

## ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* L.) の無菌発芽法

邢 朝 斌\*<sup>1, \*2</sup>・沈 海 龍\*<sup>2</sup>・井出雄二\*<sup>1</sup>

### A Method for Aseptic Germination of *Fraxinus mandshurica* L.

Zhaobin XING\*<sup>1, \*2</sup>, Hailong SHEN\*<sup>2</sup> and Yuji IDE\*<sup>1</sup>

#### I. は じ め に

ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica* L.) は、中国東北部、日本の北海道および本州、朝鮮半島、沿海州などに広く分布するモクセイ科の落葉広葉樹である (能城, 1994)。成長が早く材質が良いため、家具材や装飾材として用いられ、特に、中国東北部では重要な人工造林樹種となっている (中国樹木誌編委会, 1978)。

しかし、ヤチダモ種子は著しい発芽遅延を示し (浅川, 1956)、完熟した乾燥種子を播種した場合、ほとんどの種子は発芽に2年を要するため、苗畑では高温処理と低温湿層処理を組み合わせた発芽促進処理が不可欠とされている (浅川, 1963)。また、この方法により十分な発芽率を得るためにはおよそ4ヶ月の処理期間を要することから、育苗上の問題となっている。

一方、トネリコ属樹木では、*Fraxinus pennsylvanica* で、GA<sub>3</sub> (gibberellic acid) 水溶液や BAP (6-benzylaminopurine) 水溶液への浸漬による著しい発芽促進が報告されている (TINUS, 1982)。しかし、トネリコ属樹木の種子は大きく3種類にタイプ分けされ、ヤチダモは結実時に胚が十分に発達していないグループに、*F. pennsylvanica* は胚の発達が中庸であるグループに属し、それぞれ発芽特性が異なることから (浅川, 1956)、ヤチダモの発芽における植物ホルモンの働きは他のグループに属する樹種とは異なる可能性もあり、植物ホルモンの適用による本種の発芽促進は、独自に検討する必要がある。

ところで筆者らは、ヤチダモの育種に必要な技術の一つとして、組織培養による増殖法の開発を進めている。そのための外植体として無菌発芽させた芽生えの組織の利用が有効であると考えられるが、本種の植物ホルモン処理による発芽促進についてはこれまで報告が無く、効率的に無菌芽生えを得る方法は未確立である。一方、PREECE *et al.* (1995) は、トネリコ属樹木 *Fraxinus americana* の *in vitro* での発芽において、種子の子葉側の端から1/3程度を切断除去して胚乳を露出させ植物ホルモンを添加した培地上で培養することにより、容易に芽生えを取得する方法を開発した。そこで、ヤチダモに対してこの方法を適用して、無菌芽生えを効率的に取得するための種子の処理法および培地条件について検討した。

なお本研究の一部は、中国国家自然科学基金項目 (30170772) によった。

\*<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科生圏システム学専攻

\*<sup>1</sup> Department of Ecosystem Studies, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

\*<sup>2</sup> 東北林業大学森林資源と環境学院

\*<sup>2</sup> Faculty of Forest Resources and Environment, Northeast Forestry University, China

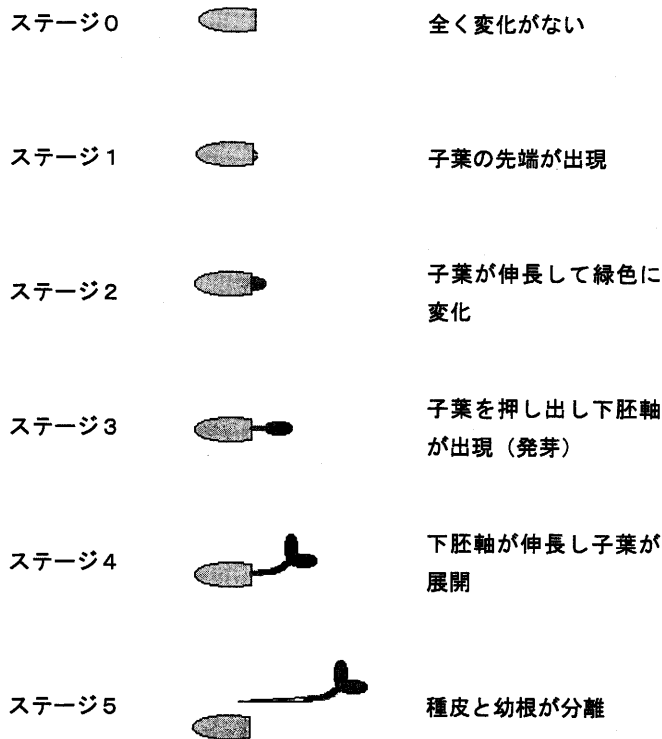


図-1 種子の一部を切断除去したヤチダモ種子の無菌発芽過程  
 Fig. 1. Course of aseptic germination of cut seed of *Fraxinus mandshurica*.

### 材料と方法

中国東北林業大学帽児山林場構内の約50年生、樹高15mのヤチダモから、2000年11月上旬に成熟種子を採取し十分乾燥させた後、実験に使用するまで5℃で貯蔵した。

種子を10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液中に30分間浸漬した後、滅菌水で3回洗浄した。洗浄した種子は、滅菌水中に24時間静置して十分吸水させた後、果皮を取り除いた。以下、PREECE *et al.* (1995)の方法に準じて、目印のために子葉側の端から約2mmのところをメスで切断し、さらに、10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液中に種子を30分間浸漬し滅菌水で5回洗浄後、種子の切断してあった側の端を種子の全長の1/3程度の部分で再度切断し取り除いた後、培地上に水平に置いた。また、同時に全く切断しない種子についても同様の表面殺菌を行い果皮を取り除いた状態で培地に置いた。

また、発芽した芽生えの一部は、幼根が種子から出現した時期に、子葉節を下胚軸の一部とともに切り取って、発芽に用いたものと同じ組成の培地にさしつけ、経過を観察した。

基本培地として、MS培地 (Murashige and Skoog, 1962) とMS培地の主要塩類 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) の濃度を半分にした1/2MS培地に寒天7g/lを加えたものを用いた。それらに、BAPを0, 1.0, 5.0, 10.0 mg/lの4種類の濃度で添加し、さらに、それぞれショ糖の濃度を0, 15, 30 g/lとした、合計24種類の培地を用意した。培地は25 mm×150 mmの培養試験管に約10 mlずつ分注し、1試験管あたり1個の種子を置床した。また、各培地に対して

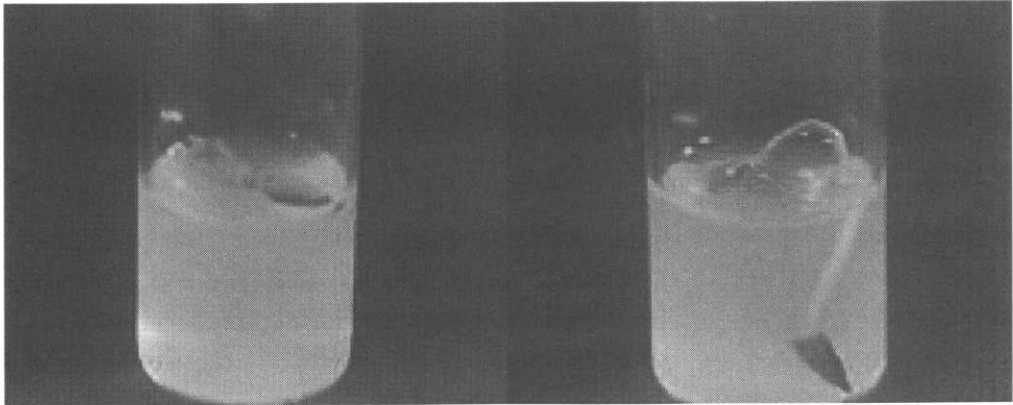


図-2 ヤチダモの無菌発芽

Fig. 2. *In vitro* germination of *Fraxinus mandshurica*.

左: 図-1のステージ3に相当, 右: ステージ5に相当

Left is at stage 3 and right is at stage 5 in Fig. 1 respectively.

20個の種子を供試した。

培養は、約 3,000 lux, 16 時間日長の蛍光灯照明下, 25±2°C で行った。

なお、結果の統計解析には SPSS ver. 11.0.1 J (SPSS Co.) を用いた。

## 結 果

図-1 に切断種子の発芽過程を模式的に示す。幼根が出現した後子葉が展開する正常な発芽と異なり、培養開始から 1 週間後には種子の切断箇所から子葉の先端が現れてきた (ステージ 1)。その後、子葉は伸長を続けるとともに緑色に変化した (ステージ 2)。さらに、培養 2 週間後には、下胚軸が子葉を種子から押し出し、下胚軸自身も種子から伸出するものが多数見られた (ステージ 3, 図-2)。切断種子については、この下胚軸が現れた時点を以って種子の発芽とした。

表-1 に培養開始から 14 日, 21 日, 38 日後の切断種子の発芽率を各処理区ごとに示した。また、培養期間ごとに、基本培地の種類, BAP および糖の添加濃度間の差について分散分析を行った (表-2)。

なお、切断処理を施さなかったインタクトな種子では、観察期間中まったく発芽は認められなかった。また、切断種子全体では、14 日後には 29.6%, 21 日後には 51.1%, 38 日後には 65.3% の種子が発芽した。なお、未発芽種子を切断して胚の有無を確認したところ、いずれも胚は存在したが褐変していた。

BAP 5 mg/l とショ糖 15 g/l を組み合わせた処理では、MS, 1/2 MS いずれの場合でも 14 日後には約 70% の発芽率を示した。また、21 日後に 70% 以上の発芽率を示した処理区は 24 処理区中 9 処理区で、いずれも BAP を添加した処理区であった。また、21 日後から 38 日後に新たに発芽率が 70% 以上に達したものが 3 処理区あったが、これも BAP を添加した処理区であった。38 日後の BAP 添加培地における MS と 1/2 MS をあわせた発芽率の平均は 75.0% であったのに対し、無添加の場合は 36.3% とほぼ半分であった。

分散分析の結果から、各培養期間において BAP 濃度間に有意な差が認められており、また、

表-1 培養期間別、処理別の発芽率  
Table 1. Germination percent at different periods of culture and on different medium.

培養期間	培地	ショ糖 (g/l)	BAP (mg/l)				平均
			0	1	5	10	
14 日	MS	0	5.0	60.0	26.3	10.5	25.5
		15	15.8	47.4	73.7	21.1	39.5
		30	10.0	22.2	21.1	42.1	23.9
		平均	10.3	43.2	40.4	24.6	29.6
	1/2MS	0	0.0	10.0	63.2	25.0	24.6
		15	10.0	52.6	68.4	42.1	43.3
		30	0.0	5.0	21.1	57.9	21.0
		平均	3.3	22.5	50.9	41.7	29.6
	全体	0	2.5	35.0	44.8	17.8	24.6
		15	12.9	50.0	71.1	31.6	41.4
		30	5.0	13.6	21.1	50.0	22.4
		平均	6.8a	32.9b	45.6b	33.1b	29.6
21 日	MS	0	20.0	73.7	47.4	31.6	43.2
		15	26.3	76.5	84.2	44.2	57.8
		30	15.0	77.8	57.8	68.4	54.8
		平均	20.4	76.0	63.1	48.1	51.9
	1/2MS	0	30.0	36.8	89.5	31.6	47.0
		15	35.0	87.2	84.2	72.2	69.7
		30	0.0	15.0	42.1	79.0	34.0
		平均	21.7	46.3	71.9	60.9	50.2
	全体	0	25.0	55.3	68.5	31.6	45.1
		15	30.7	81.9	84.2	58.2	63.7
		30	7.5	46.4	50.0	73.7	44.4
		平均	21.1a	61.2b	67.5b	54.5b	51.1
38 日	MS	0	36.8	88.9	52.6	50.0	57.1
		15	50.0	86.7	94.7	64.7	74.0
		30	20.0	88.9	79.0	68.4	64.1
		平均	35.6	88.2	75.4	61.0	65.1
	1/2MS	0	50.0	50.0	89.5	76.5	66.5
		15	45.0	89.5	89.5	88.2	78.1
		30	15.8	40.0	73.7	79.0	52.1
		平均	36.9	59.8	84.2	81.2	65.6
	全体	0	43.4	69.5	71.1	63.3	61.8
		15	47.5	88.1	92.1	76.5	76.0
		30	17.9	64.5	76.4	73.7	58.1
		平均	36.3a	74.0b	79.8b	71.1b	65.3

表中のアルファベットは Duncan 法によるグループ分け (5%水準) を示す。

表-2 発芽率に対する分散分析表  
Table 2. Analysis of variance for germination rate.

培養期間	要因	自由度	平方和	平均平方	F
14 日	ショ糖	2	1692.686	846.343	2.420
	BAP	3	4799.675	1599.892	4.576*
	培地	1	0	0	0
	誤差	17	5944.169	349.657	
	全体	23	12436.530		
21 日	ショ糖	2	1925.957	962.979	2.225
	BAP	3	7715.695	2571.898	5.942**
	培地	1	17.170	17.170	0.040
	誤差	17	7358.334	432.843	
	全体	23	17017.156		
38 日	ショ糖	2	1435.771	717.885	2.810
	BAP	3	6983.218	2327.739	9.112**
	培地	1	1.500	1.500	0.006
	誤差	17	4342.849	255.462	
	全体	23	12763.388		

\* 5%水準で有意, \*\* 1%水準で有意

表-3 種子の培養開始から 21 日後の発芽個体の平均子葉長  
Table 3. Mean length of cotyledon of germinated seedlings after 21 days of inoculation.  
(mm±S.D.)

培地	ショ糖 (g/l)	BAP (mg/l)				平均
		0	1	5	10	
MS	0	5.3±1.7	9.4± 3.3	9.0±3.9	8.5±3.7	8.6±3.5
	15	14.0±1.2	19.4± 7.3	26.9±4.7	20.3±5.1	21.8±6.9
	30	17.7±0.6	29.4± 9.8	17.4±6.0	20.4±7.3	22.5±9.1
	平均	12.0±5.3	19.4±11.0	19.5±8.8	17.7±7.7	18.3±9.3
1/2 MS	0	8.7±3.8	12.7± 3.9	14.7±4.8	11.8±1.2	12.7±4.4
	15	11.1±3.5	18.0± 4.1	18.6±6.2	17.9±8.9	17.2±6.5
	30	—	22.7± 4.9	17.9±6.9	16.7±5.5	17.8±6.0
	平均	10.0±3.7	17.1± 5.0	17.0±6.0	16.3±6.8	16.0±6.2
全体	0	7.0	11.1	11.9	10.2	10.0a
	15	12.6	18.7	22.8	19.1	18.3b
	30	16.8	26.1	17.7	18.6	19.8b
	平均	12.1a	18.6b	17.4b	15.9b	16.0

表中のアルファベットは Duncan 法によるグループ分け (5% 水準) を示す。

DUNCAN 法による比較では、BAP 無添加区と添加区の間に明らかな差が認められた。

ショ糖の濃度別で見ると、いずれの培養期間においても、15 g/l を添加した場合に無添加あるいは 30 g/l 添加に比べて発芽率の平均値は高かったが、分散分析の結果ではショ糖濃度間に有意な差は認められなかった。

表-4 培養 21 日後の子葉長に対する分散分析表  
Table 4. Analysis of variance for cotyledonal length after 21 days culture.

要因	自由度	平方和	平均平方	F
ショ糖	2	419.072	209.536	16.690**
BAP	3	129.544	43.181	3.440*
培地	1	5.387	5.387	0.429
誤差	16	200.870	12.554	
全体	22	790.799		

\* 5%水準で有意, \*\* 1%水準で有意

表-5 無菌発芽した芽生えの子葉節からの発根  
Table 5. Rooting from excised cotyledonal nodes of *in vitro* germinated seedlings.  
(発根数・さしつけ数)

培地	ショ糖 (g/l)	BAP (mg/l)			
		0	1	5	10
MS	0	0/3	0/5	0/4	—
	15	3/4	3/4	1/4	0/3
	30	1/4	1/4	0/4	0/4
1/2 MS	0	3/4	2/4	0/4	0/4
	15	4/4	2/4	1/4	0/4
	30	4/4	2/3	1/4	0/10

種子の培養開始から 53 日後

また、基本培地については、全体の平均発芽率は MS, 1/2 MS それぞれ、14 日後では 29.6% と 29.6%, 21 日後では 51.9% と 50.2%, 38 日後では 65.1% と 65.6% で、いずれも両者の間には大きな差が見られず、分散分析でも差が認められなかった。

培養開始から 21 日後の処理区ごとの子葉長を表-3 に示す。これについての分散分析を行った結果 (表-4)、培地間には有意差が認められなかったが、糖および BAP の濃度の間には有意差が認められた。また、DUNCAN 法による比較では、BAP の添加区と無添加区の子葉長の有意な差が認められ、あきらかに添加区での値が大きかった。

形態的な観察では、BAP を添加しない培地では子葉の緑色が薄い傾向にあった。一方、BAP 濃度が高い培地では子葉の緑色はより濃く子葉も長い傾向にあったが、BAP 10 mg/l を添加した場合には一部の芽生えで子葉の奇形が観察された。

また、ショ糖無添加の培地では添加した場合に比べて子葉が DUNCAN 法で比較した場合有意に短かった。また、BAP を添加したショ糖無添加の培地では、どの BAP 濃度でも子葉色が黄色を示した。さらに、発芽後、そのまま培地上に置いた芽生えのうち、ショ糖を添加した培地で発芽したものは正常に生育したが、ショ糖を添加しなかった培地で発芽したものはやがて枯死していった。

切り取って培養した子葉節は、移植後 1 週間程度で発根するものが見られた。移植 3 週間後の発根状況を表-5 に示す。発根率はホルモン無添加で最も高く、BAP 添加量が増加するにしたがって低くなり、10 mg/l では全く発根が見られなかった。

## 考 察

本研究では、インタクトな種子と切断種子を同じ培地で培養したにも関わらず、インタクトな種子では、培養期間内の発芽は全く見られなかった。一方、切断種子では通常とは異なるものの、発芽して芽生えを得ることが出来た。従って、切断種子の培養はヤチダモの無菌発芽に有効であることが示された。

切断したヤチダモ種子の発芽は、種子の切断箇所からの子葉の出現という形で起こった。これは *F. americana* の切断種子の発芽過程 (PREECE *et al.*, 1995) とまったく同様である。しかし、*F. americana* の場合ホルモンを添加しなかった培地においても、播種後 2 週間以内に 90% 以上の発芽率に達していたが (PREECE *et al.*, 1995)、ヤチダモのホルモン無添加の培地における発芽率は、培養開始から 38 日目においても最大 50% であった。両研究における発芽の基準はほぼ同様とみなせるので、ヤチダモは著しく発芽率が低いといえる。これは、*F. americana* では胚が相当に発達した状態にあるのに対して、ヤチダモでは胚が未発達な状態にある (浅川, 1956) ことによるものと考えられる。

一方、分散分析の結果から、培地への BAP の添加が発芽促進に有効であることは明らかであり、実際、BAP 添加培地において培養開始後 21 日目には、最高で 89.5% の発芽率が得られている。DUNCAN 法による比較では BAP 無添加の場合と添加した場合とでは有意な差が認められたが、添加濃度間には認められなかった。このことから、BAP の発芽促進効果は、試みた濃度間では大きな違いがないといえる。しかし、芽生えの形態的な異常の発生などから見て、BAP 10 mg/l の添加は過剰と考えられた。

*F. pennsylvanica* の貯蔵種子を 10 ppm の BAP 水溶液に 1~4 日間浸漬処理後 30 日間低温湿層処理した場合に、発芽が極端に早まることが知られており (TINUS, 1982)、本研究の結果からも、BAP の添加がトネリコ属樹木の発芽促進に一定の効果を持つと考えられる。

一方、分散分析の結果から、試みた基本培地の組成の違いが発芽率に影響を及ぼしたとは考えられない。また、ショ糖の濃度によって発芽率に有意な差は認められなかったが、培養開始から 14 日目の発芽率に見るように、特定の BAP 濃度とショ糖濃度との組み合わせで高い発芽率を示すなど、両者の交互作用の存在も疑われた。しかし、本研究においては各処理において反復が無いいため交互作用の検出は不可能であり、この点については今後検討する必要がある。

一方、発芽後の芽生えの成長や健全性に関しては、BAP 濃度とともにショ糖濃度の影響が少なからず認められた。ショ糖を添加した培地では無添加培地に比べ子葉長が有意に増大したが、ショ糖の添加量間には差はなかった。さらに、ショ糖無添加培地で発芽した芽生えがやがて枯死してしまったことや BAP との組み合わせによっては、子葉色の変化が認められたことから、ショ糖は発芽後の芽生えの生育に少なからず影響を及ぼしているものと考えられる。今後、無菌発芽種子を組織培養の外植体とする場合にはこの点を考慮する必要がある。

なお、本法によって得られた芽生えの子葉節の培養により、発根した幼植物体を得ることができた。サンプル数が少ないこともあり培養条件等についてさらに検討が必要ではあるが、無菌発芽した芽生えが組織培養の外植体として利用可能なことが示された。

以上、ヤチダモの無菌発芽においても種子の子葉側の一部を切断して培養する方法 (PREECE *et al.*, 1995) が適用できることが明らかになった。今後は、本法による無菌芽生えを用いたヤチダモ

の組織培養研究を進める予定である。

## 要 旨

ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*) の無菌発芽法を開発した。ヤチダモの成熟種子を表面殺菌後、そのまま、あるいは子葉側の端から種子の全長の約 1/3 を切断除去して、MS (MURASHIGE and SKOOG) 培地あるいはその主要塩類を半分の濃度にした 1/2MS 培地を基本培地として、ショ糖 (0, 15, 30 g/l) および BAP (6-benzylaminopurine, 0, 1, 5, 10 mg/l) を添加した固形培地上で培養した。38 日の培養期間中、インタクトな種子では発芽は全く観察されなかった。一方、切断種子では発芽が認められ、BAP を添加した場合には、明らかな発芽促進が認められ、培養開始から 38 日後の発芽率は 75.0% と、無添加培地の 2 倍以上であった。一方、ショ糖の添加および基本培地の違いは発芽率には明確な影響を及ぼさなかったが、発芽した芽生えの子葉の伸長はショ糖の添加により促進された。発芽した芽生えの子葉節を切り取って発芽培地と同じ組成の培地に挿しつけたところ、BAP 5 mg/l 以下の添加あるいは無添加の培地で、発根して植物体が再生する場合が認められた。

キーワード: ヤチダモ (*Fraxinus mandshurica*), 切断種子, 無菌発芽, 組織培養, 発芽促進

## 引 用 文 献

- 浅川澄彦 (1956) ヤチダモのタネの発芽遅延についての研究 (第 1 報) これまでの研究のあらましとトネリコ属植物のタネの比較観察. 林試研報, **83**: 1-18.
- 浅川澄彦 (1963) ヤチダモ種子を中心とした林木種子の発芽生理に関する研究. 林試研報, **159**: 1-88.
- 中国樹木誌編委会 (1978) 水曲柳. (中国主要樹種造林技術. 中国樹木誌編委会主編, 1342 pp, 農業出版社, 北京). 780-784.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 能城修一 (1994) トネリコ. (週間朝日百科 植物の世界 2. 八尋州東編, 320 pp, 朝日新聞社, 東京). 197-201.
- PREECE, J. E., BATES, S. A. and Van SAMBEEK, J. W. (1995) Germination of cut seeds and seedling growth of ash (*Fraxinus* spp.) in vitro. *Can. J. For. Res.*, **25**: 1368-1374.
- Tinus, R. W. (1982) Effects of dewinging, soaking, stratification, and growth regulators on germination of green ash seed. *Can. J. For. Res.*, **12**: 931-935.

(2002 年 6 月 13 日受付)

(2002 年 11 月 4 日受理)

## Summary

An effective method for aseptic germination of *Fraxinus mandshurica* was developed. After surface sterilization, one-third of cotyledonal side of the seed was cut and discarded. Cut seeds were laid on a solid MS (MURASHIGE and SKOOG) medium or 1/2 MS medium wherein the major inorganic elements of MS were reduced by a half, containing sucrose (0, 15, 30 g/l) and BAP (6-benzylaminopurine, 0, 1, 5, 10 mg/l) in combination. Intact seeds were cultured on the same medium also. No intact seed germination was observed during 38 days culture period. Cut seeds were germinated on every media. BAP of any concentrations markedly promoted the germination of cut seeds. Germination percent after 38 days of inoculation on BAP contained medium was 75%, which was twice the percentage on the medium without BAP. Sucrose concentration and basal media did not significantly affect germination. However, the growth of germinated seedlings was promoted by sucrose.



Cotyledonal nodes of germinated seedlings were excised and cultured on the same medium for germination test. Some nodes rooted and regenerated into plantlets on hormone free medium or the medium containing BAP less than 5 mg/l.

**Key words:** *Fraxinus mandshurica*, cut seed, aseptic germination, tissue culture, promoting germination

## A Quantitative Analysis on the Root System Structure of *Pinus massoniana* Plantation

Xuequn CHEN, Yukihiro CHIBA, Masaya MASUMORI,  
Shobu SAKURAI and Hisayoshi YAGI

In four planted *Pinus massoniana* stands with various stand ages in Fujian Province, China, aboveground biomass, root biomass and root system structure were investigated. The results of allometric analysis implied that the pipe model theory of tree form is applicable to the root structure of *P. massoniana* trees.

## A Method for Aseptic Germination of *Fraxinus mandshurica* L.

Zhaobin XING, Hailong SHEN and Yuji IDE

An effective method for *in vitro* germination of *Fraxinus mandshurica* was developed. After surface sterilization, one-third of cotyledonal side of the seed was cut and discarded. Cut seeds were laid on a solid MS medium or 1/2MS medium, containing sucrose and BAP in combination. BAP of any concentrations markedly promoted the germination for cut seeds. Sucrose concentrations and basal media did not significantly affect germination. However, the growth of germinated seedling was promoted by sucrose. Cotyledonal nodes of germinated seedlings were cultured on the same medium for germination test. Some nodes rooted and regenerated into plantlets.