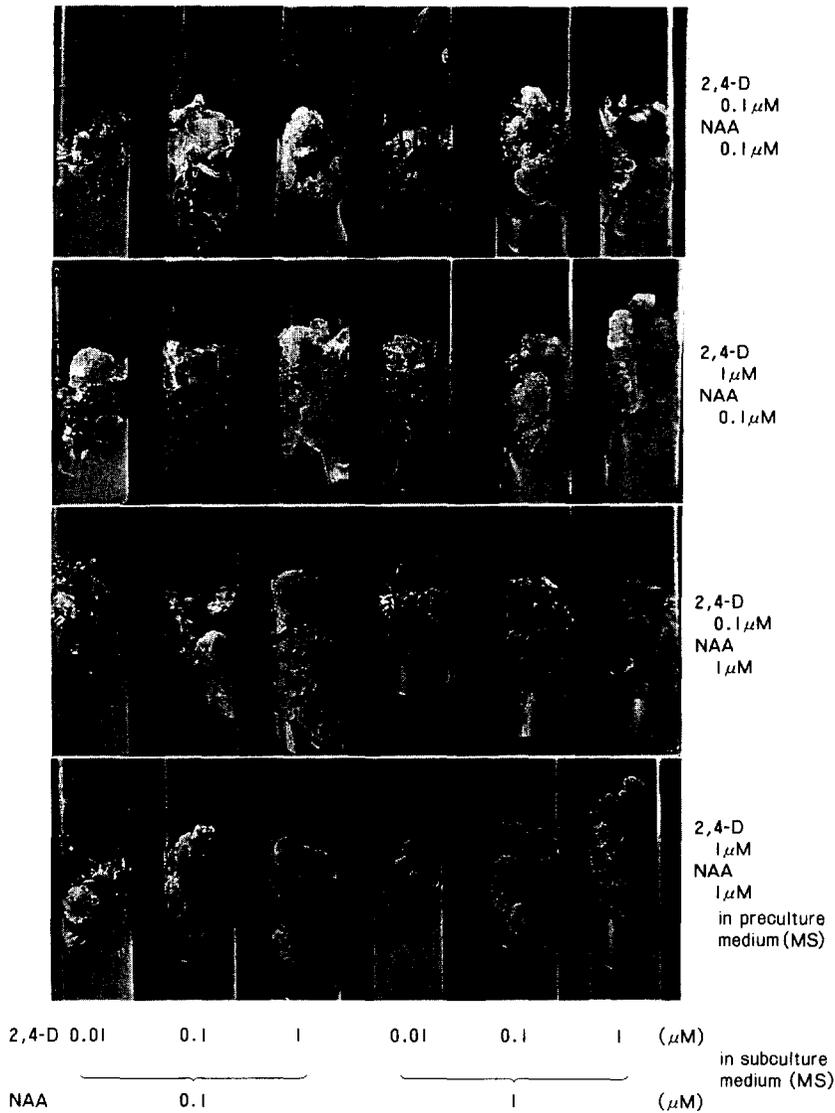


Photo. 28. カナデンシスポプラのカルス4代目継代培養におけるシュート分化の状況 (MS 培地)

Shoot formation during 4th subculture of callus tissues in *Populus canadensis*.

を加え、そして、おのおのの培地には 0.1 μ M の BAP, 0.316 μ M の NAA 及び 3.16 μ M の 2,4-D を加えた。これらの培地で6~8代目の継代培養を行い、継代培養開始後500日間経過したカルスを分化用培地に移植した。

分化用培地には、雑種ヤマナラシと同様に WS-標準のほかに、 NH_4NO_3 の量を変えた WS-中N と WS-多N を準備し、それぞれに NAA を 0.1 μ M 加え、さらに、シュート分化の引きがねとして、ゼアチンを 3.16 μ M と 10 μ M の2水準で添加した。

調製した培地は試験管に 10 ml あて分注し、常法によって加圧滅菌した。培養条件は、照度 2000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

B 結果と考察

培養開始後、60 日目におけるカルスからのシュートの形成率（シュート形成カルス数/供試カルス数×100%）を Table 27 に示した。形成率を分化培地の側からみると、WS-中N で 91.7~100.0% を示し、次いで、WS-多N で 75.0~100.0% と高かった。これに対し、WS-標準では、33.3~75.0% とやや低かった。また、ゼアチンの濃度別にみた場合、WS-中N では、3.16 μM と 10 μM との間には差がみられなかったが、WS-標準、WS-多N 両培地では、3.16 μM よりも 10 μM での形成率が高かった。さらに、継代培養培地の側からみた場合の形成率は、大きな違いが認められなかった。

シュート形成率を MOSTELLER and YOUTZ (1961) の式で変数変換して分散分析した。分化用培地間には 0.1% 水準で、また、ゼアチン濃度間には 5% 水準で有意性が認められたが、継代培養用培地間には有意性が認められなかった。

4.3 カルスの継代培養に適した培地組成及びカルスの培養保存可能日数と
器官再分化能持続期間

ここでは、スギ、クロマツ、及びポプラ数種の、カルスの継代培養に適する培地組成と植物ホルモンの濃度、組み合わせについて探索し、また、雑種ポプラを中心としたポプラ類のカルス増殖に及ぼす植物ホルモンの種類と濃度について検討し、さらに、継代培養によるカルスの保存可能日数と培養カルスからの器官再分化能力を持続する期間をまとめた。

Table 27. 500 日間培養したカナデンススポプラカルスのシュート形成率（シュート形成カルス数/供試カルス数%）

Shoot formation rates from calli which were subcultured for 500 days in *Populus canadensis*

分化培地 Differentiation medium	シュート形成率 Shoot formation rates (%)					
	WS-標準 WS-standard		WS-中N WS-median N		WS-多N WS-abundant N	
ゼアチン濃度 Concentration of Zeatin (μM)	3.16	10	3.16	10	3.16	10
継代培養培地 Subculture medium						
MS-標準 MS-standard(NH ₄ NO ₃ 1650 mg/l)	50.0	66.7	100.0	91.7	75.0	83.4
MS-中N MS-median N (NH ₄ NO ₃ 620 mg/l)	58.4	75.0	91.7	100.0	91.7	100.0
MS-少N MS-less N (NH ₄ NO ₃ 165 mg/l)	33.3	66.7	100.0	100.0	83.4	100.0

分化培地は Table 21 に同じ。分化培地には 0.1 μM の NAA を添加。

Compositions of differentiation media were same as Table 21, and were supplemented with 0.1 μM of NAA.

4.3.1 スギ

(1) 材料と方法

i NAA と BAP を加えた改変 WS 及び MS 培地での継代培養

雄花鱗片由来のカルスを用い、改変 WS 及び MS 培地に、NAA を3段階（0.316, 1, 3.16 μM ）と、BAP を4段階（0, 1, 3.16, 10 μM ）の濃度で組み合わせて加えた同一組成の培地に植え継いだ。10 ml の培地を試験管に分注し、常法により加圧滅菌し、斜面固化した。培養条件は、照度 500 ルックスの蛍光灯照明下、日長 14 時間、25°C の恒温とした。

継代培養の植え継ぎ時におけるカルスの成長量の評価は、肉眼判定によって次のように評点を与えた。

4：試験管内の寒天斜面の半分以上がカルスで覆われた場合

2：寒天斜面の 1/2～1/4 がカルスで覆われた場合

1：カルスの占める割合が寒天斜面の 1/4 より小さい場合

0：全く成長しないか、壊死した場合

増殖成長指数は、培地ごとの評点合計を試験管数で除して示し、生存率は評点 4 と 2 と 1 の成長を示した試験管数を供試試験管数で除した百分率で表した。

なお、後述のクロマツと雑種ポプラのカルス成長量の調査にもこの評点を使った。

ii c-AMP 及び dib. c-AMP を加えた WS 培地での継代培養

6月採取の未熟種子起源のカルスを用い、BAP の代わりに c-AMP と dib. c-AMP を 0.01～10 μM の濃度で加えた WS 培地上で継代培養した。オーキシンとしてはすべての培地に NAA を 0.1 μM の濃度で加えた。

培養の方法及び条件は前項と同じとした。

なお、生存率は前述の方法で表した。

iii カルスの継代培養による長期保存

前述の研究結果から、Table 30 に示したように c-AMP, BAP 及び NAA を L_8 直交表で実験計画を組み合わせ加えた WS 培地を試験管に調製し、スギカルスを6か月ごとに植え継いで継代培養を続けた。培養条件は、照度 2000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

(2) 結果と考察

i NAA と BAP を加えた改変 WS 及び MS 培地での継代培養

改変 WS 培地で増殖したカルスはやや compact であるのに対して、MS 培地ではやや friable なカルスを増殖した。1年間の成長指数を Table 28 に示した。MS 培地で培養したカルスは移植初期の成長が早く、カルス表面から褐変が現れ、3か月ごとに植え継ぎが必要であった。しかし、それでも4か月ごとに植え継いだ改変 WS 培地上のカルスの成長指数は大きかった。ちなみに、5年間継代培養した時点の、BAP の低濃度培地での生存率は高く、高濃度になるにつれて低くなった。NAA は、1 または 3.16 μM の濃度が適量であった。

SAITO (1979) は、WS 培地をもとにして、N, P 及び K の量を変えた培地でスギカルスを培養した結果、 NH_4NO_3 の低濃度培地でよくカルスが成長することが分かった。この NH_4NO_3 の量は、ここ

Table 28. 継代培養によるスギカルスの増殖成長指数 (改変 WS 及び MS 培地)
Growth index of subcultured callus in sugi (*Cryptomeria japonica*) (modified WS and MS)

植物成長物質 Growth regulators		増殖成長指数 Growth index						
		改変 WS 培地 Modified WOLTER and SKOOG's medium			MS 培地 MURASHIGE and SKOOG's medium			
NAA(μM)	BAP(μM)	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	4th
0.316	0	1.19	1.98	3.19	0.75	1.68	1.23	1.55
	1	1.14	2.04	2.26	0.83	1.52	1.48	1.80
	3.16	1.58	2.01	2.86	0.43	1.06	1.41	1.67
	10	1.06	2.10	2.56	0.51	1.00	1.00	0.60
1	0	1.64	1.89	3.25	1.36	1.92	1.94	2.55
	1	1.14	2.10	3.09	1.05	2.14	2.35	2.84
	3.16	1.16	2.35	2.65	1.02	2.36	2.48	2.58
	10	1.10	1.69	2.58	0.53	1.67	1.88	1.88
3.16	0	1.60	2.03	2.80	1.57	2.48	2.42	2.98
	1	1.68	2.23	3.31	1.64	2.96	2.72	3.08
	3.16	1.20	2.14	3.12	0.91	2.59	2.60	2.32
	10	1.00	2.02	3.15	0.61	2.19	2.26	1.74
培養日数 (月) Period of subculture (months)		4	4	4	3	3	3	3

増殖成長指数はカルスの成長程度を 4, 2, 1 及び 0 で評点したものを平均した値。
Growth index was mean of score (4, 2, 1, and 0) of callus growth rate.

で用いた改変 WS 培地のそれに近かった。また、スギカルスの成長に用いた BAP と NAA の濃度は、本研究で用いた濃度よりも低いときにカルスがよく成長した (SAITO, 1980 a)。

この結果から、スギカルスは、NAA を 1~3.16 μM, BAP をなし (0) か、低濃度で加えた改変 WS 培地を用い、4 か月ごとの植え継ぎで長期間継代培養が出来ることが分かった。

ii c-AMP 及び dib. c-AMP を加えた WS 培地での継代培養

BAP の代わりに、サイトカイニン様物質である c-AMP と dib. c-AMP を、WS 培地に添加してスギカルスを継代培養し、6 代目までの生存率と増殖成長指数とを Table 29 に示した。c-AMP, dib. c-AMP を加えた各培地の生存率と成長指数は、対照区に比べて高い値を示した。ただし、高濃度で加えた場合には、対照区に近い値を示した。SMELTZER and JOHNSON (1977) の実験によれば、培地に与えた c-AMP は、*Pinus taeda* のカルスの生重量の増加に効果を認めた。

BAP を加えた培地でのスギカルスの継代培養は、4 か月ごとに植え継ぎする必要があったが、c-AMP または dib. c-AMP を加えた場合は、6~7 か月ごとの植え継ぎだけで、継代培養世代期間を長くすることができることが分かった。

iii カルスの継代培養による長期保存

Table 30 の植物成長調節物質を組み合わせた各培地とも、植え継ぎして 4~5 か月間はカルスの褐

Table 29. スギカルスの成長に及ぼす c-AMP 及び dib. c-AMP の効果 (WS 培地)
Effects of c-AMP and dib. c-AMP in WS-medium on callus growth in sugi, *Cryptomeria japonica*

植物成長調節物質 Growth regulators (μM)		継代培養 Subculture											
		1代(180日) 1st(180 days)		2代(227日) 2nd(227 days)		3代(212日) 3rd(212 days)		4代(181日) 4th(181 days)		5代(188日) 5th (188 days)		6代(231日) the(231 days)	
		生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index
対照 Control		70.0	3.8	67.7	3.5	78.9	2.3	93.3	2.7	92.9	3.7	71.4	2.8
c-AMP	0.01	100.0	3.9	68.2	3.3	85.0	3.1	93.3	3.3	100.0	3.7	92.9	3.6
	0.1	89.5	4.0	68.4	3.3	84.2	3.0	100.0	3.0	100.0	3.6	80.9	3.7
	0.316	90.0	3.5	64.7	3.6	84.2	3.0	100.0	2.7	100.0	3.7	80.0	3.1
	1	90.0	3.6	62.5	3.6	84.2	3.0	100.0	2.9	100.0	3.5	82.4	3.2
	10	95.0	3.7	61.1	3.4	83.3	3.1	100.0	2.7	88.8	3.5	85.7	3.4
dib. c-AMP	0.01	95.0	3.8	70.0	3.4	73.3	2.2	90.9	3.1	100.0	3.6	71.4	3.1
	0.1	95.0	3.6	78.6	3.1	77.7	2.9	100.0	3.1	100.0	3.7	85.7	3.4
	0.316	70.0	3.6	53.8	3.4	88.2	3.4	100.0	3.5	100.0	3.9	80.0	3.3
	1	70.0	3.6	52.9	3.4	76.5	3.4	100.0	3.4	100.0	3.9	78.6	3.6
	10	70.0	3.9	57.1	2.8	62.3	2.6	100.0	2.5	90.0	3.5	69.2	3.4

成長指数はカルスの成長程度を 4, 2, 1, 及び 0 と評点したものを平均した値。すべての培地に $0.1 \mu\text{M}$ の NAA を添加。
Growth index was mean of score (4, 2, 1, 0) of callus growth rate. All media were supplemented with $0.1 \mu\text{M}$ of NAA.

Table 30. スギカルの継代培養に適した培地組成
 Suitable medium composition for sugi (*Cryptomeria japonica*) callus
 subculture

植物成長調節物質 Growth regulators			カルの成長 Growth of callus
NAA(μ M)	c-AMP(μ M)	BAP(μ M)	
1	1	0.1	良, Good
1	1	1	良, Good
1	3.16	0.1	やや不良, Poor a little
1	3.16	1	良, Good
3.16	1	0.1	良, Good
3.16	1	1	やや不良, Poor a little
3.16	3.16	0.1	良, Good
3.16	3.16	1	良, Good

変はみられず、5か月を過ぎてからカルス表面にわずかに褐変を生じた。一部の培地ではカルの成長が多少劣るものもあったが、ほとんどの培地では評点4の成長を示した。そして、継代培養期間約18年の間、6か月ごとの植え継ぎによって保存できた。

18年間の継代培養中に、一部の培地上のカルスから緑色の根の構造をした突起物がみられた。また、培養カルスをゼアチンを加えたWS培地に移植してシュートの分化を試みたが、植物体の形成は全くみられなかった。

4.3.2 クロマツ

(1) 材料と方法

i クロマツカルの生存と成長に及ぼすL-アルギニンと尿素の効果

胚軸起源のクロマツカルスを用い、SSS培地の有機Nの有効な量を見るために、L-アルギニンを100~800mg/lの範囲で、また、尿素を50~400mg/lの範囲でそれぞれ4段階で加えた。各培地には10 μ MのNAAと1 μ MのBAPを加え、同じ成分の培地で同じカルスを継代培養した。カルの成長程度はスギカルスで用いた評点法と同じとし、継代1代目は移植後100日、2、3代目は70日で調べた。成長指数はスギと同様に評点の平均値とし、枯死率は1代目の培養に供した試験管数に対する各世代の評点0を示した試験管の百分率で表した。

培地は試験管に約10mlあて分注し、常法によって加圧滅菌し、培養条件は、照度1000ルクスの蛍光灯照明、日長16時間、25℃の恒温とした。

ii クロマツカルの継代培養に及ぼすNAAとBAPの効果

継代培養における植物ホルモンの最適添加量を得るため、400mg/lのL-アルギニンを加えたSSS培地で、クロマツ胚軸由来のカルの継代培養を行った。NAAを3.16、10及び31.6 μ Mと、BAPを0、0.1、1及び10 μ Mの12通りの組み合わせとし、各世代とも、おのおのの同一組み合わせの培地で継代培養した。成長指数は前項と同じにし、生存率は、各世代に植え継いだときの試験管数に対する評点4と2と1を示した試験管合計数の百分率で表した。

培養条件は前項と同じにし、約2か月ごとに植え継いだ。

(2) 結果と考察

i クロマツカルスの生存と成長に及ぼす L-アルギニンと尿素の効果

カルスの成長指数と枯死率を Fig. 4 に掲げた。継代培養1代目のカルスの成長指数はどの培地でも小さかった。2代目と3代目のカルスの成長は、L-アルギニンを100~400 mg/l 加えた培地で優れていたが、800 mg/l 加えた培地ではやや不良となり、褐変することが多かった。また、200mg/l の尿素を加えた培地で優れた成長をし、2~3代目になるにつれて成長指数が高くなった。

枯死率は、L-アルギニンを加えた培地よりも、尿素を加えた培地で高く、特に、尿素を400 mg/l 加えた培地では75%と高かった。

BROWN and LAWRENCE (1968) は、*Pinus palustris* のカルスの継代培養で、MS 培地からグリシンを除き、アスパラギンを加え、IAA の代わりに2,4-D を添加したときにより結果を得た。欧州トウヒのカルス培養では、STEINHART et al. (1961) は、SSS 培地にはL-アルギニンを400 mg/l、尿素を200 mg/l 添加するのが適量としている。筆者が行ったクロマツカルスの継代培養でも、L-アルギニン400 mg/l、尿素200 mg/lが適量であった。

ii クロマツカルスの継代培養に及ぼす NAA と BAP の効果

NAA と BAP を組み合わせ加えた SSS 培地に、クロマツカルスの継代培養を行い、各世代の生存率と成長指数を Table 31 に示した。1代目の生存率はやや低かったが、2代目以降は高くなった。2~

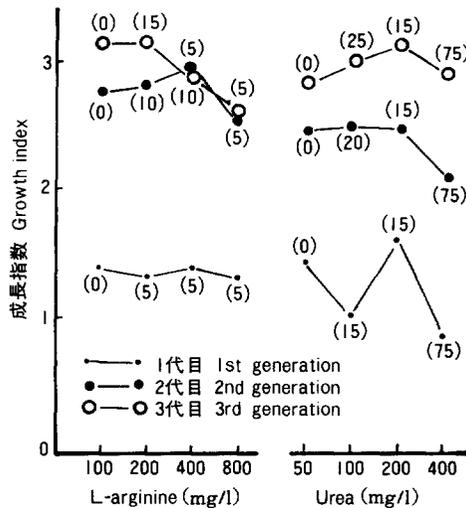


Fig. 4. L-アルギニンと尿素がクロマツカルスの成長と枯死に及ぼす効果

Effects of L-argininien and urea on callus growth and motality of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*).

(): 数字は枯死率。

Accumulated motality, in succesive generation.

成長指数はカルスの成長程度を4, 2, 1及び0と評点したものを平均した値。

Growth index is mean of score (4, 2, 1, 0) of callus growth rate.

Table 31. クロマツカサの成長に及ぼす SSS-培地に組み合わせ加えた NAA と BAP の効果
Effects of concentration of NAA and BAP in SSS-medium on callus growth in Japanese black pine (*Pinus thnbergii*)

植物成長調節物質 Growth regulators		継代培養 Subculture											
		1代 1st		2代 2nd		3代 3rd		4代 4th		5代 5th		6代 6th	
NAA (μ M)	BAP (μ M)	生存率 Survival (%)	成長指数 Growth index										
3.16	0	66.7	1.3	100.0	2.2	100.0	2.3	100.0	2.2	86.7	2.6	92.5	2.5
	0.1	75.0	1.2	100.0	1.6	100.0	2.4	87.7	2.2	86.7	2.2	91.7	2.2
	1	77.8	1.6	87.5	1.9	100.0	2.2	80.0	2.8	83.3	2.5	100.0	2.9
	10	87.5	1.7	100.0	2.6	100.0	2.7	81.3	2.7	86.7	2.6	77.8	2.3
10	0	88.9	2.3	100.0	2.4	87.5	2.6	83.3	2.9	100.0	2.9	100.0	2.7
	0.1	87.5	1.7	100.0	2.0	95.0	2.0	100.0	2.3	100.0	2.4	100.0	2.3
	1	88.9	2.1	100.0	2.4	95.0	2.0	100.0	2.3	94.1	2.3	100.0	2.6
	10	88.9	2.5	100.0	3.3	85.0	2.7	94.1	2.0	81.3	2.0	84.6	1.9
31.6	0	77.8	1.7	85.9	1.8	95.0	2.1	89.5	2.2	88.2	2.2	100.0	1.1
	0.1	100.0	2.2	80.0	2.5	93.8	2.1	94.7	2.6	100.0	2.3	94.1	1.4
	1	88.9	2.6	87.5	2.4	94.7	2.7	88.9	2.4	100.0	1.9	88.2	1.3
	10	88.9	2.3	100.0	2.7	95.0	2.4	85.0	2.2	88.2	1.8	83.3	1.3

成長指数はカサの成長程度を 4, 2, 1, 及び 0 と評点したものを平均した値。

Growth index was mean of score (4, 2, 1, 0) of callus growth rate.

5代目の成長指数はあまり変動がみられないが、6代目のNAAを $31.6\ \mu\text{M}$ 加えた培地では、カルスの成長がわずかに減退した。また、NAA, BAPともに高濃度の培地上における5~6代目のカルスの成長は低下した。

クロマツカルスの継代培養による長期保存は、NAAを $10\ \mu\text{M}$ と、BAPを低濃度または無添加のSSS培地上で、2か月ごとに植え継ぐことにより可能であることが分かった。

4.3.3 ポプラ類

(1) 雑種ヤマナラシのカルス増殖に及ぼすBAPとオーキシンの効果

i 材料と方法

ポプラ類カルスの増殖にはWS培地よりもMS培地が適していることが分かった。そこで、雑種ヤマナラシカルスをMS培地(2,4-Dを $1\ \mu\text{M}$ とBAPを $0.1\ \mu\text{M}$ 添加)で5代(約270日)継代培養したカルスを用い、次の三つの実験を行った。

① BAPの有無がカルスの増殖に及ぼす効果

サイトカイニンとしてBAPを添加しない($0\ \mu\text{M}$)ときと、 $0.316\ \mu\text{M}$ の濃度で加えたときのカルス増殖に与える効果について、20個のカルスで検討した。

② オーキシンの種類がカルスの増殖に及ぼす効果

NAA, 2,4-D及びIAAの有無がカルスの増殖に与える効果について、12個のカルスで調べた。

③ オーキシンの濃度がカルスの増殖に及ぼす効果

NAA, 2,4-D及びIAAの濃度をそれぞれ $0.1, 1\ \mu\text{M}$ の2段階の濃度で組み合わせ、17個のカルスを用いてカルスの増殖に対する効果を調べた。

カルスの成長の評点はスギの場合と同じとし、カルスの成長「良」は評点4と2を示した試験管数で、また、「不良, 枯死」は評点1と0を示した試験管数とした。

これらの実験は、 L_8 直交表に割り付けた計画のもとに培地を調製し、試験管に10mlあて分注し、常法により加圧滅菌した。培養条件は、照度1000ルクスの蛍光灯照明下、16時間日長、 25°C の恒温とした。

ii 結果と考察

① BAPの有無がカルスの増殖に及ぼす効果

カルスの成長「良」と「不良, 枯死」の試験管数を、Table 32 ①に示した。表から、BAPを加えない培地よりも、 $0.316\ \mu\text{M}$ の濃度で加えた培地でのカルスの成長「良」の数が多く、BAPが雑種ヤマナラシのカルスの増殖に有効に働いていることが分かる。

統計処理の結果は、BAPの有無の間に1%水準で有意であり、その寄与率は2.8%であった。

② オーキシンの種類がカルスの増殖に及ぼす効果

MS培地に $0.316\ \mu\text{M}$ のBAPを加え、それにNAA, 2,4-D及びIAAをそれぞれ0及び $1\ \mu\text{M}$ の濃度で組み合わせ加えて、カルスの成長に与えた効果を調べた結果を、Table 32 ②に掲げた。2,4-Dを加えた各培地でのカルスの成長が最もよく、次いでNAAを加えた培地でややよく、IAA添加の効果は全くなかった。

Table 32. 雑種ヤマナラシカルスの成長に及ぼす植物成長調節物質の効果

Effects of plant growth regulators on callus growth in aspen hybrid (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*)

① カルスの成長に及ぼす BAP の効果

Effects of BAP on callus growth in aspen hybrid

サイトカイニン Cytokinin BAP (μM)	オーキシン auxins			カルスの成長 Growth of callus	
	NAA (μM)	2, 4-D (μM)	IBA (μM)	良 Good	不良, 枯死 Poor or dead
0	0.1	0.1	0.1	2	18
0	0.1	1	1	15	5
0	1	0.1	1	7	13
0	1	1	0.1	16	4
0.316	0.1	0.1	0.1	6	14
0.316	0.1	1	1	18	2
0.316	1	0.1	1	12	8
0.316	1	1	0.1	18	2

② カルスの成長に及ぼすオーキシンの種類の効果

Effects of kinds of auxin on callus growth in aspen hybrid

サイトカイニン Cytokinin BAP (μM)	オーキシン Auxins			カルスの成長 Growth of callus	
	NAA (μM)	2, 4-D (μM)	IAA (μM)	良 Good	不良, 枯死 Poor or dead
0.316	0	0	0	0	12
0.316	0	0	1	0	12
0.316	0	1	0	11	1
0.316	0	1	1	10	2
0.316	1	0	0	3	9
0.316	1	0	1	4	8
0.316	1	1	0	12	0
0.316	1	1	1	12	0

③ カルスの成長に及ぼすオーキシン類の濃度の効果

Effects of concentration of auxins on callus growth in aspen hybrid

サイトカイニン Cytokinin BAP (μM)	オーキシン Auxins			カルスの成長 Growth of callus	
	NAA (μM)	2, 4-D (μM)	IAA (μM)	良 Good	不良, 枯死 Poor or dead
0.316	0.1	0.1	0.1	4	13
0.316	0.1	0.1	1	5	12
0.316	0.1	1	0.1	13	4
0.316	0.1	1	1	15	2
0.316	1	0.1	0.1	8	9
0.316	1	0.1	1	6	11
0.316	1	1	0.1	15	2
0.316	1	1	1	17	0

カルスの成長「良」は評点 4, 2 の成長を示したカルスの試験管数, 「不良, 枯死」は評点 1, 0 の成長を示したカルスの試験管数。

Growth of callus: "Good" indicated numbers of test tubes scored as 4 and 2, and "Poor or dead" indicated numbers of test tubes scored as 1 and 0.

統計処理を行ったところ、2,4-D と NAA の主効果はともに 0.1% 水準で有意性が認められ、両者の交互作用も 5% 水準で有意であった。そして、寄与率は NAA が 5% 強に対して、2,4-D は 75% の高さを示した。

③ オーキシン濃度がカルスの増殖に及ぼす効果

BAP を 0.316 μM 加え、NAA, 2,4-D 及び IAA をそれぞれ 0.1 と 1 μM の 2 水準濃度で組み合わせ加えた MS 培地で培養したカルスの成長結果は、Table 32 ③ のとおりである。2,4-D を 0.1 μM 加えた培地よりも、1 μM 加えた培地がよくカルスを成長させ、さらに NAA を 1 μM 加えた培地で最高の成長を示した。

分散分析を行った結果、2,4-D は 0.1% 水準で、NAA は 5% 水準で有意であり、寄与率はそれぞれ 75.7, 1.41% であり、2,4-D の 1 μM 添加の効果が示された。

(2) カナデンススポプラカルスの継代培養に及ぼすオーキシン類の効果

i 材料と方法

BAP (0.316 μM), NAA (0.1 または 1 μM) と 2,4-D (0.1 または 1 μM) を組み合わせ加えた MS 培地で、1 代目の継代培養をしたカナデンススポプラのカルスを用い、2 代目のカルスの増殖成長に与える 2,4-D と NAA の効果を調べた。すなわち、0.316 μM の BAP を加えた MS 培地に、2,4-D と NAA をそれぞれ 0, 0.01, 0.1 及び 1 μM の 4 水準の濃度を組み合わせ添加した 16 種の培地を用意し、各培地に約 100 mg のカルスを置床して 60 日間培養した。

次に、3 代目継代培養において、BAP を 0.316 μM の濃度で添加した MS 培地に、2,4-D と NAA をそれぞれ 0.1 及び 1 μM の濃度で組み合わせ加えた 4 種類の培地で培養したカルスを準備した。このカルスを BAP を 0.316 μM 含み、2,4-D を 0.01, 0.1, 1 μM , NAA を 0.1, 1 μM の濃度で組み合わせさせた 6 種類の MS 培地に、約 100 mg ずつ移植し、60 日間培養した。

上に述べた二つの実験には、培地を試験管に 15 ml あて分注し、常法によって加圧滅菌して用いた。培養条件は、照度 1000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

ii 結果と考察

NAA と 2,4-D をそれぞれ 4 水準の濃度で組み合わせさせた MS 培地を用い、培養 60 日目におけるカルスの生重量の平均値と標準偏差を Fig. 5 に示した。カルスの成長は 2,4-D の濃度が 0.1, 1 μM の培地で優れ、0.01 μM 含む培地では成長は劣り、無添加の培地ではさらに成長が劣った。すなわち、カルスの生重量は 2,4-D の添加量の増加につれて、ほぼ直線的に増加した。NAA の濃度は影響を与えなかった。それらのカルスの成長状況を Photo. 29 に示した。

カルスの生重量を統計処理した結果、NAA の主効果は有意性を示さず、2,4-D の主効果は 0.1% 水準で有意となり、その寄与率は 96.8% と非常に高かった。次に、2,4-D と NAA を組み合わせさせた 4 種類の培地で 3 代目の継代培養をしたカルスを、2,4-D と NAA を組み合わせさせた 6 種類の培地を用いて 4 代目の継代培養をした。培養 60 日後のカルス生重量の平均値±標準偏差を Fig. 6 に示した。ここでも 2,4-D の濃度が大きく影響を与えた。3 代目の 2,4-D と NAA をそれぞれ 0.1 μM 加えた培地で培養したカルス生重量は、全般に 4 代目のどの培地でも小さかった。しかし、4 代目培地の 2,4-

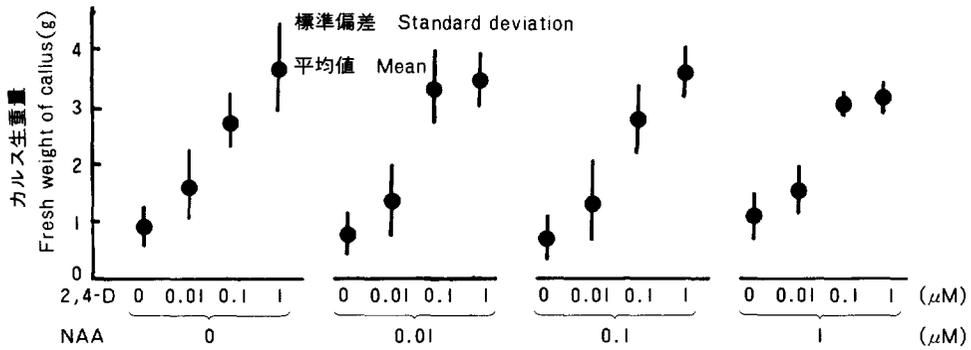


Fig. 5. カナデンスポプラのカルスの成長に及ぼす 2,4-D と NAA の濃度の効果 (MS 培地)

Effects of the concentration of 2,4-D and NAA on callus growth in *Populus canadensis* (MS medium).

すべての培地に 0.316 μM の BAP を含む。

All media were supplemented with 0.316 μM of BAP.

D の濃度の影響を受け、2,4-D の濃度を増すにつれて直線的にカルスの生重量が増加した。また、3 代目の培地に 2,4-D と NAA をそれぞれ 1 μM 加え、4 代目培地に 2,4-D を 0.1 μM と 1 μM の濃度で加えて培養したときのカルス生重量の違いはほとんどなかった。

得られたカルスの生重量の値を分散分析した結果、4 代目培地の 2,4-D の主効果は 0.1% 水準で有意であり、その寄与率は 77% と高く、また、3 代目培地の植物ホルモンの組み合わせの間にも 0.1% 水準で有意であったが、寄与率は 10% と小さかった。

(3) ポプラ類カルスの継代培養による保存可能日数

i 材料と方法

誘導したポプラ類のカルスを MS 培地に BAP、2,4-D 及び NAA を添加してほぼ 60 日ごとに 4 代目まで継代培養を行った。この結果、カナデンスポプラやギンドロなどは極めて優れた成長を示し、ときにはスポンジ状のカルスを形成することもあった。そこで、継代培養によるカルスの長期保存を目的とし、次の 18 種類の培地を調製した。すなわち、

培地組成 3 × BAP 濃度 1 × NAA 濃度 2 × 2,4-D 濃度 3 = 18 種類の培地

培地組成は、MS-標準 (NH₄NO₃ 1 650 mg/l) のほかに、NH₄NO₃ の量を減らした MS-中 N (NH₄NO₃ 620 mg/l) と MS-少 N (NH₄NO₃ 165 mg/l) を処方した。また、植物ホルモンとして BAP を 0.1 μM、NAA を 0.316 及び 1 μM の 2 段階、2,4-D を 0.1、0.316 及び 1 μM の 3 段階の濃度で組み合わせ加えた。雑種ヤマナラシほか 8 種のポプラカルスを 5 代目の培養から、ほぼ 60 日ごとにそれぞれ同一の培地に植え継いで継代培養を行なった。そしてカルスの成長が悪く、あるいはカルスの形質が悪くなった培地は次の代の培養には使用しないこととし、ポプラ 9 種それぞれのカルスの培養に適した培地組成を消去法によって探索した。

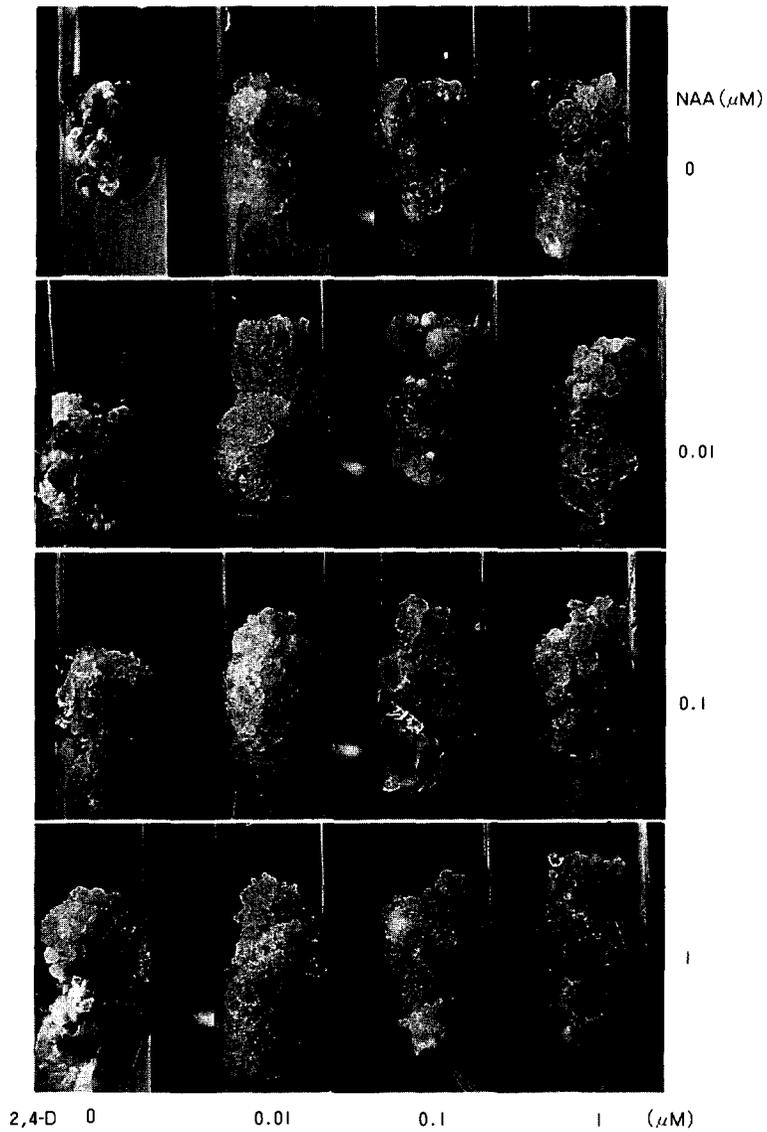


Photo. 29. カナデンスポブラのカルス成長に及ぼすオーキシンの濃度の効果 (MS 培地)
Effects of concentration of auxins on callus growth in *Populus canadensis* (MS medium).

すべての培地に 0.316 μM の BAP を含む。
All media were supplemented with 0.316 μM of BAP.

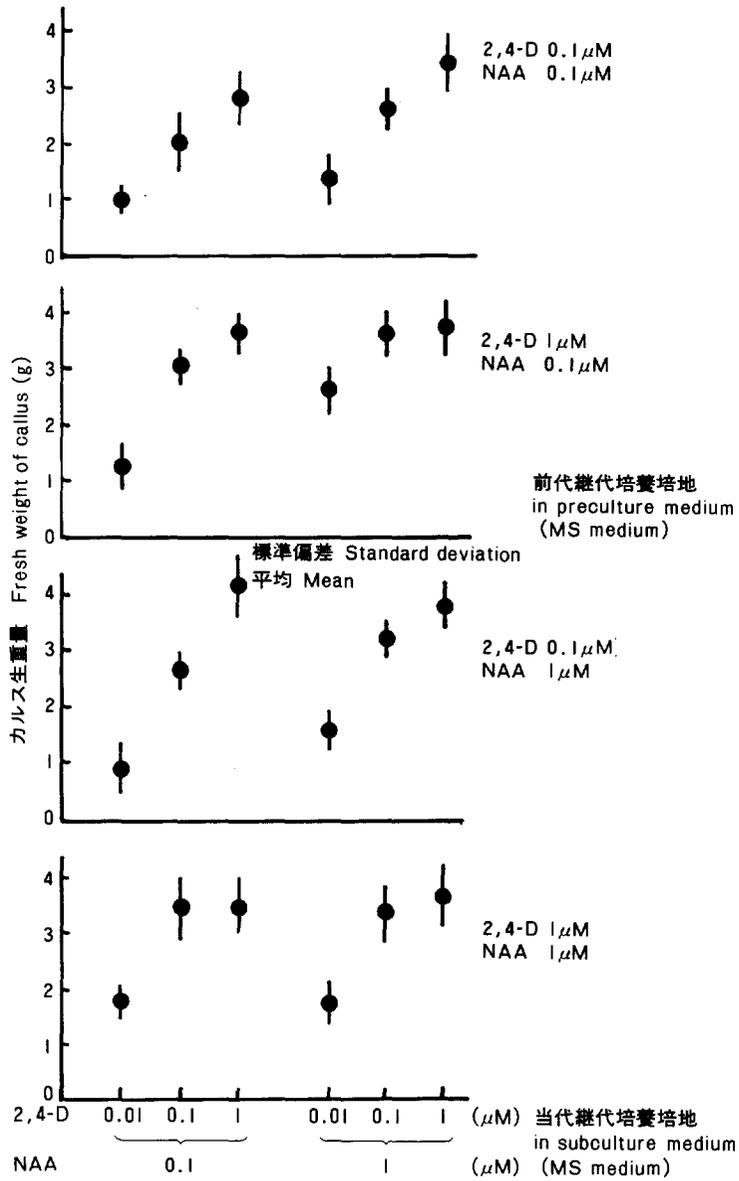


Fig. 6. カナデンスポラのカルス成長に及ぼすオーキシン濃度の効果
Effects of the concentration of auxins on callus growth in *Populus canadensis*.
すべての培地に $0.316 \mu\text{M}$ の BAP を含む。
All media were supplemented with $0.316 \mu\text{M}$ of BAP.

培地は試験管に 15 ml あて分注し、常法により加圧滅菌した。培養条件は、照度 3000 ルックスの蛍光灯照明下、日長 16 時間、25°C の恒温とした。

ii 結果と考察

18 種類の培地を植え継ぎの都度用意し、消去法によってポプラカルの継代培養に適した培地を探索した結果を、Table 33 にまとめた。

培地組成をみると、ポプラ属内の節間におけるカルの継代培養に適した MS 培地に含まれる NH_4 、 NO_3 の適量は、節間には一定の傾向はなかった。強いていえば、*Tachamahaca* 属に属する 2 種のポプラ *Populus simonii* と *P. maximowiczii* は、N 成分が少なくてもカルスが成長することを示した。また、NAA と 2,4-D の濃度の間にもそれほどの違いは認められなかったが、上記のポプラ 2 種は、低濃度の 2,4-D がよく、また、NAA もやや低い濃度がよかった。その他のポプラでは、カルの継代培養に適した NAA と 2,4-D の濃度にはほとんど差はなかった。

このように、消去法によって 9 種のポプラについて継代培養に適した培地及びホルモン組成の検索を行いながら、ほぼ 60 日ごとに継代培養したところ、Table 33 の最右欄に掲げた日数だけの期間、すなわち、ポプラカルスは 1300 日 (約 5 年) から 2900 日 (約 8 年) の長きにわたって保存することができた。

Table 33. ポプラカルの継代培養に適した培地組成と継代培養実施日数

Suitable composition of medium for subculturing and possible total subculturing days in calli of various poplar species

樹種 Species	継代培養に適した培地 Suitable medium in subculture	オーキシンの濃度 Conc. of growth regulators		継代培養実施 日数 Numbers of subcultured days (d)
		NAA (μM)	2, 4-D (μM)	
<i>Populus sieboldii</i>	MS-standard N	0.316	0.316	1500
<i>P. alba</i>	MS-standard N	0.316	1	1300
<i>P. sieboldii</i> × <i>P. grandidentata</i>	MS-median N	0.316	0.316 or 1	2900
<i>P. simonii</i>	MS-median N	0.316	1	2200
		1	1	
	MS-less N	1	1	
<i>P. maximowiczii</i>	MS-less N	0.316	1	1300
		1	1	
<i>P. deltoides</i>	MS-standard N	0.316	0.316	1300
<i>P. canadensis</i>	MS-standard N	0.316	0.316 or 1	1800
<i>P. euroamericana</i> I-214	MS-standard N or MS-median N	0.316	0.316	2100
<i>P. euroamericana</i> I-45/51	MS-less N	0.316	0.316 or 1	1300

すべての培地に 0.1 μM の BAP を添加。

All media were supplemented with 0.1 μM of BAP.

Table 35. ポプラカルスの継代培養日数とシュート分化率
Subcultur days and rate of shoot formation in poplar species

樹種 Species	シュート分化率 (培養日数) Rates of shoot formation (Culture days)		分化能力を失った日数 The days, after which the ability of shoot formation was lost
	%	(d)	(d)
<i>Populus sieboldii</i>	—	—	—
<i>P. alba</i>	36.4	(760)	960
<i>P. sieboldii</i> × <i>P. grandidentata</i>	13.3	(995)	1400
<i>P. simonii</i>	—	—	—
<i>P. maximowiczii</i>	—	—	—
<i>P. deltoides</i>	50.0	(760)	960
<i>P. canadensis</i>	100.0	(760)	1800
<i>P. euroamericana</i> I-214	—	—	—
<i>P. euroamericana</i> I-45/51	71.4	(760)	960

シュート分化率が低下し、発根能力も1.5年で失われた (MURASHIGE and NAKANO, 1965)。また、サトウキビのカルスを、1か月ごとに継代培養した場合、5か月で分化能力を失うものもあり、2年以上にわたって70%以上の分化能力をもっているカルスもあった (CHEN, et al., 1988)。さらに、SYONO (1965) はニンジン6系統のカルスを毎月継代培養し、移植の都度、芽の発生を試みたところ、カルスの系統によって8か月から12か月で芽の発生能力が失われた。これらに比べて、雑種ヤマナラシのカルスは比較的長い期間、全形成能を保持しているものと考えられる。

次に、継代培養によってカルスの状態で保存できた5種のポプラについて、シュート分化を維持できた日数を調べた。結果を、Table 35 に示した。760日の継代培養カルスを分化培地に置床してカルス単位でシュート分化率を調べたところ、カナデンススポプラが100%、次いで、イタリー改良ポプラ I-45/51 が71%、また、デルトイデスポプラが50%のシュート分化率を示した。しかし、3種類のポプラカルスは960日間培養した時点でシュート分化能力を失い、先に述べたように雑種ヤマナラシでも1400日培養した時点では全く植物体再生能力を失った。ただし、カナデンススポプラだけはそれ以後も高い植物体再生能力を維持しており、継代培養によってカルスの状態で保存可能であった1800日 (約5年) 間は、シュートの分化能力を維持できた。

5 ま と め

本研究は、組織培養によるクローン増殖法を数種の樹木に適用し、器官培養及びカルス培養によって幼植物体を得る方法を確立した。スギ、シラカンバ、シナミザクラ、クヌギの器官培養においては、①無菌発芽させた芽生えの組織・器官を外植体として培養した場合、②ガラス器内で培養した幼植物体の組織を外植体とした場合、次いで、③成木の当年生枝の腋芽をつけた茎軸を外植体とした場合の、シュート増殖法について検討した。また、スギ、クロマツ、ポプラ類のカルス培養においては、樹種ご

とに、① カルス誘導に適した外植体の種類と培地組成及び植物成長調節物質の組成の関係、② 培養カールの植物体再生能力に与える培地の組成と植物成長調節物質の種類、濃度の組み合わせ、並びに③ カルスの継代培養に適する培地組成と、継代培養による生殖質の長期保存と保存カールの植物体再生能力の保持期間の検討をした。得られた結果は次のとおりである。

1. スギ芽生えの3つの器官、すなわち、子葉、胚軸、幼芽部分を用いて WS 培地による培養によって植物体を再生できた。芽とシュートの分化率と分化した数は、幼芽部分からが最多で、これに胚軸が次ぎ、子葉からは最少であった。そして芽やシュートの分化には BAP が必須であったが、NAA の効果は明らかでなかった。植物ホルモンを欠いた WS 培地に植えつけた芽やシュートから、発根した。

2. クヌギ堅果から発芽伸長した上胚軸を外植体として BTM 培地で培養したとき、鱗片葉の着生部位からのみ芽・シュートの分化・発生をみた。この芽株（芽、シュート群）を 30～50 日間隔で継代培養し、その都度シュートを収穫した。600 日の培養期間中に収穫したシュート数は、堅果 1 個当たりの平均本数にして 400 本であった。収穫したシュートは、1 または $3.16 \mu\text{M}$ の IBA と $0.316 \mu\text{M}$ の NAA を加えた 1/2 濃度の WPM 培地に植えて、高い発根率で多数の幼植物体を得た。

3. シラカンバ成木の当年生枝を採り、改変 MS 培地を用いて剥皮枝条の培養を行い、無菌の不定芽苗条を得た。この幼植物体の葉柄を外植体とした培養において、苗条原基の形成に及ぼす IS 培地の Fe-EDTA の適量を検討した。 32.1 mg/l または、 58.6 mg/l を加えた IS 培地で高い苗条原基の形成率が得られ、その中間に近い 0.1 mM の 42.1 mg/l が最適と推定された。この量の Fe-EDTA を加えた IS 培地で BAP と IAA の効果を検討した結果、1 本の幼植物体から出発した 1 年間の培養によって、葉柄からは 4 500 本、茎軸からは 3 500 本、計 8 000 本余の発根苗を増殖させ得ることを試算した。

4. シナミザクラの成木の新梢から採取した節つき当年生茎軸を WS 培地で培養した結果、培養器具として 50 ml の三角フラスコを用いた場合は、 $18 \text{ mm} \times 180 \text{ mm}$ の試験管を用いたときよりも増殖シュート本数が多かった。また、BAP なしの培地では全くシュートは増殖せず、1 または $3.16 \mu\text{M}$ の BAP を加えた時のシュート増殖数が多かった。

5. 11 年生クヌギの台切り萌芽の当年生枝の節つき茎軸を外植体とし、腋芽から芽やシュートの分化・発生を試みた結果、BTM 及び WPM 培地でよく腋芽が開芽伸長した。引きがねとしての BAP の濃度は 1 または $3.16 \mu\text{M}$ が最適であった。継代培養によるシュートの増殖にあたって、BTM と WPM の中間の組成をもつ BW 培地を用いたが、芽株の生存率は継代培養 1 年目で半減し、2 年目で 30%、3 年目で 20% まで低下した。

前述のように、継代培養に移したクヌギ腋芽シュートは、クロロシスを起こして枯死する芽株が多い。これを防ぐため、BW 培地の無機成分の一部を改変して培養したところ、 K_2SO_4 の 5.3 mM の増量でクロロシスの発生を防ぐことができたが、Ca の増量及び Mg と Fe の減量は効果がなかった。

6. スギのカルスは雄花の鱗片または未熟種子を外植体としてサイトカイニンとオーキシンを加えた改変 WS 培地で誘導できた。スギカルスから BAP と NAA を中～高濃度で加えた改変 WS 培地で培養したところ、不定根だけが発生した。また、 $0.01 \sim 10 \mu\text{M}$ の c-AMP または dib. c-AMP を加

えた改変 WS 培地でカルスを 6 か月ごとに継代培養したときに、5 代目の継代培養で高い発根率を示した。

カルスの継代培養は BAP と NAA を加えた改変 WS 培地では約 4 か月ごとの植え継ぎが必要であったが、BAP の代わりに c-AMP または dib. c-AMP を加えた培地では、6~7 か月ごとの植え継ぎでよく、2~3 か月の期間延長をしても継代培養ができた。さらに、スギカルスは、NAA (1 と 3.16 μM)、c-AMP (1 と 3.16 μM) 及び BAP (0.1 と 1 μM) を組み合わせた WS 培地上で 6 か月ごとに植え継いで、18 年間も保存できた。

7. クロマツのカルスは、雄花鱗片を外植体として、NAA か 2,4-D を加えた改変 WS 培地でわずかに誘導できた。これに対して、芽生えの胚軸切片を外植体とし、NAA または 2,4-D を加えた SSS 培地で高頻度でカルスを誘導できた。クロマツカルスの継代培養は、SSS 培地の N 源としては L-アルギニンは 400 mg/l、尿素は 200mg/l が適量であった。

8. 雑種ヤマナラシは、当年生枝を外植体として MS 培地よりも WS 培地でよくカルスを誘導できた。他のポプラ 8 種は当年生枝の皮層の外植体を用いて、WS 培地でカルスの誘導ができた。

ポプラ類のカルスは、 NH_4NO_3 を 676 mg/l または 1637 mg/l に増した WS 培地でよくシュートを分化した。雑種ヤマナラシの 3~4 代目まで継代培養したカルスは、ゼアチンを 3.16 または 10 μM の濃度で添加、 NH_4NO_3 を 676 mg/l に増した WS 培地で高率のシュート分化がみられた。また 8 代継代培養したカルスは、BAP 添加 WS 培地では全くシュートを分化しなかったが、 NH_4NO_3 の量を増した WS 培地に 3.16 または 10 μM のゼアチンを加えて培養した場合には、高率のシュート分化をみた。ヤマナラシとギンドロのシュート分化にも高濃度のゼアチンを必要とした。カナデンスポプラは MS 培地で継代培養中のカルスからシュートを分化したが、この場合は、2,4-D を 0 または 0.01 μM の低濃度で加えたときに限られた。そして、継代培養したカルスは、 NH_4NO_3 を 676 mg/l または 1637 mg/l に増量した WS 培地ではほとんどのカルスからシュートが分化した。

ポプラ類のカルスの継代培養には WS 培地よりも MS 培地が適し、BAP が必須であったほかに、2,4-D が NAA よりもより効果的に作用した。ポプラ属 9 種のカルスは NH_4NO_3 を 620 mg/l または 165 mg/l に減らした MS 培地、または MS 標準培地 (NH_4NO_3 を 1650 mg/l) 培地に NAA, 2,4-D と BAP をいろいろな濃度で組み合わせ加えた培地での継代培養により、3.5~8 年の間保存できた。9 種のポプラカルスの多くは培養 2.7 年以内で植物体再生能力を失ったが、カナデンスポプラは 4.9 年まで保持した。

謝 辞

本論文の作成に当たり、ご助言と校閲を賜った、筑波大学農林学系教授大庭喜八郎博士に厚く御礼申し上げますとともに、本研究を遂行するに当たり、終始ご指導とご助言をいただき、本稿の校閲をも賜った、森林総合研究所生物機能開発部遺伝科長齊藤 明博士に対して深く感謝する。また、本論文の取りまとめに当たり、筑波大学生物科学系原田 宏教授、同農林学系菊池文雄教授、荒木真之助教授のご懇切なご指導を賜り、森林総合研究所生物機能開発部長三上 進博士の校閲を賜った。謹んで感謝申し上げ

げる。

本研究遂行のきっかけとなった無菌培養確立をご指示下さった元林業試験場造林部長戸田良吉博士、また、研究の遂行に当たってご鞭撻とご指導を賜った森林総合研究所企画調整部長勝田 柁博士、元林業試験場造林部遺伝育種科長（現関東学園大学）石川広隆博士、並びに研究遂行に当たって種々ご助言をいただいた森林総合研究所生物機能開発部生物工学科組織培養研究室長石井克明博士に対して厚く御礼申し上げます。

引用文献

- ABDULLAH, A.A., YEOMAN, M.M. and GRACE, J. : *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* TEN., Plant Cell Tissue Organ Culture, **5**, 35-44 (1985)
- AHUJA, M.R. : Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen, Silv. Genet., **32**, 131-135 (1983)
- AHUJA, M.R. : Isolation and culture of mesophyll protoplasts from mature beech trees, *ibid.*, **33**, 37-39 (1984)
- AITKEN, J., HORGAN, T.J. and THORPE, T.A. : Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*, Can. J. For. Res., **11**, 112-117 (1981)
- AITKEN-CHRISTIE, J. and THORPE, T.A. : Clonal propagation: Gymnosperms, In "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol.1," (ed.: VASIL, I.K.), Academic Press, Inc. 82-95 (1984)
- ARNOLD, S. von and HAKMAN, I. : Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA), J. Plant Physiol., **132**, 164-196 (1988)
- BAROCKA, K.H., BAUS, M., LONTKE, E. and SIERET, F. : Tissue culture as a tool for in vitro-mass-propagation of aspen, Z. Pflanzenzüchtg., **94**, 340-343 (1985)
- BENNETT, L.K. and DAVIES, F.T.Jr. : *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings, HortScience, **21**, 1045-1047 (1986)
- BHOJWANI, S.S. and RAZDAN, M.K. : Plant tissue culture: Theory and practice, ELSEVIER, 502pp. (1983)
- BONGA, J.M. : Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation in tissue culture, In "Tissue culture in forestry" (eds.: BONGA, J.M. and DURZAN D.J.), Martinus Nijhoff/Dr W. JUNK Publishers, 387-412 (1985)
- BONGA, J.M. and DURZAN, D.J. : Introduction, In "Tissue culture in forestry" (eds.: BONGA, J.M. and DURZAN, D.J.), Martinus Nijhoff/Dr W. JUNK Publishers, 1-3 (1985)
- BROWN, C.L. and LAWRENCE, R.H. : Culture of pine callus on a defined medium, For. Sci., **14**, 62-64 (1968)
- BROWN, C.L. and SOMMER, H.E. : An atlas of gymnosperms cultured *in vitro* : 1924-1974, Georgia Forest Research Council, 271 pp. (1975)
- BURDON, R.D. : The role and optimal place vegetative propagation in tree breeding strategies, Proc. IUFRO Joint Meeting of Working Parties on Genetics about

- Breeding Strategies including Multiclonal Varieties, 66-83 (1982)
- CHALUPA, V. : Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*, Commun. Inst. For. Czechoslov., **12**, 255-271 (1981)
- CHALUPA, V. : *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* MILL.), Biologia Plantarum (Praha), **26**, 374-377 (1984)
- CHEN, W.H., DAVEY, M.R., POWER, J.B. and COCKING, E.C. : Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures, J. Exp. Bot., **39**, 251-261 (1988)
- CHEVRE, A.M., GILL, S.S., MOURAS, A. and SALESSES, G. : *In vitro* vegetative multiplication of chestnut, J. Hort. Sci., **58**, 23-29 (1983)
- DAVID, A., DAVID, H. and MATEILLE, T. : *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles, Physiol. Plant., **56**, 102-107 (1982)
- DURZAN, D.J., CHALUPA, V. and MIA, A.J. : Growth and metabolism of cell and tissues of jack pine (*Pinus banksiana*), 1. The establishment and some characteristics of a proliferated callus from jack pine seedlings, Can. J. Bot., **54**, 437-445 (1976)
- ECONOMOU, A.S. and READ, P.E. : *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas, HortScience, **19**, 60-61 (1984)
- GRESSHOFF, P.M. and DOY, C.H. : Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*, Planta, **107**, 161-170 (1972)
- HAKMAN, I. and FOWKE, L.C. : Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce), Can. J. Bot., **65**, 656-659 (1987)
- HAKMAN, I. and ARNOLD, S. von. : Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce), Physiol. Plant., **72**, 579-587 (1988)
- HALPERIN, W. and WETHERELL, D.E. : Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*, Nature, **205**, 519-520 (1965)
- HARVEY, A. and GRASHAM, J. : Procedures and media for obtaining tissue cultures of 12 conifer species, Can. J. Bot., **47**, 547-549 (1969)
- 井出雄二, 山本茂弘 : コナラの芽生えから分離したえき芽の培養による幼植物体の再生, 日林誌, **63**, 109-112 (1987)
- 石井克明 : オーストラリア・ニュージーランドにおける林木の組織培養, 林木の育種, **141**, 22-24 (1986)
- ISIKAWA, H. : *In vitro* formation of adventitious bud and root on the hypocotyl of *Cryptomeria japonica*, Bot. Mag. (Tokyo), **87**, 73-77 (1974)
- ISIKAWA, H. : Effects of cytokinin and morphactin on bud generation from *Cryptomeria* and *Chamaecyparis* hypocotyl segments cultured *in vitro*, In "Long term preservation of favorable germ plasm in arboreal crops." (eds. : AKIHAMA, T. and NAKAJIMA, K.). Fruit Tree Research Station, Ministry of Agriculture and Forestry, 142-147 (1978)
- 鎌田 博, 原田 宏 : 植物のバイオテクノロジー, 中央公論, 200 pp. (1981)
- KAUL, K. and KOCHHER, T.S. : Growth and differentiation of callus cultures of *Pinus*, Plant Cell Reports, **4**, 180-183 (1985)
- KAUL, K. : Plant regeneration from cotyledon-hypocotyl explants of *Pinus strobus* L.,

- Plant Cell Reports, **6**, 5-7 (1987)
- KOLEVSKA-PLETIKAPIC, B., JELASKA, S., BERLJAK, J. and VIDAKOVIC, M. : Bud and shoot formation in juvenile tissue culture of *Pinus nigra*, Silv. Genet., **32**, 115-119 (1983)
- LIBBY, W.J. : The clonal option, Norwegian For. Res. Inst. 1432 As-NLH, 32 pp. (1983)
- LLOYD, G. and McCOWN, B. : Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture, Comb. Proc. Int. Plant Propagators' Soc., **30**, 421-427 (1980)
- MANGAT, B.S. and JANJUA, S. : Cyclic nucleotides and *in vitro* plant culture. 1. Induction of organogenesis in tobacco (*Nicotiana tabacum*) callus cultures, J. Exp. Bot., **38**, 2057-2067 (1987)
- MATHES, M.C. : The *in vitro* formation of plantlets from isolated aspen tissue, Phyton, **21**, 137-141 (1964)
- 水越俊雄, 糸山登志子, 益子洋一, 松島 久 : タバコ茎の無菌培養における器官形成とサイクリック AMP, 科学と生物, **11**, 594 ~596 (1973)
- MOSTELLER, F. and YOUTZ, C. : Tables of the Freeman-Tuckey transformations for the binominal and Poisson distribution, Biometrika, **48**, 433-440 (1961)
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, Physiol. Plant., **15**, 473-497 (1962)
- MURASHIGE, T. and NAKANO, R. : Morphogenic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence, Amer. J. Bot., **52**, 819-827 (1965)
- 農林水産技術会議 (監修) : 遺伝子工学の現状と未来, 家の光協会, 552 pp. (1982)
- 大庭喜八郎 : クローン化技術を利用した林木育種の新しい展開, 第5回基礎育種学シンポジウム報告, 13~20 (1984)
- OKA, S. and OHYAMA, K. : Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *Broussonetia kazinoki* SIEB. (Paper mulberry), J. Plant Physiol., **119**, 455-460 (1985)
- REDENBAUGH, K., KARNOSKY, D.F. and WESTFALL, R.D. : Protoplast isolation and fusion in three *Ulmus* species, Can. J. Bot., **59**, 1436-1443 (1981)
- RUSSEL, J.A. and McCOWN, B.H. : Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue, Plant Sci., **46**, 133-142 (1986)
- SAITO, A. : Effects of inorganic elements on somatic callus culture in *Cryptomeria japonica*, J. Jpn. For. Soc., **61**, 457-458 (1979)
- SAITO, A. : Effects of growth regulators on somatic callus culture in *Cryptomeria japonica*, *ibid.*, **62**, 17-18 (1980a)
- SAITO, A. : Effects of inorganic elements in the medium on shoot differentiation from *Populus* callus, *ibid.*, **62**, 147-149 (1980b)
- SAITO, A. and IDE, Y. : *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced on cuttings of peeled twigs of Japanese white birch, *ibid.*, **67**, 282-284 (1985a)
- SAITO, A. and IDE, Y. : *In vitro* Plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch, *ibid.*, **67**, 373-375 (1985b)
- 齊藤 明 : 林木育種とバイオテクノロジー, 農業および園芸, **60**, 193~199 (1985 c)
- 齊藤 明 : 組織培養利用による林木のクローン大量増殖, “林業におけるバイオテクノロジー”, (農林

- 省林業試験場バイオテクノロジー研究会編), 林業科学技術振興所, 30~38 (1986)
- 斉藤 明: 林木の組織培養とその利用, “森林のバイオテクノロジー入門”, (佐々木恵彦編著), 創文, 53~114 (1987)
- SAITO, A., HOSOI, Y., ISHII, K. and SATO, T.: Callus formation from protoplasts of mesophyll cells of *Populus* plantlets, *J. Jpn. For. Soc.*, **69**, 472-477 (1987)
- SAITO, A., HOSOI, Y., ISHII, K. and SATO, T.: Protoplast isolation, somatic hybridization and eye-visible colony formation in different *Populus* species. *ibid.*, **70**, 119-126 (1988)
- SAN-JOHE, M.C., BALLESTER, A. and VIEITEZ, A.M.: Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus rubor* L. *Tree Physiol.*, **4**, 281-290 (1988)
- SATO, T.: Induction and maintenance of callus tissues in Japanese black pine, *In* “Long term preservation of favorable germ plasm in arboreal crops,” (eds.: AKIHAMA, T. and NAKAJIMA, K.), *Fruit Tree Res. Stn.*, Ministry of Agriculture and Forestry, 130-135 (1978)
- 佐藤 亨: ヤマナラシ培養カルスの茎葉分化に与える NH_4NO_3 の量と Zeatin 濃度の効果, *日林誌*, **63**, 46~50 (1981)
- SATO, T., IDE, Y. and SAITO, A.: Tissue culture technology in the rapid clonal propagation of Japanese white birch, *J. Jpn. For. Soc.*, **68**, 343-346 (1986)
- 佐藤 亨: スギ稚苗の組織片からの不定芽の誘導による幼植物体の再生, *日林誌*, **68**, 389~392 (1986)
- 佐藤 亨, 森 格良, 斉藤 明: クヌギ芽生えの上胚軸片からの幼植物の再生, 同上, **69**, 113~117 (1987)
- SHA, L., McCOWN, B.H. and PETERSON, L.A.: Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 631-634 (1985)
- SMELTZER, R.H. and JOHNSON, M.A.: Evidence for the presence of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and its metabolism in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) callus, *Can. J. For. Res.*, **7**, 68-75 (1977)
- SMITH, M.A. and McCOWN, B.H.: A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species, *Plant Sci. Lett.*, **28**, 149-156 (1983)
- 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)
- STEINHART, C.E., STANDIFER, L.C.Jr. and SKOOG, F.: Nutrient requirements for *in vitro* growth of spruce tissue, *Amer. J. Bot.*, **48**, 465-472 (1961)
- STICKLEN, M.B., COMIR, S.C. and LINEBERGER, R.D.: Shoot regeneration from protoplasts of *Ulmus* × ‘Pioneer’, *Plant Sci.*, **47**, 29-34 (1986)
- STONE, E.C. and DUFFIELD, J.W.: Hybrids of sugar pine by embryo culture, *J. For.*, **48**, 200-201 (1950)
- SYONO, K.: Change in organ forming capacity of carrot root calluses during subcultures, *Plant Cell Physiol.*, **6**, 403-419 (1965)
- 真山真策: クロウン増殖と人工種子, オーム社, 190 pp. (1989)
- TUKEY, H.B.: Artificial culture of sweet cherry embryos, *J. Hered.*, **24**, 1-12 (1933)
- VIEITEZ, A.M. and VIEITEZ, E.: Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut

- grown *in vitro*, *Physiol. Plant.*, **50**, 127-130 (1980)
- VIEITEZ, A.M., SAN-JOHE, M.C. and VIEITEZ, E.: *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L., *J. Hort. Sci.*, **60**, 99-106 (1985)
- WASHER, J., REILLY, K.J. and BARNETT, J.R.: Differentiation in *Pinus radiata* callus culture: The effects of nutrients, *New Zealand J. For. Sci.*, **7**, 321-328 (1977)
- WINTON, L.L.: Plantlets from aspen tissue cultures, *Science*, **160**, 1234-1235 (1968)
- WINTON, L.L.: Shoot and tree production from aspen tissue cultures, *Amer. J. Bot.*, **57**, 904-909 (1970)
- WINTON, L.L.: Tissue culture propagation of European aspen, *For. Sci.*, **17**, 348-350 (1971)
- WINTON, L.L.: Annotated bibliography of somatic conifer callus cultures, *Genetics and Physiology Notes*, No.16, Inst. Paper Chemistry, 19pp. (1972a)
- WINTON, L.L.: Bibliography of somatic callus cultures from deciduous trees, *Genetics and Physiology Notes*, No.17, Inst. Paper Chemistry, 19pp. (1972b)
- WINTON, L.L.: Morphogenesis in clonal propagation of woody plants, *In "Frontiers of plant tissue culture 1978"*, (ed.: THORPE, T. A.) The Bookstore, Univ. Calgary, 419-426 (1978)
- WOLTER, K. and SKOOG, F.: Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures, *Amer. J. Bot.*, **53**, 263-269 (1966)
- WOLTER, K.: Root and shoot initiation in aspen callus cultures, *Nature*, **219**, 509-510 (1968)
- 吉田文武: 栄養生理研究への利用, 細胞・カルス, “植物組織培養”(竹内正幸・石原愛也・古谷 力編), 朝倉書店, 298~309 (1972)

Basic Studies of Organ and Callus Culture in Woody Plants

SATO, Toru⁽¹⁾

Summary

In this study, attempts have been made to use tissue culture technology to develop organ culture and callus culture of various species in woody plants such as *Cryptomeria japonica*, *Pinus thunbergii*, *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Prunus pseudo-cerasus*, *Quercus acutissima*, *Populus sieboldii*, *P. alba*, *P. sieboldii* × *P. grandidentata*, *P. simonii*, *P. maximowiczii*, *P. deltoides*, *P. canadensis*, *P. euramericana* I-214 and *P. euramericana* I-45/51.

In the organ culture, methods for shoot differentiation by the culture of different tissues of plantlets raised aseptically from tissues or organs of germinated seedlings in glass vessels, and of stem segments with axillary buds obtained from newly elongated branches in the open were investigated.

In the callus culture, (1) the relationship between different types of explant and culture medium components, and kinds and concentrations of added plant hormones suitable to callus induction from each species, (2) relationship between culture medium components and kinds or concentrations of added plant hormones for organ regenerations from callus cultures, (3) the relationship between culture medium components and kinds or concentrations of added plant hormones suitable to establish subculture from induced callus were studied, and the investigations on long-term storage of callus by repeated subculture of callus and on the preservation period of callus with a capacity for plant regeneration were made.

The results obtained are summarized as follows :

1. Plantlets were regenerated by the culture of seedling tissues in *Cryptomeria japonica*. The acquired ratio and the number of regenerated plantlets was the highest from hypocotyl segments with a bud, medium from hypocotyl, and the lowest in cotyledon. Existence of BAP was essential for plantlet regeneration, but the effects of NAA were unclear. Cultures from hypocotyl segments with a bud, plantlets with roots and shoots were produced in hormone free WS medium.

2. When epicotyl segments sprouted from the acorn of *Quercus acutissima* and were cultured in BTM medium, buds and shoots were regenerated from latent buds at the bases of scaly leaves. These bud stumps (buds, shoots) were subcultured at an interval of 30-50 days. And, at the time of their subculturing elongated shoots were harvested for rooting. The total number of shoots harvested in 600 days was on average 400 per acorn. The harvested shoots cultured in a half-strength medium of WPM supplemented with 1 or 3.16 μ M of IBA and 0.316 μ M of NAA showed very good rooting, and many plantlets were

Received March 30, 1990

(1) Bio-resources Technology Division

obtained.

3. The optimum amount of Fe-EDTA to be supplemented to IS medium for shoot primordium formation from the petiole culture of plantlets of *Betula platyphylla* var. *japonica* was investigated. A higher ratio of shoot primordium formation was observed in cultures of IS medium supplemented with 32.1 mg/l or 58.6 mg/l of Fe-EDTA. These results showed that the median of the two concentrations, namely, 42.1 mg/l of Fe-EDTA was the optimum for shoot primordium formation.

Based on investigation of effects of BAP and IAA concentrations in IS medium supplemented with 42.1 mg/l of Fe-EDTA, the best combination of their concentrations was determined, and by applying this combination more than 8000 plantlets in total (4500 from petioles and 3500 from stems) were propagated from only one initial plantlet in one year of culturing.

4. The nodal stem sections obtained from newly sprouted twigs of *Prunus pseudo-serasus* were cultured in WS medium. More shoots were obtained from the culture in 50 ml Erlenmeyer flasks than that of the culture in test tubes of 18 mm × 180 mm size. In cultures with BAP free medium, proliferation of shoots was not observed. Shoot proliferation was better in culture media supplemented with 1 or 3.16 μM of BAP.

5. The nodal stem segments with axillary buds obtained from newly elongated twigs of *Quercus acutissima* were cultured. The development of axillary buds was remarkable on BTM and WPM media. BAP concentrations of 1 and 3.16 μM were suitable for development of axillary buds. In propagation of shoots by subculture, the survival ratio of these buds decreased to half at 6 generations of subculture, namely one year, and to three tenth at 2 years.

As mentioned above, shoots obtained from axillary bud culture mostly showed chlorosis and died. Experiments were made to find an effective combination of inorganic elements in BW [1/2 (BTM + WPM)] medium for the purpose of suppressing chlorosis. Results showed that the increase in K₂SO₄ in medium was effective and that the increase of Ca and a decrease in Fe and Mg, however, was not.

6. Scales removed from male flowers or immature seeds of *Cryptomeria japonica* were cultured in modified WS medium supplemented with cytokinin and auxin, and well developed calli were induced on the explants. Calli were preserved by repeated subculture at an interval of about 4 months in modified WS medium supplemented with BAP and NAA. Calli cultured in modified WS medium supplemented with c-AMP or dib. c-AMP instead of BAP and NAA were preserved by repeated subculture at an interval of 6-7 months.

Only adventitious roots were regenerated from subcultured calli of *Cryptomeria japonica* in modified WS medium supplemented with 0.01-10 μM of c-AMP or dib. c-AMP. The best differentiation of adventitious roots was obtained from calli after the 5th subculture. The calli of *Cryptomeria japonica* was preserved for 18 years by subculturing at the intervals of the 6 months on WS medium supplemented with a combination of NAA (1 or 3.16 μM), c-AMP (1 or 3.16 μM) and BAP (0.1 or 1 μM).

7. The callus formation of *Pinus thunbergii* was induced with low frequency by culture of scales of male strobili in modified WS medium supplemented with NAA or

2,4-D. However, well developed calli were induced by culture of hypocotyl segments on SSS medium supplemented with NAA or 2,4-D. Moreover, it was recognized that SSS medium supplemented with 400 mg/l of L-arginine or 200 mg/l of urea as N resources was more suitable for preservation of calli from *Pinus thunbergii*.

8. In *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*, calli was induced more easily by culture of branch segments of the newly elongated twigs on WS medium than on MS medium. In the other 8 species of *Populus*, calli were induced from the cortical layer of branch segments obtained from the newly elongated twigs on WS medium. The preservation of calli by MS medium with BAP was better than that of WS medium with BAP. Moreover, for the preservation of calli, MS medium supplemented with 2,4-D was more effective than MS medium supplemented with NAA.

Morphogenesis in *Populus* was very active when WS medium was supplemented with 676 mg/l or 1 637 mg/l of NH_4NO_3 than 50 mg/l of NH_4NO_3 . The shoot formation of aspen hybrid (*Populus sieboldii* × *P. grandidentata*) from calli of the 3-4th generations of subculture was induced on WS medium supplemented with 3.16 or 10 μM of zeatin and 676 mg/l of NH_4NO_3 . Although no shoot formation of aspen hybrid from the 8th generation of subculture was observed on WS medium containing BAP, the shoot formation was considerably induced by culture on WS medium supplemented with 3.16 or 10 μM of zeatin.

In *Populus sieboldii* and *P. alba*, morphogenesis was observed by callus culture on the medium supplemented with a high content of zeatin. In *Populus canadensis*, morphogenesis, by the subculture of callus, was observed only when the subculture medium was changed to MS medium supplemented with a low level of 2,4-D. Morphogenesis from calli cultured on WS medium supplemented with 676 mg/l or 1 637 mg/l of NH_4NO_3 was very easy.

In 9 species of *Populus*, the induced calli was preserved for 3.5-7.9 years by subculture in MS medium supplemented with 1 650 mg/l (basic), 620 mg/l and 165 mg/l of NH_4NO_3 . Morphogenesis in the 9 species of *Populus* was lost after 2.7 years culture. However, the calli of *Populus canadensis* showed morphogenic ability for 4.9 years.