

ヒノキとクロマツの組織培養条件の検索

石井 克明⁽¹⁾

ISHII, Katsuaki: Screening of Tissue Culture Conditions
of Hinoki Cypress and Japanese Black Pine

要 旨: ヒノキの芽生えからの増殖では、Campbell と Durzan の基本培地に BA や NAA を添加して、平均 150 本のシュートを 13 か月で得ることが可能であった。これらシュートは 70% の発根率を示し、高率で植物体の個体再生ができた。再生個体はパーライト又はパーミキュライト培地に鉢出し後、含水ろ紙で 1 か月被覆することにより外環境に順化できた。このようにして 18 か月で一つの芽生えから平均 100 個体、最大 500 個体の植物体を得る技術を開発した。ヒノキ成木からのマイクロプロパゲーションでは、当年生葉条の先端部を外植体とすることにより個体再生ができた。1 葉条より 20 本程度の不定シュートが得られた。クロマツの成熟胚からの組織培養においては、初代培養、継代培養、発根処理時ごとに基本培地を変えることにより、8 か月の培養で一つの胚より平均 9~13.5 (最大 31) 本の不定シュート及び発根再生個体を得た。増殖にはサイトカイニンパルス処理や培養中の葉束より新たに葉束芽を誘導する再増殖法が有効であることが分かった。サイセンチュウ抵抗性検定済のクロマツの 6~7 年生木からの組織培養では、塩化ベンザルコニウム液やエタノールを用いた比較的效果的な表面殺菌法を開発した。心止め誘導葉束芽を外植体とし、BA 添加の 1/2 LePouvre 培地を用いて、1 か月に平均 1 本の新しい不定シュートを得る増殖法を開発した。安定的に個体再生するには、発根率の向上が必要であることが分かった。

目 次

1	はじめに.....	132
2	ヒノキの芽生えを用いた増殖.....	134
2.1	材料と方法	134
2.2	結果と考察	134
3	ヒノキ成木からの増殖.....	137
3.1	材料と方法	137
3.2	結果	137
3.3	考察	139
4	クロマツの成熟胚を用いた増殖.....	140
4.1	材料と方法	140
4.2	結果	140
4.2.1	芽の誘導	140
4.2.2	継代培養におけるシュートの生存率とシュート数	140
4.2.3	シュートの再増殖	143

4.2.4	発根試験	145
4.2.5	発根におけるクローン間差	145
4.2.6	各種発根助長物質の効果	147
4.2.7	発根シュートの順化	147
4.3	考察	149
5	クロマツ成木からの増殖	149
5.1	材料と方法	149
5.2	結果	150
5.2.1	初代培養における殺菌法の違いの効果 (1986 年分)	150
5.2.2	初代培養における基本培地の短枝の生存に及ぼす影響 (1987 年分)	152
5.2.3	初代培養での BA の濃度の生存への影響	152
5.2.4	継代培養での BA による短枝からの不定芽形成	153
5.2.5	継代培養での各種培地のシュート生育への影響	153
5.2.6	継代培養での蔗糖濃度のシュート伸長への影響	153
5.2.7	活性炭の銘柄の違いがシュートの生育に及ぼす影響	154
5.2.8	IBA 濃度がシュートの発根に及ぼす影響	154
5.3	考察	154
6	まとめ	155
	謝 辞	157
	引用文献	157
	Summary	160

1 はじめに

選抜優良個体の形質をそのまま次代に伝えるにはクローン増殖が最も優れている。従来行われているクローン増殖の方法として、挿し木、つぎ木があるが、すべての樹種に応用できるものではなく、季節や場所の制約もある。そこで、組織培養による林木のクローン増殖の可能性を検討する必要がある。

組織培養による林木の大量増殖技術の研究には多くの報告があり (BAJAJ, 1986; BOULAY, 1987 a), なかでもユーカリ (DURAND-CRESSWELL *et al.*, 1982), ポプラ (AHUJA, 1987), チーク (MASCARENHAS *et al.*, 1987) のように実用的に応用できる成功例が増えてきた。温帯、寒帯地域の主要造林木である針葉樹については、ニュージーランドの *Pinus radiata* (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984), 米国ウエハウザー社の *Pseudotsuga menziesii*, シンプソン木材会社の *Sequoia sempervirens* (農林水産技術会議, 1982) 等で組織培養によって増殖された苗木が植栽され、商業的な利用が図られている (BOULAY, 1987 b)。我が国ではスギの挿し木による増殖がクローン林業としては世界一の歴史をもっている。しかし、これは挿し木発根性の悪い他の樹種への応用が難しい。

斎藤 (1987) によると、一般に組織培養による増殖の方法として 1) 頂芽や腋芽などの直接培養, 2)

不定芽の形成, 3) 苗条原基の形成, 4) カルスからの器官分化, 5) カルスからの不定胚形成が掲げられているが, ここでは主に 2) の外植体に不定芽を誘導して増殖させる方法を用いて, 我が国の重要造林木であるヒノキとクロマツについて検討した。

まずヒノキについては, 芽生え及び成木よりの外植体を用いた組織培養における問題点を追及した。ヒノキはスギと同じく最も重要な造林用針葉樹であるが, 挿し木の容易な品種のナンゴウヒ以外は, 比較的クローン増殖の難しい樹種である。また, 採種園の着花結実性の良くないクローンが多いといわれているので, 組織培養によるクローン増殖の可能性について検討を加えることにした。なお, ヒノキ属の組織培養は世界的にみると, カナダでの *Chamaecyparis nootkatensis* の組織培養の記載があるが (BOULAY, 1987 b), これは胚の培養で, 4~5本のシュートを得たに過ぎない。

マツ属は挿し木が困難である上に重要な樹種が多いので, 世界的に多くの樹種で組織培養の研究がなされている (BOULAY, 1987 b)。例えば, ラジアータマツ, テーダマツ, フランス海岸松等について研究されており, ラジアータマツでは芽生えを用いたマイクロプロパゲーションの実用化に成功している。しかし, クロマツについては, 発根・個体再生まで記載した報告はない。

クロマツ (*Pinus thunbergii* PARL.) はザイセンチュウによる被害が著しく, その抵抗性個体のクローン増殖の必要性がいられている (藤本, 1987)。また, 抵抗性個体の子供も高い抵抗性を示すことが判明してきたので, 増殖効率のよい胚や芽生えからの培養による大量増殖法の開発を試みた。

以上のことから本研究ではマイクロプロパゲーションを目指し, 増殖率が高く実用化の可能性が大きい芽生えや胚及び優良個体の増殖を意図して成木からの外植体に不定芽を形成させる方法について研究を行った。

基本培地の選択には過去の文献を参照する方法が一般的と思われるが, ここで問題になるのは, 正確な培地成分の把握であった。過去の文献中では, 略記号で表記された培地が実際どういう成分構成なのか曖昧なものが多い。例えば, GD の培地は, アカマツ, テーダマツ, リギテーダマツの胚からの培養に用いられているが (KIM, *et al.*, 1982; MEHRA-PALTA, *et al.*, 1978; SHIM, *et al.*, 1986), 元の文献 (GRESSHOF and DOY, 1972) では, DBM I~III の3種あり, 一般に GD といわれているものがどれなのか曖昧なことが判明した。本研究では DBM I を用いたが, 他の文献で GD がどれを指しているかは不明である。DBM II は木本用としては無機塩の内 N, P, K, 濃度が高く DBM III は蔗糖のかわりにグルコースを用いた特殊な組成であったので, ここでは試みなかった。ほかにも SSS の培地で, 有機態窒素を尿素にする場合とアルギニンにする場合があるが, 本報告ではアルギニンの方を用いた。又, SH の場合も, 元の文献 (SCHENK and HILDEBRANDT, 1972) と, *P. radiata* での文献 (REILY and WASHER, 1981) 中での SH とでは myo-イノシトールの量が10倍違っている。本論文では *P. radiata* で用いられた 100 mg/l の濃度で用いた。

これまで発表された論文の中で, 培地成分表が掲載されていない場合は, 特に注意が必要と思われる。

なお, 本報告中①ヒノキの芽生えを用いた増殖, ②ヒノキ成木からの増殖, ③クロマツ成熟胚を用いた増殖についての結果の一部はすでに公表しているが (ISHII, 1986; 石井, 1988, 1989), 本報告はそれらのデータも含めて検討し, ヒノキとクロマツの組織培養条件の検索に関するこれまでの成果を総

合的に取りまとめたものである。

2 ヒノキの芽生えを用いた増殖

2.1 材料と方法

ヒノキ種子は森林総合研究所（当時林業試験場）種子貯蔵庫に保管されている高知県長岡郡奥日が山国有林産を用いた。流水で洗ったあとに、70%エタノールで2分、10%過酸化水素水で10分滅菌し、2回滅菌水で洗浄して1%和光寒天培地上に播種し、25°C暗所で発芽させた。発芽後1週間の芽生えを材料として用いた。

不定芽誘導培地として、WS (WOLTER and SKOOG, 1966), SSS (STEINHART, STANDIFER and SKOOG, 1961), Heller (DAVID and DAVID, 1977), MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962), CD (CAMPBELL and DURZAN, 1975) の基本培地 (Table 1 参照) にサイトカイニンとして BA, オーキシンとして NAA, IBA, 2, 4-D を各種濃度で加えたものを用いた。そのほかに、不定芽伸長用、茎葉発根用として、SEM (ABO-EL-NIL and MILTON, 1982), GD (GRESSHOF and DOY, 1972), LM (VERMA, 1982), SH (SCHENK and HILDEBRANDT, 1972) の培地 (Table 2 参照) も試験した。蔗糖濃度は2~3%, 寒天は和光純薬製で0.9%とし、培地 pH を高圧蒸気滅菌前に5.7~5.9に調製した。100 ml のフラスコ中に40 ml の培地を入れ、25±1°Cで16時間/日の5000 lx の蛍光灯照明で培養した。1処理に少なくとも15本以上の芽生えやシュートを用いた。

2.2 結果と考察

まず不定芽形成を促進する条件を求めた。Table 1 に示すように芽生えを CD の基本培地に 2.25 mg/l (10 μM) の BA と 0.005 mg/l (0.027 μM) の NAA を入れて培養すると、子葉部と胚軸部に60%以上の高率で、不定芽が生じた (Photo 1)。初代培養では、グルタミンとアスパラギンを200 mg/l ずつ (それぞれ1370 μM, 1514 μM) を添加すると、不定芽形成率が向上した。

次に不定芽を伸長させる条件を求めた。誘導された不定芽を2か月後 Table 2 に示す茎葉伸長用の各種培地に移植し、最適な培地を検索した。検索した中では、CD の基本培地に NAA を 0.005 mg/l (0.027 μM) 添加したものが最も適していた (Photo 2)。2~5 mm の長さだった不定芽が3か月後20 mm 以上に伸長した。

この伸長したシュートより、再度の不定芽を発生させてみた。すなわちこれを CD の基本培地に、BA 2.25 mg/l, NAA 0.005 mg/l, グルタミン 200 mg/l を添加した培地に移植すると、平均18本の不定芽が生じた。このシュートより不定芽を生じさせる系は、不定芽→伸長したシュート→不定芽→伸長したシュートの系の繰り返し培養過程からなり、再生個体を大量に得る系の開発に必要なシュート増殖手段として有効なことが判明した (Table 3)。その後の研究でこの1サイクルには最小4か月でよいことが分かり、9年以上の継代培養が可能であった。

次に、伸長したシュートから発根させる条件を求めた。すなわち1 cm 以上に伸びた茎葉を各種発根培地に移植して、最適培地を検索した (Table 4)。CD の培地に IBA 3 mg/l (14.8 μM), NAA 0.1 mg/l (0.54 μM) 添加の培地では67%の発根率であったが、同時にカルス形成も促進され、生じた根

Table 1. ヒノキの芽生えからの不定芽の誘導
Induction of adventitious buds on juvenile seedlings of *C. obtusa*

基本培地 (文献年) Basic media (Year of publication)	BA (μ M)	オーキシン Auxin			供試 外植体 本数 No. of explants	芽形成率% (平均芽数) Percent of budding (Av. of buds)
		NAA	IBA	2,4-D		
WOLTER & SKOOG (1966)(WS)	10	0.27	0	0	18	17(8.0)
STEINHART <i>et al.</i> (1961)(S)	10	0.054	0	0	20	35(5.0)
HELLER (DAVID, 1977)	0	0	0.094	0	15	0(0)
MURASHIGE & SKOOG (1962)(MS)	4	0	0	0.045	16	50(2.3)
1/2 MS (Cheng, 1975)	1	1	0	0	15	0(0)
CAMPBELL & DURZAN (1975)(CD)	10	0.027	0	0	20	60(8.3)
CAMPBELL & DURZAN 1 370 μ M グルタミン含有 with Glutamine	10	0.027	0	0	15	66(5.3)
CAMPBELL & DURZAN 1 370 μ M グルタミンと 1 514 μ M アスパラギン含有 with-Glutamine and Asparagine	10	0.027	0	0	15	87(7.9)

芽形成率 = 不定芽形成芽生え数 \times 100 / 供試芽生え数
Percent of budding (%) = adventitious buds \times 100 / seedlings
No. of buds which formed No. of juvenile

Table 2. シュートの伸長に対する培地の影響
Effects of media on elongation of shoots

基本培地 (文献年) Basic media (Year of publication)	添加物 Addition (μ M)	シュートの 伸長 Shoot elongation
WS (1966)	NAA (1) 活性炭 5g/l Activated charcoal	悪い Bad
1/2 MS (CHENG, 1975)		枯死 Dead
CAMPBELL & DURZAN (1975)	NAA (0.027)	大変良い Very good
CD (1975)	グルタミン (1 370) Glutamine	良い Good
SCHENK & HILDEBRANDT (1972)		良い Good
SH (1972)	BA (22.22) NAA (0.0054)	悪い Bad
1/2 GRESSHOF & DOY (1972)		悪い Bad
LM (VERMA, 1982)		悪い Bad
SEM (ABO El-Nil, 1982)		悪い Bad

3か月後のシュートの長さ; 悪い < 1cm, 良い: 1-2cm
Shoot length after 3 months culture
Bad < 1cm, Good: 1-2cm
; 大変良い > 2cm
Very good > 2cm

Table 3. 芽誘導培地に継代培養されたシュートからの不定芽形成数
Number of adventitious buds formed on shoots subcultured on bud induction media

基本培地 (文献年) Basic media (Year of publication)	添加物 (μ M) Addition	供試 シュート本数 No. of shoots	平均不定芽数/シュート Ave. adventitious buds/shoot	
			2か月後 2 months after	3か月後 3 months after
CD (1975)	BA (10) NAA (0.027) グルタミン (1370) Glutamine	10	7.0	18.5
CD (1975)	BA (10) NAA (0.027) グルタミン (1370) Glutamine アスパラギン (1510) Asparagine	10	4.7	12.5

Table 4. シュートからの発根に対する培地の影響
Effects of media on root formation from shoots

基本培地 (文献年) Basic media (Year of publication)	添加物 (μ M) Addition	供試 シュート数 No. of shoots	発根 率% Rooting rate (%)	備 考 Remarks
HELLER (DAVID, 1977)	IBA (0.094)	15	0	
RIM (Abo El- Nil, 1982)	IBA (14.8) NAA (0.54)	21	14.3	カルス形成 長い黒色根 Callus formation Long black roots
GD (1972)	IBA (2.46) NAA (0.54)	21	28.6	カルス形成 細い気根 Callus formation Thin aerial roots
CD (1975)	IBA (14.8) NAA (0.54)	15	66.7	カルス形成 細い気根 Callus formation Thin aerial roots
CD (1975)	IBA (14.8) NAA (0.54) リボフラビン(2.66) Riboflavin	15	66.7	数本の直根 Several taproots

発根率 = 発根シュート数 \times 100 / 全シュート数

Rooting No. of rooted

rate = shoots \times 100 /

No. of total shoots

は細い気根が主であった。リボフラビンを 1 mg/l ($2.66 \mu\text{M}$) 同じ培地に添加するとカルス形成がおさえられ、数本の根が培地中に直根として伸長した。Photo 4 で示すように、根の伸びは3か月後 30 cm 以上に達した。このように発根した苗木は、1か月の順化の後、パーライト培地の鉢植えとすることが可能であった。鉢だしされた苗は1年後も生存していた (Photo 5)。

以上の結果から芽生えよりの増殖率を計算した。初代培養により、1本の芽生えより8か月で平均 8.3 本 (最大 42 本) のシュートを得た。そのシュートより5か月で平均 18.5 本の2次的なシュートを得た。発根率を4か月で 70% 、順化に1か月かけるとすると1本の芽生えより1年半で $8.3 \times 18.5 \times 0.7 = 100$ (最大 500) 本の苗木を得ることが可能であった。

3 ヒノキ成木からの増殖

3.1 材料と方法

林業試験場構内に植栽されていた12~13年生のヒノキ成木2個体の葉条を外植体とした。1985年6月に1個体 (A) の当年生葉条の先端部 $3\sim 4 \text{ cm}$ を切りとり、 70% エタノールで5分、 3% 過酸化水素水で15分間表面殺菌した後、クリーンベンチ内のろ紙上で風乾し (滅菌法1)、供試した。同じく10月に別の個体 (B) より採取した葉条をオスバン100倍液に10分、 1% 次亜塩素酸ナトリウムに10分、 70% エタノールに2分、 5% 過酸化水素水に10分浸漬した後、滅菌水で2回洗浄 (滅菌法2) し供試した。これを $2\sim 3 \text{ cm}$ 位の長さで切断して、CDの基本培地に $\text{BA } 2.25 \text{ mg/l}$, $\text{NAA } 0.005 \text{ mg/l}$ を加えたものに置床した。

3.2 結果

培養1年後、伸長したシュートをCDの培地に NAA を 0.005 mg/l 含むものに移植し、さらに3か月おきに植え継いだ。

シュートの発根はCDの基本培地に、 $\text{NAA } 0.1 \text{ mg/l}$ 、リボフラビン 1 mg/l を含むものに IBA を $0.3\sim 10 \text{ mg/l}$ 添加した培地に移植して行った。発根したシュートはパーミキュライトの鉢に移植しビニール袋をかぶせて順化させた。

ヒノキ成木から採取した葉条の表面殺菌法を比較すると、無菌率が殺菌法1では 36% であったのに、殺菌法2では 63% であり、殺菌法2の方が優れていた。

初代培養から3か月ごとに植え継ぎ、21か月目に得たシュート数を計測したところ、Table 5 で示すように、芽生えよりの外植片の組織培養で好成绩だったCD培地が成木においてもLP培地より成績が良いことが判明した。

次に、3種のサイトカイニンの不定シュート形成に対する効果の違いを調べたところ、Table 6 で示すように、シュート形成率では BA とゼアチンがよく、1葉条当たりを得られたシュート数ではゼアチンが21本で最も多かった。個体AとBとでのシュート形成能の違いは見られなかった。

シュートからの発根について調べたところ、Table 7 で示すように個体差が顕著で、個体Aは3か月後 28% の発根率を示した (Photo 6) が、個体Bでは 8% しか発根しなかった。 IBA 濃度を変化させて、その発根への影響を2個体混合シュートで調べたところ、2か月後では IBA を $1\sim 3 \text{ mg/l}$ 含

Table 5. ヒノキ葉条の長期培養での初代培地の違いが得られるシュート数に及ぼす影響
Effects of initial media on induced shoots number after long term culture of leaf of *C. obtusa*

培地 Media	ホルモン Hormone (mg/l)	供試 葉条数 No. of leaves	無菌生 存数(率) No. of surviving leaves(%)	得られた シュート数 No. of induced shoots	シュート数 /葉条 No. of shoots /leaf
CD	BAP 2.25 NAA 0.005	40	24 (60)	338	14.1
LP	BAP 0.5 NAA 0.005 IBA 1	50	33 (66)	87	2.6

上記培地に12か月培養した後、NAA 0.005 mg/l を含む CD 培地で 9 か月培養
After culturing on the above mentioned media for 12 months, subcultured on the CD medium containing 0.005 mg/l of NAA for 9 months

Table 6. ヒノキ葉条の長期培養での各種のサイトカイニンが不定シュート形成に及ぼす効果
Effects of plant growth regulators to the adventitious shoot formation

サイト カイニン Cytokini- nins	濃度 Concent- ration (mg/l)	供試 葉条数 No. of leaves	無菌残存 葉条数 No. of sterilized leaves	生存 葉条数 No. of surviving leaves	シュート形成 葉条数 No. of shoot forming leaves(%)	新たに形成 したシュート数 No. of newly formed shoots	1葉条あたり の新シュート No. of newly formed shoot/leaf
BA	5	50	12	4	4(100)	63	16
カイネチン	1	50	22	16	2(13)	21	11
ゼアチン	1	50	20	15	15(100)	311	21

NAA 0.005 mg/l と上記のサイトカイニンを含む CD 培地に 19 か月培養した後、NAA 0.005 mg/l を含む CD 培地に 7 か月培養
After culturing on CD media containing above mentioned cytokinines and 0.005 mg/l of NAA for 19 months then subcultured on the CD medium containing 0.005 mg/l of NAA for 7 months

Table 7. ヒノキ葉条からの不定シュートよりの発根数
Rooting from adventitious shoot of adult leaf of *C. obtusa*

実 験 Experiments	供試シュート数 No. of shoots	発植シュート数(%) Rooting shoots (%)		
		1か月後 1 month	2か月後 2 months	3か月後 3 months after
A	76	8(11)	19(25)	21(28)
B	61	0(0)	5(8)	5(8)

3 mg/l IBA 含有 CD 培地
CD medium containing 3 mg/l of IBA

有した培地で発根率が高かった (Table 8)。

3.3 考 察

ヒノキ成木の殺菌は後述するマツの短枝の殺菌程困難ではなかったが、それでも、供試外植体の30～40%は雑菌か薬害による枯死が認められ、成木を組織培養の材料に用いた場合に常に生ずる問題点の一つである。基本培地については、カナダトウヒの培養で用いられた CD 培地で十分長期間培養できたので、芽生えからのシュートと葉条からのシュートは同様な養分要求をすることが推察された。これまでヒノキ成木で試験した3種の基本培地の主なイオン濃度を Table 9 に示した。WS 培地は N, P, K 要素の濃度が最も低く、LP 培地が最も高く、CD 培地は中庸であることが分かる。このことから、3要素に関しては、比較的低濃度の培地がシュートの培養に適していることが推察された。その他のイオンについては、培地に不適だった LP 培地の Cl 濃度が極めて低い以外は、はっきりした傾向は見られなかった。サイトカイニンについては、ゼアチンが優れていたが、BA に比べると高価である

Table 8. ヒノキ葉条からの不定シュートよりの発根に対する IBA 濃度の影響
Effects of IBA concentration on rooting of adventitious shoot from leaf of adult *C. obtusa*

IBA mg/l	供試シュート数 No. of shoots	発根シュート数(%) Rooting shoots(%)	
		2か月後 2 months	3か月後 3 months after
0.3	31	3(10)	3(10)
1	31	7(23)	9(29)
3	31	5(16)	8(26)
10	31	4(13)	4(13)

供試シュートの内訳は各処理区とも個体 A 由来シュート 16 本と個体 B 由来シュート 15 本の混合
Applied shoots consist 16 from A and 15 from B.
CD 培地 CD medium

Table 9. 各種培地の主なイオン濃度
Balance sheets of ions of media (mmol)

イオン種 ions	CD	LP	WS
NO ₃	13.37	32.98	2.31
NH ₄	10.00	5	0.63
Total N	23.37	37.98	2.94
P	1.25	1.99	0.15
K	5.49	19.81	3.57
Ca	4.15	5.08	1.80
Mg	1.50	1.46	3.10
Cl	0.87	0.0014	1.88
Fe	0.10	0.108	0.01
S	1.71	1.61	6.15
Na	0.20	0.22	6.15

ので、実用上は BA を用いる場合もあろう。成木由来のシュートの発根率は 8~28% で、芽生えからのシュートの場合の 70% と比較して低く、外植体の成熟度の差によるものと思われた。

4 クロマツの成熟胚を用いた増殖

4.1 材料と方法

関東林木育種場（現林木育種センター、水戸市）のクロマツ精英樹採種園産の完熟種子を流水で良く洗浄し、一晚滅菌水に浸漬した。表面殺菌は 70% エタノールで 3 分、次に 10% 過酸化水素水で 5~10 分行った後、滅菌水で 2 回洗浄した。滅菌済メスとピンセットで成熟胚を取り出し、各種寒天培地上に水平に静置し、培養を始めた。培養には CD (CAMPBELL and DURZAN, 1975), GD (GRESSHOFF and DOY, 1972), LP (AITKEN-CHRISTIE and THORPE, 1984), 1/2 M S (MURASHIGE and SKOOG, 1962), RIM (Abo El-Nil and WINTON, 1982), SBK (SOMMER, *et al.*, 1975), SEM (Abo El-Nil and WINTON, 1982), SH (SCHENK and HILDEBRANDT, 1972), W (WHITE, 1943), WS (WOLTER and SKOOG, 1966) などの基本培地を用い、植物成長調節物質として BA と NAA を組み合わせて添加した。16 mm×185 mm の試験管に培地を 10~15 ml ずつ分注し、少なくとも 1 条件で 15 個以上の成熟胚を供試した。培養は、25°C±1°C、16 時間日長、蛍光灯照度約 5 000 lx のもとで行った。

成熟胚上に多数形成された不定芽は、各種伸長用培地に移植し約 1 か月の間隔で植え継いだ。シュートの伸長用の培養には 100 ml 容積の三角フラスコを用いた。

約 1 cm 以上に伸びたシュートは、発根培地に植え継いだ。発根したシュートはパーミキュライトとパーライトを混合した鉢に出し順化させた。

4.2 結果と考察

4.2.1 芽の誘導

成熟胚の最初の大きさは約 5mm で白色を呈していた。初代培養において、1 週間後 BA 含有の芽誘導培地上で胚は肥大し、子葉と胚軸が緑色になり幼根部が褐変した。約 3 週間後、子葉と胚軸の表面に多くの不定芽が形成されたが、子葉の部分に、より多かった (Photo 7)。特に培地と接している部分に多く見受けられた。各種培地で試みた結果は、Table 10 のように BA 3 mg/l の WS 培地が成熟胚から不定芽を誘導するのに適していた。

次に BA 濃度を 3 mg/l に一定にして、基本培地を変えた場合の結果を Fig. 1 に示した。ここでも初代培養には WS 培地が適していることが明らかになった。

次に、WS 基本培地について BA と NAA を種々の濃度に組み合わせての初代培養での胚の生存率の検討をした結果は Fig. 2 に示した。このように BA が 10 mg/l で、NAA が 0.1~0.3 mg/l の高濃度の組み合わせでは、胚の生存率が低く、カルス形成が盛んとなった。Fig. 3 に示すように、平均不定芽数は、3 mg/l の BA だけを WS 培地に添加したときが最大であった。

4.2.2 継代培養におけるシュートの生存率とシュート数

不定芽が生じたものを約 1 カ月後、胚ごと継代培養用の各種培地に移植した。活性炭又は NAA を加え生存率とシュート数を 2 カ月後調べた。Table 11 で示すように、試みた中では活性炭を添加した

Table 10. クロマツ成熟胚からの不定芽形成に対する培地の違いの影響
Influence of different media on adventitious bud formation from mature embryos of *P. thunbergii*

不定芽誘導用培地 Media for adventitious buds	基本培地 Basic media	BA濃度 Concentration (mg/l)	培養胚数 No. of embryos	不定芽形成数 No. of adventitious buds(%)	一つの胚からの平均不定芽数 Ave. no. of adventitious buds per embryo	生存率 Surviving rate(%)
BI 1	CD	2.25	19	0(0)	0	1(5)
BI 2	GD	10	60	0(0)	0	19(32)
BI 3	LP	3	15	7(47)	4.1	9(60)
BI 4	LP	0.3	15	4(27)	2.0	8(53)
BI 5	1/2 MS	2	40	0(0)	0	14(35)
BI 6	SH	5	40	3(8)	6.3	3(8)
BI 7	SH	0.5	40	9(23)	1.6	9(23)
BI 8	W	5	38	2(5)	—	19(50)
BI 9	WS	3	15	10(67)	6.2	13(87)
BI 10	WS	0.5	15	7(47)	2.9	12(80)

—, no count; CD, CAMPBELL and DURZAN; GD, GRESSHOFF and DOY; LP, Le POIVRE; MS, MURASHIGE and SKOOG; SH, SCHENK and HILDEBRANDT; W, WHITE; WS, WOLTER and SKOOG; BA, N⁶-benzyladenine.

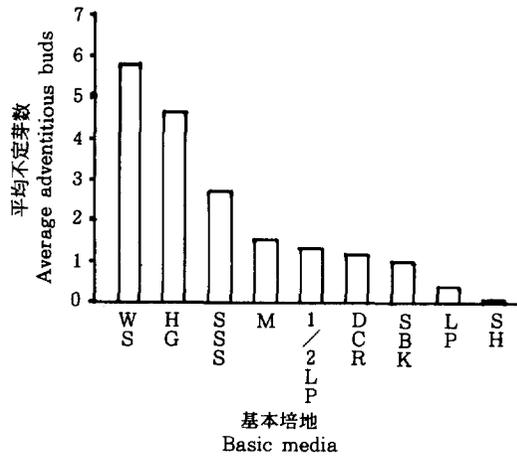


Fig. 1. クロマツ成熟胚からの平均不定芽数に対する基本培地の違いの影響
Influence of different basic media on adventitious bud formation from mature embryos of *P. thunbergii*

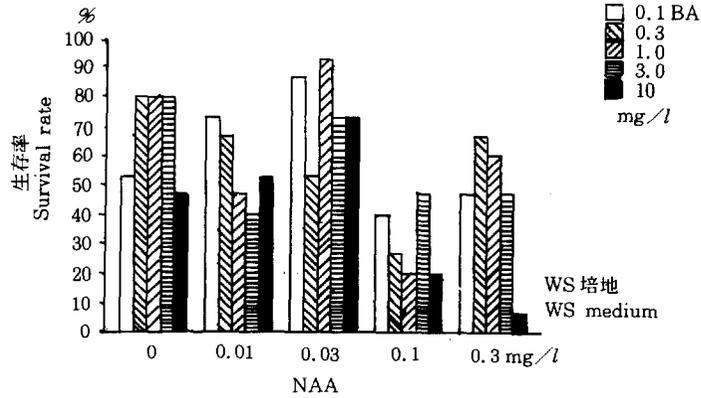


Fig. 2. BA と NAA の異なる組み合わせの WS 培地でのクロマツ成熟胚の 1 か月後の生存率

Survival rate of mature embryos of *P. thunbergii* cultured on WS medium with different concentrations of BA and NAA for one month

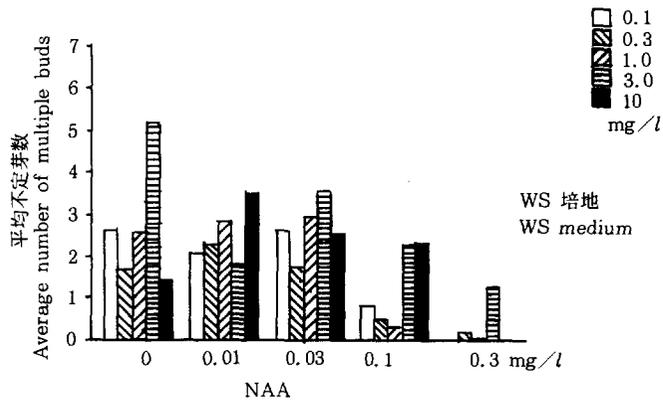


Fig. 3. BA と NAA の異なる組み合わせの WS 培地でのクロマツ成熟胚の 1 か月後の平均不定芽数

Average number of multiple buds on mature embryos of *P. thunbergii* cultured on WS medium with different concentrations of BA and NAA for one month

た LP 培地が優れており、活性炭は生存率を高め、シュートの数を増大した。活性炭のシュート伸長に対する止の効果については、DAVID *et al.* (1978) や KIM *et al.* (1982) が *Pinus pinaster* や *P. rigida* × *P. taeda* F₁ において認めているので、マツ属の組織培養に共通した効果と推察された。マツ特有の樹脂による仮道管組織の通水障害の防止の作用等が考えられる。Table 11 で試みた培地では依然として培養中に枯死するものが見られた。これは特に、不定芽が小さいものについて著しかった。類似の試験を 2 回継代培養組織で行った結果は Table 12 に示すように、生存率は活性炭添加 1/2 LP よりグルタミンと活性炭を添加した半分の濃度の DCR (GUPUTA and DURZAN, 1985) 培地の方が良かった。しかし、表には示していないがシュートの伸長では、活性炭添加 1/2 LP 培地の方が優れていた。

類似の 9 回継代培養の伸長量の大きいシュートを用いた実験でも、Table 13 に示すように活性炭添加の 1/2 LP 培地が最も良かった。この場合どの培地でもシュートは 100% 生存した。

次に活性炭含有の 1/2 LP 培地において蔗糖濃度の差が茎葉の伸長に与える影響を調べたところ、Table 14 に示すように、2% の濃度が最も良かった。

以上を総合すると、シュートの伸長には活性炭含有 2% の蔗糖濃度の 1/2 LP 培地が最もよいが、初期の継代での生存に適した培地はさらに検索が必要である。

4.2.3 シュートの再増殖

シュートを多量に得る目的で、初代培養で BA 2.25 mg/l 含有 1/2 LP 培地で 22 日培養し、さらに、

Table 11. クロマツ成熟胚からのシュート数に対する異なる培地の影響
Influence of different media on shoot elongation of mature embryos of *P. thunbergii*

シュート伸長 用培地	基本 培地	添加物 の濃度	不定芽 誘導胚 の数	生存数 (%)	全シュートと 芽の数 (移植胚に 対する%)
Media for shoot elongation	Basic media	Concen- tration of addition (mg/l)	No. of embryos inducing adventi- tious buds	Survi- ving embryos (%)	Total no. of shoots and buds (% to embryos)
S 1	LP	AC(10 000)	36	26(72)	90(250)
S 2	LP	NAA(0.01)	35	20(56)	59(169)
S 3	1/2 MS	AC(5 000)	30	4(13)	13(43)
S 4	SEM	AC(10 000)	27	20(74)	56(207)
S 5	SH		22	0(0)	0
S 6	SH	AC(8 000)	12	3(25)	—
S 7	WS	NAA(0.186)	19	12(63)	7(37)
S 8	WS	NAA(0.186)	40	19(48)	43(108)
		AC(3 000)			

—, no count : LP, Le POIVRE : MS, MURASHIGE and SKOOG : SEM, shoot elongation medium of ABO EL-
Nil : SH, SCHENK and HILDEBRANDT : WS, WOLTER and SKOOG : AC, activated charcoal : NAA, α -na-
phthaleneacetic acid.

Table 12. 継代培養における不定芽誘導胚の生存に対する培地の影響
Influence of media on survival of embryos with induced multiple buds during subculture

培地 Media	添加物 Addition	供試胚数 No. of embryos	生存胚数 No. of surviving embryos (%)
1/2 LP		38	26(68)
1/2 DCR		24	22(92)
1/2 DCR	Glutamine 100 mg/l	22	22(100)

すべて 5g/l の活性炭を含有
All media contain 5g/l of activated charcoal

Table 13. 各種培地のシュート伸長に対する影響 (活性炭 5g/l 添加)
Influence of media on shoot elongation (Addition of 5g/l of activated charcoal)

培地 Media	供試シュート数 No. of shoots	初めの長さ 平均±s.d. Initial shoot length (mm) ave. ± s.d.	30日目の長さ 平均±s.d. Shoot length after 30 days(mm) ave. ± s.d.	伸長比 Rate of elongation
1/2 WS	47	23.1±9.7	28.0±9.8	1.21
1/2 DCR	47	24.4±12.4	29.0±14.7	1.19
1/2 GD	47	25.0±15.0	28.2±14.4	1.13
1/2 LP	42	24.5±14.7	32.0±18.6	1.31

Table 14. 蔗糖濃度のシュート伸長に対する影響 (5g/l 活性炭含有 1/2 LP 培地)
Influence of concentration of sucrose on shoot elongation(1/2 LP medium containing 5g/l of activated charcoal)

蔗糖 Sucrose	供試シュート数 No. of shoots	始めの長さ 平均±s.d. Initial shoot length (mm) ave. ± s.d.	30日目の長さ 平均±s.d. Shoot length after 30 days(mm) ave. ± s.d.	伸長比 Rate of elongation
2%	19	9.8±5.0	15.5±6.6	1.58
3%	23	11.8±5.7	15.5±5.0	1.32
4%	23	10.9±3.9	14.4±3.9	1.32

培養 109 日目から 137 日目, 171 日目から 201 日目までの 2 回それぞれ BA を 0.225 mg/l, 2.25 mg/l 加えた 1/2 LP 培地で培養した (サイトカニンパルス処理と称する)。4 クローンについての結果を Fig. 4 に示した。培養 250 日では, シュート数が増加し, 平均 9~13.5 本/胚 (最大 31 シュート) になった。

また, 一度再生された個体の葉束を, BA を 2.25 mg/l 添加した 1/2 LP 培地で培養すると, 新た

に芽が誘導された (Photo 8)。このような培養個体の葉束からの芽の誘導によるシュートの再増殖の可能性が示された。

4.2.4 発根試験

小さなシュートの株を同じシュート伸長用の活性炭入り 1/2 LP 培地に1か月おきに継代培養を続け、2 cm 以上の長さになったものを、種々の発根培地に植え継いだ。Table 15 に示すように、IBA 3 mg/l と NAA 0.1 mg/l を含む RIM か、IBA を 2 mg/l 含む SBK の培地で 20% 以上の発根率が得られた。

4.2.5 発根におけるクローン間差

得られたシュートを用いて、RIM 培地を基本に IBA の濃度を変えて発根率への影響を調べたところ、供試クローンごとに IBA の効果に違いがある傾向が得られた (Table 16)。

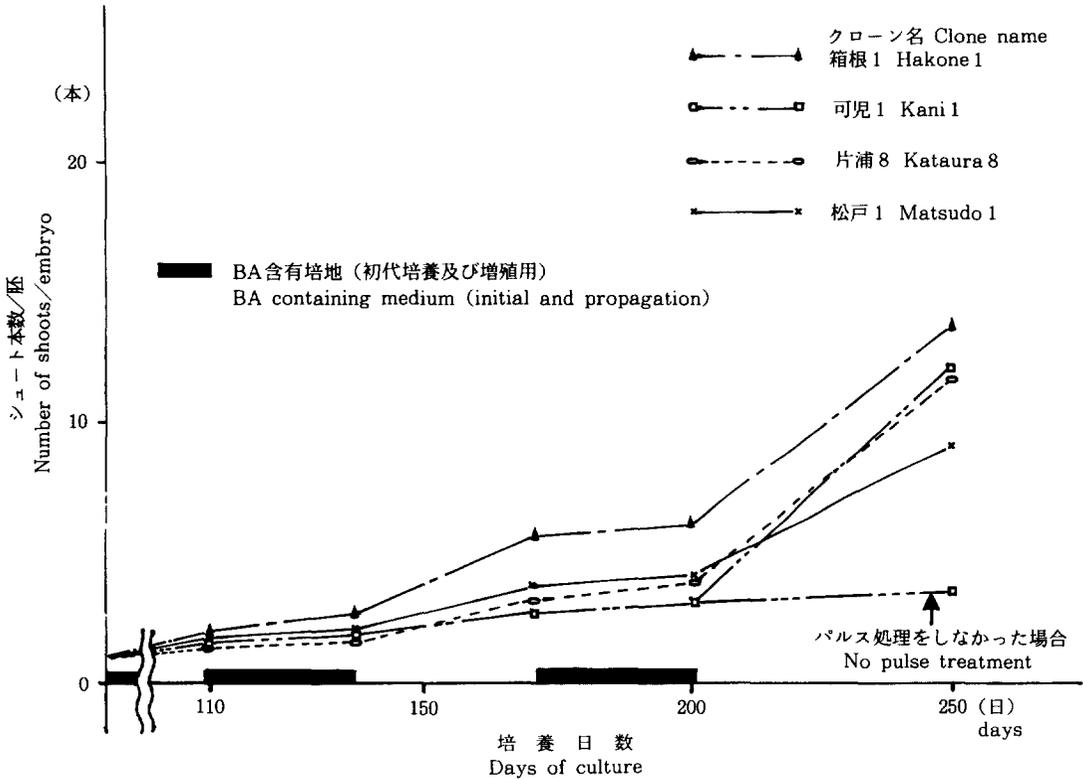


Fig. 4. BA パルス処理がシュートの増殖に与える効果
 Effect of BA pulse treatment on propagation of shoots
 各クローン毎に 2-16 胚を用いた。
 2-16 embryos were used for each clone.
 1/2 LP 培地 1/2 LP medium

Table 15. シュートからの発根に対する培地の違いの影響
Influence of different media on rooting from shoots

発根 培地	基本 培地	添加物 の濃度	供試 シュート 数	生存 シュート数 (%)	発根数 (供試シュート に対する%)
Rooting media	Basic media	Concent- ration of addition (mg/l)	No. of shoots	No. of surviving shoots (%)	No. of rooting shoots (% based on shoots no.)
R 1	GD	NAA(0.5)	10	0(0)	0(0)
R 2	LP	IBA(2)	59	45(76)	1(2)
R 3	RIM	NAA(0.5) IBA(3)	19	19(100)	4(21)
R 4	RIM	NAA(0.1) IBA(0.5)	13	13(100)	2(15)
R 5	SBK	NAA(0.1) IBA(2)	16	16(100)	4(25)
R 6	WS	AC(3 000)	70	28(40)	2(3)

GD, GRESSHOFF and DOY ; LP, Le POIVRE ; RIM, root induction medium of Abo El-Nil ; SBK, SOMMER, BROWN and KORMANIK ; WS, WOLTER and SKOOG ; NAA, α -naphthaleneacetic acid ; IBA, 3-indole butyric acid ; AC, activated Charcoal

Table 16. 採種クローンごとの発根に対する IBA の濃度の影響
Clonal difference of rooting of shoot

採種クローン名 Clone	IBA (mg/l)	供試本数 No. of shoots	発根本数 (%) No. of rooting shoots (%)
片浦 8 Kataura	0	3	0 (0)
	0.2	3	0 (0)
	1	3	1 (33)
	5	3	0 (0)
松戸 1 Matsudo	0	8	0 (0)
	0.2	8	1 (13)
	1	8	0 (0)
	5	8	4 (50)
箱根 1 Hakone	0	7	0 (0)
	0.2	7	1 (14)
	1	7	1 (14)
	5	7	0 (14)
可児 1 Kani	0	18	1 (6)
	0.2	18	0 (0)
	1	18	0 (0)
	5	18	3 (17)

最も発根率が良いと思われた IBA 5 mg/l と NAA との組み合わせでは、Table 17 に示すように、NAA はかえって阻害的に作用するときがあるなどはっきりした傾向はつかめなかった。

4.2.6 各種発根助長物質の効果

組織の内生サイトカイニンの影響で培地のオーキシンの発根作用が弱められている可能性があったので、アンチサイトカイニン (2-chloro, 4-cyclohexyl-amino 6-diamino-s-triazine) を添加して、その効果をみた (Table 18)。表に示すように効果は明瞭には認められなかった。オーキシンのみと共用すると、切り口の肥大化を抑制し、強い発根促進効果を示したレクチン (UEA-I とヒロチャワンタケ抽出のもの) (山口隆司ほか, 1987) や他の樹種で不定根の誘導に効果があるという毛根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 処理を行ってみた。しかし、それらの結果は、Table 19 及び 20 に示すように、ともに発根促進の効果がなかった。

4.2.7 発根シュートの順化

発根したシュートは順次パーライト: パーミキュライト (1:1) に鉢だしし、初めの1か月間ビニール袋をかぶせることにより順化させることができた (Photo 9)。順化後1年目のクロマツはすべて生存していた (Photo 10)。

Table 17. 採種クローンごとのシュートの発根に対する NAA 濃度の影響
(IBA 5 mg/l 含有 RIM)
Clonal difference of rooting with NAA

採種クローン名 Clone	NAA (mg/l)	供試本数 No. of shoots	発根本数 (%) No. of rooting shoots (%)
片浦 8 Kataura	0	1	0 (0)
	0.01	1	0 (0)
	0.1	1	0 (0)
松戸 1 Matsudo	0	7	3 (43)
	0.01	10	2 (20)
	0.1	12	1 (8)
箱根 1 Hakone	0	9	5 (56)
	0.01	7	2 (29)
	0.1	7	0 (0)
可児 1 Kani	0	15	3 (20)
	0.01	15	1 (7)
	0.1	13	1 (8)

Table 18. シュートの発根に対するアンチサイトカイニンの影響
Effect of anticytokinin on the rooting of shoot

アンチサイトカイニン Anticytokinin (mg/l)	培地 Medium	供試本数 No. of shoots	発根本数 (%) No. of rooting shoots (%)
0	A	20	1 (5)
	B	20	2 (10)
0.1	A	20	0 (0)
	B	20	3 (15)
1	A	20	2 (10)
	B	20	2 (10)
5	A	20	1 (5)
	B	20	2 (10)

A ; RIM 培地 (IBA 5 mg/l), B ; 1/2 SBK 培地 (IBA 5 mg/l)
RIM medium (IBA 5 mg/l) 1/2 SBK medium (IBA 5 mg/l),

Table 19. *Agrobacterium rhizogenes* の影響
Effects of *Agrobacterium rhizogenes*

培地 Media	供試本数 No. of shoots	生存数 (3か月後) No. of surviving shoots (3 months after)	発根数 No. of rooting shoots
0.5 LP	7	5	0
MS	6	0	0
0.5 LP (対照 Control)	4	3	0

Table 20. レクチンのシュートからの発根に対する影響
Effect of lectin on rooting from shoot

処理 Treatment	処理時間 (分) Time of treatment (min)	供試本数 No. of shoots	生存シュート数 No. of surviving shoots	発根シュート No. of rooting shoots
ヒロチャワン タケ 抽出液 1% IBA 100 mg/l NAA 100 mg/l	1	8	6	0
	30	10	5	1
UEA 1 ppm IBA 100 mg/l NAA 100 mg/l	1	10	6	0
	30	7	4	1

4.3 考察

遺伝的に優良な交配組み合わせやザイセンチュウ抵抗性のクロマツの増殖を目的に、クロマツ成熟胚を用いた組織培養の条件について検索した。初代培養に、BA を 3 mg/l 添加した WS 培地を用い、多数の不定芽を得た。不定芽の伸長には活性炭を 5~10 g/l 添加した 1/2 濃度の LP 培地 (不定芽伸長用培地) が適していた。この伸長用培地で 1 か月ごとに継代培養を続ける途中で BA を 2.25 mg/l 添加した培地で培養すること、すなわちサイトカイニンパルス処理を加えることが、増殖率を増大させるのに効果があった。

不定芽伸長用培地で 2 cm 程度にまでなったシュートを IBA を 1~5 mg/l 添加した RIM 培地で発根させると、クローン差や培地間のばらつきが大きい上に、発根率も 0~56% の範囲で全体的には低かった。

このような方法で、クロマツの増殖を行った場合、胚の摘出から合計 19 週間の培養で一つの胚より平均 12 本のシュートが得られた。その後良い条件では 4 週間で約半数が発根するので、約半年で 6 倍に増殖させることができる。この増殖率は依然として低いもので不定胚誘導等の高効率の増殖法の開発が望まれる。不定芽シュートの挿し木発根は、*in vitro* での高発根率系統の選抜による挿し木が容易なクローンの作出等に利用できるかもしれない。

5 クロマツ成木からの増殖

5.1 材料と方法

実験に用いた苗木は、関東林木育種場 (現林木育種センター、水戸) において 1981 年の春にまき付け養苗し、1982 年の夏にザイセンチュウの接種検定を行って生き残ったクロマツを、1983 年春に国立林業試験場 (現森林総合研究所、筑波) 圃場に定植して育成した。1986 年春に心止めを行い誘導した 1~2 cm 位の長さの短枝 (土用芽) を外植体とした。1987 年にも同様の方法で短枝を誘導し外植体とした。外植体を切りとったときの樹齢は、それぞれ 6, 7 年生であった。

1986 年は採取した外植体を Table 21 に示した 5 種類の殺菌方法で表面殺菌後、滅菌水で 4 回洗浄して、各種培地に植え付けた。

1987 年は採取した外植体の表面を水道水で洗ったあと、0.1% 塩化ベンザルコニウム水溶液で 30 分攪拌洗浄した。次に、70% エタノールで 3 分間殺菌した後に 5% 過酸化水素水で 20 分間殺菌し、クリーンベンチ内の乾熱滅菌済のろ紙上に静置して、風乾させた。

培養容器は最初内径 16 mm 長さ 180 mm の試験管を用い、生育するにつれて 200 ml, 300 ml 容量の培養フラスコを使用した。培養は各種培養成分を含む 0.9% の寒天培地を用い、3 000~5 000 lx, 16 時間日長の蛍光灯照明下、25℃ の恒温条件で行った。初代培養での供試外植体数は処理当たり 20 本以上とした。

培養に用いた基本培地は DCR (GUPTA and DURZAN, 1985), GD (GRESSHOFF and DOY, 1972), LP (HORGAN, 1987), RIM (ABO El-Nil and MILTON, 1982), SBK (SOMMER *et al.*, 1975), SH (SCHENK and HILDEBRANDT, 1972), SSS (STEINHART *et al.*, 1961), WS (WOLTER and SKOOG,

1966) そしてマツの針葉の成分分析値に基づいて作った独自の培地 M である (Table 22)。1/2 LP とは LP 培地の蔗糖以外のすべての基本培地成分を半分にしたものであり、1/2 GD, 1/2 DCR, 1/2 WS 等も同様である。また、SH 培地は myo-イノシールの濃度を 100 mg/l とし、1986 年はビタミンと糖以外の濃度を半分にしたものを用いた。

5.2 結果

5.2.1 初代培養における殺菌法の違いの効果 (1986 年分)

SH, LP, DCR 基本培地に、BA (0, 0.225, 2.25 mg/l) と、NAA (0.186, 1.86 mg/l) を含ませた培地に Table 21 の殺菌法 1~3 を用いたものを、BA (0.711, 2.25, 7.11 mg/l) と NAA (0, 0.186 mg/l) を含ませた培地に殺菌法 4, 5 を用いたものをそれぞれ植え付けて、初代培養における雑菌混入や葉害について調べた結果は Table 21 に示すとおりである。なお、ここで用いた三つの基本培地は、各殺菌法において同数均等に用いた。殺菌法 4, 5 では 2 か月後の生存率が高かったが、雑菌混入も半分程あった。また、継代した時に雑菌が増殖し始める例があるなど問題があり今後さらに殺菌法を検索する必要がある。観察によれば LP 培地はあまり培養に適しておらず、SH や DCR 培地が適

Table 21. 殺菌法の違いによる雑菌混入及び葉害の差
Difference of degree of contamination and chemical damage with different sterilization

殺菌法* Methods of sterili- zation	植え付け日 Date of initiation of culture	供試本数 No. of explants	培養 1 か月 後の雑菌混入 本数 (%) No. of conta- mination tubes after 1 month (%)	1 か月後の 葉害枯死 本数 (%) No. of dead explants after 1 month (%)	1 か月後の 生存本数 (%) No. of surviving explants after 1 month (%)	2 か月後の 生存本数 (%) No. of surviving explants after 2 months (%)
1	7月14日 14 July	75	7 (9)	48 (64)	20 (27)	9 (12)
2	7月14日 14 July	75	22 (29)	28 (37)	25 (33)	3 (4)
3	7月14日 14 July	150	50 (33)	63 (42)	37 (25)	18 (12)
3	7月16日 16 July	150	59 (39)	52 (35)	39 (26)	17 (11)
4	7月24日 24 July	180	81 (45)	—**	99 (55)	43 (24)
5	7月25日 25 July	180	82 (46)	—	98 (54)	42 (23)

* 1. 70% エタノール 1 分, 0.1% 塩化第二水銀液 15 分, 5% 過酸化水素水 15 分
70% Ethanol 1 min. 0.1% Mercuric chloride 15 min. 5% Hydrogen peroxide 15 min.
2. 70% エタノール 1 分, 0.1% 塩化第二水銀液 15 分, 1% 過酸化水素水 15 分
70% Ethanol 1 min. 0.1% Mercuric chloride 15 min. 1% Hydrogen peroxide 15 min.
3. 70% エタノール 1 分, 0.1% 塩化第二水銀液 10 分, 1% 次亜塩素酸ナトリウム 10 分
70% Ethanol 1 min. 0.1% Mercuric chloride 10 min. 1% Sodium hypochloride 10 min.
4. 70% エタノール 30 秒, 0.1% 塩化第二水銀液 10 分, 1% 次亜塩素酸ナトリウム 10 分
70% Ethanol 30 s. 0.1% Mercuric chloride 10 min. 1% Sodium hypochloride 10 min.
5. 70% エタノール 10 秒, 0.1% 塩化第二水銀液 10 分, 1% 次亜塩素酸ナトリウム 10 分
70% Ethanol 10 s. 0.1% Mercuric chloride 10 min. 1% Sodium hypochloride 10 min.

** 計測せず No counting.

Table 22. 培地の成分組成
Composition of media (mg/l)

	DCR	GD	LP	RIM	SBK	SH	SSS	WS	M	CD
(NH ₄) ₂ SO ₄		200			200					
NH ₄ NO ₃	400		400					50	400	800
NH ₄ H ₂ PO ₄						300				
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		90		138		90		45 (2H ₂ O)		
Na ₂ HPO ₄		30				30				
KH ₂ PO ₄	170		270				125		110	170
KNO ₃	340	1 000	1 800	187.5	1 000	2 500	125	170	152	340
KCl		300			300		140			65
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	360	200	250	400	125	1 564	121	370
Na ₂ SO ₄								425		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556		1 200	152			500	611	90	980
							(no water)			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96	150			150	200				
H ₂ SO ₄ (66%)							0.0005			
TiO ₂							0.2			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3 (H ₂ O)	10 (H ₂ O)	1	5 (H ₂ O)	10 (H ₂ O)	10 (H ₂ O)	1	14 (4H ₂ O- 6H ₂ O)	22.3 (H ₂ O)	16.9 (H ₂ O)
H ₃ BO ₃	6.2	3	6.2	5	3	5	0.025	3.2	6.2	6.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	3	8.6	0.5 (H ₂ O)	3	1	0.05 (no water)	5.7	8.6	8.6
KI	0.83	0.75	0.08	1	0.75	1	0.25	1.6	0.83	0.83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.25	0.025	0.1 (H ₂ O)	0.25	0.2			0.25	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.1	0.25	0.1			0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.25	0.025	0.1	0.25	0.1	0.025		0.025	0.025
NiCl ₂	0.025						0.025 (6H ₂ O)		0.025	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	30	27.8	27.8	15			27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	40	37.3	37.3	20			37.3	37.3
Fe ₂ (SO ₄) ₃							25			
Na-Fe-EDTA								5.5		
myo-Inositol	200	10	1 000	100	10	1 000 (100)	100	10	200	100
Thiamine·HCl	1	1	0.4	5	1	5	0.2		1	0.4
Nicotinic acid	0.5	0.1		0.5	0.1	5			0.5	
Pyridoxine·HCl	0.5	0.1		0.5	0.1	0.5		0.1	0.5	
Glycine	2	0.4							2	
L-Glutamine				100						
Choline chloride							0.5			
L-Cystein·HCl							10			
Arginine							400			
Sucrose	30 000	20 000	30 000	15 000	20 000	30 000	20 000	20 000	30 000	20 000

していた。BA が 7.11 mg/l で NAA が 0 か 0.186 mg/l のとき、芽が膨らみ下部が肥大し一部カルス形成するものがあった。

5.2.2 初代培養における基本培地の短枝の生存に及ぼす影響 (1987 年分)

BA をそれぞれ 3 mg/l 含む各種基本培地に短枝を植え付け、培地の短枝の生存率を調べた (Table 23)。無菌短枝数が少ないので明確なことはいえないが、WS, M, DCR, 1/2 LP, SH の各培地が初代培養に適し、SBK 培地が不適なことが推察された。

5.2.3 初代培養での BA の濃度の生存への影響

DCR 基本培地に BA 濃度を 4 段階に変えた培地で短枝の生存率を比較した。Table 24 に示すように BA が含まれない場合、褐変枯死数が増す傾向があり、BA が 8 mg/l のとき、生存率が最も良かった。

Table 23. 基本培地の短枝の生存に及ぼす影響
Effect of basic media on survival of brachyblasts

基本培地 Basic media	供試本数 No. of brachyblasts	1 か月後の 無菌短枝数 No. of clean brachyblasts after 1 month	1 か月後の 生存本数 (%) No. of surviving brachyblasts after 1 month (%)
WS	20	1	1 (100)
M	20	7	6 (86)
DCR	20	3	2 (67)
LP	20	3	1 (33)
1/2LP	20	6	5 (83)
SH	20	3	2 (67)
SSS	20	5	2 (40)
SBK	20	6	0 (0)

BA 3 mg/l 含有
containing BA 3 mg/l

Table 24. 初代培養での BA 濃度の短枝生存への影響
Effect of BA concentration on the survival of brachyblasts in the initial culture

BA 濃度 Concentration (mg/l)	供試短枝数 No. of brachyblasts	1 か月後の 無菌短枝数 No. of viral free brachyblasts after 1 month culture	1 か月後の 生存数 (%) No. of surviving brachyblasts after 1 month culture (%)
0	13	8	5 (63)
0.4	13	9	8 (89)
4	12	9	7 (78)
8	12	7	7 (100)

5.2.4 継代培養での BA による短枝からの不定芽形成

次に、不定芽誘導の実験を行った。BA 2.25 mg/l を含む 1/2 LP 培地と、0.5% の和光活性炭を含む 1/2 LP 培地で交互に継代培養中の短枝を植え継いで、新たに不定芽が生ずるかどうかを調べた (Table 25)。表に示すように平均 1 本、最大 4 本の不定芽が 1 本の短枝より生じた。これを 0.5% の活性炭を含む 1/2 LP 培地で培養するとシュートになった (Photo 11, 12)。これは、成木からの短枝においても BA 添加で増殖が可能であることを示している。

5.2.5 継代培養での各種培地のシュート生育への影響

Photo 12 に 1 例を示す継代によるシュートの生存率を調べた。継代培養中のシュートを 0.5% の和光活性炭を含む各種培地に移植して、生存率とシュートの伸長率を調べた (Table 26)。シュートの生存率では、1/2 GD 培地が優れていた。シュートの伸長率は 22 日間の短い間隔での動きのみしか調べなかったのではっきりしないが 1/2 LP 培地でのシュートの生育が止まっていた。ほかの培地でもはっきりした差は見られなかった。

5.2.6 継代培養での蔗糖濃度のシュート伸長への影響

継代中の培地でのシュートの伸長について蔗糖の影響を調べた。1/2 LP 培地に和光活性炭を 0.5% 入れた培地において蔗糖濃度を 3 段階にとり、シュートの伸長に対する差を比べたところ Table 27 のように、蔗糖濃度が 3% のときが最も伸長したが、5% の t 検定では処理間に有意差がなかった。蔗糖濃度が 4% では、2 か月後褐変したものがあり、浸透圧の影響が推察された。

Table 25. 継代培養における BA 含有培地で誘導される不定芽数
Number of induced adventitious buds on subculture

はじめのシュート数 No. of initial shoots	1 か月後の生存数(率) No. of surviving shoots after one month	不定芽数レンジ(平均) No. of adventitious buds range(average)	はじめのシュートの長さ Initial length of shoots (mm ±SD)	1 か月後のシュートの長さ Shoot length after 1 month culture (mm ±SD)	伸長比率 Ratio of shoot elongation
25	16 (64)	0-4 (1.1)	15.8±8.8	19.1±9.1	1.2

1/2 LP 培地 (BA 2.25 mg/l)
1/2 LP medium (BA 2.25 mg/l)

Table 26. 各種培地のシュート生育への影響
Effect of media on shoot elongation

培地 (5 g/l 活性炭含有 Media (containing activated charcoal, 5 g/l))	はじめのシュート本数 No. of initial shoots	26日後の生存数(%) No. of surviving shoots after 26 days (%)	26日後のシュートの長さ Shoot length after 26 days (mm ±SD) A	48日後のシュートの長さ Shoot length after 40 days (mm ±SD) B	シュート伸長率 (後半 22 日の培養での伸長比) Rate of shoot elongation (B/A)
1/2 WS	8	5 (63)	27.2±30.3	30.2±35.1	1.1
1/2 DCR	8	6 (75)	19.0±18.4	22.3±22.4	1.2
1/2 GD	7	6 (86)	28.8±21.7	31.7±23.5	1.1
1/2 LP	7	4 (57)	24.8±14.7	24.8±14.7	1.0

5.2.7 活性炭の銘柄の違いがシュートの生育に及ぼす影響

継代中の LP 基本培地に、W 社製と S 社製の活性炭をそれぞれ 0.5% 入れ、効果の差を調べたところ Table 28 に示すように、シュートの生存率では、S 社製が優れており、シュートに対する伸長効果では W 社製が良い傾向を示したが、5% の t 検定では有意差はなかった。一般に活性炭の生育促進効果は、成長阻害物質の吸着によるものといわれており、2 種の活性炭に吸着能力の差はないと推察された。

5.2.8 IBA 濃度がシュートの発根に及ぼす影響

IBA を 4 段階の濃度で加えた RIM 培地でシュートを 1 か月間培養した後、ホルモンを含まない 1/2 GD (DBM1) 培地に移植して 15 日経過した時の発根を調べた (Table 29)。Table に示すように、IBA 濃度が 1 mg/l の培地で培養したもので 1 本だけ発根したシュートがあったが、これも根の伸びは悪かった (Photo 13)。

5.3 考 察

クロマツの成木を材料として組織培養を行う上で最大の問題は、初代培養における効果的な殺菌法であると思われる。予備試験においてクロマツ冬芽を用いて、70% エタノール (0.5~3 分)、5% 次亜塩素酸ナトリウム (7~15 分)、30% 過酸化水素水 (10~20 分)、5% 過酸化水素水 (20~45 分)、1% サ

Table 27. 蔗糖濃度のシュート伸長に対する影響
Effect of sucrose concentration on shoot elongation

蔗糖濃度(%)	供試 シュート数	2か月後の 生存本数(%)	はじめての 長さ	2か月後の 長さ	伸長比
Concentration of sucrose (%)	No. of shoots	No. of surviving shoots after 2 months (%)	Initial length of shoots (mm±SD)	Shoot length after 2 months (mm±SD)	Rate of elongation (B/A)
			A	B	
2	5	5 (100)	15.0±6.2	21.4±10.2	1.4
3	9	9 (100)	13.6±12.6	23.1±10.3	1.7
4	9	7 (78)	13.0±7.7	16.6±5.1	1.3

5g/l 活性炭含有 1/2 LP 培地
1/2 LP medium containing 5g/l activated charcoal

Table 28. 活性炭の銘柄がシュートの生育に及ぼす差
Effect of brand of activated charcoal on shoot elongation

活性炭 製造元	供試 シュート 数	1か月後の 生存本数(%)	2か月後の 生存本数(%)	はじめての長さ (生存した物のみ)	2か月後の 長さ	シュート 伸長倍率
Makers of activated charcoal	No. of shoots	No. of surviving shoots after 1 month(%)	No. of surviving shoots after 2 months(%)	Initial shoot length (Ave. of surviving shoots) (mm±SD)	Shoot length after 2 months (mm±SD)	Rate of shoot elonga- tion
W 社	22	16 (73)	8 (36)	9.1±6.7	20.8±12.8	2.3
S 社	11	11 (100)	6 (55)	9.3±8.1	16.5±14.2	1.8

Table 29. IBA 濃度のシュート発根に対する効果
Effect of IBA concentration on rooting of shoot

IBA 濃度 IBA Concentration (mg/l)	供試シュート数 No. of shoots	1.5か月後の 生存数(%) No. of survi- ving shoot after 1.5 month (%)	1.5か月後の 発根シュート数(%) No. of rooting shoot after 1.5 month (%)
0	7	6 (86)	0 (0)
0.2	7	4 (57)	0 (0)
1	7	6 (86)	1 (17)
5	7	7 (100)	0 (0)

RIM 培地
RIM Medium

ラン粉 (15分), 3.5% サラン粉 (15分), 0.1 塩化第二水銀液 (3~10分) を組み合わせて様々な表面殺菌を行い, 除菌及び外植体の葉害の程度を調べたが, 葉害の全くない完全な除菌の条件は見い出せなかった。どのような材料からも効率よく無菌外植体を得られるような殺菌法の検討が今後必要になる。

本報告で用いた Table 22 の DCR, LP, SBK, SH, SSS, WS, M 培地のクロマツ初代培養での適, 不適については Table 23 に示すように, 得られた無菌シュートが少なかったので明確ではないが, WS, M, DCR, 1/2 LP がある程度用いることのできるものと思われる。胚起源の培養でシュートの伸長について効果のあった活性炭は, 成木由来のシュートでも効果があった。短枝からの新たな不定芽の分化は, BA を含んだ培地で見られた (Photo 11) が, 平均1本最大4本であり低い数であった。だが, 芽の伸長を速くできれば, 1か月おきにシュートが2倍になるわけで, 発根困難育種母材の増殖・研究用などのためのマイクロプロパゲーションへの応用の可能性を示すものといえよう。

ここでは, ザイセンチュウ接種検定済のザイセンチュウ抵抗性個体成木からの組織培養による増殖における各種培養条件の検索を行った。成木の場合, 外植体としては心止めを行い誘導した短枝が最も適していた。BA を含有した WS, DCR, 1/2 LP 培地を用いて, 短枝から不定芽を分化させて増殖する方法が今のところ, 最も可能性がある。成木からの組織培養技術の開発には, 安定的な外植体の滅菌法や不定芽数とシュートからの発根率の向上に向けての研究が今後必要である。

6 ま と め

主要造林樹種のなかで, スギは挿し木増殖が比較的容易であり, クローン造林が伝統的に行われてきた。そこで, 我が国のもう一方の主要造林樹種であるヒノキと海岸林の造成に欠かせないクロマツについて組織培養技術の活用による育種母材の作出やマイクロプロパゲーションの可能性を検討した。

ヒノキ, マツとも胚や芽生えなどの幼若な材料は, 不定芽の形成や発根において優れており, マイクロプロパゲーションの基礎技術は容易に適用できた。なお, ヒノキとクロマツを比較すると, ヒノキの方が組織培養の対照としては増殖率の面などで優れ, より利用しやすい材料であることが分かった。

ヒノキの芽生えからの増殖では、CD 基本培地を用い、植物調節物質の BA や NAA の添加により、初代培養において、1本の芽生えから平均8本の不定シュートを得ることができた。しかも、この不定シュートは再度不定芽誘導用の培地に継代することにより、1本のシュートから平均18本の不定シュートの誘導ができたので、一つのシュートから平均約150本の新たなシュートを増殖することが可能である。また、継代数を増やすことにより、さらに増殖数をあげることができる。

オーキシンの IBA と NAA を添加した CD 基本培地で培養することにより、これらのシュートから70%の発根率で植物体を再生できた。これらの植物体は、パーライト又はパーミキュライト培地で鉢出しして、水を含ませたろ紙で1か月間覆うことにより順化できた。このようにして、ヒノキの芽生えからの増殖では、18か月で、1本の芽生えから平均100本、最大500本の植物体を得た。ヒノキは採種園における種子の生産が年によって安定せず、ジベレリン処理等による花芽分化の調節もスギに比較すると難しい。そこで、限られた数の採種園産の種子をもとに、普通では1種子から1本の苗木しか得られないところを、この芽生えからの組織培養の技術を用いると100本以上の種苗が得られることとなり、経済性の問題が解決されれば優良種苗の大量増殖に応用できる。そのためには、培養作業の機械化や人工種子の作出へ向けた研究が必要である。また、細胞・組織選抜による耐病性の個体の作出などの研究にこの培養技術はすぐに応用できる。

ヒノキ成木からの組織培養による増殖では CD 基本培地を用いて、当年生葉条の先端部を外植体とすることにより個体を再生することに成功した。芽生えからの場合に比較して、発根率が平均30%と低かった。1葉条片より14~21本の不定シュートが得られたが、発根率が低いので1葉条片より2年間の長期培養で4~6本の再生植物体を得られたにすぎない。だが芽生えの場合と異なり、1本の成木から当年生葉条片は何千本という極めて多く採取できるから、1葉条片当たりの再生個体数が少なくても、十分にクローン増殖の方法として利用できるであろう。成木からの増殖の場合は、検定済の個体や、耐瘠地性等で選抜された個体を材料として直接利用できる利点がある。現在進行中の気象害抵抗性育種事業の中で、あるいは将来、耐乾性、耐陰性個体を選抜したあとでの、採種園造成や、抵抗性個体の増殖による普及の段階において大いに役に立つ手法であると思われる。

クロマツの成熟胚からの組織培養において、各種類の培地をスクリーニングしたところ、初代培養においては BA 含有の WS 培地が、継代培養においては活性炭を添加した半分濃度の LP 培地が増殖されたシュートからの発根には IBA を添加した SBK 培地や RIM 培地が適していた。このように各生育段階において基本培地を変えることで、クロマツ成熟胚1個より8か月で、平均9~13.5(最大31)本の不定シュートが得られた。しかし、発根率は低い上に個体差が大きかった(0~56%, 平均25%)ので、結局1年間の培養で一つの成熟胚より得られた再生個体は0~10本であった。この低い増殖率を改善するには、継代培養期間中に短期間 BA 添加培地での培養を挟む、サイトカイニンパルス処理や伸長葉束下に葉束芽を誘導して再増殖を図る方法が有効であることが分かった。

クロマツの6~7年生木からの外植体の組織培養は、初代培養において試みた殺菌方法では完璧なものは見い出せなかったが、0.1% 塩化ベンザルコニウム水溶液で30分、70% エタノール液で3分、5% 過酸化水素水で20分間殺菌後クリーンベンチ内で風乾する方法で、1か月後の生存率が50% 前後あり、

ある程度有効であった。

採取した冬芽や葉束については試みた培養条件では生育せず、外植体としては不適當であることが分かった。5月に緑摘みを行い7月に誘導された短枝が、初代培養の材料として最も適していた。BAを2.25 mg/l 含む半分の濃度のLP培地で継代培養することにより、平均1本、最高4本の新たな不定シュートが得られた。また、増殖されたシュートの伸長には活性炭を添加した半分の濃度のLP培地が適していた。

シュートからの発根は、胚起源の増殖によるシュートよりも、さらに難しかったが、IBAを添加したRIM培地で発根したものがあつた。

このように、クロマツの成木を材料にするには、今後より一層、供試材料や培養条件を検索しなければならない。シュートの増殖については、BA添加培地で少なくとも1か月に2倍になることが判明したので、今後マツノザイセンチュウ抵抗性個体等の増殖には、シュートからの発根条件を明らかにすることが急務である。これらの条件が確立すれば成木からの場合も十分、組織培養による育種母材の作出が可能であると推察される。

謝 辞

本研究を行うに当たり終始ご指導ご助言をいただいた、森林総合研究所前遺伝科長齋藤 明博士(現九州大学農学部教授)、同前生物工学科組織培養研究室長佐藤 亨博士に対し深く感謝する。また、本稿のご校閲を賜った森林総合研究所生物機能開発部長三上 進博士、同生物工学科長森 徳典博士に対して深く感謝する。さらに、精英樹種子を提供して下さった関東林木育種場(現林木育種センター)の諸氏に対して深く感謝する。本研究の取りまとめに際して終始懇切なご指導をいただき、本稿の校閲を賜った東京大学農学部名誉教授善本知孝博士に厚くお礼申し上げる。

そして、元三重県林業技術センターの滝尻富士雄氏、広島県林業試験場の吉岡 寿氏、愛媛県林業試験場の森 格良氏らの実験への協力に対して深謝する。

引用文献

- ABDULLAH, A.A. *et al.*: Micropropagation of mature Calabrian pine (*Pinus brutia* TEN.) from fascicular buds. *Tree Physiology*, **3**, 123-136 (1987)
- ABO El-Nil, M.M. and MILTON, W.: Method for asexual reproduction of coniferous trees. United States Patent No. 4353186 (1982)
- AHUJA, M.R.: *In vitro* propagation of poplar and aspen. In "Cell and Tissue Culture in Forestry" Vol. **3**. (Eds. BONGA, J.M. *et al.*). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 207-223 (1987)
- 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., London, New York, San Francisco, 82-95 (1984)
- 天野孝之・酒谷昌孝: ヒノキの葉条培養による増殖. 奈良県林試研報, **16**, 31~33 (1986)
- BAJAJ, Y.P.S.: Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass

- energy production. In "Trees I (Biotechnology in agriculture and forestry 1)" (Ed. BAJAJ, Y.P.S.), Springer-Verlag, Berlin, 1-23 (1986)
- BOULAY, M.: *In vitro* propagation of tree species. In "Plant Tissue and Cell Culture" (Eds. GREEN C.E. *et al.*), Alan R. Liss, Inc., New York, 367-382 (1987 a)
- : Conifer micropropagation: Applied research and commercial aspects. In "Cell and Tissue Culture in Forestry" Vol. 3. (Eds. BONGA, J.M. *et al.*), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 185-206 (1987 b)
- CAMPBELL, R.A. and DURZAN, D.J.: Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. *Can.J. Bot.*, **53**, 1652-1657 (1975)
- DAVID, A. and DAVID, H.: Manifestations de diverses potentialites organogenes d'organes ou de fragments d'organes de Pin maritime (*Pinus pinaster* SOL.) en culture *in vitro*. *CR Acad. Sci. Serie D*, **248**, 627-630 (1977)
- DAVID, H. *et al.*: Obtention de plants de Pin maritime (*Pinus pinaster* SOL.) a partir de brachyblasts ou d'apex caulinaires de tres jeunes sujets cultives in vitro. *CR Acad. Sci. Serie D*, **287**, 245-248 (1978)
- DURAND-CRESSWELL, R. *et al.*: Vegetative propagation of eucalyptus. In "Tissue culture in Forestry" (Eds. BONGA, J.M. and DURZAN, D.J.), Martinus Nijhoff/DR. W. Junk Publishers, Dordrecht, 256-324 (1982)
- GRESSHOFF, P.M. and DOY, C.H.: Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta*, **107**, 161-170 (1972)
- GUPTA, P.K. and DURZAN, D.J.: Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, **4**, 177-179 (1985)
- HORGAN, K.: Micropropagation of mature radiata pine. Abstracts of 3rd meet. of international conifer tissue culture work group. p. 13 (1985)
- : *Pinus radiata*, In "Cell and Tissue Culture in Forestry, vol. 3 (Eds. BONGA, J.M. and DURZAN, D.J.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 128-145 (1987)
- 藤本吉幸: マツノサイセンチュウ抵抗性育種の体系化と技術開発. 林木の育種, **144**, 1~3 (1987)
- IDE, Y. and YAMAMOTO, S.: Adventitious root formation on *in vitro* micro cutting of Hinoki. *J. Jpn. For. Soc.*, **68**, 296-298 (1986 a)
- 井出雄二・山本茂弘: ヒノキの試験管内微小サシキにおける小枝葉の伸長. 97 回日林論, 443~444 (1986 b)
- ISHII, K.: *In vitro* plantlet formation from adventitious buds on juvenile seedlings of Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **7**, 247-255 (1986)
- 石井克明: クロマツ成熟胚からの組織培養による植物体の形成. 日林誌, **70**, 278~282 (1988)
- ほか: ヒノキ成木よりの組織培養による個体の増殖. 100 回日林論, 523~524 (1989)
- KIM, J.H. *et al.*: Mass clonal propagation of *Pinus rigida* × *P. taeda* F₁ by embryo culture. *Research Report of Inst. of Forest Genetics (Korea)*, **18**, 74-79 (1982)
- MASCARENHAS, A.F. *et al.*: Teak. In "Cell and Tissue Culture in Forestry" **3**. 300-315, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht., 300-315 (1987)
- MEHRA-PALTA, A. *et al.*: Hormonal control of induced organogenesis: Experiments

- with excised plants of loblolly pine. *Tappi*, **61**, 37-40 (1978)
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, **15**, 473-497 (1962)
- 農林水産省農林水産技術会議：遺伝子工学の現状と未来-アメリカ合衆国議会特別調査，家の光協会，東京，496～499 (1982)
- REILY, K. and WASHER, J. : Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture. *N.Z.J. For. Sci.*, **7**, 199-206 (1981)
- 斎藤 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”，創文，東京，51～114 (1987)
- 佐藤 亨：スギ・クロマツの胚培養に用いる培地の探索，日林誌，**60**，81～86 (1978)
- SCHENK, R.U. and HILDEBRANDT, A.C. : Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.*, **50**, 199-202 (1972)
- SHIM, S.Y. *et al.* : Micropropagation of *Pinus densiflora* S. et Z. by embryo and needle fascicle culture. *New Frontiers in Breeding Researches, Proceeding of the Fifth International Congress Society for the Advancement of Breeding Research in Asia and Oceania (SABRAO)*., 137-145 (1986)
- SOMMER, H.E. *et al.* : Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* MILL.) tissue culture *in vitro*. *Bot. Gaz.*, **136**, 196-200 (1975)
- STEINHART, C.E. *et al.* : Nutrient requirements for *In vitro* growth of spruce tissue. *Am. J. Bot.*, **48**, 465-472 (1961)
- VERMA, D.C. *et al.* : Media development for cell suspension of conifers. In “Plant Tissue Culture 1982” (Ed. FUJIWARA, A.) Maruzen, Tokyo, 59-60 (1982)
- WHITE, P.R. : Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth*, **7**, 53-65 (1943)
- WOLTER, K.E. and SKOOG, F. : Nutrient requirements of *Fraxinus* callus cultures. *Am. J. Bot.*, **53**, 236-269 (1966)
- 山口隆司ほか：不定根の形成に及ぼす種々のレクチンの影響，第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集，p. 144 (1987)

Screening of Tissue Culture Conditions of Hinoki Cypress and Japanese Black Pine

ISHII, Katsuaki⁽¹⁾

Summary

For micropropagation application, two of the most important Japanese silvicultural species, Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) and Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) were selected as source trees for tissue culture study. Regeneration from both young and adult explants was successfully achieved. The results obtained are summarized as follows.

1. Micropropagation of *Chamaecyparis obtusa* was possible from germinated juvenile seedling using the following methods. CAMPBELL and DURZAN's medium (CD) containing 2.25 mg/l BAP and 0.005 mg/l NAA was good for adventitious bud induction. CD medium containing 0.005 mg/l NAA was good for shoot elongation. Over 70% rooting was achieved in the CD medium containing 3 mg/l IBA, 0.1 mg/l NAA and 1 mg/l riboflavin. *In vitro* propagated plantlets were transplanted to the pots covered with wet filter paper and habituated successfully.

2. *In vitro* plantlet regeneration from adult *Chamaecyparis obtusa* was successful using the same medium and the same combinations of plant growth regulators as juvenile material. However the rooting percentage of the shoots was lower than 30%.

3. Micropropagation from mature embryos of *Pinus thunbergii* was developed. For initial adventitious buds induction, WOLTER and SKOOG's medium with 3 mg/l BA was the best. For elongation of shoots a half strength of Lepoivre medium (LP) containing 5 g/l activated charcoal (AC) was the best. Rooting percentage was 0-50% on the Root Induction Medium of Abo El-Nil (RIM) and there were big clonal differences in rooting percentages.

4. *In vitro* plantlet regeneration from 6-7 years old *Pinus thunbergii* which were selected as resistant clones using pine wood nematode inoculation test was tried. Induced brachyblast buds obtained by topping the trees were the best for explants and the half-strength LP medium containing 2.25 mg/l BA was used for subculture, half-strength of LP medium containing 5 g/l AC for shoot elongation and RIM for rooting.

Received October 29, 1992

(1) Bio-resources Technology Division

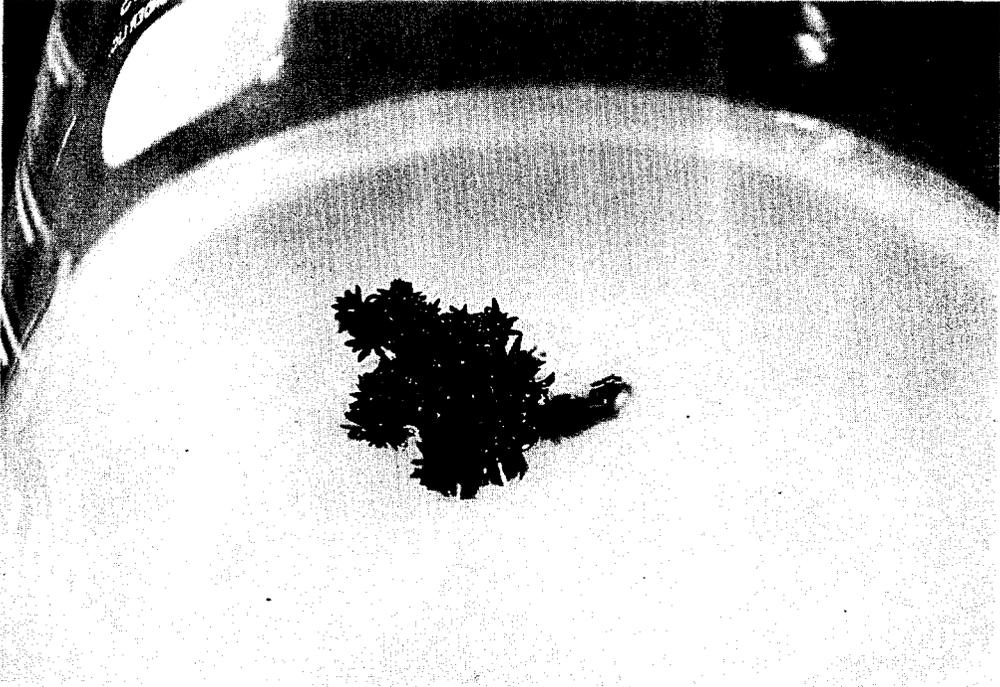


Photo 1. 芽生えに形成された不定芽
Adventitious buds formed on juvenile seedlings



Photo 2. 芽のシュートへの伸長
Elongation of buds to shoots



Photo 3. 継代培養されたシュートから形成された2次的な不定芽
Second phase adventitious buds formation from subcultured shoots

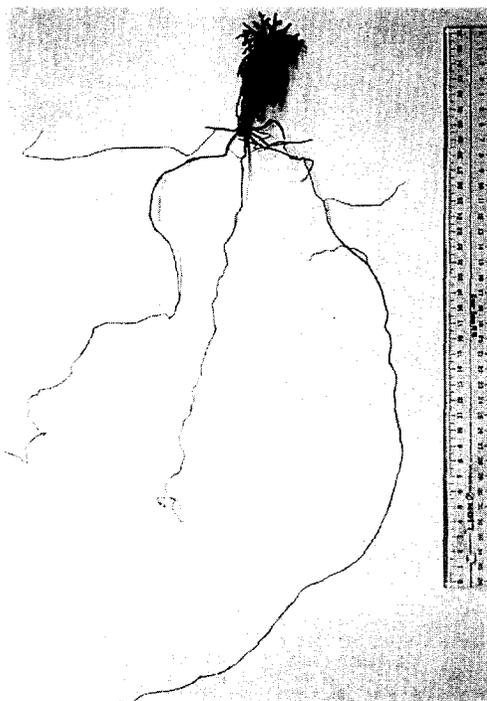


Photo 4. シュートからの発根 (物差しは 36 cm 長)
Roots development from shoot (with a 36 cm long rule alongside)



Photo 5. 鉢出し1年後の培養苗
Regenerated plantlets of *C. obtusa* after one year



Photo 6. ヒノキ成木より再生された個体
Regenerated plantlets from adult Hinoki cypress

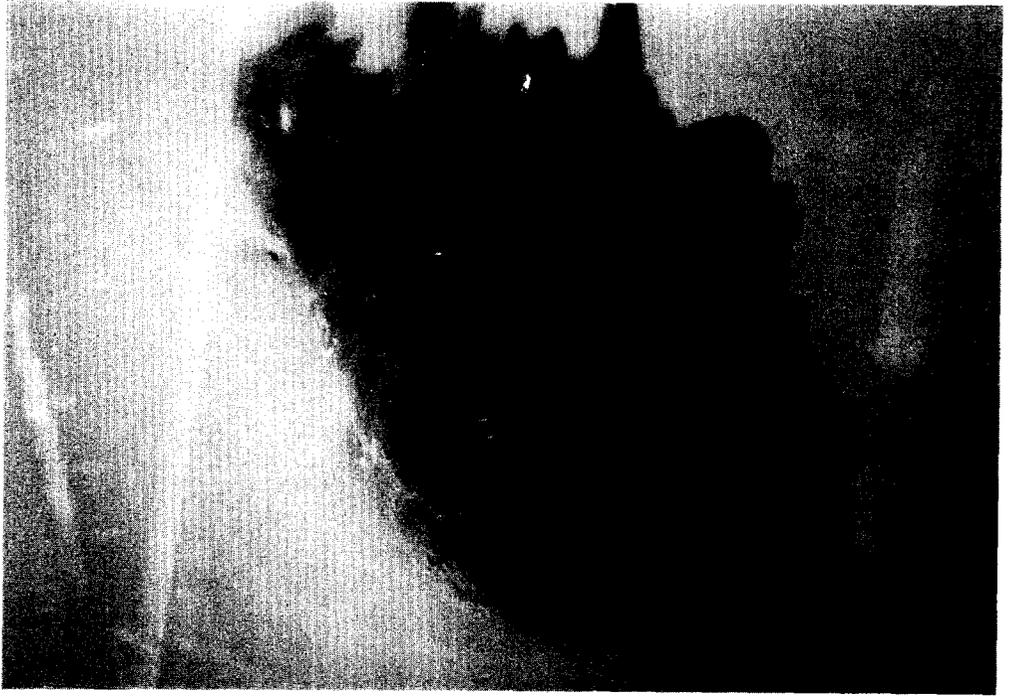


Photo 7. 培養1か月後、成熟胚の胚軸と子葉に形成された多くの不定芽
Multiple bud formation on cotyledon-hypocotyl of a mature embryo after one month

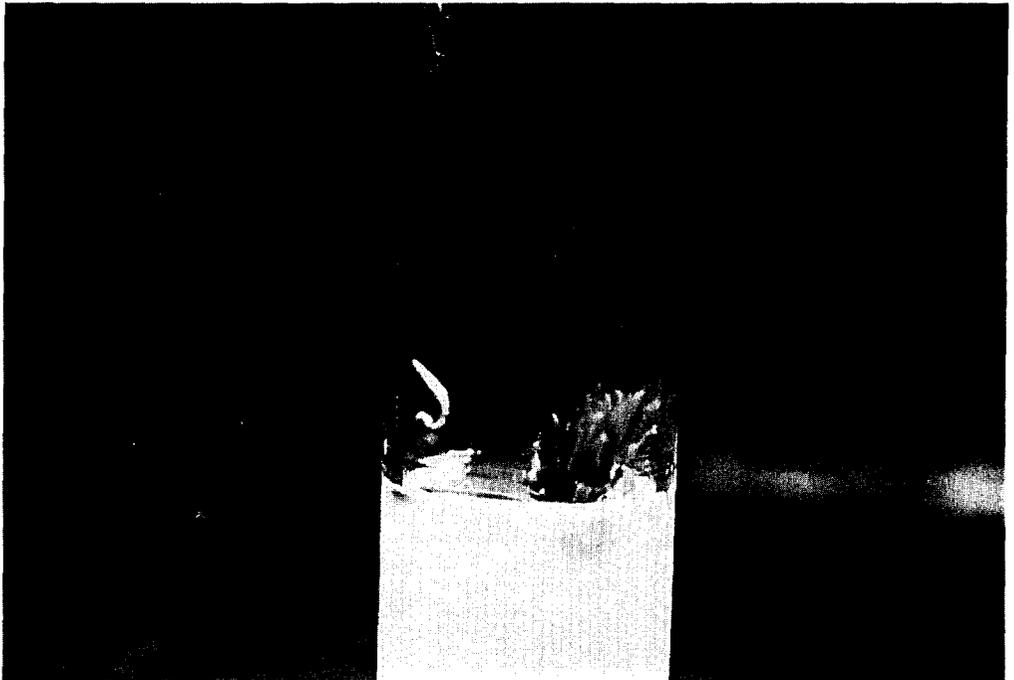


Photo 8. 再生個体の葉束下からの新たな芽の誘導
Induction of buds from brachyblast cultured *in vitro*



Photo 9. クロマツの不定シュートよりの発根
Rooting from adventitious shoots of *P. thunbergii*



Photo 10. 順化鉢だし1年後のクロマツの培養苗
In vitro propagated *P. thunbergii* 1 year after habituation

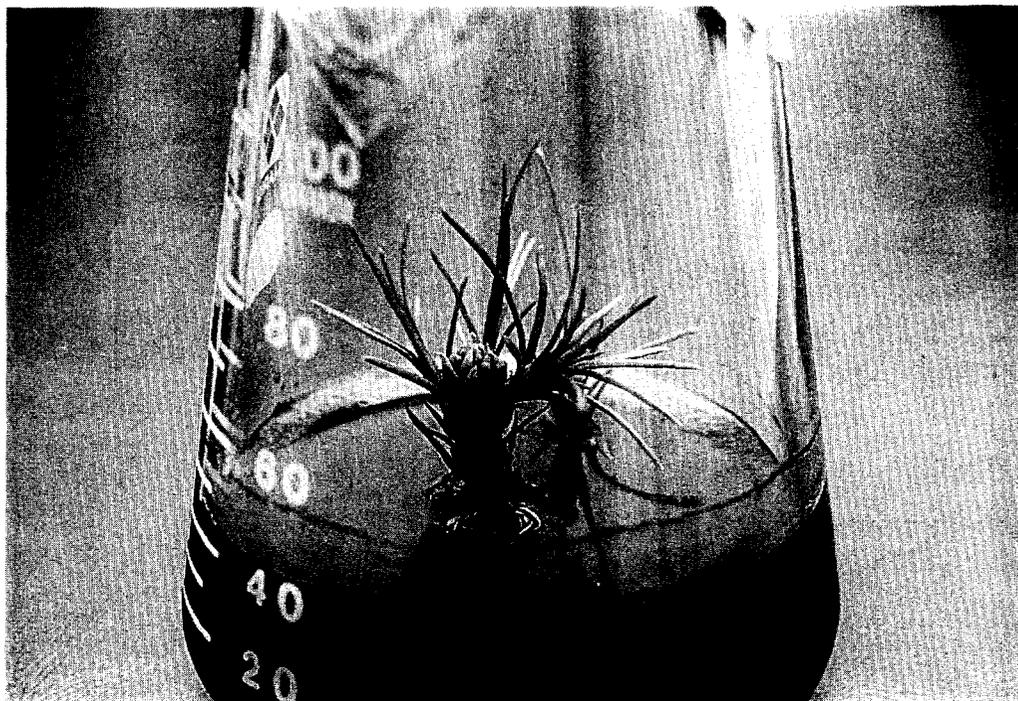


Photo 11. 短枝から新たなシュートの形成
Formation of new shoots from brachyblast



Photo 12. クロマツ成木の短枝より増殖されたシュート
Shoot propagation from brachyblast of adult *P. thunbergii*

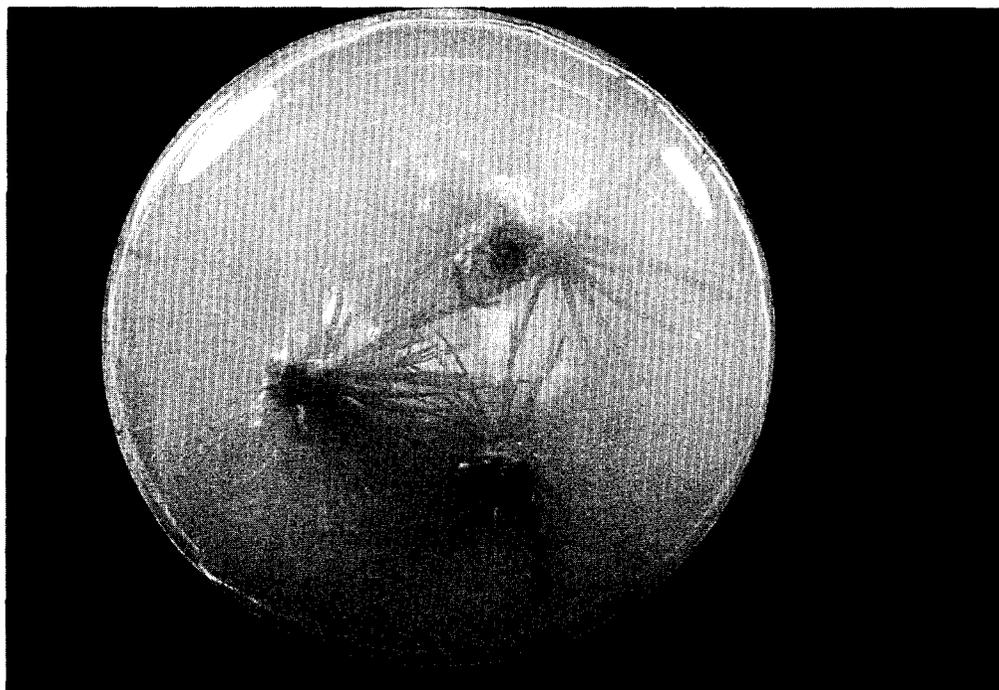


Photo 13. クロマツ成木より増殖されたシュートからの発根
Rooting of shoot propagated from adult *P. thunbergii*